

A New Type of Extended Soft Set Operation: Complementary Extended Lambda Operation

Ashhan SEZGİN^{1*}, Emre AKBULUT², Hüseyin DEMİR³

^{1,3}Department of Mathematics and Science Education, Faculty of Education, Amasya University, Amasya, Türkiye

²Department of Mathematics, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Amasya University, Amasya, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0002-1519-7294>

²<https://orcid.org/0009-0004-2855-0140>

³<https://orcid.org/0000-0002-6944-4609>

*Corresponding author: aslihan.sezgin@amasya.edu.tr

Research Article

Article History

Received: 21.04.2024

Accepted: 25.06.2024

Available online: 17.03.2025

Keywords

Soft sets

Soft set operations

Lambda operation

Algebraic structures

Conditional complements

ABSTRACT

Soft set theory was proposed by Molodtsov in 1999 to model some problems involving uncertainty and it has a wide range of theoretical and practical applications. Soft set operations constitute the vital building block of soft set theory. Since its introduction, several kinds of soft set operations have been proposed. In this study, in order to advance the soft theory, a new soft set operation known as the complementary extended lambda operation is described in this study, and all of its characteristics are thoroughly examined, and to obtain the relationship of the operation with other soft set operations, the distribution of this operation over other type soft set operations are examined.

Yeni Tip Genişletilmiş Esnek Küme İşlemi: Tümleyenli Genişletilmiş Lamda İşlemi

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi:

Geliş tarihi: 21.04.2024

Kabul tarihi: 25.06.2024

Online Yayınlanma: 17.03.2025

Anahtar Kelimeler

Esnek kümeler

Esnek küme işlemleri

Lamda işlemi

Cebirsel yapılar

Koşullu tümleyenler

ÖZ

Esnek küme teorisi, 1999 yılında Molodtsov tarafından belirsizlik içeren bazı problemleri modellemek amacıyla ortaya atılmış olup, geniş bir teorik ve pratik uygulama alanına sahiptir. Esnek küme işlemleri esnek küme teorisinin önemli yapı taşını oluşturur. Başlangıçtan bu yana çeşitli türlerde esnek küme işlemleri tanımlanmıştır. Teoriye katkı sağlamak amacıyla bu çalışmada tümleyenli genişletilmiş lamda işlemi olarak adlandırılan yeni bir esnek küme işlemi tanımlanmış, tüm özellikleri ayrıntılı olarak ele alınmış ve işlemin diğer esnek küme işlemleriyle ilişkisinin elde edilmesi için, bu işlemlerin diğer tip esnek ayarlama işlemlerine göre dağılımı incelenmiştir.

To Cite: Sezgin A, Akbulut E, Demir H., 2025. A new type of extended soft set operation: Complementary extended lambda operation. Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi Dergisi, 5(1): 1-28.

1. Introduction

Probability theory, interval mathematics, statistics, intuitive fuzzy set theory, and fuzzy set theory are some of the most well-known and commonly used mathematical theories for

modeling uncertainty. One of the most prominent theories among these theories is the fuzzy set theory. Since this theory contains some structural difficulties, there has been a need for different theories. A fuzzy set is defined through its membership function. Since it is difficult to create a membership function for each case, the nature of the membership function is highly individualized. Therefore, there has been a need for a set theory independent of the formation of the membership function. The Soft Set Theory proposed by Molodstov (1999) has eliminated the problems arising from the membership function. Molodstov has transferred soft set theory to many areas of mathematics. Operations research, game theory, probability, measurement theory, continuously differentiable functions, Riemann's integration, and Perron's integration are the areas where soft set theory has been successfully used.

Soft set operations constitute the basis of soft set theory, as studies on both soft algebraic structures and soft decision-making methods are based on soft set operations. In this regard, Maji et al. (2003) started the inspiring studies on soft set operations. A more widely accepted definition of soft subset than the one defined by Maji et al. (2003) was proposed by Pei and Miao (2005). When the studies of soft set operations such as Maji et al. (2003), Ali et al. (2009), Ali et al. (2011), Sezgin and Atagün (2011), Sezgin et al. (2019), Stojanovic (2021) are examined, it is seen that soft set operations proceed under two separate headings as restricted and extended operations. Eren and Çalışıcı (2019) proposed a new form of soft set operation for the literature and Sezgin and Çalışıcı (2024) improved the work of Eren and Çalışıcı (2019) and studied the properties of the soft binary piecewise difference operation comparing it with the difference operation in classical sets. Çağman (2021) and Sezgin et al. (2023c) studied new binary set operations, and these operations were transferred to soft sets by Aybek (2024). Besides, some new forms of soft set operations, different from the restricted and extended forms of operations were introduced by various authors (Sarıalioğlu, 2024; Akbulut, 2024; Sezgin and Aybek, 2023; Sezgin and Akbulut, 2023; Sezgin and Dagtoros, 2023; Sezgin and Demirci, 2023; Sezgin and Sarıalioğlu, 2024; Sezgin and Yavuz, 2023a; Sezgin et al., 2023a; Sezgin et al., 2023b; Sezgin and Atagün, 2023; Sezgin and Çağman, 2024), and soft set operations, one of the most fundamental elements of soft set theory, have been studied by researchers since the theory was introduced.

Moreover, different types of soft equalities were defined and some important equivalence relations were obtained with these different types of soft equalities as Jun and Yang, 2011; Liu et al., 2012; Feng and Li, 2013; Abbas et al., 2014; Abbas et al., 2017; Al-shami, 2019; Alshasi and El-Shafe, 2020; Ali et al., 2022. Studying the soft algebraic structures of an algebraic structure and other types of soft sets has been of interest by the researchers as Sezer, 2014;

Muştuoğlu et al., 2015; Ali et al., 2015; Sezer et al., 2015; Mahmood et al., 2015; Sezgin et al., 2017; Atagün and Sezgin, 2018; Sezgin, 2018; Mahmood et al., 2018; İftikhar and Mahmood, 2018; Jana et al., 2019; Mahmood, 2020; Özlü and Sezgin, 2020; Sezgin et al., 2022. Soft set theory and fuzzy set theory in different aspects have both theoretical and application aspects and they have been applied to decision making problems and real-life problems successfully as Özer, 2022; Özlü, 2023a, 2023b, 2024, Özlü et al., 2024.

In the scope of algebra, one of the most important mathematical issues is to analyze the properties of the operation defined on a set to classify algebraic structures. In this study, we define a novel type of soft set operation called complementary extended lambda operation and we discuss its properties to contribute to the theory of soft set literature theoretically. In order to determine the relationship between the complementary extended lambda operation and other soft set operations, the distribution of complementary extended lambda operations over other kinds of soft set operations such as; restricted soft set operations, extended soft set operations and soft binary piecewise operations are examined and many interesting results have been obtained.

2. Preliminaries

Definition 2.1. Let E be the parameter set, U be the universal set, $P(U)$ be the power set of U , and $M \subseteq E$. A pair (F, M) is called a soft set on U . Here, F is a function given by $F: M \rightarrow P(U)$ (Molodtsov, 1999).

$S_E(U)$ denotes the set of all soft sets over U throughout this paper. Let M be a fixed subset of E , then the set of all soft sets over U with M is indicated by $S_M(U)$. In other words, in the collection $S_M(U)$, only soft sets with the parameter set M are included, while in the collection $S_E(U)$, soft sets over U with any parameter set can be included.

Definition 2.2. Let (F, M) be a soft set over U . If $F(v)=\emptyset$ for all $v \in M$, then the soft set (F, M) is called a null soft set with respect to M , indicated by \emptyset_M . If for all $v \in M$, $F(v)=U$, then the soft set (F, M) is called a whole soft set with respect to M , indicated by U_M . The relative whole soft set U_E with respect to E is called the absolute soft set over U (Ali et al. 2009). A soft set with an empty parameter set is indicated by \emptyset_\emptyset , called by empty soft set, and \emptyset_\emptyset is the only soft set with an empty parameter set (Ali et al., 2011)

Definition 2.3. For two soft sets (F, M) and (G, Y) , we say that (F, M) is a soft subset of (G, Y) and it is indicated by $(F, M) \subseteq (G, Y)$, if $M \subseteq Y$ and $F(v) \subseteq G(v)$, for all $v \in M$. Two

soft sets (F, M) and (G, Y) are said to be softequal if (F, M) is a soft subset of (G, Y) and (G, Y) is a soft subset of (F, M) (Pei and Miao, 2005).

Definition 2.4. The relative complement of a soft set (F, M) , indicated by $(F, M)^r$, is defined by $(F, M)^r = (F^r, M)$, where $F^r: M \rightarrow P(U)$ is a mapping given by $(F, M)^r = U \setminus F(v)$ for all $v \in M$ (Ali et al. 2009). From now on, $U \setminus F(v) = [F(v)]'$ will be designated by $F'(v)$ for the sake of designation.

Çağman (2021) defined two new complements as inclusive and exclusive complements. $+$ and θ denote inclusive and exclusive complements, respectively, and M and N are two sets, these binary operations, $M+N=M' \cup N$, $M\theta N=M' \cap N'$. Sezgin et al. (2023c) analyzed the relations between these two operations and also defined three new binary operations and examined their relations with each other. Let M and N be two sets, then $M^*N=M' \cup N'$, $M\gamma N=M' \cap N$, $M \lambda N=M \cup N'$

Let \odot denote $\cap, \cup, -, \Delta, \lambda, \gamma, \theta, +, *$. Then, all the types of soft set operations may be given with the following generalised definitions:

Definition 2.5. Let $(F, M), (G, Y) \in S_E(U)$. The restricted \odot operation of (F, M) and (G, Y) is the soft set (H, Z) , denoted to be $(F, M) \odot_R (G, Y) = (H, Z)$, where $Z=M \cap Y \neq \emptyset$ and for all $v \in Z$, $H(v) = F(v) \odot G(v)$. Here, if $Z=M \cap Y = \emptyset$, then $(F, M) \odot_R (G, Y) = \emptyset_\emptyset$ (Ali et al., 2009; Ali et al, 2011; Sezgin and Atagün, 2011; Aybek, 2024).

Definition 2.6. Let $(F, M), (G, Y) \in S_E(U)$. The extended \odot operation (F, M) and (G, Y) is the soft set (H, Z) , indicated by $(F, M) \odot_\varepsilon (G, Y) = (H, Z)$, where $Z = M \cup Y$ and for all $v \in Z$,

$$H(v) = \begin{cases} F(v), & v \in M - Y \\ G(v), & v \in Y - M \\ F(v) \odot G(v), & v \in M \cap Y \end{cases}$$

(Maji et al., 2003; Ali et al., 2009; Sezgin et al., 2019; Stojanovic, 2021; Aybek, 2024).

Definition 2.7. Let $(F, M), (G, Y) \in S_E(U)$. The complementary extended \odot operation (F, M) and (G, Y) is the soft set (H, Z) , indicated by $(F, M) \overset{*}{\odot}_\varepsilon (G, Y) = (H, Z)$, where $Z = M \cup Y$ and for all $v \in Z$,

$$H(v) = \begin{cases} F'(v), & v \in M - Y \\ G'(v), & v \in Y - M \\ F(v) \odot G(v), & v \in M \cap Y \end{cases}$$

(Sarıalioğlu, 2024; Akbulut, 2024; Demirci, 2024).

Definition 2.8. Let $(F, M), (G, Y) \in S_E(U)$. The soft binary piecewise \odot of (F, M) and (G, Y) is the soft set (H, V) , indicated by $(F, M) \underset{\odot}{\sim} (G, Y) = (H, M)$, where for all $v \in M$

$$H(v) = \begin{cases} F(v), & v \in M - Y \\ F(v) \odot G(v), & v \in M \cap Y \end{cases}$$

(Eren, 2019; Sezgin and Yavuz, 2023b; Yavuz, 2024; Sezgin and Çalışıcı, 2024,).

Definition 2.9. Let $(F, M), (G, Y) \in S_E(U)$. The complementary soft binary piecewise \odot^* of (F, M) and (G, Y) is the soft set (H, M) , indicated by $(F, M) \underset{\odot^*}{\sim} (G, Y) = (H, M)$, where for all

$v \in M$

$$H(v) = \begin{cases} F'(v), & v \in M - Y \\ F(v) \odot^* G(v), & v \in M \cap Y \end{cases}$$

(Sezgin and Demirci, 2023; Sezgin and Sarialioğlu, 2024; Sezgin and Atagün, 2023; Sezgin and Aybek, 2023; Sezgin and Dagtoros, 2023; Sezgin et al. 2023a, 2023b; Sezgin and Yavuz, 2023a; Sezgin and Çağman, 2024).

For the possible future graph applications and network analysis as regards soft sets, we refer to Pant et al. (2024) which is motivated by the divisibility of determinants.

3. Complementary Extended Lambda Operation

In this section, complementary extended lambda operation is introduced, and its full algebraic properties are analyzed in detail.

Definition 3.1. Let (F, T) and (G, Z) be two soft sets over U . The complementary extended lambda operation of (F, T) and (G, Z) is the soft set (H, C) , indicated by $(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (G, Z) = (H, C)$, where for all $\omega \in C = T \cup Z$;

$$H(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus Z \\ G'(\omega) & \omega \in Z \setminus T \\ F(\omega) \cup G'(\omega) & \omega \in T \cap Z \end{cases}$$

Example 3.2. Let $E = \{e_1, e_2, e_3, e_4\}$ be the parameter set and $Z = \{e_1, e_3\}$ and $B = \{e_2, e_3, e_4\}$ be two subsets of E and $U = \{h_1, h_2, h_3, h_4, h_5\}$ be the universal set.

Assume that $(F, Z) = \{(e_1, \{h_2, h_5\}), (e_3, \{h_1, h_2, h_5\})\}$, $(G, B) = \{(e_2, \{h_1, h_4, h_5\}), (e_3, \{h_2, h_3, h_4\}), (e_4, \{h_3, h_5\})\}$ be soft sets over U . Let $(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (G, Z) = (H, T \cup Z)$, where for all $\omega \in T \cup Z$;

$$H(\mathfrak{y}) = \begin{cases} F'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in T \setminus Z \\ G'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in Z \setminus T \\ F(\mathfrak{y}) \cup G'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in T \cap Z \end{cases}$$

Here, since $T \cup Z = \{e_1, e_2, e_3, e_4\}$, $T \setminus Z = \{e_1\}$, $Z \setminus T = \{e_2, e_4\}$, $T \cap Z = \{e_3\}$, $H(e_1) = F'(e_1) = \{h_1, h_3, h_4\}$, $H(e_2) = G'(e_2) = \{h_2, h_3\}$, $H(e_4) = G'(e_4) = \{h_1, h_2, h_4\}$ and $H(e_3) = F(e_3) \cup G'(e_3) = \{h_1, h_2, h_5\}$.

Thus, $(F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G, Z) = \{(e_1, \{h_1, h_3, h_4\}), (e_2, \{h_2, h_3\}), (e_3, \{h_1, h_2, h_5\}), (e_4, \{h_1, h_2, h_4\})\}$.

Proposition 3.3. $\overset{*}{\lambda_\varepsilon}$ is closed in $S_E(U)$.

Proof: $\overset{*}{\lambda_\varepsilon} : S_E(U) \times S_E(U) \rightarrow S_E(U)$

$$((F, T), (G, Z)) \rightarrow (F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G, Z) = (H, T \cup Z)$$

Similarly,

$$\overset{*}{\lambda_\varepsilon} : S_T(U) \times S_T(U) \rightarrow S_T(U)$$

$$((F, T), (G, T)) \rightarrow (F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G, T) = (K, T \cup T) = (K, T)$$

That is, when T is a fixed subset of the set E and (F, T) and (G, T) are elements of $S_T(U)$, then so is $(F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G, T)$. Namely, S_T is closed under $\overset{*}{\lambda_\varepsilon}$ as well.

Proposition 3.4. $[(F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G, Z)] \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (H, M) \neq (F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} [(G, Z) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (H, M)]$.

Proof: Firstly, let's consider the left hand side (LHS). Suppose $(F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G, Z) = (S, T \cup Z)$, where for all $\mathfrak{y} \in T \cup Z$;

$$S(\mathfrak{y}) = \begin{cases} F'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in T \setminus Z \\ G'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in Z \setminus T \\ F(\mathfrak{y}) \cup G'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in T \cap Z \end{cases}$$

Let $(S, T \cup Z) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (H, M) = (R, (T \cup Z) \cup M)$, where for all $\mathfrak{y} \in (T \cup Z) \cup M$,

$$R(\mathfrak{y}) = \begin{cases} S'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in (T \cup Z) \setminus M \\ H'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in M \setminus (T \cup M) \\ S(\mathfrak{y}) \cup H'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in (T \cup Z) \cap M \end{cases}$$

Hence,

$$R(\varpi) = \begin{cases} F(\varpi) & \varpi \in (T \setminus Z) \setminus M = T \cap Z' \cap M' \\ G(\varpi) & \varpi \in (Z \setminus T) \setminus M = T' \cap Z \cap M' \\ F'(\varpi) \cap G(\varpi) & \varpi \in (T \cap Z) \setminus M = T \cap Z \cap M' \\ H'(\varpi) & \varpi \in M \setminus (T \cup Z) = T' \cap Z' \cap M \\ F'(\varpi) \cup H'(\varpi) & \varpi \in (T \setminus Z) \cap M = T \cap Z' \cap M \\ G'(\varpi) \cup H'(\varpi) & \varpi \in (Z \setminus T) \cap M = T' \cap Z \cap M \\ [F'(\varpi) \cap G(\varpi)] \cup H'(\varpi) & \varpi \in (T \cap Z) \cap M = T \cap Z \cap M \end{cases}$$

$(G, Z) \stackrel{*}{\lambda_\varepsilon} (H, M) = (L, Z \cup M)$, where for all $\varpi \in Z \cup M$;

$$L(\varpi) = \begin{cases} G'(\varpi) & \varpi \in Z \setminus M \\ H'(\varpi) & \varpi \in M \setminus Z \\ G(\varpi) \cup H'(\varpi) & \varpi \in Z \cap M \end{cases}$$

$(F, T) \stackrel{*}{\lambda_\varepsilon} (L, Z \cup M) = (N, (T \cup (Z \cup M)))$, where for all $\varpi \in T \cup Z \cup M$;

$$N(\varpi) = \begin{cases} F'(\varpi) & \varpi \in T \setminus (Z \cup M) \\ R'(\varpi) & \varpi \in (Z \cup M) \setminus T \\ F(\varpi) \cup R'(\varpi) & \varpi \in T \cap (Z \cup M) \end{cases}$$

Hence,

$$N(\varpi) = \begin{cases} F'(\varpi) & \varpi \in T \setminus (Z \cup M) = T \cap Z' \cap M' \\ G(\varpi) & \varpi \in (Z \setminus M) \setminus T = T' \cap Z \cap M' \\ H(\varpi) & \varpi \in (M \setminus Z) \setminus T = T' \cap Z' \cap M \\ G'(\varpi) \cap H(\varpi) & \varpi \in (Z \cap M) \setminus T = T' \cap Z \cap M \\ F(\varpi) \cup G(\varpi) & \varpi \in T \cap (Z \setminus M) = T \cap Z \cap M' \\ F(\varpi) \cup H(\varpi) & \varpi \in T \cap (M \setminus Z) = T \cap Z' \cap M \\ F(\varpi) \cup [G'(\varpi) \cap H(\varpi)] & \varpi \in T \cap (Z \cap M) = T \cap Z \cap M \end{cases}$$

Thus, $(R, (T \cup Z) \cup M) \neq (N, T \cup (Z \cup M))$. That is, in the set $S_E(U)$, $\stackrel{*}{\lambda_\varepsilon}$ is not associative.

Moreover, we have the following:

Proposition 3.5. $[(F, T) \stackrel{*}{\lambda_\varepsilon} (G, T)] \stackrel{*}{\lambda_\varepsilon} (H, T) \neq (F, T) \stackrel{*}{\lambda_\varepsilon} [(G, T) \stackrel{*}{\lambda_\varepsilon} (H, T)]$.

Proof: Since $[F'(\varpi) \cap G(\varpi)] \cup H'(\varpi) \neq F(\varpi) \cup [G'(\varpi) \cap H(\varpi)]$, in the set $S_T(U)$, $\stackrel{*}{\lambda_\varepsilon}$ is not associative

Proposition 3.6. $(F, T) \stackrel{*}{\lambda_\varepsilon} (G, Z) \neq (G, Z) \stackrel{*}{\lambda_\varepsilon} (F, T)$.

Proof: Firstly, the parameter sets of the soft set on both sides of the equation is $T \cup Z$, and thus the first condition of the soft equality is satisfied. Now let's consider the LHS. Let $(F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G, Z) = (H, T \cup Z)$, where for all $\varpi \in T \cup Z$,

$$H(\varpi) = \begin{cases} F'(\varpi) & \varpi \in T \setminus Z \\ G'(\varpi) & \varpi \in Z \setminus T \\ F(\varpi) \cup G'(\varpi) & \varpi \in T \cap Z \end{cases}$$

Now consider the RHS. Let $(G, Z) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F, T) = (S, Z \cup T)$, where for all $\varpi \in Z \cup T$,

$$S(\varpi) = \begin{cases} G'(\varpi) & \varpi \in Z \setminus T \\ F'(\varpi) & \varpi \in T \setminus Z \\ G(\varpi) \cup F'(\varpi) & \varpi \in Z \cap T \end{cases}$$

Hence, $(F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G, Z) \neq (G, Z) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F, T)$. But, if $Z \cap T = \emptyset$, then $(F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G, Z) = (G, Z) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F, T)$, Moreover, $(F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G, T) \neq (G, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F, T)$, Hence, in $S_E(U)$ and $S_T(U)$, $\overset{*}{\lambda_\varepsilon}$ is not commutative.

Proposition 3.7. $(F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F, T) = U_T$

Proof: Let $(F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F, T) = (H, T)$. Hence, for all $\varpi \in T$, $H(\varpi) = F(\varpi) \cup F'(\varpi) = U$, thus $(H, T) = U_T$. That is, $\overset{*}{\lambda_\varepsilon}$ is not idempotent in $S_E(U)$.

Proposition 3.8. $(F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} \emptyset_T = U_T$

Proof: Let $\emptyset_T = (S, T)$. Thus, for all $\varpi \in T$, $S(\varpi) = \emptyset$. Let $(F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (S, T) = (H, T)$, where for all $\varpi \in T$; $H(\varpi) = F(\varpi) \cup S'(\varpi) = F(\varpi) \cup U = U$. Thus, $(H, T) = U_T$.

Proposition 3.9. $\emptyset_T \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F, T) = (F, T)^r$

Proof: Let $\emptyset_T = (S, T)$. Hence, for all $\varpi \in T$, $S(\varpi) = \emptyset$. Let $(S, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F, T) = (H, T)$, where for all $\varpi \in T$; $H(\varpi) = S(\varpi) \cup F'(\varpi) = \emptyset \cup F'(\varpi) = F'(\varpi)$. Thus, $(H, T) = (F, T)^r$.

Proposition 3.10. $(F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} \emptyset_\emptyset = \emptyset_\emptyset \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F, T) = (F, T)^r$

Proof: Let $\emptyset_\emptyset = (S, \emptyset)$ and $(F, T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (S, \emptyset) = (H, T \cup \emptyset)$, where for all $\varpi \in T \cup \emptyset = T$,

$$H(\varpi) = \begin{cases} F'(\varpi) & \varpi \in T \setminus \emptyset = T \\ S'(\varpi) & \varpi \in \emptyset \setminus T = \emptyset \\ F(\varpi) \cup S'(\varpi) & \varpi \in T \cap \emptyset = \emptyset \end{cases}$$

Thus, for all $\mathfrak{y} \in T$, $H(\mathfrak{y})=F'(\mathfrak{y})$, and so $(H,T)=(F,T)^r$. Similarly, let $(S,\emptyset) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F,T)=(K, \emptyset \cup T)$, where for all $\mathfrak{y} \in \emptyset \cup T=T$;

$$K(\mathfrak{y}) = \begin{cases} S'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in \emptyset \setminus T = \emptyset \\ F'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in T \setminus \emptyset = T \\ S(\mathfrak{y}) \cup F'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in \emptyset \cap T = \emptyset \end{cases}$$

Thus, for all $\mathfrak{y} \in T$, $K(\mathfrak{y})=F'(\mathfrak{y})$, $(K,T)=(F,T)^r$

Proposition 3.11. $(F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} \emptyset_E = U_E$

Proof: Let $\emptyset_E=(T,E)$. Thus, for all $\mathfrak{y} \in E$, $T(\mathfrak{y})=\emptyset$. Let $(F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (T,E)=(H,T \cup E)$, where for all $\mathfrak{y} \in T \cup E=E$;

$$H(\mathfrak{y}) = \begin{cases} F'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in T \setminus E = \emptyset \\ T'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in E \setminus T = T' \\ F(\mathfrak{y}) \cup T'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in T \cap E = T \end{cases}$$

Thus,

$$H(\mathfrak{y}) = \begin{cases} F'(\mathfrak{y}) & \mathfrak{y} \in T \setminus E = \emptyset \\ U & \mathfrak{y} \in E \setminus T = T' \\ U & \mathfrak{y} \in T \cap E = T \end{cases}$$

For all $\mathfrak{y} \in E$; $H(\mathfrak{y})=U$, so $(H,E)= U_E$.

Proposition 3.12. $(F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} U_T=(F,T)$

Proof: Let $U_T=(K,T)$. Thus, for all $\mathfrak{y} \in T$, $K(\mathfrak{y})=U$. Let $(F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (K,T)=(H,T)$. Hence, for all $\mathfrak{y} \in T$; $H(\mathfrak{y})= F(\mathfrak{y}) \cup T'(\mathfrak{y})=F(\mathfrak{y}) \cup \emptyset=F(\mathfrak{y})$. Thus, $(H,T)=(F,T)$.

That is, in $S_T(U)$, the right identity element of $\overset{*}{\lambda_\varepsilon}$ is the soft set U_T .

Proposition 3.13. $U_T \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F,T)= U_T$

Proof: Let $U_T=(K,T)$. Thus, for all $\mathfrak{y} \in T$; $K(\mathfrak{y})=U$. Let $(K,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F,T)=(H,T)$, where for all $\mathfrak{y} \in T$; $H(\mathfrak{y})=T(\mathfrak{y}) \cup F'(\mathfrak{y})=U \cup F'(\mathfrak{y})=U_T$. Thus, $(H,T)= U_T$. That is, the left absorbing element of $\overset{*}{\lambda_\varepsilon}$ in $S_T(U)$ is the soft set U_T .

Proposition 3.14. $(F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F,T)^r=(F,T)$.

Proof: Let $(F,T)^r=(H,T)$. Thus, for all $\omega \in T$; $H(\omega)=F'(\omega)$. Let $(F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (H,T)=(L,T)$, where for all $\omega \in T$; $L(\omega)=F(\omega) \cup H'(\omega)=F(\omega) \cup F(\omega)=F(\omega)$. Thus, $(L,T)=(F,T)$.

That is, in $S_E(U)$, the complement of every element is its own right identity for $\overset{*}{\lambda_\varepsilon}$.

Proposition 3.15. $(F,T)^r \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F,T)=(F,T)^r$.

Proof: Let $(F,T)^r=(H,T)$. Thus, for all $\omega \in T$, $H(\omega)=F'(\omega)$. Let $(H,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F,T)=(L,T)$, where for all $\omega \in T$, $T(\omega)=H(\omega) \cup F'(\omega)=F'(\omega) \cup F'(\omega)=F'(\omega)$. Thus $(L,T)=(F,T)^r$.

That is, in $S_E(U)$, the complement of every element is its own left absorbing element for $\overset{*}{\lambda_\varepsilon}$.

Proposition 3.16. $[(F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G,Z)]^r=(F,T) \gamma_\varepsilon (G,Z)$.

Proof: Let $(F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G,Z)=(H,T \cup Z)$, where for all $\omega \in T \cup Z$;

$$H(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus Z \\ G'(\omega) & \omega \in Z \setminus T \\ F(\omega) \cup G'(\omega) & \omega \in T \cap Z \end{cases}$$

Let $(H,T \cup Z)^r=(K,T \cup Z)$, where for all $\omega \in T \cup Z$;

$$K(\omega) = \begin{cases} F(\omega) & \omega \in T \setminus Z \\ G(\omega) & \omega \in Z \setminus T \\ F'(\omega) \cap G(\omega) & \omega \in T \cap Z \end{cases}$$

Thus, $(K,T \cup Z)=(F,T) +_\varepsilon (G,Z)$.

Proposition 3.17. $(F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G,T)=\emptyset_T \Leftrightarrow (F,T) = \emptyset_T$ and $(G,T) = U_T$.

Proof: Let $(F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G,T) = (K,T)$, where for all $\omega \in T$; $K(\omega)=F(\omega) \cup G'(\omega)$. Since $(K,T)=\emptyset_T$, for all $\omega \in T$, $K(\omega)=\emptyset$. Thus, for all $\omega \in T$; $K(\omega)=F(\omega) \cup G'(\omega)=\emptyset \Leftrightarrow$ for all $\omega \in T$, $F(\omega)=\emptyset$ and $G'(\omega)=\emptyset \Leftrightarrow$ for all $\omega \in T$, $F(\omega)=\emptyset$ and $G(\omega)=U \Leftrightarrow (F,T) = \emptyset_T$ and $(G,T)=U_T$

Proposition 3.18. $\emptyset_T \cong (F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G,Z)$, $\emptyset_Z \cong (F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G,Z)$, $\emptyset_Z \cong (G,Z) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F,T)$, $\emptyset_T \cong (G,Z) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F,T)$. Besides, $(F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G,Z) \cong U_{T \cup Z}$ and $(G,Z) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (F,T) \cong U_{Z \cup T}$.

Proposition 3.19. $(F,T) \cong (F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G,T)$ and $(G,T)^r \cong (F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G,T)$

Proof: Let $(F,T) \overset{*}{\lambda_\varepsilon} (G,T)=(H,Z)$, where for all $\omega \in T$; $H(\omega)=F(\omega) \cup G'(\omega)$. Thus, for all $\omega \in T$, $H(\omega)=$

$F(\omega) \subseteq F(\omega) \cup G'(\omega)$ ve $H(\omega) = G'(\omega) \subseteq F(\omega) \cup G'(\omega)$. Thus, $(F,T) \overset{*}{\underset{\lambda_\varepsilon}{\cong}} (G,T)$ and $(G,T) \overset{*}{\underset{\lambda_\varepsilon}{\cong}} (F,T)$

Proposition 3.20. If $(F,T) \overset{*}{\underset{\lambda_\varepsilon}{\cong}} (G,T)$, then $(H,Z) \overset{*}{\underset{\lambda_\varepsilon}{\cong}} (F,T)$

Proof: Let $(F,T) \overset{*}{\underset{\lambda_\varepsilon}{\cong}} (G,T)$, where for all $\omega \in T$, $F(\omega) \subseteq G(\omega)$ and $G'(\omega) \subseteq F'(\omega)$. Let $(H,Z) \overset{*}{\underset{\lambda_\varepsilon}{\cong}} (G,T) = (Y,Z \cup T)$, where for all $\omega \in Z \cup T$;

$$Y(\omega) = \begin{cases} H'(\omega) & \omega \in Z \setminus T \\ G'(\omega) & \omega \in T \setminus Z \\ H(\omega) \cup G'(\omega) & \omega \in Z \cap T \end{cases}$$

Let $(H,Z) \overset{*}{\underset{\lambda_\varepsilon}{\cong}} (F,T) = (W,Z \cup T)$, where for all $\omega \in Z \cup T$;

$$W(\omega) = \begin{cases} H'(\omega) & \omega \in Z \setminus T \\ F'(\omega) & \omega \in T \setminus Z \\ H(\omega) \cup F'(\omega) & \omega \in Z \cap T \end{cases}$$

If $\omega \in Z \setminus T$; $Y(\omega) = H'(\omega)$, then $W(\omega) = H'(\omega)$, and so $Y(\omega) = H'(\omega) \subseteq H'(\omega) = W(\omega)$; if $\omega \in T \setminus Z$, $Y(\omega) = G'(\omega)$, then $W(\omega) = F'(\omega)$ and so $Y(\omega) = G'(\omega) \subseteq F'(\omega) = W(\omega)$; if $\omega \in T \cap Z$, $Y(\omega) = H(\omega) \cup G'(\omega)$ and so $W(\omega) = H(\omega) \cup F'(\omega)$, $Y(\omega) = H(\omega) \cup G'(\omega) \subseteq H(\omega) \cup F'(\omega) = W(\omega)$. Thus, for all $\omega \in Z \cup T$; $Y(\omega) \subseteq W(\omega)$. Hence, $(H,T) \overset{*}{\underset{\lambda_\varepsilon}{\cong}} (F,T)$.

Proposition 3.21. If $(H,Z) \overset{*}{\underset{\lambda_\varepsilon}{\cong}} (G,T) \overset{*}{\underset{\lambda_\varepsilon}{\cong}} (F,T)$, then $(F,T) \overset{*}{\underset{\lambda_\varepsilon}{\cong}} (G,T)$ needs not be true. That is the converse of Proposition 3.20 is not true in general.

Proof: Let $E = \{e_1, e_2, e_3, e_4, e_5, e_6\}$ be the parameter set, $T = \{e_1, e_3\}$, $Z = \{e_1, e_3, e_5\}$ be the subsets of E , $U = \{h_1, h_2, h_3, h_4, h_5\}$ be the universal set, and (F,T) , (G,T) ve (H,Z) be soft sets over U such that $(F,T) = \{(e_1, \{h_2, h_5\}), (e_3, \emptyset)\}$, $(G,T) = \{(e_1, \emptyset), (e_3, \emptyset)\}$, $(H,Z) = \{(e_1, U), (e_3, U), (e_5, \emptyset)\}$.

Let $(H,Z) \overset{*}{\underset{\lambda_\varepsilon}{\cong}} (G,T) = (L, Z \cup T)$, where for all $\omega \in Z \cup T = \{e_1, e_3, e_5\}$, $L(e_1) = H(e_1) \cup G'(e_1) = U$, $L(e_3) = H(e_3) \cup G'(e_3) = U$, $L(e_5) = H'(e_5) = U$.

Thus, $(H,Z) \overset{*}{\underset{\lambda_\varepsilon}{\cong}} (G,T) = \{(e_1, U), (e_3, U), (e_5, U)\}$. Let $(H,Z) \overset{*}{\underset{\lambda_\varepsilon}{\cong}} (F,T) = (W, Z \cup T)$, where for all $\omega \in Z \cup T = \{e_1, e_3, e_5\}$, $W(e_1) = H(e_1) \cup F'(e_1) = U$, $W(e_3) = H(e_3) \cup F'(e_3) = U$,

$W(e_5)=H'(e_5)=U$. Thus, $(H,Z)_{\lambda_\varepsilon}^*(F,T) = \{(e_1,U), (e_3,U), (e_5,U)\}$. Thus, $(H,Z)_{\lambda_\varepsilon}^*(G,T) \not\subseteq (H,Z)_{\lambda_\varepsilon}^*(F,T)$, but (F,T) is not a soft subset of (G,T) .

Proposition 3.22. If $(F,T) \subseteq (G,T)$ and $(K,T) \subseteq (L,T)$, then $(F,T)_{\lambda_\varepsilon}^*(L,T) \subseteq (G,T)_{\lambda_\varepsilon}^*(K,T)$ and $(K,T)_{\lambda_\varepsilon}^*(G,T) \subseteq (L,T)_{\lambda_\varepsilon}^*(F,T)$.

Proof: Let $(F,T) \subseteq (G,T)$ and $(K,T) \subseteq (L,T)$. Thus, for all $\omega \in T$; $F(\omega) \subseteq G(\omega)$ and $K(\omega) \subseteq L(\omega)$. Thus, $G'(\omega) \subseteq F'(\omega)$ and $L'(\omega) \subseteq K'(\omega)$. Hence for all $\omega \in T$; $F(\omega) \cup L'(\omega) \subseteq G(\omega) \cup K'(\omega)$ and $K(\omega) \cup G'(\omega) \subseteq L(\omega) \cup F'(\omega)$.

4. Distributions of complementary extended lambda operations over other type of soft set operations

Theorem 4.1. Let $(F,T), (G,Z), (H,M)$ be soft sets over U . The complementary extended lambda operation has the following distributions over restricted soft set operations

i) LHS Distributions

$$1) \text{ If } T \cap (Z \cap M) = \emptyset, \text{ then } (F,T)_{\lambda_\varepsilon}^*[(G,Z) \cup_R (H,M)] = [(F,T)_{\lambda_\varepsilon}^*(G,Z)] \cap_R [(F,T)_{\lambda_\varepsilon}^*(H,M)]$$

Proof: Consider the LHS. Let $(G,Z) \cup_R (H,M) = (M, Z \cap M)$, where for all $\omega \in Z \cap M$; $M(\omega) = G(\omega) \cup H(\omega)$. Let $(F,T)_{\lambda_\varepsilon}^*(M, Z \cap M) = (N, T \cup (Z \cap M))$, where for all $\omega \in T \cup (Z \cap M)$;

$$N(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus (Z \cap M) \\ M'(\omega) & \omega \in (Z \cap M) \setminus T \\ F(\omega) \cup M'(\omega) & \omega \in T \cap (Z \cap M) \end{cases}$$

Hence,

$$N(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus (Z \cap M) \\ G'(\omega) \cap H'(\omega) & \omega \in (Z \cap M) \cap T \\ F(\omega) \cup [G'(\omega) \cap H'(\omega)] & \omega \in T \cap (Z \cap M) \end{cases}$$

Now consider the RHS. Let $(F,T)_{\lambda_\varepsilon}^*(G,Z) = (M, T \cup Z)$, where for all $\omega \in T \cup Z$;

$$M(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus Z \\ G'(\omega) & \omega \in Z \setminus T \\ F(\omega) \cup G'(\omega) & \omega \in T \cap Z \end{cases}$$

Let $(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (H, M) = (K, T \cup M)$, where for all $\omega \in T \cup M$;

$$K(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus M \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus T \\ F(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in T \cap M \end{cases}$$

Let $(M, T \cup Z) \cap_R (K, T \cup M) = (W, (T \cup Z) \cap (T \cup M))$, where for all $\omega \in (T \cup Z) \cap (T \cup M)$;

$W(\omega) = T(\omega) \cap K(\omega)$. Thus,

$$W(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) \cap F'(\omega) & \omega \in (T \setminus Z) \cap (T \setminus M) = T \cap Z' \cap M' \\ F'(\omega) \cap H'(\omega) & \omega \in (T \setminus Z) \cap (M \setminus T) = \emptyset \\ F'(\omega) \cap [F(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in (T \setminus Z) \cap (T \cap M) = T \cap Z' \cap M \\ G'(\omega) \cap F'(\omega) & \omega \in (Z \setminus T) \cap (T \setminus M) = \emptyset \\ G'(\omega) \cap H'(\omega) & \omega \in (Z \setminus T) \cap (M \setminus T) = T' \cap Z \cap M \\ G'(\omega) \cap [F(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in (Z \setminus T) \cap (T \cap M) = \emptyset \\ [F(\omega) \cup G'(\omega)] \cap F'(\omega) & \omega \in (T \cap Z) \cap (T \setminus M) = T \cap Z \cap M' \\ [F(\omega) \cup G'(\omega)] \cap H'(\omega) & \omega \in (T \cap Z) \cap (M \setminus T) = \emptyset \\ [F(\omega) \cup G'(\omega)] \cap [F(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in (T \cap Z) \cap (T \cap M) = T \cap Z \cap M \end{cases}$$

Hence,

$$W(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \cap Z' \cap M' \\ F'(\omega) \cap H'(\omega) & \omega \in T \cap Z' \cap M \\ G'(\omega) \cap H'(\omega) & \omega \in T' \cap Z \cap M \\ G'(\omega) \cap F'(\omega) & \omega \in T \cap Z \cap M' \\ [F(\omega) \cup G'(\omega)] \cap [F(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in T \cap Z \cap M \end{cases}$$

Here, when considering the $T \setminus (Z \cap M)$ in the function N , since $T \setminus (Z \cap M) = T \setminus (Z \cap M)'$, if an element is in the complement of $(Z \cap M)$, it is either in $Z \setminus M$, in $M \setminus Z$, or in $(Z \cup M)'$. Thus, if $\omega \in T \setminus (Z \cap M)$, then $\omega \in T \cap Z \cap M'$ or $\omega \in T \cap Z' \cap M$ or $\omega \in T \cap Z' \cap M'$. Thus, $N = T$ under the conditions $T \cap Z' \cap M = T \cap Z \cap M' = \emptyset$. It is obvious that the condition $T \cap Z' \cap M = T \cap Z \cap M' = \emptyset$ is equivalent to the condition $T \cap (Z \Delta M) = \emptyset$.

$$2) \text{ If } T \cap (Z \Delta M) = \emptyset, \text{ then } (F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} [(G, Z) \cap_R (H, M)] = [(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (G, Z)] \cup_R [(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (H, M)]$$

ii) RHS Distributions

$$1) \text{ If } T \cap Z \cap M = \emptyset, \text{ then } [(F, T) \cup_R (G, Z)] \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (H, M) = [(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (H, M)] \cap_R [(G, Z) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (H, M)].$$

Proof: Consider the LHS. Let $(F,T) \cup_R (G,Z) = (R, T \cap Z)$, where for all $\omega \in T \cap Z$;

$R(\omega) = F(\omega) \cup G(\omega)$. Let $(R, T \cap Z) \stackrel{*}{\lambda_\varepsilon} (H, M) = (L, (T \cap Z) \cup M)$, where for all $\omega \in (T \cap Z) \cup M$;

$$L(\omega) = \begin{cases} R'(\omega) & \omega \in (T \cap Z) \setminus M \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus (T \cap Z) \\ R(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in (T \cap Z) \cap M \end{cases}$$

Hence,

$$L(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) \cap G'(\omega) & \omega \in (T \cap Z) \setminus M \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus (T \cap Z) \\ [F(\omega) \cup G(\omega)] \cup H'(\omega) & \omega \in (T \cap Z) \cap M \end{cases}$$

Now consider the RHS, i.e., $[(F, T) \stackrel{*}{\lambda_\varepsilon} (H, M)] \cap_R [(G, Z) \stackrel{*}{\lambda_\varepsilon} (H, M)]$ Let

$(F, T) \stackrel{*}{\lambda_\varepsilon} (H, M) = (S, T \cup M)$, where for all $\omega \in T \cup M$;

$$S(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus M \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus T \\ F(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in T \cap M \end{cases}$$

Let $(G, Z) \stackrel{*}{\lambda_\varepsilon} (H, M) = (K, Z \cup M)$, where for all $\omega \in Z \cup M$;

$$K(\omega) = \begin{cases} G'(\omega) & \omega \in Z \setminus M \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus Z \\ G(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in Z \cap M \end{cases}$$

Let $(S, T \cup Z) \cap_R (K, Z \cup M) = (W, (T \cup Z) \cap (Z \cup M))$, where for all $\omega \in (T \cup Z) \cap (Z \cup M)$;

$W(\omega) = S(\omega) \cap K(\omega)$. Hence,

$$W(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) \cap G'(\omega) & \omega \in (T \setminus M) \cap (Z \setminus M) = T \cap Z \cap M' \\ F'(\omega) \cap H'(\omega) & \omega \in (T \setminus M) \cap (M \setminus Z) = \emptyset \\ F'(\omega) \cap [G(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in (T \setminus M) \cap (Z \cap M) = \emptyset \\ H'(\omega) \cap G'(\omega) & \omega \in (M \setminus T) \cap (Z \setminus M) = \emptyset \\ H'(\omega) \cap H'(\omega) & \omega \in (M \setminus T) \cap (M \setminus Z) = T' \cap Z' \cap M \\ H'(\omega) \cap [G(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in (M \setminus T) \cap (Z \cap M) = T' \cap Z \cap M \\ [F(\omega) \cup H'(\omega)] \cap G'(\omega) & \omega \in (T \cap M) \cap (Z \setminus M) = \emptyset \\ [F(\omega) \cup H'(\omega)] \cap H'(\omega) & \omega \in (T \cap M) \cap (M \setminus Z) = T \cap Z' \cap M \\ [F(\omega) \cup H'(\omega)] \cap [G(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in (T \cap M) \cap (Z \cap M) = T \cap Z \cap M \end{cases}$$

Thus,

$$W(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) \cap G'(\omega) & \omega \in T \cap Z \cap M' \\ H'(\omega) & \omega \in T' \cap Z' \cap M \\ H'(\omega) & \omega \in T' \cap Z \cap M \\ H'(\omega) & \omega \in T \cap Z' \cap M \\ [F(\omega) \cap G(\omega)] \cup H'(\omega) & \omega \in T \cap Z \cap M \end{cases}$$

Here, when considering the $M(T \cap Z)$ in the function L , since $M(T \cap Z) = M \cap (T \cap Z)'$, if an element is in the complement of $(T \cap Z)$, it is either in $T \setminus Z$, $Z \setminus B$ or in $(T \cup Z)'$. Thus, if $\omega \in M \setminus (T \cap Z)$, then $\omega \in M \cap T \cap Z'$ or $\omega \in M \cap Z \cap T'$ or $\omega \in M \cap T' \cap Z'$. Hence, $L=W$ is satisfied if $T \cap Z \cap M = \emptyset$

2) If $T \cap Z \cap M' = T \cap Z \cap M = \emptyset$, then

$$[(F, T) \cap_R (G, Z)] \lambda_{\varepsilon}^* (H, M) = [(F, T) \lambda_{\varepsilon}^* (H, M)] \cap_R [(G, Z) \lambda_{\varepsilon}^* (H, M)].$$

Theorem 4.2. Let $(F, T), (G, Z), (H, M)$ be soft sets over U . Then, the following distributions of the complementary extended lambda operation over extended soft set operations hold:

i) LHS Distributions

1) If $T \cap (Z \Delta M) = \emptyset$, then

$$(F, T) \lambda_{\varepsilon}^* [(G, Z) \cap_{\varepsilon} (H, M)] = [(F, T) \lambda_{\varepsilon}^* (G, Z)] \cup_{\varepsilon} [(F, T) \lambda_{\varepsilon}^* (H, M)].$$

Proof: Consider the LHS. Let $(G, Z) \cap_{\varepsilon} (H, M) = (R, Z \cup M)$, where for all $\omega \in Z \cup M$;

$$R(\omega) = \begin{cases} G(\omega) & \omega \in Z \setminus M \\ H(\omega) & \omega \in M \setminus Z \\ G(\omega) \cap H(\omega) & \omega \in Z \cap M \end{cases}$$

Let $(F, T) \lambda_{\varepsilon}^* (R, Z \cup M) = (N, (T \cup (Z \cup M)))$, where for all $\omega \in T \cup (Z \cup M)$;

$$N(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus (Z \cup M) \\ R'(\omega) & \omega \in (Z \cup M) \setminus T \\ F(\omega) \cup R'(\omega) & \omega \in T \cap (Z \cup M) \end{cases}$$

Thus,

$$N(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus (Z \cup M) = T \cap Z' \cap M' \\ G'(\omega) & \omega \in (Z \setminus M) \setminus T = T' \cap Z \cap M' \\ H'(\omega) & \omega \in (M \setminus Z) \setminus T = T' \cap Z' \cap M \\ G'(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in (Z \cap M) \setminus T = T' \cap Z \cap M \\ F(\omega) \cup G'(\omega) & \omega \in T \cap (Z \setminus M) = T \cap Z \cap M' \\ F(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in T \cap (M \setminus Z) = T \cap Z' \cap M \\ F(\omega) \cup [G'(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in T \cap (Z \cap M) = T \cap Z \cap M \end{cases}$$

Now consider the RHS, i.e., $[(F, T) \lambda_{\varepsilon}^*(G, Z)] \cup_{\varepsilon} [(F, T) \lambda_{\varepsilon}^*(H, M)]$. Let

$$(F, T) \lambda_{\varepsilon}^*(G, Z) = (K, T \cup Z). \text{ Hence,}$$

for all $\omega \in T \cup Z$;

$$K(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus Z \\ G'(\omega) & \omega \in Z \setminus T \\ F(\omega) \cup G'(\omega) & \omega \in T \cap Z \end{cases}$$

Let $(F, T) \lambda_{\varepsilon}^*(H, M) = (S, T \cup M)$, where for all $\omega \in T \cup M$;

$$S(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus M \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus T \\ F(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in T \cap M \end{cases}$$

Let $(K, T \cup Z) \cup_{\varepsilon} (S, T \cup M) = (L, (T \cup Z) \cup (T \cup M))$, where for all $\omega \in (T \cup Z) \cup (T \cup M)$;

$$L(\omega) = \begin{cases} K(\omega) & \omega \in (T \cup Z) \setminus (T \cup M) \\ S(\omega) & \omega \in (T \cup M) \setminus (T \cup Z) \\ K(\omega) \cup S(\omega) & \omega \in (T \cup Z) \cap (T \cup M) \end{cases}$$

Thus,

$L(\omega) =$	$F'(\omega)$	$\omega \in (T \setminus Z) \setminus (T \cup M) = \emptyset$
	$G'(\omega)$	$\omega \in (Z \setminus T) \setminus (T \cup M) = T' \cap Z \cap M'$
	$F(\omega) \cup G'(\omega)$	$\omega \in (T \cap Z) \setminus (T \cup M) = \emptyset$
	$F'(\omega)$	$\omega \in (T \setminus M) \setminus (T \cup Z) = \emptyset$
	$H'(\omega)$	$\omega \in (M \setminus T) \setminus (T \cup Z) = T' \cap Z' \cap M$
	$F(\omega) \cup H'(\omega)$	$\omega \in (T \cap M) \setminus (T \cup Z) = \emptyset$
	$F'(\omega) \cup F'(\omega)$	$\omega \in (T \setminus Z) \cap (T \setminus M) = T \cap Z' \cap M'$
	$F'(\omega) \cup H'(\omega)$	$\omega \in (T \setminus Z) \cap (M \setminus T) = \emptyset$
	$F'(\omega) \cup [F(\omega) \cup H'(\omega)]$	$\omega \in (T \setminus Z) \cap (T \cap M) = T \cap Z' \cap M$
	$G'(\omega) \cup F'(\omega)$	$\omega \in (Z \setminus T) \cap (T \setminus M) = \emptyset$
	$G'(\omega) \cup H'(\omega)$	$\omega \in (Z \setminus T) \cap (M \setminus T) = T' \cap Z \cap M$
	$G'(\omega) \cup [F(\omega) \cup H'(\omega)]$	$\omega \in (Z \setminus T) \cap (T \cap M) = \emptyset$
	$[F(\omega) \cup G'(\omega)] \cup F'(\omega)$	$\omega \in (T \cap Z) \cap (T \setminus M) = T \cap Z \cap M'$
	$[F(\omega) \cup G'(\omega)] \cup H'(\omega)$	$\omega \in (T \cap Z) \cap (M \setminus T) = \emptyset$
	$[F(\omega) \cup G'(\omega)] \cup [F(\omega) \cup H'(\omega)]$	$\omega \in (T \cap Z) \cap (T \cap M) = T \cap Z \cap M$

Therefore,

$L(\omega) =$	$G'(\omega)$	$\omega \in T' \cap Z \cap M'$
	$H'(\omega)$	$\omega \in T' \cap Z' \cap M$
	$F'(\omega)$	$\omega \in T \cap Z' \cap M'$
	U	$\omega \in T \cap Z' \cap M$
	$G'(\omega) \cup H'(\omega)$	$\omega \in T' \cap Z \cap M$
	U	$\omega \in T \cap Z \cap M'$
	$[F(\omega) \cup G'(\omega)] \cup [F(\omega) \cup H'(\omega)]$	$\omega \in T \cap Z \cap M$

$N=L$ under the condition $T \cap Z \cap M' = T \cap Z' \cap M = \emptyset$. It is obvious that the condition $T \cap Z' \cap M = T \cap Z \cap M' = \emptyset$ is equivalent to the condition $T \cap (Z \Delta M) = \emptyset$

2) If $T \cap (Z \Delta M)$, then $(F, T) \overset{*}{\lambda_\epsilon} [(G, Z) \cup_\epsilon (H, M)] = [(F, T) \overset{*}{\lambda_\epsilon} (G, Z)] \cap_\epsilon [(F, T) \overset{*}{\lambda_\epsilon} (H, M)]$.

ii) RHS Distributions

1) If $T \cap Z \cap M = \emptyset$, then $[(F, T) \cap_\epsilon (G, Z)] \overset{*}{\lambda_\epsilon} (H, M) = [(F, T) \overset{*}{\lambda_\epsilon} (H, M)] \cup_\epsilon [(G, Z) \overset{*}{\lambda_\epsilon} (H, M)]$.

Proof: Consider the LHS. Let $(F,T) \cap_{\varepsilon}(G,Z)=(R,T \cup Z)$, where for all $\omega \in T \cup Z$;

$$R(\omega) = \begin{cases} F(\omega) & \omega \in T \setminus Z \\ G(\omega) & \omega \in Z \setminus T \\ F(\omega) \cap G(\omega) & \omega \in T \cap Z \end{cases}$$

Let $(R,T \cup Z) \overset{*}{\lambda_{\varepsilon}}(H,M)=(N,(T \cup Z) \cup M)$, where for all $\omega \in (T \cup Z) \cup M$;

$$N(\omega) = \begin{cases} R'(\omega) & \omega \in (T \cup Z) \setminus M \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus (T \cup Z) \\ R(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in (T \cup Z) \cap M \end{cases}$$

Thus,

$$N(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in (T \setminus Z) \setminus M = T \cap Z' \cap M' \\ G'(\omega) & \omega \in (Z \setminus T) \setminus M = T' \cap Z \cap M' \\ F'(\omega) \cup G'(\omega) & \omega \in (T \cap Z) \setminus M = T \cap Z \cap M' \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus (T \cup Z) = T' \cap Z' \cap M \\ F(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in (T \setminus Z) \cap M = T \cap Z' \cap M \\ G(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in (Z \setminus T) \cap M = T' \cap Z \cap M \\ [F(\omega) \cap G(\omega)] \cup H'(\omega) & \omega \in (T \cap Z) \cap M = T \cap Z \cap M \end{cases}$$

Consider the RHS, i.e., $[(F,T) \overset{*}{\lambda_{\varepsilon}}(H,M)] \cup_{\varepsilon} [(G,Z) \overset{*}{\lambda_{\varepsilon}}(H,M)]$. Let

$(F,T) \overset{*}{\lambda_{\varepsilon}}(H,M)=(K,T \cup M)$, where for all $\omega \in T \cup M$;

$$K(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus M \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus T \\ F(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in T \cap M \end{cases}$$

Let $(G,Z) \overset{*}{\lambda_{\varepsilon}}(H,M)=(S,Z \cup M)$, where for all $\omega \in Z \cup M$;

$$S(\omega) = \begin{cases} G'(\omega) & \omega \in Z \setminus M \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus Z \\ G(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in Z \cap M \end{cases}$$

Let $(K,T \cup M) \cup_{\varepsilon}(S,Z \cup M)=(L,(T \cup M) \cup (Z \cup M))$, where for all $\omega \in (T \cup M) \cup (Z \cup M)$;

$$L(\omega) = \begin{cases} K(\omega) & \omega \in (T \cup M) \setminus (Z \cup M) \\ S(\omega) & \omega \in (Z \cup M) \setminus (T \cup M) \\ K(\omega) \cup S(\omega) & \omega \in (T \cup M) \cap (Z \cup M) \end{cases}$$

Thus,

$L(\omega) =$	$F'(\omega)$	$\omega \in (T \setminus M) \setminus (Z \cup M) = T \cap Z' \cap M'$
	$H'(\omega)$	$\omega \in (M \setminus T) \setminus (Z \cup M) = \emptyset$
	$F(\omega) \cup H'(\omega)$	$\omega \in (T \cap M) \setminus (Z \cup M) = \emptyset$
	$G'(\omega)$	$\omega \in (Z \setminus M) \setminus (T \cup M) = T' \cap Z \cap M'$
	$H(\omega)$	$\omega \in (M \setminus Z) \setminus (T \cup M) = \emptyset$
	$G(\omega) \cup H'(\omega)$	$\omega \in (Z \cap M) \setminus (T \cup M) = \emptyset$
	$F'(\omega) \cup G'(\omega)$	$\omega \in (T \setminus M) \cap (Z \setminus M) = T \cap Z \cap M'$
	$F'(\omega) \cup H'(\omega)$	$\omega \in (T \setminus M) \cap (M \setminus Z) = \emptyset$
	$F'(\omega) \cup [G(\omega) \cup H'(\omega)]$	$\omega \in (T \setminus M) \cap (Z \cap M) = \emptyset$
	$H'(\omega) \cup G'(\omega)$	$\omega \in (M \setminus T) \cap (Z \setminus M) = \emptyset$
	$H'(\omega) \cup H(\omega)$	$\omega \in (M \setminus T) \cap (M \setminus Z) = T' \cap Z' \cap M$
	$H'(\omega) \cup [G(\omega) \cup H'(\omega)]$	$\omega \in (M \setminus T) \cap (Z \cap M) = T' \cap Z \cap M$
	$[F(\omega) \cup H'(\omega)] \cup G'(\omega)$	$\omega \in (T \cap M) \cap (Z \setminus M) = \emptyset$
	$[F(\omega) \cup H'(\omega)] \cup H(\omega)$	$\omega \in (T \cap M) \cap (M \setminus Z) = T \cap Z' \cap M$
	$[F(\omega) \cup H'(\omega)] \cup [G(\omega) \cup H'(\omega)]$	$\omega \in (T \cap M) \cap (Z \cap M) = T \cap Z \cap M$

Hence,

$L(\omega) =$	$F'(\omega)$	$\omega \in T \cap Z' \cap M'$
	$G'(\omega)$	$\omega \in T' \cap Z \cap M'$
	$F'(\omega) \cup G'(\omega)$	$\omega \in T \cap Z \cap M'$
	$H'(\omega)$	$\omega \in T' \cap Z' \cap M$
	$G(\omega) \cup H'(\omega)$	$\omega \in T' \cap Z \cap M$
	$F(\omega) \cup H'(\omega)$	$\omega \in T \cap Z' \cap M$
	$[F(\omega) \cup H'(\omega)] \cup [G(\omega) \cup H'(\omega)]$	$\omega \in T \cap Z \cap M$

It is observed that $N=L$ under the condition $T \cap Z \cap M' = \emptyset$.

2) If $T \cap Z \cap M' = \emptyset$, then $[(F, T) \cup_{\varepsilon} (G, Z)] \lambda_{\varepsilon}^*(H, M) = [(F, T) \lambda_{\varepsilon}^*(H, M)] \cup_{\varepsilon} [(G, Z) \lambda_{\varepsilon}^*(H, M)]$.

Theorem 4.3. Let $(F, T), (G, Z), (H, M)$ be soft sets over U . The following distributions of the complementary extended lambda operation over soft binary piecewise operations hold:

i) LHS Distributions

1) If $T \cap (Z \Delta M) = \emptyset$, then $(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} [(G, Z) \underset{\sim}{\cap} (H, M)] = [(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (G, Z)] \underset{\sim}{\cup} [(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (H, M)]$.

Proof: Consider the LHS. Let $(G, Z) \underset{\sim}{\cap} (H, M) = (R, Z)$, where for all $\omega \in Z$;

$$R(\omega) = \begin{cases} G(\omega) & \omega \in Z \setminus M \\ G(\omega) \cap H(\omega) & \omega \in Z \cap M \end{cases}$$

Let $(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (R, Z) = (N, T \cup Z)$, where for all $\omega \in T \cup Z$;

$$N(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus Z \\ R'(\omega) & \omega \in Z \setminus T \\ F(\omega) \cup R'(\omega) & \omega \in T \cap Z \end{cases}$$

Hence,

$$N(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus Z \\ G'(\omega) & \omega \in (Z \setminus M) \setminus T = T' \cap Z \cap M' \\ G'(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in (Z \cap M) \setminus T = T' \cap Z \cap M \\ F(\omega) \cup G'(\omega) & \omega \in T \cap (Z \setminus M) = T \cap Z \cap M' \\ F(\omega) \cup [G'(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in T \cap (Z \cap M) = T \cap Z \cap M \end{cases}$$

Consider the RHS, i.e., $[(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (G, Z)] \underset{\sim}{\cup} [(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (H, M)]$. Let $(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (G, Z) = (K, T \cup Z)$, where for all $\omega \in T \cup Z$;

$$K(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus Z \\ G'(\omega) & \omega \in Z \setminus T \\ F(\omega) \cup G'(\omega) & \omega \in T \cap Z \end{cases}$$

Let $(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (H, M) = (S, T \cup M)$, where for all $\omega \in T \cup M$;

$$S(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus M \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus T \\ F(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in T \cap M \end{cases}$$

Let $(K, T \cup Z) \underset{\sim}{\cup} (S, T \cup M) = (L, (T \cup Z) \cup (T \cup M))$, where for all $\omega \in (T \cup Z) \cup (T \cup M)$;

$$L(\omega) = \begin{cases} K(\omega) & \omega \in (T \cup Z) \setminus (T \cup M) \\ K(\omega) \cup S(\omega) & \omega \in (T \cup Z) \cap (T \cup M) \end{cases}$$

Thus,

$$\begin{array}{l}
 L(\omega) = \left[\begin{array}{ll}
 F'(\omega) & \omega \in (T \setminus Z) \setminus (T \cup M) = \emptyset \\
 G'(\omega) & \omega \in (Z \setminus T) \setminus (T \cup M) = T' \cap Z \cap M' \\
 F(\omega) \cup G'(\omega) & \omega \in (T \cap Z) \setminus (T \cup M) = \emptyset \\
 F'(\omega) \cup F'(\omega) & \omega \in (T \setminus Z) \cap (T \setminus M) = T \cap Z' \cap M' \\
 F'(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in (T \setminus Z) \cap (M \setminus T) = \emptyset \\
 F'(\omega) \cup [F(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in (T \setminus Z) \cap (T \cap M) = T \cap Z' \cap M \\
 G'(\omega) \cup F'(\omega) & \omega \in (Z \setminus T) \cap (T \setminus M) = \emptyset \\
 G'(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in (Z \setminus T) \cap (M \setminus T) = T' \cap Z \cap M \\
 G'(\omega) \cup [F(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in (Z \setminus T) \cap (T \cap M) = \emptyset \\
 [F(\omega) \cup G'(\omega)] \cup F'(\omega) & \omega \in (T \cap Z) \cap (T \setminus M) = T \cap Z \cap M' \\
 [F(\omega) \cup G'(\omega)] \cup H'(\omega) & \omega \in (T \cap Z) \cap (M \setminus T) = \emptyset \\
 [F(\omega) \cup G'(\omega)] \cup [F(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in (T \cap Z) \cap (T \cap M) = T \cap Z \cap M
 \end{array} \right.
 \end{array}$$

Hence,

$$\begin{array}{l}
 L(\omega) = \left[\begin{array}{ll}
 G'(\omega) & \omega \in T' \cap Z \cap M' \\
 F'(\omega) & \omega \in T \cap Z' \cap M' \\
 U & \omega \in T \cap Z' \cap M \\
 G'(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in T' \cap Z \cap M \\
 U & \omega \in T \cap Z \cap M' \\
 [F(\omega) \cup G'(\omega)] \cup [F(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in T \cap Z \cap M
 \end{array} \right.
 \end{array}$$

Here, if we consider $T \setminus Z$ in the function N , since $T \setminus Z = T \cap Z'$, if an element is in the complement of Z , then the element is either in $M \setminus Z$ or in $(M \cup Z)'$. Thus, if $\omega \in T \setminus Z$, then $\omega \in T \cap M \cap Z'$ vey $\omega \in T \cap M' \cap Z'$. Therefore, $N=L$ under the $T \cap Z' \cap M = T \cap Z \cap M' = \emptyset$. It is obvious that the condition $T \cap Z' \cap M = T \cap Z \cap M' = \emptyset$ is equivalent to the condition $T \cap (Z \Delta M) = \emptyset$.

$$2) \text{ If } T \cap (Z \Delta M) = \emptyset, \text{ then } (F, T) \underset{\lambda_\epsilon}{\overset{*}{\sim}} [(G, Z) \underset{\sim}{\cup} (H, M)] = [(F, T) \underset{\lambda_\epsilon}{\overset{*}{\sim}} (G, Z)] \underset{\sim}{\cap} [(F, T) \underset{\lambda_\epsilon}{\overset{*}{\sim}} (H, M)].$$

ii) RHS Distributions

$$1) \text{ If } T \cap (Z \Delta M) = \emptyset, \text{ then } [(F, T) \underset{\sim}{\cup} (G, Z)] \underset{\lambda_\epsilon}{\overset{*}{\sim}} (H, M) = [(F, T) \underset{\lambda_\epsilon}{\overset{*}{\sim}} (H, M)] \underset{\sim}{\cup} [(G, Z) \underset{\lambda_\epsilon}{\overset{*}{\sim}} (H, M)]$$

Proof: Consider the LHS. Let $(F,T) \overset{\sim}{\cup} (G,Z) = (R,T)$, where for all $\omega \in T$;

$$R(\omega) = \begin{cases} F(\omega) & \omega \in T \setminus Z \\ F(\omega) \cup G(\omega) & \omega \in T \cap Z \end{cases}$$

Let $(R,T) \overset{*}{\lambda}_\varepsilon (H,M) = (N,T \cup M)$, where for all $\omega \in T \cup M$;

$$N(\omega) = \begin{cases} R'(\omega) & \omega \in T \setminus M \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus T \\ R(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in T \cap M \end{cases}$$

Thus,

$$N(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in (T \setminus Z) \setminus M = T \cap Z' \cap M' \\ F'(\omega) \cap G'(\omega) & \omega \in (T \cap Z) \setminus M = T \cap Z \cap M' \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus T \\ F(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in (T \setminus Z) \cap M = T \cap Z' \cap M \\ [F(\omega) \cup G(\omega)] \cup H'(\omega) & \omega \in (T \cap Z) \cap M = T \cap Z \cap M \end{cases}$$

Now consider the RHS, i.e., $[(F,T) \overset{*}{\lambda}_\varepsilon (H,M)] \overset{\sim}{\cup} [(G,Z) \overset{*}{\lambda}_\varepsilon (H,M)]$. Let

$(F,T) \overset{*}{\lambda}_\varepsilon (H,M) = (K,T \cup M)$, where for all $\omega \in T \cup M$

$$K(\omega) = \begin{cases} F'(\omega) & \omega \in T \setminus M \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus T \\ F(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in T \cap M \end{cases}$$

Let $(G,Z) \overset{*}{\lambda}_\varepsilon (H,M) = (S,Z \cup M)$, where for all $\omega \in Z \cup M$;

$$S(\omega) = \begin{cases} G'(\omega) & \omega \in Z \setminus M \\ H'(\omega) & \omega \in M \setminus Z \\ G(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in Z \cap M \end{cases}$$

Let $(K,T \cup M) \overset{\sim}{\cup} (S,Z \cup M) = (L,(T \cup M) \cup (Z \cup M))$, where for all $\omega \in (T \cup M) \cup (Z \cup M)$;

$$L(\omega) = \begin{cases} K(\omega) & \omega \in (T \cup M) \setminus (Z \cup M) \\ K(\omega) \cup S(\omega) & \omega \in (T \cup M) \cap (Z \cup M) \end{cases}$$

Thus,

$$\begin{array}{l}
 L(\omega) = \left\{ \begin{array}{ll}
 F'(\omega) & \omega \in (T \setminus M) \setminus (Z \cup M) = T \cap Z' \cap M' \\
 H'(\omega) & \omega \in (M \setminus T) \setminus (Z \cup M) = \emptyset \\
 F(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in (T \cap M) \setminus (Z \cup M) = \emptyset \\
 F'(\omega) \cup G'(\omega) & \omega \in (T \setminus M) \cap (Z \setminus M) = T \cap Z \cap M' \\
 F'(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in (T \setminus M) \cap (M \setminus Z) = \emptyset \\
 F'(\omega) \cup [G(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in (T \setminus M) \cap (Z \cap M) = \emptyset \\
 H'(\omega) \cup G'(\omega) & \omega \in (M \setminus T) \cap (Z \setminus M) = \emptyset \\
 H'(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in (M \setminus T) \cap (M \setminus Z) = T' \cap Z' \cap M \\
 H'(\omega) \cup [G(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in (M \setminus T) \cap (Z \cap M) = T' \cap Z \cap M \\
 [F(\omega) \cup H'(\omega)] \cup G'(\omega) & \omega \in (T \cap M) \cap (Z \setminus M) = \emptyset \\
 [F(\omega) \cup H'(\omega)] \cup H'(\omega) & \omega \in (T \cap M) \cap (M \setminus Z) = T \cap Z' \cap M \\
 [F(\omega) \cup H'(\omega)] \cup [G(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in (T \cap M) \cap (Z \cap M) = T \cap Z \cap M
 \end{array} \right.
 \end{array}$$

Hence,

$$\begin{array}{l}
 L(\omega) = \left\{ \begin{array}{ll}
 F'(\omega) & \omega \in T \cap Z' \cap M' \\
 F'(\omega) \cup G'(\omega) & \omega \in T \cap Z \cap M' \\
 H'(\omega) & \omega \in T' \cap Z' \cap M \\
 G(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in T' \cap Z \cap M \\
 F(\omega) \cup H'(\omega) & \omega \in T \cap Z' \cap M \\
 [F(\omega) \cup H'(\omega)] \cup [G(\omega) \cup H'(\omega)] & \omega \in T \cap Z \cap M
 \end{array} \right.
 \end{array}$$

Here, if we consider $M \setminus T$ in the function N , since $M \setminus T = M \cap T'$, then if an element is in the complement of T , it is either in $Z \setminus T$ or in $(Z \cup T)'$. From here, $N=L$ under $T' \cap Z \cap M = T \cap Z \cap M' = \emptyset$. It is obvious that the condition $T' \cap Z \cap M = T \cap Z \cap M' = \emptyset$ is equivalent to the condition $(T \Delta M) \cap Z = \emptyset$.

$$2) \text{ If } T \cap (Z \Delta M) = \emptyset, \text{ then } [(F, T) \underset{\cap}{\sim} (G, Z)] \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (H, M) = [(F, T) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (H, M)] \underset{\cap}{\sim} [(G, Z) \underset{\lambda_\varepsilon}{*} (H, M)]$$

5. Conclusion

Soft set operations are the most fundamental building block of soft set theory for the progress of soft set theory in both theoretical and practical fields. Since the theory was introduced in 1999, many restricted and extended operations have been introduced. This work proposes and investigates the algebraic properties of a novel soft set operation, called

complementary extended lambda operation. We deal with the distributions of complementary extended lambda operations over other types of soft set operations. Since the concepts linked to soft set operations are just as important for soft sets as basic operations from classical set theory and thus examining the algebraic structures of soft sets in connection to new soft set operations offers us a thorough knowledge of their application as well as new examples of algebraic structures, we believe that this work contributes to the literature of both classical algebra and soft set theory. To determine what algebraic structures are produced in the classes of soft sets with a fixed parameter set or over the universe, future studies may look at different types of complementary extended soft set operations along with their distributions and properties. Moreover, this novel operation can be conveyed to bipolar soft sets, lattice ordered soft sets and double framed soft sets and the researchers may explore which algebraic structures are formed with this operation when combined with other operations, and new decision-making methods may be proposed with the inspiration of the operation.

Acknowledgement

This paper is derived from the second author's Master Thesis, supervised by the first author, at Amasya University, Amasya, Türkiye.

Author's Contribution

The contributions of the authors are equal.

Conflict of Interest

The authors have declared that there is no conflict of interest.

References

Abbas M, Ali B, Romaguera S., 2014. On generalized soft equality and soft lattice structure. *Filomat*, 28(6): 1191-1203.

Abbas M, Ali MI, Romaguera S., 2017. Generalized operations in soft set theory via relaxed conditions on parameters. *Filomat*, 31(19): 5955–5964.

Akbulut E., 2024. New type of extended operations of soft set: complementary extended lambda and difference operations. Amasya University the Graduate School of Natural and Applied Sciences Master of Science in Mathematics Department, page no 80, Amasya.

Ali B, Saleem N, Sundus N, Khaleeq S, Saeed M, George RA., 2022. Contribution to the theory of soft sets via generalized relaxed operations. *Mathematics*, 10: 26-36.

Ali MI, Feng F, Liu X, Min WK, Shabir M., 2009. On some new operations in soft set theory. *Computers and Mathematics with Applications*, 57(9): 1547-1553.

Ali MI, Shabir M, Naz M., 2011. Algebraic structures of soft sets associated with new operations. *Computers and Mathematics with Applications*, 61(9): 2647-2654.

Ali MI, Mahmood T, Rahman MM, Aslam MF., 2015. On lattice ordered soft sets. *Applied Soft Computing*, 36: 499-505.

Alshasi T, El-Shafei T., 2020. T-soft equality relation. *Turkish Journal of Mathematics*, 44(4): Article 25.

Al-shami TM., 2019. Investigation and corrigendum to some results related to g-soft equality and gf -soft equality relations. *Filomat*, 33: 3375–3383.

Aybek F., 2024. New restricted and extended soft set operations. Amasya University the Graduate School of Natural and Applied Sciences Master of Science in Mathematics Department, page no 199, Amasya.

Çağman N., 2021. Conditional complements of sets and their application to group theory. *Journal of New Results in Science*, 10(3): 67-74.

Demirci AM., 2024. New type of extended operations of soft set: Complementary extended union, plus and theta operations. Amasya University the Graduate School of Natural and Applied Sciences Master of Science in Mathematics Department, page no 204, Amasya.

Eren ÖF, Çalışıcı H., 2019. On some operations of soft sets. *The Fourth International Conference on Computational Mathematics and Engineering Sciences*, Antalya.

Feng F, Li Y., 2013. Soft subsets and soft product operations. *Information Sciences*, 232: 44-57.

Iftikhar M, Mahmood T., 2018. Some results on lattice ordered double framed soft semirings. *International Journal of Algebra and Statistics*, 7: 123-140.

Jana C, Pal M, Karaaslan F, Sezgin A., 2019. (α, β) -soft intersectional rings and ideals with their applications. *New Mathematics and Natural Computation*, 15 (2): 333-350.

Jun YB, Yang X., 2011. A note on the paper combination of interval-valued fuzzy set and soft set. *Computers and Mathematics with Applications*, 61(5): 1468-1470.

Liu X, Feng F, Jun YB., 2012. A note on generalized soft equal relations. *Computers and Mathematics with Applications*, 64(4): 572-578.

Mahmood T, Waqas A, Rana MA., 2015. Soft intersectional ideals in ternary semiring. *Science International*, 27(5): 3929-3934.

Mahmood T, Rehman ZU, Sezgin A., 2018. Lattice ordered soft near rings. *Korean Journal of Mathematics*, 26 (3): 503-517.

Mahmood T., 2020. A novel approach toward bipolar soft sets and their applications. *Journal of Mathematics*, 2020: Article ID 4690808.

Maji PK, Bismas R, Roy AR., 2003. Soft set theory. *Computers and Mathematics with Applications*, 45(1): 555-562.

Molodtsov D., 1999. Soft set theory-first results. *Computers and Mathematics with Applications*, 37(1): 19-31.

Muştuoğlu E, Sezgin A, Türk ZK., 2016. Some characterizations on soft uni-groups and normal soft uni-groups. *International Journal of Computer Applications*, 155(10): 1-8.

Özer Ö., 2022. Hamacher prioritized aggregation operators based on complex picture fuzzy sets and their applications in decision-making problems. *Journal of Innovative Research in Mathematical and Computational Sciences*, 1(1): 33-54.

Özlu Ş, Sezgin A., 2020. Soft covered ideals in semigroups. *Acta Universitatis Sapientiae Mathematica*, 12(2): 317-346.

Özlu Ş., 2022. Interval valued q- rung orthopair hesitant fuzzy choquet aggregating operators in multi criteria decision making problems. *Gazi University Journal of Science Part C: Design and Technology*, 10(4): 1006-1025.

Özlu Ş., 2023a, Q-rung orthopair probabilistic hesitant fuzzy hybrid aggregating operators in multi criteria decision making problems. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27(3): 366-373.

Özlu Ş., 2023b. Generalized Dice measures of single valued neutrosophic type-2 hesitant fuzzy sets and their application to multi-criteria decision-making problems.” *International Journal of Machine Learning and Cybernetics*, 14: 33–62.

Özlu Ş., 2024. New q-rung orthopair fuzzy Aczel–Alsina weighted geometric operators under group-based generalized parameters in multi-criteria decision-making problems. *Computational and Applied Mathematics*, 43: 122.

Özlu Ş, Al-Quran A, Riaz M., 2024. Bipolar valued probabilistic hesitant fuzzy sets based on Generalized Hybrid Operators in multi-criteria decision-making problems based on TOPSIS. *Journal of Intelligent & Fuzzy Systems*, 4: 10553-10572.

Pant Ş, Dagtoros K, Kholil MI, Vivas A., 2024. Matrices: Peculiar determinant property. *Optimum Science Journal*, 1: 1-7.

Pei D, Miao D., 2005. From soft sets to information systems. in: *proceedings of granular computing. IEEE*, 2: 617-621.

Sarılioğlu M., 2024. New type of extended operations of soft set: complementary extended gamma, intersection and star operations. Amasya University the Graduate School of Natural and Applied Sciences Master of Science in Mathematics Department, page no 206, Amasya.

Sezer AS., 2014. Certain characterizations of LA-semigroups by soft sets. *Journal of Intelligent and Fuzzy Systems*, 27(2): 1035-1046.

Sezer AS, Çağman N, Atagün AO., 2015. Uni-soft substructures of groups. *Annals of Fuzzy Mathematics and Informatics*, 9(2): 235-246.

Sezgin A., 2018. A new view on AG-groupoid theory via soft sets for uncertainty modeling. *Filomat*, 32(8): 2995–3030.

Sezgin A, Ahmad S, Mehmood A., 2019. A new operation on soft sets: Extended difference of soft sets. *Journal of New Theory*, 27: 33-42.

Sezgin A, Atagün AO., 2011. On operations of soft sets. *Computers and Mathematics with Applications*, 61(5): 1457-1467.

Sezgin A, Atagün AO., 2023. New soft set operation: Complementary soft binary piecewise plus operation. *Matrix Science Mathematic*, 7(2): 125-142.

Sezgin A, Atagün AO, Çağman N, Demir H., 2022. On near-rings with soft union ideals and applications. *New Mathematics and Natural Computation*, 18(2): 495-511.

Sezgin A, Aybek FN., 2023. New soft set operation: Complementary soft binary piecewise gamma operation. *Matrix Science Mathematic*, 7(1): 27-45.

Sezgin A, Aybek FN, Atagün AO., 2023a. New soft set operation: Complementary soft binary piecewise intersection operation. *Black Sea Journal of Engineering and Science*, 6(4): 330-346.

Sezgin A, Aybek FN, Güngör NB., 2023b. New soft set operation: Complementary soft binary piecewise union operation. *Acta Informatica Malaysia*, 7(1): 38-53.

Sezgin A, Çağman N, Atagün AO, Aybek FN., 2023c. Complemental binary operations of sets and their application to group theory, *Matrix Science Mathematic*, 7(2): 114-121.

Sezgin A, Çağman N., 2024. New soft set operation: Complementary soft binary piecewise difference operation. *Osmaniye Korkut Ata University Journal of the Institute of Science and Technology*, 7(1): 58-94.

Sezgin A, Çalışıcı H., 2024. A comprehensive study on soft binary piecewise difference operation. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi B - Teorik Bilimler*, 12(1): 32-54.

Sezgin A, Dagtoros K., 2023. Complementary soft binary piecewise symmetric difference operation: a novel soft set operation. *Scientific Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 6(2): 31-45.

Sezgin A, Demirci AM., 2023. New soft set operation: Complementary soft binary piecewise star operation. *Ikonion Journal of Mathematics*, 5(2): 24-52.

Sezgin A, Sarıalioğlu M., 2024. New soft set operation: Complementary soft binary piecewise theta operation. *Journal of Kadirli Faculty of Applied Sciences*, 4(2): 325-357.

Sezgin A, Shahzad A, Mehmood A., 2019. New operation on soft sets: Extended difference of soft sets. *Journal of New Theory*, 27: 33-42.

Sezgin A, Yavuz E., 2023a. A new soft set operation: soft binary piecewise symmetric difference operation. *Necmettin Erbakan University Journal of Science and Engineering*, 5(2): 189-208.

Sezgin A, Yavuz E., 2023b. New soft set operation: Complementary soft binary piecewise lambda operation. *Sinop University Journal of Natural Sciences*, 8(2):101-133.

Stojanovic NS., 2021. A new operation on soft sets: extended symmetric difference of soft sets. *Military Technical Courier*, 69(4): 779-791.

Yavuz E., 2024. Soft binary piecewise operations and their properties, Amasya University the Graduate School of Natural and Applied Sciences Master of Science in Mathematics Department, page no 238, Amasya.

A Comparative Study on the Phenolic Extraction of Total Hydro-Alcoholic Extract of *Satureja Hortensis L.* for Bioactive Properties

Buket AŞKIN^{1*}, Tuğba BAYBURTLUOĞLU², Sercan ÖZBEK YAZICI³

^{1,2} Kırklareli University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Kırklareli

³ Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, Burdur

¹<https://orcid.org/0000-0001-6327-0946>

²<https://orcid.org/0009-0000-5693-3406>

³<https://orcid.org/0000-0003-3406-4291>

*Corresponding author: buketaskin@klu.edu.tr

Research Article

Article History:

Received: 07.04.2024

Accepted: 06.09.2024

Available online: 17.03.2025

Keywords:

Bioactivity

Extraction

Microwave

S. hortensis L.

Ultrasound

ABSTRACT

In Türkiye, *S. hortensis* species are naturally found especially in the Thrace region. This plant, which has been used as a spice since ancient times and benefited from its medicinal properties, is the only annual member of the *Lamiaceae* family. Natural products derived from the *Lamiaceae* family are predominantly characterized by polyphenols and flavonoids, responsible for antioxidant properties among others. In the research, extracts of plant samples were obtained with different concentrations of ethanol (EtOH) and three different extraction methods. The plant material (*Satureja hortensis L.*) was sourced from the province of Kırklareli. Three different extraction methods, namely traditional, ultrasound, and microwave, were employed along with three different ethanol solvent ratios (40%, 50%, and 60%, v:v) for phenolic compound extraction. The total phenolic content and total antioxidant activity (DPPH) were compared for all samples. Among the samples, the highest total phenolic content (TPC) value was determined for extracts obtained with ethanol (60%, v:v) using traditional extraction (TE), ultrasound extraction (15 minutes) (US-15), and microwave extraction (2.5 minutes) (MW-2.5), respectively. Other extracts obtained with ultrasound extraction (30 minutes) (US-30) and microwave extraction (5 minutes) (MW-5) resulted in the highest TPC value when applied with ethanol (50%, v:v). Some *Satureja* species known to have therapeutic properties for diabetes also possess antioxidant characteristics. However, there is no research available for *S. hortensis L.* This study, by presenting the characteristics for the first time, investigated the potential anti-hyperglycemic and anti-obesity effects of *S. hortensis L.* extracts. For this purpose, the enzyme activities of amylase and lipase were determined for all samples. Thus, the data obtained for *S. hortensis L.* holds significance for future research and industrial applications.

Biyoaktif Özellikler Açısından *Satureja Hortensis L.*'nin Toplam Hidro-Alkollük Ekstraktının Fenolik Ekstraksiyonu Üzerine Karşılaştırmalı Bir Çalışma

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 07.04.2024

Kabul tarihi: 06.09.2024

Online Yayınlanma: 17.03.2025

ÖZ

Türkiye'de *S. hortensis* türleri özellikle Trakya bölgesinde doğal olarak bulunmaktadır. Antik çağlardan beri baharat olarak kullanılan ve tıbbi özelliklerinden faydalanılan bu bitki, *Lamiaceae* familyasının tek yıllık üyesidir. *Lamiaceae* familyasından elde edilen doğal ürünlerde, diğerlerinin

Anahtar Kelimeler:

Biyoaktivite
Ekstraksiyon
Mikrodalga
S. hortensis L.
Ultrason

yanı sıra antioksidan özelliklerinden sorumlu olan polifenoller ve flavonoidler hakimdir. Araştırmada bitki örneklerinin farklı derişimlerdeki etanol (EtOH) ve üç farklı ekstraksiyon yöntemi ile ekstraktları elde edilmiştir. Bitki materyali (*Satureja hortensis L.*) Kırklareli ilinden temin edilmiştir. Geleneksel, ultrason ve mikrodalga olmak üzere üç farklı ekstraksiyon yöntemi ve üç farklı etanol çözücüsü (%40, %50 ve %60, hacim:hacim) ile fenolik madde ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Tüm örneklerin toplam fenolik madde miktarı ve toplam antioksidan aktivitesi (DPPH) karşılaştırılmıştır. Örnekler arasında geleneksel ekstraksiyon (TE), ultrasonik ekstraksiyon (15 dakika) (US-15) ve mikrodalga ekstraksiyon (2.5 dakika) (MW-2.5) ve etanol (%60, hacim:hacim) ile elde edilen ekstraktlar için en yüksek toplam fenolik madde miktarı (TPC) değeri belirlendi. Ultrasonik ekstraksiyon (30 dakika) (US-30) ve mikrodalga ekstraksiyon (5 dakika) (MW-5) ile elde edilen diğer örnekler için ise, etanol (50%, hacim:hacim) ile yapılan uygulama sonucunda en yüksek TPC değeri elde edildi. Diyabet için tedavi edici özelliğe sahip olduğu bilinen bazı *Satureja* türleri, aynı zamanda antioksidan özelliklere de sahiptir. Ancak, *S. hortensis L.* için herhangi bir araştırma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile ilk kez ortaya koyulan özellikler ile, *S. hortensis L.* ekstraktlarının olası anti-hiperglisemik ve anti-obezite etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, tüm örnekler için amilaz ve lipaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir. Böylece *S. hortensis L.* için elde edilen veriler gelecek araştırmalar ve endüstri uygulamaları için önem taşımaktadır.

To Cite: Askın B, Bayburtluoglu T, Özbek Yazıcı S., 2025. A comparative study on the phenolic extraction of total hydroalcoholic extract of *Satureja Hortensis L.* for bioactive properties. Kadiri Uygulamalı Bilimler Fakültesi Dergisi, 5(1): 29-46.

Introduction

Satureja hortensis L. is an annual herbaceous plant of *Lamiaceae Lindl. Family*. *S. hortensis L.*, is related to thyme and rosemary. It is also known by as “summer savory” and native to North Africa, Middle East, and Central Asia, Southern and Southeastern Europe (Bimbiraitè-Survilienè et al., 2021). The leaves, stems, and flowers of *S. hortensis* are frequently used in herbal tea and spice mixtures as the add aroma and flavour (Güllüce et al., 2003). *Satureja* species have different contents of many phenolic and volatile components such as carvacrol, γ -terpinene, thymol, p-cymene etc. (Pirbaloutia et al., 2014). As summer savory (*Satureja hortensis L.*) has anti-inflammatory, antioxidant, antifungal and antimicrobial properties because of contains volatile oils (carvacrol and thymol) (Ejaz et al., 2023). Besides it has also shown antispasmodic, antidiarrheal, antioxidant, sedative, and antimicrobial properties (Güllüce et al., 2003). It also possesses stimulating, carminative, antipyretic, and aphrodisiac properties (Mohammed et al., 2019).

The increasing interest in this plant is due to its chemical composition, which provides significant biological activity. Obesity, dyslipidemia, glycemic index imbalance, glucose intolerance, or hypertension are early signs of potential development of chronic diseases such as type 2 diabetes. Additionally, oxidative stress, an endogenous toxin, is a significant determinant of type 2 diabetes complications. Inhibiting these enzymes is an important

strategy for controlling blood sugar levels. α -amylase is responsible for the breakdown of long-chain carbohydrates. The inhibitory activity of extracts against α -Amylase functions to impede the breakdown of starch and oligosaccharides, thereby diminishing glucose absorption and subsequently mitigating the rise in postprandial glucose levels. Pancreatic lipase, identified as a pivotal enzyme in lipid absorption within the digestive system, catalyses the hydrolysis of triglycerides into glycerol and free fatty acids. Consequently, inhibiting pancreatic lipase activity is linked with the prevention of obesity-related disorders. Notably, phenolics, bioactive compounds abundant in plants, have been shown to inhibit both α -amylase and α -lipase enzymes. Hence, the simultaneous provision of antioxidants and α -amylase and lipase inhibitors through diet is a potential and feasible method for managing type 2 diabetes and obesity. Due to its natural source potential, we evaluated the obesity and antidiabetic potential of this plant traditionally used in herbal medicine in our study. In this study, all extracts exhibit inhibitory activity against amylase and lipase enzymes. Depending on the extraction method and solvent ratio, the percentage of extract inhibitor values ranges between 8.55% to 50.77% for amylase and 17.41% to 36.56% for lipase at a concentration of 0.4 mg mL⁻¹. In a previous study, the known *Moringa oleifera* extract's effects on diabetes and obesity reported lipase and amylase activities' 50% inhibition concentration values as 1.0877 mg mL⁻¹ and 0.1802 mg mL⁻¹, respectively (Ogundipe et al., 2022).

The use of advanced extraction techniques such as organic solvent extraction, ultrasound-assisted extraction, and microwave-assisted extraction is crucial for investigating the impact of biologically active compounds. The chemical profile of these compounds can vary significantly depending on factors such as the *Satureja* species, geographical origin, and prevailing climatic conditions. This study primarily aims to investigate the quantity and effects of bioactive components in *Satureja hortensis* L. (summer savory) extracts. Therefore, the study will evaluate the properties of *S. hortensis* L. cultivated in Kırklareli using a series of in vitro analyses, including the determination of total phenolic compounds, radical scavenging activity through DPPH and ABTS assays, reducing power, and the inhibitory effects on lipase and α -amylase activities.

Material and Methods

Plant Material and Reagents

Satureja hortensis L. (summer savory) were gathered from the wild flora in Devecatagi, Kırklareli, located in the western region of Türkiye (41.7350° N, 27.2253° E), during the 2022 growing season. The plants were harvested before the blooming period in August at the

point when the volatile oil content reached its peak percentage in relation to the volatile compounds under investigation. Following this, the samples underwent drying in shaded conditions at an ambient temperature of approximately 30 °C and relative humidity of approximately 40-60 % for 48 hours. The dried material was subjected to grinding utilizing an analytical laboratory mill (A 11 basic Analytical Mill; IKA Werke, Staufen, Germany).

All standard chemicals used for LC-MS analysis were procured from Sigma-Aldrich; Merck KGaA (Darmstadt, Germany). The reagents employed for assessing antioxidant activity, total phenolic content, and enzyme activities were sourced from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), Merck Co. (Darmstadt, Germany), and Fluka Chemical (USA), respectively.

Extraction Procedures

Extraction using organic solvents

Traditional extraction of phenolic compounds was performed according to the traditional extraction method (Şahin, 2019). 1 g of dried and powdered samples were weighed by precision scales (Weightlab WSA-224) at room temperature and transferred to a volumetric glass balloon with a volume of 100 mL. Three different concentrations of ethanol solution (40:60, 50:50 and 60:40, v:v, in water) were prepared as a solvent. It was completed to the volume line by adding ethanol solution to it. The balloon was capped and mixed several times by inverting the balloon to allow the solvent to contact the material. It was kept at room temperature (26 °C) and in the dark for 72 hours. At the end of 72 hours, the samples were filtered by paper filter and then PVDF membrane filter (0.45 µm) into amber-coloured flasks. Then the samples were stored frozen at -18°C until further analysis. Extractions were performed in two replicates and three parallels.

Ultrasound assisted extraction procedure

Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds was performed according to the method applied by Wang et al. (2008). An ultrasonic water bath (Advantage Lab AL04-12-230, 800W, 38 kHz, 12.75 L, Belgium) was used for extraction. The treatment conditions were determined according to the literature (Mohammed et al., 2019; Popovici et al., 2019; Şahin, 2019; Chambre et al., 2020; Shanaida, 2021). Three different ethanol solutions prepared at three different concentrations as solvent (40:60, 50:50 and 60:40, v:v, in water) and two different extraction times (15 min and 30 min) were determined as the treatments. 1 g of the ground and powdered samples were weighed into a 100 mL volumetric balloon and

ethanol solution was added up to the line. The closed and mixed balloon was placed in the ultrasonic bath. The Temperature of the ultrasonic bath was adjusted to 30 °C using the adjustment button on it and the extraction process was carried out at the specified times. At the end of the time, the samples were cooled to room temperature and filtered using paper filter and later 0.45 µm pore size PVDF membrane filter into amber coloured flasks. The filtrate was taken into sealed plastic sample containers and stored in a deep freezer at -18 °C. Extraction was repeated three times for each experiment.

Microwave assisted extraction procedure

Microwave extraction was carried out using a domestic microwave oven (Altus ALMD-17BY 20L, Arçelik, Istanbul, Türkiye) with a maximum power output of 850 W. Plant samples (1 g) were combined with identical solvents (100 mL) as those used in the standard procedure in a volumetric flask. Microwave irradiation followed the protocols outlined by Pan et al. (2003) and Şahin (2019) for varying durations (2.5 min and 5 min), ensuring avoidance of super-boiling. The samples were filtered using a paper filter and later 0.45 µm pore size PVDF membrane filter into amber coloured flasks, then the filtrate was stored in a deep freezer at -18 °C. Extraction was repeated three times for each experiment.

Determination of Analyses

Total phenolic compounds content

The total phenolic compounds content (TPC) evaluation was realized using Folin-Ciocalteu method as described in the literature (Popovici et al., 2019; Ergün, 2022). The samples were diluted to a predetermined concentration and left to incubation for 5 minutes at room temperature. Following the addition of 2 mL of sodium carbonate, the samples were further incubated for 60 minutes at room temperature, after which the absorbance was measured at 760 nm using a UV-VIS spectrophotometer (UV-2550 Shimadzu, Kyoto, Japan). The calibration curve (Figure 1) was obtained using gallic acid (GA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The results were expressed in mg GAE g⁻¹ dry material (DM).

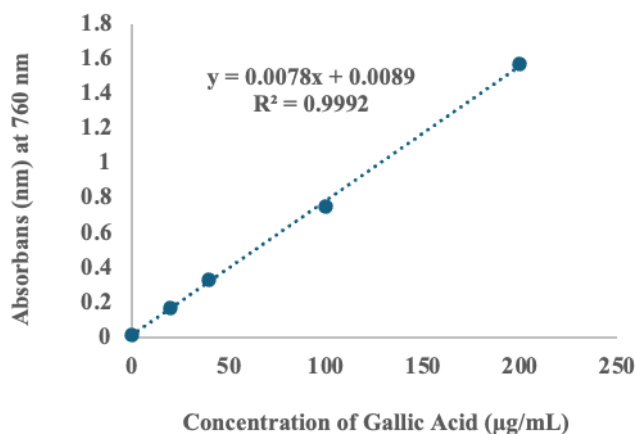


Figure 1. Calibration curve of gallic acid

Radical scavenging assay (DPPH assay)

The determination of the extract's free radical scavenging capacity (DPPH) was applied according to the method of Sanchez-Moreno et al. (1998). The extracts dissolved in methanol were prepared at various concentrations (50-1500 µg mL⁻¹). After incubating at room temperature, the absorbance of the samples at 517 nm was read against an ethanol blank. All experiments were performed in triplicate. Free radical inhibition was calculated as a percentage (I%) of DPPH :

$$I\% = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}}) \times 100 \quad (1)$$

IC₅₀ (50% inhibition) values for the extracts were calculated.

ABTS radical scavenging capacity assay

ABTS•+ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical scavenging activity of extracts was determined spectrophotometrically based on the method of Askin and Atik (2016). A standard curve was obtained using Trolox analysis, and the results were expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) in mM Trolox mL⁻¹.

Reducing power assay

The reducing power of the extracts (RP) was determined according to Oyaizu (1986). The mixture absorbance was measured at 700 nm against the blank (ethanol). The inhibitory concentration (IC₅₀), defined as the extract concentration producing 0.5 absorbance units at λ700nm, was used to describe the reducing capacity (Oliveira et al., 2009).

Enzymatic Inhibitions

The percentage of α -amylase (EC 3.2.1.1) and lipase inhibition was calculated with the given formula:

$$\% \text{Inhibition} = [(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{blank}}] \times 100 \quad (2)$$

where A_{blank} is the absorbance of the control (blank, without extract), and A_{sample} is the absorbance in the presence of the extracts.

The plant concentration with different levels were evaluated. The best concentration had the highest inhibitory was determined for 400 μg dried plant extract mL^{-1} .

α -Amylase inhibition assay

The α -amylase inhibitory activity of the extracts was assessed following the protocol outlined by Uysal et al. (2017). Enzyme activities were measured in the presence of the extracts at a concentration of 400 μg DW mL^{-1} , and absorbance readings were taken at 630 nm. Blanks were prepared for each sample by substituting buffer for enzyme.

Lipase inhibition assay

The lipase inhibition assay followed the procedure outlined by De Camargo et al. (2016), utilizing p-NPB as the substrate. Blanks were prepared for each sample by substituting enzyme with buffer. Enzyme activities were measured in the presence of the extracts at a concentration of 400 μg DW mL^{-1} , with absorbance readings taken at 412 nm.

Statistical Analysis

Every experiment was conducted in triplicate, and standard deviations were computed accordingly. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Duncan test, employing the statistical software JMP 19.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Significance was determined at the level of $P < 0.05$.

Results and Discussions

The extraction techniques represent the initial crucial phase in acquiring bioactive compounds from botanical sources. Typically, the extraction of phenolic compounds from plant matrices is accomplished through either traditional or innovative methods employing various solvents due to their intricate nature and interactions with other bioactive compounds within the plant matrices (Chew et al., 2011; Alara et al., 2020).

Long time-consuming is the most important disadvantage of the traditional solvent extraction method. Microwave and ultrasound extractions are alternative extraction methods to solve time-consuming (Proestos and Komaitis, 2008; Ince et al., 2013). It is important to evaluate different methods for the desired product to achieve optimal efficiency, quality, and cost in extraction (Alara et al., 2020).

Table 1. Total phenolic contents (TPC) and total flavonoid contents (TF) of *Satureja hortensis L.* extracts obtained using different extraction methods with different solution ratios.

Extraction Method	Extraction Time	TPC ($\mu\text{g GA mg DW}^{-1}$)	TF ($\mu\text{g mg DW}^{-1}$)
Traditional (%40 EtOH)	72h	235.15 \pm 2.18 ^f	14.32 \pm 1.25 ^{cd}
Traditional (%50 EtOH)	72h	255.88 \pm 5.00 ^e	15.70 \pm 1.26 ^{bc}
Traditional (%60 EtOH)	72h	270.15 \pm 5.10 ^d	19.63 \pm 1.36 ^a
US (%40 EtOH)	15 min	93.38 \pm 0.20 ^l	08.11 \pm 0.90 ^e
US (%50 EtOH)	15 min	131.71 \pm 0.21 ^j	08.61 \pm 0.92 ^e
US (%60 EtOH)	15 min	144.73 \pm 0.94 ⁱ	08.53 \pm 1.08 ^e
US (%40 EtOH)	30 min	149.10 \pm 1.77 ⁱ	08.40 \pm 0.62 ^e
US (%50 EtOH)	30 min	173.06 \pm 0.52 ^h	09.12 \pm 1.02 ^e
US (%60 EtOH)	30 min	149.10 \pm 3.43 ⁱ	09.18 \pm 1.21 ^e
MW (%40 EtOH)	2.5 min	120.04 \pm 8.96 ^k	08.78 \pm 1.03 ^e
MW (%50 EtOH)	2.5 min	213.27 \pm 5.10 ^g	09.94 \pm 1.16 ^e
MW (%60 EtOH)	2.5 min	271.81 \pm 2.60 ^d	10.23 \pm 1.30 ^e
MW (%40 EtOH)	5 min	310.77 \pm 2.60 ^c	12.59 \pm 1.48 ^d
MW (%50 EtOH)	5 min	447.33 \pm 5.83 ^a	16.97 \pm 1.34 ^b
MW (%60 EtOH)	5 min	390.88 \pm 8.12 ^b	17.32 \pm 1.36 ^b

Note: Means with different letters differ significantly at P= 0.05 (a-l: in the same column). All data is three replicates of mean \pm SD

Based on the statistical analysis, it is evident that a 5-minute extraction duration sufficed for the complete release of phenolic compounds. This indicates that all accessible phenolics efficiently permeated into the solvent during microwave extraction, resulting in their rapid extraction within a short timeframe. Microwaves engage with polar molecules in the extraction medium, thereby increasing the internal pressure exerted on solid materials. This interaction leads to enhanced extraction efficiency. As a result, microwave-assisted extraction enhances extraction effectiveness (Ince et al., 2013). The decrease in extraction duration is

due to microwaves' heating mechanism, which raises the internal pressure of solid materials. This increase in pressure aids in extraction, enabling phenolic compounds to be extracted in shorter periods compared to traditional methods (Bayramoglu et al., 2008). The shortened extraction time under microwave conditions likely reduced the degradation of phenolic compounds compared to traditional extraction techniques.

In this study, ethanol and water were selected as the extraction solvents due to their safer handling characteristics when compared to alternative organic solvents such as methanol and acetone. Furthermore, their compatibility with human consumption played a significant role in their selection. As described in Table 1, ethanol concentration showed a significant effect ($P < 0.05$) on TPC, except MW-5 samples and US-30 samples.

In ultrasound extraction, the duration of extraction significantly influenced the TPC of the extracts. Extraction periods of 15 and 30 minutes exhibited statistically significant differences regarding TPC (Table 1). Based on statistical analysis, the optimal conditions for ultrasound extraction of *Satureja hortensis L.* were determined to be 50% ethanol extraction for 30 minutes. This suggests that hydrogen bonds formed between solvents and phenolic compounds contribute to the enhanced extractability of phenolic acids. Similar trends in the relationship between total phenolic content (TPC) and extraction time have been observed in previous studies. Additionally, according to the literature, the lower TPC observed in extracts obtained at higher ultrasound power levels may be attributed to the degradation of certain phenolic compounds (Farahmandfar et al., 2020; Askin, 2021).

The increased solvent concentration has led to a higher yield of phenolic extract in MW extraction for 2.5 min. There was no significant difference between the TPCs obtained by microwave and traditional extractions by 60% ethyl alcohol ($P > 0.05$). Nevertheless, the total phenolic content (TPC) of extracts obtained for 5 minutes exceeded that of the extract obtained at 2.5 minutes. When comparing the TPC of a microwave-extracted sample obtained over 5 minutes to that of conventionally extracted ones, the microwave extraction also yielded a higher TPC within a shorter duration. As mentioned, the TPC content of samples treated with microwave extraction for 5 minutes and ultrasound extraction for 30 minutes increased with the use of 50% ethanol. Additionally, ethanol concentration did not cause significant differences in TF and antioxidant properties ($p < 0.05$). For MW-5 and US-30 extraction the samples, TPC values were increased as the ethanol concentration was increased up to 50%. The TPC values were significantly ($P < 0.05$) decreased with 60% ethanol concentration for the same samples.

TPC experimental results are consistent with previous studies reporting different solvent concentration from plant samples (Nawaz et al., 2006; Turkmen et al., 2006; Kim et al., 2007; Yang and Zhang, 2008; Chew et al., 2011). However, the best ethanol concentration determined for TF is completely different from TPC. The TF values were found to be influenced only by concentration for the traditional method and MW-5 ($P < 0.05$), while concentration did not significantly affect the TF value in other sample groups ($P > 0.05$). Galvan d'Alessandro et al. (2012) similarly attributed this to the fact that ethanol increases mass transfer and, accordingly, more phenolic substances are extracted. While soluble phenolic substances are generally found in cell vacuoles, the presence of flavonoids, lignin, and insoluble polyphenols bound to proteins and polysaccharides in the cell membrane has shown that water and low concentration of ethanol can reach the cells, but high concentrations of ethanol cause protein denaturation and prevent phenolic substance extraction. In the other literatures, 50% ethanol concentration was defined as the best value for TF extraction from plants (Yagcioglu, 2015; Xie et al., 2016). It has been determined that ultrasound-assisted extraction causes more degradation of flavonoids than other methods. Yağcıoğlu (2015), who reached a similar conclusion, stated that myricetin, quercetin, camperol, and rhamnetin flavonoids are the most degraded flavonoids, depending on the amount of hydroxyl groups they contain.

Following the principle of "like dissolves like," solvents will solely extract compounds that share similar polarity with them (Spigno et al., 2007; Zhang, 2007; Yang and Zhang, 2008; Alara et al., 2020). Briefly, the phenolic compounds extracted from *S. hortensis* would have the same polarity as the extraction solvent. Besides, another factor affected by solvent concentration is the dielectric constant. Therefore, in the literature, it is stated that by adding a solvent with lower polarity such as ethanol into a polar solvent such as water to reduce the dielectric constant, medium polarity phenolic substances can be effectively extracted. For example, by 60% ethanol extraction, while polar components such as glycosides can be effectively extracted at higher concentrations. It is stated that good results cannot be obtained due to the decrease in resolution (Alara et al., 2020).

The antioxidant activities of the samples were assessed through three different methods; radical scavenging DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free assay, ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical scavenging activity, and the reducing power of the extracts. Ethanol concentration notably impacted the reducing power (RP) value for all samples ($P < 0.05$). The in vitro antioxidant activities were evaluated using DPPH as a free radical, measuring the extracts' capacity to donate H or e- (Chambre et al., 2020). The results

indicated inhibitions ranging from 32% to 57% for the samples analysed, signifying significant antioxidant activity. Ethanol concentration exhibited a discernible influence on the antioxidant capacities of the extracts. While higher inhibition was observed for samples extracted via microwave (MW) for 5 minutes, no significant difference was found between extracts obtained through ultrasound (US) and traditional methods. Notably, ethanol concentration induced significant changes in DPPH and ABTS^{•+} values, particularly evident in traditional extraction. However, prolonged extraction times in MW and US extractions did not yield significant changes. Increasing the ethanol concentration in US-15 extracted samples resulted in a significant (P<0.05) decrease in ABTS^{•+} but had no significant (P<0.05) effect on DPPH, potentially due to the extraction of phenolic compounds with differing molecular weights (Paixão et al., 2007; Choi et al., 2014). Earlier research indicates that the DPPH assay demonstrates a higher reactivity towards low molecular weight phenolic compounds, suggesting that 60% ethanol may be more effective in extracting low molecular weight phenolic compounds with potent antioxidant properties from plants when compared to 40% ethanol.

Table 2. Antioxidant activity values in different methods of *Satureja hortensis* L. extracts obtained using different extraction methods with different solution ratios.

Extraction Method	Extraction Time	DPPH IC50 (µg DW mL ⁻¹)	ABTS ^{•+} IC50 (µg DW mL ⁻¹)	RP IC50 (µg DW mL ⁻¹)
Traditional (40% EtOH)	72h	57.32±3.65 ^a	27.50±1.17 ^{ab}	423.11±11.44 ^b
Traditional (50% EtOH)	72h	53.31±2.34 ^{abc}	26.10±1.20 ^b	270.27±6.34 ^f
Traditional (60% EtOH)	72h	49.69±2.13 ^{cd}	19.23±0.91 ^c	122.54±3.90 ^j
US (40% EtOH)	15 min.	55.45±1.99 ^{bc}	30.11±1.91 ^a	496.76±13.89 ^a
US (50% EtOH)	15 min.	51.78±2.77 ^{bcd}	28.27±1.76 ^d	389.77±13.62 ^c
US (60% EtOH)	15 min.	51.33±2.76 ^{bcd}	26.78±1.68 ^b	322.45±13.56 ^e
US (40% EtOH)	30 min.	55.77±3.23 ^{bc}	28.44±2.02 ^{ab}	487.22±14.09 ^a
US (50% EtOH)	30 min.	50.65±2.90 ^{bcd}	27.55±1.17 ^{ab}	367.55±12.94 ^d
US (60% EtOH)	30 min.	50.58±2.29 ^{cd}	26.03±2.30 ^b	245.11±11.46 ^g
MW (40% EtOH)	2.5 min.	47.72±2.08 ^d	27.22±0.89 ^b	367.29±12.42 ^d
MW (50% EtOH)	2.5 min.	34.23±1.90 ^e	10.33±1.20 ^d	197.89±10.69 ^h
MW (60% EtOH)	2.5 min.	34.29±2.51 ^e	09.27±0.69 ^d	119.55±11.97 ^j
MW (40% EtOH)	5 min.	35.65±2.20 ^e	11.14±1.14 ^d	273.45±11.76 ^f
MW (50% EtOH)	5 min.	33.93±1.25 ^e	09.11±0.40 ^d	168.45±9.94 ⁱ
MW (60% EtOH)	5 min.	32.10±1.37 ^e	08.55±1.04 ^d	59.78±5.64 ^k

Note: Means with different letters in the same column differ significantly at P= 0.05. All data is three replicates of mean ± SD

The results obtained from statistical evaluation between total phenolic content and antioxidant activity. Strong correlations were observed between TPC and IC50 values of DPPH, ABTS•+, and RP, as well as between TPC and total flavonoid content (Table 3). The phenolic hydroxyl group in *Satureja hortensis L.* serves as an effective hydrogen donor, enabling reaction with reactive oxygen species and preventing the generation of newer radical species. Despite potential variations in the impact of *S. hortensis L.* extract on cell survival, its antioxidant activity, linked to the polyphenols within the extract, was demonstrated. Existing literature supports a direct relationship between the content of polyphenolic compounds and the antioxidant activity observed in most plant extracts. These associations suggest that the robust antioxidant capacity of extracts is closely tied to the presence of both phenolic and flavonoid content (Fathi et al., 2013; Choi et al., 2014; Akyuz, 2019; Bimbiraitè-Survilienè et al., 2021).

Comparison ultrasonic method and traditional extraction, it was noted that processing time was reduced without significantly altering the total phenolic content of the extracts. On the other hand, microwave extraction is not only minimize the processing time but also notably increase the total phenolic content compared to traditional extraction methods.

Table 3. Correlation coefficients between colour characteristics for different treatment groups

	TPC	TF	ABTS	DPPH	RP IC50
TPC	1.000				
TF	0.800**	1.000			
ABTS	-0.810**	-0.480	1.000		
DPPH	-0.710**	-0.300	0.960**	1.000	
RP IC50	-0.730**	-0.630**	0.820**	0.770**	1.000

*: p<0.05; **: p<0.01

Obesity, dyslipidemia, glycemic index imbalance, glucose intolerance, or hypertension are early indicators of potential chronic diseases like type 2 diabetes. Moreover, oxidative stress, considered an endogenous toxin, is believed to play a pivotal role in type 2 diabetes complications (Knekt et al., 2002). Inhibiting these enzymes represents a crucial strategy for regulating blood sugar levels. α -Amylase is responsible for breaking down long-chain carbohydrates. The inhibitory activity of α -amylase by the extracts delays the hydrolysis of starch and oligosaccharides, thereby reducing glucose absorption and preventing the subsequent rise in postprandial glucose levels (Gao et al., 2000). It's well-established that pancreatic lipase is the primary enzyme involved in lipid absorption in the digestive tract,

breaking down triglycerides into glycerol and free fatty acids. Consequently, inhibiting pancreatic lipase is linked with preventing obesity-related diseases (Amoutzopoulos, 2013; Kim et al., 2020).

Phenols, a bioactive compound abundant in plants, have been shown to inhibit both α -amylase and α -lipase. Thus, the simultaneous provision of antioxidants and inhibitors for α -amylase and lipase through dietary sources presents a promising and practical approach for managing type 2 diabetes and obesity (Ogundipe et al., 2022).

Table 4. Inhibition of amylase and lipase enzyme activities of of *Satureja hortensis* L. extracts obtained using different extraction methods with different solution ratios.

Extraction Method	Extraction Time	Amylase Activity (%)	Lipase Activity (%)
Traditional (40% EtOH)	72h	16.40±0.50 ^{ef}	17.41±1.14 ^l
Traditional (50% EtOH)	72h	18.73±1.05 ^{de}	21.37±0.18 ^f
Traditional (60% EtOH)	72h	19.93±1.18 ^d	22.45±0.80 ^{ef}
US (40% EtOH)	15 min.	15.53±1.18 ^f	18.69±1.43 ^{hi}
US (50% EtOH)	15 min.	18.04±2.05 ^{de}	22.02±0.85 ^{ef}
US (60% EtOH)	15 min.	41.44±1.71 ^b	23.65±1.08 ^{de}
US (40% EtOH)	30 min.	24.11±1.49 ^c	19.98±0.65 ^{gh}
US (50% EtOH)	30 min.	24.10±0.00 ^c	24.78±1.12 ^{cd}
US (60% EtOH)	30 min.	49.51±2.42 ^a	25.69±1.11 ^c
MW (40% EtOH)	2.5 min.	08.68±0.89 ^g	23.87±1.12 ^{cde}
MW (50% EtOH)	2.5 min.	09.57±1.31 ^g	32.01±1.27 ^b
MW (60% EtOH)	2.5 min.	08.35±0.87 ^g	31.95±1.32 ^b
MW (40% EtOH)	5 min.	16.53±0.81 ^{ef}	25.78±1.05 ^c
MW (50% EtOH)	5 min.	18.04±1.19 ^{de}	35.09±1.29 ^a
MW (60% EtOH)	5 min.	24.18±1.27 ^c	35.56±1.31 ^a

Note: Means with different letters in the same column differ significantly at P= 0.05. All data is three replicates of mean ± SD

In the present study, it was assessed the obesity and antidiabetic potential of *S. hortensis* L., a plant renowned in traditional medicine for its natural healing properties. All extracts exhibited inhibitory activity against amylase and lipase enzymes. The percentage inhibitory values of the extracts varied from 8.55% to 50.77% for amylase and 17.41% to 36.56% for lipase, depending on the extraction method and ethanol concentration, at a concentration of 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Notably, these values align with findings from previous studies on *Moringa oleifera* extract, a plant recognized for its effects on diabetes and obesity, where the 50% inhibitory concentration values for lipase and amylase activities were reported as 1.0877 mg mL^{-1} and 0.1802 mg mL^{-1} , respectively (Lakka et al., 2020; Ogundipe et al., 2022).

Conclusion

In this study, the extraction methods of *Satureja hortensis L.* using microwave and ultrasound were compared. Microwave-assisted extraction resulted in a notable decrease in processing time and a significant enhancement in the total phenolic content compared to traditional extraction methods. Moreover, significant disparities in antioxidant activity were evident between microwave-assisted and traditional extracts. Conversely, while ultrasonic extraction reduced processing time compared to traditional methods, it did not yield higher total phenolic content in the extracts. Overall, microwave-assisted extraction exhibited superior advantages in terms of time efficiency and total phenolic content compared to other extraction techniques.

This study introduces the novel and innovative potential of microwave-assisted extraction, demonstrating its superior efficiency in reducing processing time and enhancing total phenolic content and antioxidant activity compared to traditional methods. Future research could focus on optimizing microwave-assisted extraction parameters for various plant species and exploring its combination with other advanced techniques to further improve extraction efficiency and bioactive compound stability.

Disclosure Statement

No conflicts of interest were reported by the authors.

Authors' Contributions

The authors of this manuscript would like to acknowledge the following contributions: The conceptualization and methodology were carried out by Buket Askin. The extraction procedures and analyses were Sercan Ozbek Yazıcı. Data evaluation was carried out by Buket Askin.

References

- Akyüz M., 2019. Determination of antioxidant activity of ethanol extract of Gölevez [(*Colocasia esculenta (L.)*] tubers. *Journal of Agriculture and Nature*, 22(Suppl 2): 388-394.
- Alara OR, Abdurahman NH, Olalera OA., 2020. Ethanolic extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from *vernonia amygdalina* leaf using two-level factorial design. *Journal of King Saud University Science*, 32, 7-16.
- Amoutzopoulos B., 2013. Effects of a traditional fermented grape-based drink “Hardaliye” on a variety of biochemical and antioxidant parameters in healthy adults.

Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Nutrition and Dietetics, Ankara, 2013.

Askin B, Atik A., 2016. Color, phenolic composition, and antioxidant properties of hardaliye (Fermented Grape Beverage) under different storage conditions. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40(6): 803-812.

Askin B., 2021. Comparison of aroma profiles of essential oils extracted by hydro-distillation from orange peel waste dried by various methods. *Journal of Food and Nutrition Research*, 60, 271-278.

Bayramoglu B, Sahin S, Sumnu G., 2008. Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. *Journal of Food Engineering*, 88(4): 535-540.

Bimbiraite-Survilien K, Stankevičius M, Šuštauskaite S, Egotek AG, Maruška A, Skrzydlewska E, Barsteigiene Z, Akuneca I, Ragažinskiene O, Lukošius A., 2021. Evaluation of chemical composition, radical scavenging and antitumor activities of *Satureja hortensis L.* herb extracts. *Antioxidants*, 10, 53.

Chambre DR, Moisa C, Luoitul A, Copolovicil L, Pop G, Copolovicil DM., 2020. Chemical composition, antioxidant capacity, and thermal behavior of *Satureja hortensis* essential oil. *Scientific Reports*, 10, 21322.

Chew KK, Khoo MZ, Ng SY, Thoo YY, Wan AWM, Ho CW., 2011. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18(4): 1427-1435.

Choe JH, Kim HY, Kim YJ, Yeo EJ, Kim CJ., 2014. Antioxidant activity and phenolic content of persimmon peel extracted with different levels of ethanol. *International Journal of Food Properties*, 17, 1779-1790.

de Camargo AC, Regitano-d'Arce MA, Biasoto AC, Shahidi F., 2016. Enzyme-assisted extraction of phenolics from winemaking by-products: Antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. *Food Chemistry*, 212, 395-402.

Ergün F., 2022. The effects of drying methods on total phenolic and flavonoid substances and antioxidant capacity of redstem filaree (*Erodium cicutarium*). *Applied Ecology and Environmental Research*, 20(1): 499-509.

Farahmandfar R, Tirgarian B, Dehghan B, Nemati A., 2020. Changes in chemical composition and biological activity of essential oil from thomson navel orange (*Citrus sinensis L. Osbeck*) peel under freezing, convective, vacuum, and microwave drying methods. *Food Science and Nutrition*, 8(1): 124-138.

Fathi A, Sahari MA, Barzegar M, Naghdi BH., 2013. Antioxidant activity of *Satureja hortensis* L. essential oil and its application in safflower oil. *Journal of Medicinal Plants*, 12, 45.

Galvan d'Alessandro L, Kriaa K, Nikova I, Dimitrov K., 2012. Ultrasound assisted extraction of polyphenols from black chokeberry. *Separation and Purification Technology*, 93, 42-47.

Gao X, Ohlander M, Jeppsson N, Björk L, Trajkovski V., 2000. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophaerhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5): 1485-1490.

Güllüce M, Sökmen M, Daferera D, Açar G, Ozkan H, Kartal N, Polissiou M, Sökmen M, Sahin F., 2003. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3958-3965.

İnce AE, Şahin S, Şümnü SG., 2013. Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 37, 69-75.

Kim HD, Park YH, Lee JS, Jeong H, Lee KW, Kang TH., 2020. Anti-obesity effect of dkb-117 through the Inhibition of Pancreatic Lipase and α -Amylase Activity. *Nutrients*, 12(10): 3053.

Kim Y, Brecht JK, Talcott ST., 2007. Antioxidant phytochemical and fruit quality changes in mango (*Mangifera indica* L.) following hot water immersion and controlled atmosphere storage. *Food Chemistry*, 105(4): 1327-1333.

Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A., 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(3): 560-568.

Lakka A, Grigorakis S, Kaltsa O, Karageorgou I, Batra G, Bozinou E, Makris DP., 2020. The effect of ultrasound pretreatment on the production of polyphenol-enriched extracts from *Moringa oleifera* L. (drumstick tree) using a novel bio-based deep eutectic solvent. *Applied Sciences*, 10(1): 220.

Mohammed FS, Daştan T, Sevindik M, Selamoglu Z., 2019. Antioxidant, antimicrobial activity and therapeutic profile of *Satureja hortensis* from Erzincan province. *Cumhuriyet Medical Journal*, *Cumhuriyet Medical Journal*, 41(3): 558-562.

Nawaz H, Shi J, Mittal GS., 2006. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 48(2): 176-181.

Yukio Kakuda Ogundipe A, Adetuyi B, Iheagwam F, Adefoye K, Olugbuyiro J, Ogunlana O, Ogunlana O., 2022. In vitro experimental assessment of ethanolic extract of *Moringa oleifera* leaves as an α -amylase and α -lipase inhibitor. Biomedical Research Papers, 2022, 4613109.

Oliveira I, Coelho V, Baltasar R, Pereira JA, Baptista P., 2009. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo L.*) leaves on free radicals. Food and Chemical Toxicology, 47(7): 1507-1511.

Pan X, Niu G, Liu H., 2003. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. Chemical Engineering and Processing, 42, 129-133.

Pirbalouti AG, Siahpoosh A, Setayesh M, Craker L., 2014. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of some medicinal and aromatic plants used as herbal teas and condiments in Iran. Journal of Medicinal Food, 17(10).

Proestos M, Komaitis C., 2008. Application of Microwave-Assisted Extraction to the Fast Extraction of Plant Phenolic Compounds. Food Science and Technology, LWT, 652-659.

Shanaida M., 2021. Comparative analysis of phenolic compounds in the American basil and wild bergamot herbs. PhOL, Pharmacology Online, 2, 943-952.

Spigno G, Tramelli L, Marco DFD., 2007. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. Journal of Food Engineering, 81(1): 200-208.

Şahin S., 2019. Experimental and modelling study of polyphenols in *Olea europaea* Leaves through ultrasound-assisted extraction. Journal of the Turkish Chemical Society Section A Chemistry, 6(3): 383-394.

Turkmen N, Sari F, Velioglu YS., 2006. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and folin-ciocalteu methods. Food Chemistry, 99 (4): 835-841.

Uysal A, Ozer OY, Zengin G, Stefanucci A, Mollica A, Picot-Allain CMN, Mahomoodally MF., 2019. Multifunctional approaches to provide potential pharmacophores for the pharmacy shelf: *Heracleum sphondylium L. subsp. Ternatum. (Velen.) Brummitt.* Computational Biology and Chemistry, 78, 64-73.

Xie Y, Guo QS, Wang GS., 2016. Preparative separation and purification of the total flavonoids in *Scorzonera austriaca* with Macroporous Resins. Molecules, 21(6): 768.

Yagcioglu P., 2015. Optimization of antioxidant extraction from sage (*Salvia Officinalis L.*) using different extraction methods. Master Thesis, Istanbul Technical University, 95p, İstanbul.

Yang C, Tang Q, Liu J, Zhang Z, Liu W., 2008. Preparative isolation and purification of phenolic acids from smilax China by high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*, 61(3): 474-478.

Wang J, Sun B, Cao Y, Tian Y., 2008. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. *Food Chemistry*, 106(2): 804-810.

Zhang ZS, Li D, Wang LJ, Ozkan N, Chen XD, Mao ZH, Yang HZ., 2007. Optimization of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. *Separation and Purification Technology*, 57(1): 17-24.

Hava Sıcaklık Değerlerinin Sinüzoidal Fonksiyonlarına En Küçük Kareler Regresyonu İle Eğri Uydurma: Bingöl İli Örneği

Cebeli İNAN^{1*}, Şenol ÇELİK²

¹Bingöl Üniversitesi, Sosyal Bilimler Meslek Yüksekokulu, Bingöl, Türkiye

²Bingöl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootečni Bölümü, Biyometri ve Genetik ABD, Bingöl, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0002-7924-9911>

²<https://orcid.org/0000-0001-5894-8986>

¹Sorumlu yazar: cinan@bingol.edu.tr

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 03.02.2024

Kabul tarihi: 23.07.2024

Online Yayınlanma: 17.03.2025

Anahtar Kelimeler:

Sıcaklık

Fourier serileri

Periyot

Bingöl

ÖZ

Bu çalışmada, Türkiye'nin Bingöl ilinde Ocak 2000 yılından Kasım 2021'e kadar olan ortalama sıcaklık değerleri, sinüzoidal fonksiyon kullanılarak modellenmiştir. Bingöl ilinde bu dönemler arasında ortalama sıcaklık değerlerinin karesel hataların toplamını en aza indirmek ve belirleme katsayısını (R^2) maksimuma çıkarmak için trigonometrik eğri tahmin edildi. Dönem boyunca en düşük sıcaklıklar Aralık, Ocak ve Şubat aylarında olmuştur. Mart, Nisan ve Mayıs aylarında sıcaklıklar hafif yükselirken, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında en yüksek seviyede, Eylül, Ekim ve Kasım aylarında ise sıcaklıkta gerileme olmuştur. Bu durum her yıl periyodik olarak devam etmiştir. Fourier serileri kullanılarak oluşturulan sinüzoidal fonksiyona en küçük kareler regresyonu ile eğri uydurma modeli ile sinüzoidal eğri uydurmanın sıcaklık tahmin modelleri için uygun ve kullanışlı olduğu sonucuna varılmıştır.

Curve Fitting with Least Squares Regression of Air Temperature Values on Sinusoidal Functions: The Case of Bingöl Province

Research Article

Article History:

Received: 03.02.2024

Accepted: 23.07.2024

Available online: 17.03.2025

Keywords:

Temperature

Fourier series

Period

Bingöl

ABSTRACT

In this study, the average temperature values from January 2000 to November 2021 in Bingöl province of Turkey were modelled using a sinusoidal function. The trigonometric curve was estimated to minimize the sum of squared errors and maximize the coefficient of determination (R^2) of the mean temperature values for the period from January 2000 to November 2021 in Bingöl province. During this period, temperatures were lowest in December, January and February. Temperatures increased slightly in March, April and May, peaked in June, July and August, and decreased in September, October and November. This situation continued periodically every year. It was concluded that sinusoidal curve fitting is suitable and useful for temperature forecasting models with the curve fitting model with least squares regression to the sinusoidal function created using Fourier series.

To Cite: İnan C, Çelik Ş., 2025. Hava sıcaklık değerlerinin sinüzoidal fonksiyonlarına en küçük kareler regresyonu ile eğri uydurma: Bingöl İli örneği. Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi Dergisi, 5(1): 47-58.

Giriş

Dünya yüzeyindeki hava sıcaklığı en önemli çevresel faktörlerden biridir. Yüzey sıcaklığındaki değişimleri modellemek ve güvenilir tahminler yapmak, sağlam çevre

politikalarının temelini oluşturur (Romilly, 2005). Hava durumu, bir sektörün ürün ve hizmetleri için hem arz hem de talebi etkileyerek ekonomiyi etkiler (Lazo ve ark., 2011). Başka bir ifade ile hava durumu, birçok ürüne yönelik talep ve satışların belirlenmesinde doğrudan veya dolaylı olarak önemli bir role sahiptir (Granger, 1978).

Sıcaklığın tahmin edilmesi özellikle tarım alanında, bitki örtüsünün çeşitliliğinde, su kaynakları ve turizm sektörleri ile ilişkili iklim etkisi çalışmalarında dikkate alınan en önemli göstergelerden biridir (IPCC, 2007). Daha geniş bir bağlamda; sıcaklık, diğer birçok çevresel faktörü karmaşık şekillerde etkiler. Sıcaklık, mahsul büyüme simülasyonu alanlarındaki birçok eko-çevresel modelde kritik bir girdi parametresidir. Bu ekosistem modellerini kullanan politika analizi ancak gelecekteki sıcaklıkların doğru tahmin edilmesiyle mümkündür (Caldiz ve ark., 2001; Vedoodt et al., 2004; Bechini ve ark., 2006).

Hava sıcaklığının doğru tahmini, hem insan yaşamını hem de mülklerini korumaya hizmet ettiğinden meteorolojik tahminin temel bir bileşenidir. İnsan faaliyetlerinin, enerji politikasının ve iş geliştirmenin planlanmasında önemli bir rol oynar (Abbass ve ark., 2022). Aşırı hava sıcaklığı, bireyler için ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır (Lan ve ark., 2010; Schulte ve ark., 2016) ve flora ve faunaya zarar verme potansiyeline sahiptir. Endüstriler, enerji sektörleri ve tarım özellikle sıcaklık dalgalanmalarına karşı hassastır (Sardans ve ark., 2006). Bu nedenle günlük aşırı hava sıcaklığını tahmin etmek için uygun bir yöntem bulmak, kamu güvenliğinin sağlanması açısından hayati önem taşımaktadır.

Aylık sıcaklık değerlerinin analizi, iklim düzenlerini ve değişikliklerini anlamada çok önemli bir göstergedir. Birçok çalışmada aylık sıcaklık verilerini analiz etmek için çeşitli teknikler kullanılmıştır. Avustralya'da yapılan bir çalışma, sıcaklık değişimlerini ve modellerini analiz etmek için yerel ağırlıklı dağılım grafiği yumuşatma (LOESS) ve çift üstel düzeltme (DES) kullanmış ve tüm kümelerdeki artan sıcaklık eğilimlerini ve sıcaklıkların periyodikliğini ortaya çıkarmıştır (Wanishsakpong ve Notodiputro, 2018).

Ustaoglu ve ark. (2008) çalışmalarında Türkiye'de, Marmara bölgesinin Geyve ve Sakarya havzasına ait 15 yıllık verilerine (1989–2003 yılları arasında) üç farklı YSA yöntemini kullanarak günlük ortalama, maksimum ve minimum sıcaklık zaman serilerini tahmin etmişlerdir. Üç farklı yapay sinir ağı (YSA) yöntemini kullanarak (1) ileri beslemeli geri yayılım (FFBP), (2) radyal temel fonksiyon (RBF) ve (3) genelleştirilmiş regresyon sinir ağı (GRNN), ayrıca çoklu doğrusal regresyon (MLR) modeliyle yapılan tahminleri YSA yöntemleriyle karşılaştırmışlar ve dört yöntem de maksimum, ortalama ve minimum sıcaklık serilerinin tahmininde birbirine yakın ve tatmin edici sonuçlar verdiğini belirtmişler.

İspanya'da yapılan başka bir çalışmada, sıcaklık eğilimlerindeki mekânsal değişimi analiz etmek için hareketli pencere görsel yaklaşımı kullanılmış ve İspanya anakarasında sıcaklıkların genel olarak arttığını, ancak etkinin soğuk ve sıcak aylar, maksimum ve minimum sıcaklıklar için farklı olduğunu ve anlamlı eğilimlerden etkilenen alanın aylara göre değiştiği sonucunu elde etmişlerdir (Gonzalez-Hidalgo ve ark., 2018).

Hindistan'da yapılan bir araştırmada (Narula ve ark., 2018), sıcaklık değişiminin uzay-zamansal ayak izlerini tanımlamak için fonksiyonel veri analizinden (FDA) yararlanıldı ve 1901-2005 yılları arasında, esas olarak muson sonrası ve kış mevsimlerinde sıcak noktalarla birlikte meydana gelen 0,53°C'lik önemli bir sıcaklık artışı ortaya çıkarıldı. Ülkenin kuzey-orta ve doğu kesimlerinde sıcaklıkların kümelendiği tespit edilmiştir. Bu çalışmalar, aylık sıcaklık değerlerinin analizinde çeşitli yöntem ve bulguları ortaya koyarak iklim kalıpları ve değişiklikleri hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır.

Cesaraccio ve ark. (2001), çalışmalarında otomatik bir hava durumu ağından alınan saatlik sıcaklık verileri kullanılarak bir günlük sıcaklık eğilimi modelini (TM) ve literatürde yayınlanmış modellerle karşılaştırmışlardır. TM ve WAVE (Wit ve ark., 1978) modelleri, çok farklı iklime sahip beş lokasyondan 4 yıllık saatlik hava durumu verilerini kullanan P&L (Parton ve Logan, 1981) ve WK (Wilkerson ve ark., 1983) modellerine göre genel olarak daha doğru sıcaklık eğilimi tahminleri sağladığını tespit etmişlerdir.

Chow ve ark., (2007) çalışmalarında yer alan üç analizden; günlük maksimum, minimum ve ortalama sıcaklıkları kullanan Q-Sinüs yönteminin, saatlik sıcaklığı sadece maksimum ve minimum değerleri kullanan algoritmalarından daha iyi yeniden ürettiği sonucuna vardılar. Pauly ve Liang (2022), sinüzoidal model kullanarak dünyanın güneş etrafındaki düzenli hareketleri ve eğiklik açısı tarafından yönlendirilen mevsimsel sıcaklık salınımlarının, su kütlelerinin sıcaklığındaki mevsimsel değişim de dâhil olmak üzere birçok doğal olayın sinüzoidal salınımlar oluşturduğunu saptamıştır.

Bu çalışmanın amacı, aylık sıcaklık değerleri için trigonometrik eğri uydurularak model oluşturmak ve gelecek dönemin öngörüsünün yapılmasıdır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Çalışmanın materyali, Çevre, Şehircilik ve İklim Değişikliği Bakanlığı Meteoroloji Genel Müdürlüğü'nün Bingöl meteoroloji istasyonundan 2000 Ocak-2021 Kasım ayları arasında ölçülen aylık ortalama sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$) verilerinden oluşmaktadır. Sinüzoidal fonksiyonlara En Küçük Kareler Yöntemi (Fourier Serileri) ile eğri uydurulmuştur.

Metod

Sinüzoidal (Trigonometrik) eğri, sinüs ve kosinüs gibi trigonometrik fonksiyonlar kullanılarak tanımlanan bir tür matematiksel eğridir. Bu eğriler, mühendislik ve geometrik modellemedeki potansiyel uygulamaların yanı sıra ekonometrik verilerdeki salınımı (mevsimsellik) hareketi gösteren verilere uygulanması ile son yıllarda dikkat çekmiştir (Li ve Liu, 2022).

Herhangi bir $f(x)$ fonksiyonunun Fourier serisiyle yaklaşık olarak ifade edilebilmesi için, fonksiyonun her noktada tek değerli olması, istenilen aralıkta sürekli olması, istenilen aralıkta sonlu ve sürekli olması gibi koşullar vardır. İstenilen aralıkta sonlu sayıda maksimum veya minimum değerlerin karşılanması gerekir (Bayram, 2002). Bu koşullar altında Fourier serileri fonksiyonunun sürekli olduğu yerde $f(x)$ fonksiyonuna yakınsamaktadır. Süreksizlik noktalarında ise seri fonksiyonun sağdan ve soldan limitlerinin aritmetik ortalamasına yakınsamaktadır (Buttkus, 2000).

$f(x)$ fonksiyonu $(-L, L)$ aralığında tanımlı ve bu aralık dışında $f(x+2L) = f(x)$ ile tanımlanmış olsun, yani $2L$ periyoduna sahip olsun. $f(x)$ 'e karşılık gelen Fourier serisi

$$\frac{a_0}{2} + \sum_{n=1}^{\infty} \left(a_n \cos \frac{n\pi x}{L} + b_n \sin \frac{n\pi x}{L} \right) \quad (1)$$

ile verilir. Burada a_0 , a_n ve b_n Fourier katsayıları

$$a_0 = \frac{1}{L} \int_{-L}^L f(x) dx \quad (2)$$

$$\begin{cases} a_n = \frac{1}{L} \int_{-L}^L f(x) \cos \frac{n\pi x}{L} dx \\ b_n = \int_{-L}^L f(x) \sin \frac{n\pi x}{L} dx \end{cases} \quad n = 0, 1, 2, \dots$$

ile verilir. Eşitlik 2'deki sabit terim

$$\frac{a_0}{2} = \frac{1}{2L} \int_{-L}^L f(x) dx$$

e eşittir. Bu, bir periyot üzerinde $f(x)$ 'in ortalamasıdır. Eğer $L = \pi$ ise fonksiyonun periyodu 2π 'dir (Spiegel, 1963).

Bu özelliklere göre herhangi bir $f(x)$ fonksiyonu,

$$f(x) = \frac{a_0}{2} + \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos nx + b_n \sin nx) \quad (3)$$

şeklinde Fourier serisine açılabilir. Bu şekildeki seri trigonometrik seri olarak adlandırılır (Khuri, 2003). Fourier serisi üzerinde $[-\pi, \pi]$ aralığında terim terime integral alınarak ve eşitlik 4'te verilen ortogonalite bağıntıları da dikkate alınarak a_n ve b_n katsayıları

$$a_n = \frac{1}{\pi} \int_{-\pi}^{\pi} f(x) \cos n\pi dx \quad (n = 0, 1, 2, \dots)$$

$$b_n = \frac{1}{\pi} \int_{-\pi}^{\pi} f(x) \sin n\pi dx \quad (n = 0, 1, 2, \dots)$$

şeklinde hesaplanır (Rudin, 1953). a_0 katsayısı ise

$$a_0 = \frac{1}{\pi} \int_{-\pi}^{\pi} f(x) dx$$

dir. Bir $f(x)$ fonksiyonu sürekli değilse ve eşit aralıklı n ayrık noktada değerler olarak veriliyorsa, toplam sembolleri kullanılır. Özellikle y değişkeninin değerleri, x değişkeninin artan değerlerine karşılık periyodik bir değişim gösterdiğinde matematiksel model olarak kesikli Fourier serisi seçilir. Yıllık periyodun serinin bazı parametreleri üzerindeki etkisi ile oluşan periyodik bileşen eşitlik 4 ile açıklanmaktadır.

$$y_i = a_0 + \sum_{k=1}^m \left[a_k \cos\left(\frac{2\pi}{T} k x_i\right) + b_k \sin\left(\frac{2\pi}{T} k x_i\right) \right] + \varepsilon_i \quad (4)$$

şeklinde olur. Burada y_i : Parametrenin ortalama değeri, m : Önemli harmonik sayısı, a_k ve b_k : Fourier katsayıları, T : periyottur (Salas ve Yevjevich, 1972). Eşitlik 4'te verilen ε_i olan i zamandaki artık (hata) değeridir (Bloomfield, 2000).

Bir seride hem trend hem de mevsimsel dalgalanma varsa, uygulanacak regresyon modeli

$$Y_t = a + \sum_{i=1}^m b_i t^i + \sum_{i=1}^{\lfloor s/2 \rfloor} \left[c_i \sin\left(\frac{2\pi i t}{s}\right) + d_i \cos\left(\frac{2\pi i t}{s}\right) \right] + \varepsilon_t \quad (5)$$

şeklinindedir. Burada m , serinin polinom derecesidir. Burada, $\sum_{i=1}^m b_i t^i$ toplamı ile serinin trend bileşeni açıklanmaktadır. Bu eşitlikte s , periyot olmak üzere $\lfloor s/2 \rfloor$ periyodun yarısının tamsayı kısmıdır. Burada i indisli toplam serinin mevsimsel bileşenidir. Bu bilgilere göre sinüs ve kosinüs fonksiyonu çiftine harmonik denir.

Mevsimsel serilere uygulanan regresyon analizinde katsayılar en küçük kareler yöntemi kullanılarak

$$\beta = (X'X)^{-1}X'Y$$

formülüyle bulunur. Toplamsal modelde, doğrusal trend ve bir harmonik olduğunda,

$$\beta = \begin{bmatrix} a \\ b \\ c \\ d \end{bmatrix}$$

ve

$$X = \begin{bmatrix} 1 & 1 & \sin(2\pi/s) & \cos(2\pi/s) \\ 1 & 2 & \sin(4\pi/s) & \cos(4\pi/s) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ 1 & T & \sin(2\pi T/s) & \cos(2\pi T/s) \end{bmatrix}_{T \times 4}$$

şeklindedir (Kadılar, 2009).

Bulgular ve Tartışma

Bingöl ilinin aylara göre sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$) için ortalama, standart sapma, standart hata, minimum ve maksimum değerlerden oluşan tanımlayıcı istatistikler Tablo 1’de sunulmuştur.

Tablo 1. Bingöl ili aylık ortalama sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$) tanımlayıcı istatistikler

Aylar	\bar{X}	ss	$s_{\bar{x}}$	Minimum	Maksimum
Ocak	7,782	3,032	0,646	1,8	13,3
Şubat	10,855	3,544	0,755	4,2	16,2
Mart	18,414	3,360	0,716	10,2	22,3
Nisan	24,359	3,002	0,640	17,2	28,9
Mayıs	29,686	1,562	0,333	27,4	33,9
Haziran	35,068	1,483	0,316	32,6	38
Temmuz	38,659	1,547	0,330	35,6	42
Ağustos	38,450	1,119	0,239	36	40,6
Eylül	34,796	1,574	0,336	32,6	37,8
Ekim	28,586	1,723	0,367	25,1	32,1
Kasım	19,623	2,201	0,469	15,2	22,7
Aralık	12,614	3,598	0,785	5,7	22,8
Genel	24,954	10,784	0,665	1,8	42

\bar{X} : Ortalama, ss: Standart sapma, $s_{\bar{x}}$: Standart hata.

Tablo 1 incelendiğinde, Bingöl’de ortalama sıcaklığın en fazla olduğu aylar sırasıyla Temmuz (38,659), Ağustos (38,450) ve Haziran (35,068) aylarıdır. En düşük sıcaklığın görüldüğü aylar ise sırasıyla Ocak (7,782), Şubat (10,855) ve Aralık (12,614) aylarıdır. 2000 Ocak-2021 Kasım döneminde ortalama sıcaklık ile ilgili olarak

$$y_i = a_0 + a_1 \sin \theta_i + a_2 \cos \theta_i$$

şeklinde bir eğri uyumu yapılacaktır. Aylık seri olduğundan dolayı, serinin periyodu $T=12$ 'dir.

$$\theta_i = \frac{2\pi}{12}t_i = \frac{\pi}{6}t_i, \quad i = 1, 2, \dots, 12$$

dönüşümü yapılır. Dönüşüm sonucu elde edilen $\sin\theta_i$ ve $\cos\theta_i$ değerleri Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. t_i değerlerine göre oluşturulan sinüs ve kosinüs değerleri

t_i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
θ_i	$\pi/6$	$\pi/3$	$\pi/2$	$2\pi/3$	$5\pi/6$	π	$7\pi/6$	$4\pi/3$	$3\pi/2$	$5\pi/3$	$11\pi/6$	2π
$\sin \theta_i$	0,5	0,87	1	0,87	0,5	0	-0,5	-0,87	-1	-0,87	-0,5	0
$\cos \theta_i$	0,87	0,5	0	-0,5	-0,87	-1	-0,87	-0,5	0	0,5	0,87	1

Buna göre Tablo 2'deki değerler sıcaklık değerleri ile birlikte kullanıldığında elde edilen trigonometrik eğriye ait parametre tahminleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Bingöl ilindeki sıcaklık için oluşturulan trigonometrik eğrinin parametre tahmini

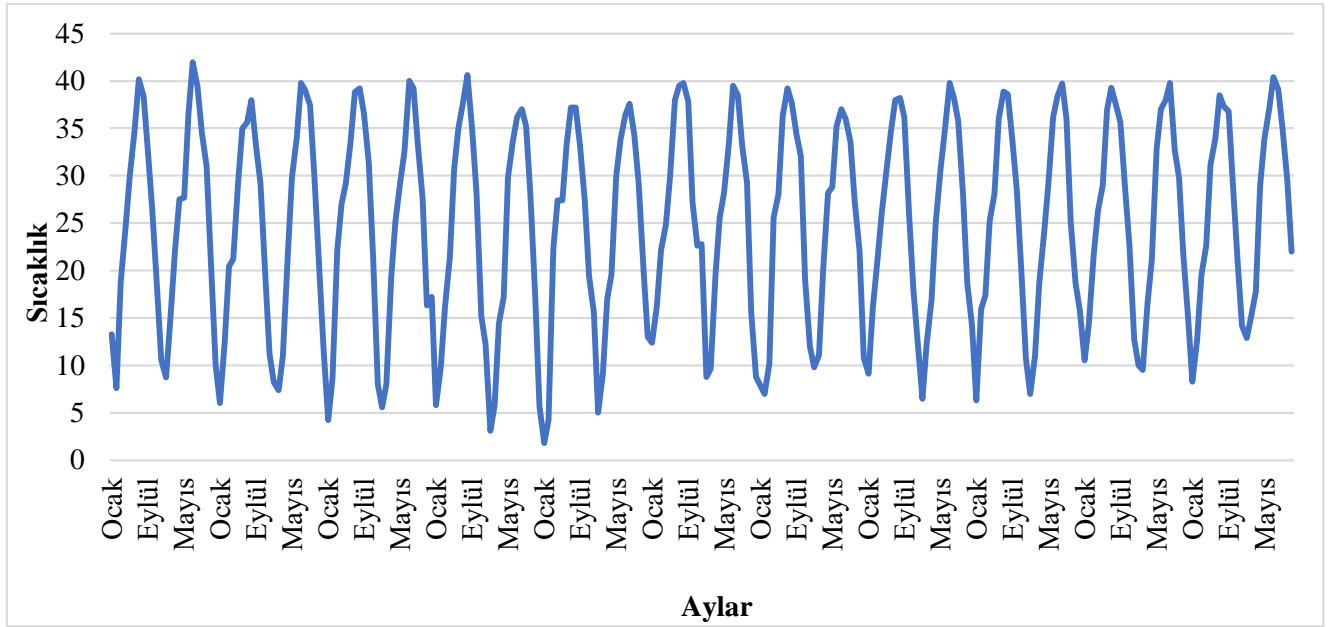
Parametre	Katsayı	Standart Hata	t	p
Sabit	24,113	0,342	70,566	0,001
t	0,006	0,002	2,690	0,01
$\sin \theta_i$	-9,037	0,241	-37,574	0,001
$\cos \theta_i$	-11,592	0,241	-48,042	0,001

*:p<0.05, **:p<0.01, ***<0.001

Tablo 3 incelendiğinde, elde edilmiş trigonometrik eğriye ilişkin tüm parametre tahminleri anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$). Buna göre;

$$Y = 24.113 + 0.006t - 9.037 \sin\left(\frac{2\pi t}{12}\right) - 11.592 \cos\left(\frac{2\pi t}{12}\right) + \varepsilon$$

şeklinde trigonometrik eğri yazılabilir. Modelin genel anlamlılığı incelendiğinde $F=1245.305$ ve $p<0.001$ 'dir. Belirleme katsayısı (R^2) 0.935 bulunmuştur. Bu durumda sıcaklık bağımsız değişkenler yani trend, sinüs ve kosinüs değişkenleri tarafından %93,5 oranında açıklanabilmektedir. Elde edilen trigonometrik eğri Şekil 1'de daha net görülmektedir.



Şekil 1. Bingöl’de 2000-2021 yılları arası aylara göre sıcaklık (°C)

Şekil 1’de görüldüğü gibi sıcaklık (°C) değerleri Mart ayı ile Ağustos ayları arasında artış eğiliminde daha yüksek iken, Eylül ayı ile Şubat ayları arasında daha düşük seyretmiştir. Bu durum ilerleyen yıllarda da benzer şekilde seyrederek periyodik bir şekilde devam etmiştir.

Farklı yer ve zamanlarda sıcaklık değerleri ile ilgili olarak istatistik analiz kullanılarak yapılmış bazı çalışmalar aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

Ye ve ark., (2013) çalışmalarında, deterministik stokastik birleştirilmiş (DSC) yaklaşımı kullanarak, mutlak yüzey sıcaklığının aylık kayıtlarını analiz etmek için genelleştirilmiş, yapısal bir zaman serisi modelleme çerçevesi kullandılar. Deterministik süreçler, sırasıyla polinom fonksiyonlarını ve Fourier yöntemini içeren küresel eğilimin değişim modellerini ve sıcaklık sinyalinin döngüsel salınımlarını karakterize etmek için kullanılırken, mevsimsellik dâhil olmak üzere sıcaklık sinyalinde kalan herhangi bir modeli açıklamak için stokastik süreçler kullandılar. Otoregresif entegre hareketli ortalama (SARIMA) modelleri, DSC modellerinin sıcaklık zaman serisindeki değişimlerin, doğrusal bir eğilimi, aylık verileri SARIMA (3, 1, 1)×(0, 1, 1)₁₂ şeklinde modellenmiştir.

Narasimha Murthy ve ark. (2021) tarafından yürütülen bir çalışmada da yapısal zaman serisi (STS) modeli ile yüzey hava sıcaklığı (SAT) meteorolojik parametresi kullanılmıştır. Hindistan bölgesi üzerindeki aylık ortalama gözlem değerlerini kullanarak SAT tahmin edilmiştir. Aylık ortalama SAT değeri, Mayıs ve Haziran aylarında maksimum sıcaklıklar ve Aralık ve Ocak aylarında minimum sıcaklıklar ile yıllık bir varyasyon gösterdiği saptanmıştır.

STS modeli analizi sonucuna göre, tüm bileşenlerin oldukça anlamlı olduğu, AIC = 1081,5, BIC = 1095,5, $R^2 = 0,98159$, düzeltilmiş $R^2 = 0,98156$ elde edilmiştir. 2017-2019 yılları arasında tahmin edilen aylık ortalama sıcaklıkların yılda yaklaşık 0.009 C⁰lık bir artış eğilimi olduğu saptanmıştır. Bu dönemde Nisan, Mayıs ve Aralık aylarında aylık ortalama sıcaklıkta 0,01 C⁰lık hafif bir artış ihtimali olduğu da ifade edilmiştir.

Diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile bu çalışmadaki sonuçlar, farklı çevre ve iklim şartlarının olması, farklı zaman aralıklarında değişik gözlem değerlerinin farklı istatistik yöntemleriyle analiz edilmesinden dolayı farklılık göstermiştir.

Sonuç

Bu çalışmamızda, 2000 Ocak-2021 Kasım dönemi Türkiye’de Bingöl ilinin ortalama sıcaklık değerleri sinüzoidal fonksiyonlar ile modellendi. Bu verilere ait hata kareleri toplamı minimum ve belirleme katsayısı (R^2) maksimum olacak şekilde bir sinüzoidal eğri denenmiştir. Dönem içinde hava sıcaklıkları Aralık, Ocak ve Şubat aylarında en düşük değerde olduğu, Mart, Nisan ve Mayıs aylarında biraz yükselişe geçtiği, Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında en yüksek seviyeye ulaştığı ve Eylül, Ekim ve Kasım aylarında düşüşe geçtiği görülmüştür. Bu durum her yıl periyodik olarak devam etmiştir. Fourier serileri yardımıyla oluşturulan sinüzoidal fonksiyonlara En Küçük Kareler Regresyonu ile eğri uydurma modeline göre, Bingöl ili hava sıcaklığı modeli trigonometrik eğri şeklinde olmuştur.

Elde edilen modelin parametre tahminleri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0.001$ ve $p < 0.01$). Modelin genel anlamlılığını test eden F değeri 1245,305 bulunmuştur ve istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.001$). Modele ait R^2 değeri 0.935 ve düzeltilmiş R^2 değeri ise 0.934 olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla modelin anlamlı olduğu ve elde edilen tahminlerin güvenilir olduğu anlaşılmaktadır. Yapılan analizle, hava sıcaklığı tahmin modeli için sinüzoidal eğri uydurulmasının uygun ve kullanışlı olduğu sonucuna varılmıştır. Son olarak bu ortaya konulan modelle hava sıcaklığının periyodikliği belirlenmiştir. Bu belirlenmiş periyodikliğe göre bölgede yer alan inşaat sektörü, tarım sektörü, mevsimsel turizm ve diğer ekonomik sektörlerin kendilerini bu tahminlere göre revize etmeleri tavsiye edilir. Bu çalışmanın diğer çalışmalara da ekonometrik açıdan ilham vermesi beklenmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler

Kaynakça

Abbass K, Qasim MZ, Song H, Murshed M, Mahmood H, Younis I., 2022. A review of the global climate change impacts, adaptation, and sustainable mitigation measures. *Environmental Science Pollution Research*, 29, 42539-42559.

Bayram M., 2002. Fen ve mühendisler için nümerik Analiz. Aktif Yayınevi, İstanbul, 374-377.

Bechini L, Bocchi S, Maggiore T, Confalonieri R., 2006. Parameterization of a crop growth and development simulation model at sub-model components level. An example for winter wheat (*Triticum aestivum L.*). *Environmental Modelling and Software*, 21, 1042-1054.

Bloomfield P., 2000. Fourier analysis of time series an introduction. John Wiley Sons, Inc, 9-14.

Buttkus B., 2000. Spectral analysis and filter theory in applied geophysics. Springer.

Caldiz DO, Gaspari FJ, Haverkort AJ, Struik PC., 2001. Agro-ecological zoning and potential yield of single or double cropping of potato in Argentina. *Agricultural and Forest Meteorology*, 109, 311-320.

Cesaraccio C, Spano D, Duce P, Snyder RL., 2001. An improved model for determining degree-day values from daily temperature data. *International Journal of Biometeorology*, 45, 161-169.

Chow DHC, Levermore GJ., 2007. New algorithm for generating hourly temperature values using daily maximum, minimum and average values from climate models. *Building Services Engineering Research and Technology*, 28(3): 237-248.

Gonzalez-Hidalgo JC, Salinas C, Peña-Angulo D, Brunetti M., 2018. A moving windows visual approach to analysing spatial variation in temperature trends on the Spanish mainland 1951–2010. *International Journal of Climatology*, 38(4): 1678-1691.

Granger CWJ., 1978. Seasonality: Causality, interpretation, and implications, in seasonal analysis of economic time series. Economic Research Report. U.S. Department of Commerce, ER-1, ed: Arnold Zeller.

IPCC., 2007: Technical summary. *Climate Change 2007: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, S. Solomon et al., Eds., Cambridge University Press, Cambridge, 74pp.

Kadırlar C., 2009. SPSS uygulamalı zaman serileri analizine giriş. Bizim Büro Kitabevi, s299, Ankara.

Khuri AI., 2003. Advanced calculus with applications in statistics. John Wiley Sons, Inc., Canada, 471.

Lan L, Lian Z, Pan L., 2010. The effects of air temperature on office workers' wellbeing, workload and productivity-evaluated with subjective ratings. *Applied Ergonomics*, 42, 29-36.

Lazo JK, Lawson M, Larsen PH, Waldman DM., 2011. US economic sensitivity to weather variability. *Bulletin of the American Meteorological Society*, 92(6): 709-720.

Li J, Liu C., 2022. Cubic trigonometric Hermite interpolation curve: construction, properties, and shape optimization. *Journal of Function Spaces*, 2022: 1-16.

Narasimha Murthy KV, Saravana R, Kishore Kumar G, Vijaya Kumar K., 2021. Modelling and forecasting for monthly surface air temperature patterns in India, 1951–2016: Structural time series approach. *Journal of Earth System Science*, 130:21.

Narula P, Sarkar K, Azad S., 2018. A functional evaluation of the spatiotemporal patterns of temperature change in India. *International Journal of Climatology*, 38(1): 264-271.

Parton WJ, Logan JA., 1981. A model for diurnal variation in soil and air temperature. *Agricultural for Meteorology*, 23, 205-216.

Pauly D, Liang C., 2022. Temperature and the maturation of fish: a simple sine-wave model for predicting accelerated spring spawning. *Environmental Biology of Fishes*, 105(10): 1481-1487.

Romilly P., 2005. Time series modeling of global mean temperature for managerial decision-making. *Journal of Environmental Management*, 76, 61-70.

Rudin W., 1953. Principles of mathematical analysis. McGraw-Hill Book Company, Inc., USA, 154.

Salas JD, Yevjevich V., 1972. Stochastic Structure of water use time series. *Hydrology Papers*, No. 52, Colorado State University, Fort Collins-Colorado, 71.

Sardans J, Penuelas J, Estiarte M., 2006. Warming and drought alter soil phosphatase activity and soil P availability in a Mediterranean shrubland. *Plant Soil*, 289, 227-238.

Schulte PA, Bhattacharya A, Butler CR, Chun HK, Jacklitsch B, Jacobs T, Kiefer M, Lincoln J, Pendergrass S, Shire J, Watson J, Wagner GR., 2016. Advancing the framework for considering the effects of climate change on worker safety and health. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 13, 847-865.

Spiegel MR., 1963. Advanced calculus. Mc-Graw Hill Inc., New York, 298-300.

Ustaoglu B, Cigizoglu HK, Karaca M., 2008. Forecast of daily mean, maximum and minimum temperature time series by three artificial neural network methods. *Meteorological Applications: A Journal of Forecasting, Practical Applications, Training Techniques and Modelling*, 15(4): 431-445.

Verdoodt A, Van Ranst E, Ye L., 2004. Daily simulation of potential dry matter production of annual field crops in tropical environments. *Agronomy Journal*, 96, 1739-1753.

Wanishsakpong W, Notodiputro KA., 2018. Locally weighted scatter-plot smoothing for analysing temperature changes and patterns in Australia. *Meteorological Applications*, 25(3): 357-364.

Wilkerson GG, Jones JW, Boote KJ, Ingram KT, Mishoe JW., 1983. Modeling soybean growth for crop management. *Trans ASAE*, 26, 63-73.

Wit CT, Goudriaan J, Laar HH., 1978. Simulation of assimilation, respiration and transpiration of crops. Center for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, The Netherlands.

Ye L, Yang G, Van Ranst E, Tang H., 2013. Time-series modeling and prediction of global monthly absolute temperature for environmental decision making. *Advances in Atmospheric Sciences*, 30, 382-396.

Fasulyenin Yüksek Sıcaklık Koşullarında Anormal Gelişim Morfolojisinin Moleküler Mekanizması

Şükran YILDIZ^{1*}, Dilek TEKDAL²

¹Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji ABD, Mersin

²Mersin Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Mersin

¹<https://orcid.org/0000-0001-7896-4748>

²<https://orcid.org/0000-0002-4545-9005>

*Sorumlu yazar: dilektekdal@mersin.edu.tr

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 31.01.2024

Kabul tarihi: 11.08.2024

Online Yayınlanma: 17.03.2025

Anahtar Kelimeler

Bitişik yapraklılık

Bitlis-76

FASCIATA geni

Fasulye

Yüksek sıcaklık

ÖZ

Baklagiller protein içeriğinin yüksek olmasından kaynaklı olarak dünyada ve ülkemizde en çok tüketilen gıdalar arasında bulunmaktadır. Baklagiller arasında yer alan fasulye zengin besin değerinden dolayı insan gıdasında oldukça önemli bir yere sahiptir. Fakat, küresel ısınma ile artan sıcaklık yetiştirilen bitkilerin strese girmesine sebep olmaktadır. Çok yüksek sıcaklıklarda yetiştirilen bitkilerde verim kayıpları yaşanmakta ve aynı zamanda genlerinde bazı mutasyonlar meydana gelmektedir. Bu çalışmada, Bitlis-76 (*Phaseolus vulgaris* L.) fasulye genotipi Mersin Üniversitesi sera alanında yetiştirilmiştir. Bitkinin yetiştirildiği bahar döneminde ani yükselen sıcaklık nedeni ile bitkide anormal morfolojide organ gelişimi gözlenmiştir. Bitkinin yapraklarında ve meyvesinde ayrılmama durumu olarak nitelendirilen bitişik yapraklılık ve bitişik bakla durumu saptanmıştır. Bu nedenle, organların ayrılmama durumunun aydınlatılması sebebiyle *P. vulgaris*'in bitişik yaprak ve baklasından RNA izolasyonu yapılmıştır. Ancak, baklasından kaliteli RNA izolasyonu gerçekleştirilemediğinden ileri analizler bitişik yapraklardan elde edilen RNA ile gerçekleştirilmiştir. Literatürde organ gelişimi üzerine etkili olduğu bilinen *Wuschel* (*WUS*), *Clavata* (*CLV*) ve *Fasciata* (*FAS*) genlerinin ekspresyon seviyesi incelenmiş ve Bitlis-76 fasulye genotipinde gözlenen ayrılmama durumu üzerine bu genlerin etkileri araştırılmıştır. Bitişik yapraktaki *FAS* geninin ekspresyonu kontrol bitkisine göre oldukça yüksek çıkmıştır. Sürgün apikal meristem hücrelerinin düzenlenmesinde sorumlu olduğu bilinen *FAS* geninin ifade düzeyinin Bitlis-76 fasulye genotipine ait bitişik yaprak örneklerinde yüksek çıkması bu genin bu durum üzerinde etkili olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Sunulan bu çalışma Bitlis-76 fasulye genotipinde oluşan anormal yaprak gelişimi üzerine *FAS* geninin etkisini araştıran ilk çalışma olma niteliğindedir.

Molecular Mechanism of Abnormal Developmental Morphology of Bean under High Temperature Conditions

Research Article

Article History:

Received: 31.01.2024

Accepted: 11.08.2024

Available online: 17.03.2025

ABSTRACT

Legumes are among the most consumed foods in the world and our country due to their high protein content. Beans have an essential for human nutrition among the legumes due to their rich nutritional value. However, the increased

Keywords:

Contiguous leaves
Bitlis-76
FASCIATA gene
Beans
High temperature

temperature with global warming causes the plants grown to be stressed. Plants grown at very high temperatures experienced yield losses, and at the same time, some mutations occur in their genes. In this study, the bean genotype Bitlis-76 (*Phaseolus vulgaris* L.) was grown in the greenhouse area of Mersin University. In the spring period when the plant was grown, abnormal organ development morphology was observed due to the sudden increase in temperature. Contiguous leaves and adjacent pods, characterized as non-separation, were observed in the leaves and fruit of the plant. Therefore, RNA was isolated from adjacent leaves and pods of *P. vulgaris* to elucidate the non-separation state of the organs. However, since quality RNA isolation from the pod could not be performed, further analyzes were performed with RNA from adjacent leaves. The expression level of *WUSCHEL* (*WUS*), *CLAVATA* (*CLV*), and *FASCIATA* (*FAS*) genes, which are known to be influential on organ development in the literature, were examined, and the effects of these genes on the non-disjunction observed in the Bitlis-76 bean genotype were investigated. Expression of the *FAS* gene in the adjacent leaf was significantly higher than in the control plant. Because the expression level of the *FAS* gene, known to regulate shoot apical meristem cells, was high in adjacent leaf samples belonging to the Bitlis-76 bean genotype, it was interpreted that this gene may affect this situation. This study is the first to investigate the effect of the *FAS* gene on abnormal leaf development in the Bitlis-76 bean genotype.

To Cite: Yıldız Ş, Tekdal D., 2025. Fasulyenin yüksek sıcaklık koşullarında anormal gelişim morfolojisinin moleküler mekanizması. Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi Dergisi, 5(1): 59-69.

Giriş

Dünya nüfusu yaklaşık 7,5 milyar kişiden oluşmaktadır ve 2050 yılına kadar bu oranın 9-10 milyara ulaşacağı bildirilmektedir (Anonim 2022a). Bu durum göz önünde bulundurulduğunda, artan nüfusa karşılık olarak insan beslenmesi için gıda veriminin artırılması gerekmektedir. Fakat, insan gelişiminde en büyük etkene sahip olan proteinin elde edildiği gıdalar sera gazı emisyonlarından, su eksikliğinden, yüksek sıcaklıklardan ve birçok dış etmenlerden büyük oranda etkilenmektedir (Poore ve Nemecek, 2018). Oluşan biyotik ve abiyotik streslerden kaynaklı verim düşüşlerine rağmen insanlar vücut sağlığını desteklemek için esansiyel amino asitler açısından zengin ve yüksek oranda protein tüketmek zorundadır (Anonim 2022b). Yüksek kaliteli proteinin ana kaynakları olarak et, kümes hayvanları, balık, yumurta, kabuklu yemişler ve baklagiller ile süt, yoğurt ve peynir gibi ürünler gösterilmektedir (Godfray ve ark., 2018). İnsan tüketiminde önemli bir yere sahip olan bitkisel kaynaklar içerisinde bitkisel proteinin ana kaynağını (%22) oluşturan baklagiller, et ürünlerine alternatif olarak insan beslenmesinde önemli yer tutmaktadır (Adak ve ark., 2010). Zengin besin değerinin yanı sıra baklagiller, azot fiksasyonu yoluyla toprak kalitesini arttırmakta ve azotlu gübrelere olan ihtiyacı azaltmaktadır (Foyer ve ark., 2016).

Baklagil türleri arasında yer alan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), Fabaceae familyasının besin değeri açısından en zengin üyeleri arasında yer almaktadır (Kaplan, 2003). Gen merkezinin Amerika ve Güney Asya olduğu belirtilen fasulye (*P. vulgaris*) sıcak-ılıman iklimlere iyi adapte olmuş ve dünyada oldukça geniş bir ekim alanına sahip sıcak iklim bitkisidir. Çimlenme döneminde sıcak,

çiçeklenme döneminde ise kuraklığa ve düşük nisbi neme hassastır. Fakat, çok yüksek sıcaklıklarda diğer pek çok bitki gibi strese girmektedir ve verim kaybı ile genlerinde bazı mutasyonlar oluşmaktadır (Şehirli, 1988). Bu genlerden bazıları bitkinin toprak üstü gelişiminden sorumlu olan ve sürgün apikal meristem (SAM) hücrelerinin düzenlenmesinde yardımcı olan *Wuschel* (*WUS*), *Clavata* (*CLV*) ve *Fasciata* (*FAS*) genleridir.

Meristem genişlemesi *Wuschel* (*WUS*) geni ve bu genin negatif düzenleyicileri olan *Clavata* (*CLV*), *Fasciata* (*FAS*) ve *Stamina Pistilloida* (*STP*) gibi diğer arasındaki etkileşim ile kontrol edilmektedir (Bäurle ve Laux, 2003). *WUS* proteini, sürgün ve çiçek meristemlerinde hücre popülasyonlarının korunmasında merkezi bir rol oynamaktadır (Laux ve ark., 1996; Mayer ve ark., 1998; Veit, 2004). *WUS*, her sürgün meristeminde uygun sayıda pluripotent gövde hücrelerini koruyarak sürgün meristeminin boyutunu pozitif olarak düzenlemektedir. *CLV*'ler, *WUS* ifadesini baskılayarak meristemlerin boyutlarını negatif olarak düzenlemektedir (Schoof ve ark., 2000; Reddy, 2008). Örneğin, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ile yapılan bir çalışmada *WUS-1* mutantlar oluşturulmuştur ve bunun sonucunda birkaç yaprak oluşuktan sonra sürgün meristemlerin kaybolduğu gözlenmiş olup bu durumun *WUS* üretiminin olmadığı meristemlerde hücre popülasyonunun korunamamasından kaynaklı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Laux ve ark., 1996). Bunun tam tersi olarak, *WUS*'un ektopik ekspresyonu, sürgün meristemlerin boyutunu arttırmaktadır ve dokulardaki sürgünlerin ve somatik embriyoların ortaya çıkmasıyla sonuçlanan meristem hücrelerin anormal birikimini indüklemektedir (Zuo ve ark., 2002; Gallois ve ark., 2004). *FASCIATA* (*FAS1* ve *FAS2*) geni apikal meristemlerin organizasyonu ve fonksiyonunun düzenlenmesinde etkili rol almaktadır. Ayrıca, *FAS* genlerinin, *Arabidopsis* bitkisinde kromatin montaj faktörü 1 (chromatin assembly factor-1; CAF-1)'in altı birimine karşılık geldiği belirlenmiştir. *FAS* kompleksinin fonksiyonel rolünün, DNA replikasyonu yoluyla epigenetik durumların stabil yayılmasını sağlayarak (muhtemelen CAF-1 aktivitesi yoluyla), apikal meristemlerde gen ekspresyonunun stabil kalmasını kolaylaştırmak olduğu belirtilmiştir (Kaya ve ark., 2001).

Sıcaklık etkisiyle sürgün apikal meristemin düzenlenmesinden sorumlu olan *WUS*, *CLV* ve *FAS* genlerinin ekspresyonlarında yüksek sıcaklık nedeni ile meydana gelen değişimler bitkinin yaprak, meyve veya çiçeklerinde değişikliklere sebep olduğundan bu çalışmada sera'da yetiştirilen Bitlis-76 fasulye genotipinde meydana gelen birleşik yaprak ve bakla örnekleri üzerinde çalışılmıştır. Bitki dokusunda anormal yapıda yaprak ve baklaların oluşması verim kayıplarına sebep olacağından protein bakımından zengin bitkisel bir besin olan fasulyelerde bu farklılıklarının moleküler olarak incelenmesi oldukça önemlidir. Fasulyede meydana gelen birleşik yaprak ve bakla

durumunun moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına dair bir çalışma bulunmadığından yapılan bu çalışmanın literatürdeki boşluğun giderilmesinde kaynak olacağı düşünülmektedir.

Materyal ve Metod

Bitki materyalinin yetiştirilmesi

Bu araştırmada, *P. vulgaris*'un bir yerel popülasyonu olan Bitlis-76 genotipi kullanılmıştır. Bitlis-76 tohum rengi siyah renk skalasına sahip olup bakla yapısı kısadır (Akça ve Tekdal, 2023). Bitlis-76 tohumları Mersin Üniversitesi sera alanında Nisan 2020 tarihinde hindistan cevizi kabuğu ve torf (1:1) karışımı bulunan bir viyole ekilmiştir. Tohum ekimini takip eden 4. günden itibaren çimlenmeler başlamıştır. Çalışma 3 tekrarlı ve her tekrar 10 adet tohum içerecek şekilde gerçekleştirilmiştir. Viyolde gelişen bitkiler saksılara transfer edilmeden önce budanmıştır. Bitkiler saksılara aktarılırken ilk stresi ortadan kaldırmak ve kök teşvikini arttırmak amacıyla can suyu ile birlikte humik fulvik asit (%39) (Erdal ve ark., 2014) uygulaması yapılmıştır. Bitkiler çimlendikten sonra bahçe toprağı ile doldurulmuş saksıya aktarılmıştır. Bitkiler serada doğal ışık altında %80 bağıl nemde büyütülmüştür. Morfolojik incelemeler sırasında gözlenen birleşik yaprak ve bakla materyalleri hasat edilmiş ve sıvı azot kullanılarak dondurulmuştur. Aynı şekilde ileri analizlerde kontrol olarak kullanılmak üzere Bitlis-76 bitkisinde normal yapıda bulunan yaprak ve bakla materyalleri de alınmış ve hızlıca sıvı azot uygulaması ile (-196°C) dondurulmuştur. Örnekler RNA izolasyonu gerçekleşinceye kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

RNA izolasyonu, agaroz jel elektroforezi ve cDNA sentezi

Total RNA izolasyonunda -80°C'de muhafaza edilen birleşik yaprak ve bakla örnekleri ile kontrol örnekleri (normal yapılı yaprak ve bakla örnekleri) (~500 mg) için kit (Zymo Research, Quick-RNA Kit, ABD) kullanılmış olup izolasyon üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Tekdal, 2015). Total RNA izolasyonu sırasında tüm adımlar oda sıcaklığında gerçekleşmiştir (25±2°C). Yaklaşık 100 mg örnek sıvı azot ile öğütülmüş ve RNA Lysis Buffer ile muamele edilerek Spin-Away filtresi sarı) içerisine aktarılmıştır. Örnek, 16.000 x g hızında santrifüj edilerek süzülen süpernatant 1:1 oranında etanol (%95-100) ile karıştırılmıştır. Karışım bir Zymo-Spin kolonuna (yeşil) aktarılmış ve santrifüj edilmiştir. Altta kalan süpernatant atıldıktan sonra, kolon içerisinde kalan RNA'lara DNase I4 uygulanmıştır. Ardından kolona 400 µl RNA Prep Buffer eklenmiş ve santrifüj edilmiştir. Bu işlem, kolona sırasıyla 700 µl ve 400 µl RNA Wash Buffer eklenerek tekrarlanmıştır. Son olarak, kolon dikkatlice nükleaz içermeyen steril bir tüpe yerleştirilmiş ve 100 µl DNase/RNase-Free su eklenerek santrifüj edilmiştir. Nano Drop spektrofotometre kullanılarak 260 nm'de izole edilen RNA'ların absorbans değerine bakılmıştır.

İzole edilen RNA'lardan 5 µl alınarak üzerine 1 µl loading dye ilave edilmiş ve örnekler %2'lik agaroz jelde 0.5x TBE (Tris Base, Boric Acid, EDTA) tamponu eklenerek çalışılmıştır. Jel %0.1 etidyum bromür solüsyonu ile boyanmıştır. Amplifikasyon ürünlerinin varlığı, UV ışığı altında fotoğraflanarak belirlenmiştir. Jel görüntüsünden sonra RNA'sı tespit edilen materyallerin RNA'larının cDNA sentezi SensiFast™ cDNA Synthesis Kit (Bioline) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Analizi (qPCR)

SybrGreen kantifikasyonu için Real-Time PCR koşulları, Roche LightCycler 480 II SybrGreen I Master veri sayfasına dayalı olarak belirlenmiştir. Göreceli kantitatif PCR sonuçları, üreticinin talimatlarına göre SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. mRNA seviyeleri, Dr. Dilek Tekdal'ın doktora tez çalışmaları kapsamında sentezini gerçekleştirdiği WUS, CLV ve FAS primerleri (Tekdal, 2015; Tablo 1) kullanılarak qRT-PCR ile değerlendirilmiştir. Fabaceae'nin 18S rRNA'sından türetilen primer (Song 2005; Tablo 1), bir dahili kontrol olarak kullanılmış ve ifade, 18S rRNA ifadesine göre normalleştirilmiştir.

Tablo 1. Quantitative Real-Time (qRT) PCR analizinde kullanılan primerlere ait bilgiler

Gen İsmi	Kısaltma	Sekans (5' - 3')	Tanım	Referans
<i>WUSCHEL B</i>	<i>WUS3</i>	CTTCTGYTGARATGRTTACTG	WUS3/sense primer	(Tekdal, 2015)
	<i>WUS4</i>	GCATAGGGAATAAAGGGAG	WUS4/antisense primer	
<i>FASCIATA B</i>	<i>FAS1</i>	TGGAGGAGAGYGAVCTTCC	FAS1/sense primer	(Tekdal, 2015)
	<i>FAS3</i>	AAACAACACRCTACTYTTTCCAC	FAS3/antisense primer	
<i>CLAVATA B</i>	<i>CLV3</i>	GGGASMCTTCTGRTTG	CLV3/sense primer	(Tekdal, 2015)
	<i>CLV4</i>	ATGATGYAGHGGRTCTGGACC	CLV4/antisense primer	
18S rRNA	18S-F	TACCGTCCTAGTCTCAACCATAA	18S/sense primer	(Song, 2005)
	18S-R	AGAACATCTAAGGGCATCACA	18S/antisense primer	

Bulgular ve Tartışma

Bitlis-76, Mersin Üniversitesi serasında yetiştirildiği sırada (Şekil 1) ani değişen hava koşulları neticesinde yüksek sıcaklıklara maruz kalmıştır. Serada fideler üzerinde yapılan morfolojik (makroskobik) gözlemler sonucunda bitki dokularında (yaprak ve bakla yapısında) diğer bitkilere göre anormal farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 2). Bitlis-76 çeşidine ait 30 birey ile yapılan

çalışma sonucunda 7 bireyde yaprakların bitişik olma durumu saptanmıştır. Bu durumun moleküler mekanizmasının aydınlatılması için birleşik yaprak ve bakla örnekleri hasat edilmiş ve hızlıca dondurularak -80°C de muhafaza edilmiştir.



Şekil 1. Bitlis-76 (*Phaseolus vulgaris* L.)'nin seradaki görüntüsü



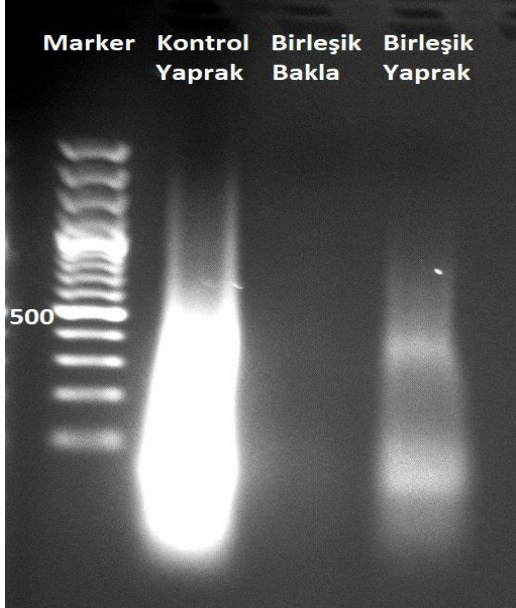
Şekil 2. Bitlis-76 yaprak ve meyve görüntüleri. (A) Kontrol bitkisinin yaprağı, (B) Kontrol bitkisinin meyvesi, (C) Bitişik yaprak, (D) Bitişik meyve

Şekil 2C'de ayrı olması gereken üç yaprağın birleşik morfolojide olduğu görülmektedir. Birleşik bakla yapısı incelendiğinde ise bu bakla yapısında tohum oluşumunun gerçekleşmediği görülmüştür (Şekil 2D).

RNA izolasyonu izole edilen ve -80°C de muhafaza edilen Bitlis-76 fasulye genotipine ait tüm örnekler ile (normal yaprak ve bakla ile birleşik yaprak ve bakla) gerçekleştirilmiştir. Ancak, birleşik bakla ile yapılan RNA izolasyon çalışmaları başarılı olamamış ve ileri analizler kullanmak için ihtiyaç duyulan total RNA'ların izolasyonu gerçekleşmemiştir. Birleşik bakla yapısı incelendiğinde (Şekil 2D) dokunun izolasyon için yeterli düzeyde canlı hücreye sahip olmadığı renk

ve yapısından anlaşılmaktadır. Birleşik bakla örneğinden istenilen düzeyde ve kalitede total RNA'lar izole edilemediğinden ileri analizler yaprak materyalleri ile gerçekleştirilmiştir.

Birleşik yaprak ile normal tip yaprak örneklerinden RNA izolasyonu başarı ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3). İzole edilen RNA'lar ile elektroforez işlemi gerçekleştirilmiş ve izole edilen RNA'ların agaroz jel görüntüleri neticesinde bütünlüğünü koruduğu ve 18S ve 28S ribozomal RNA bantları ile iyi kalitede olduğu görülmüştür (Şekil 3).



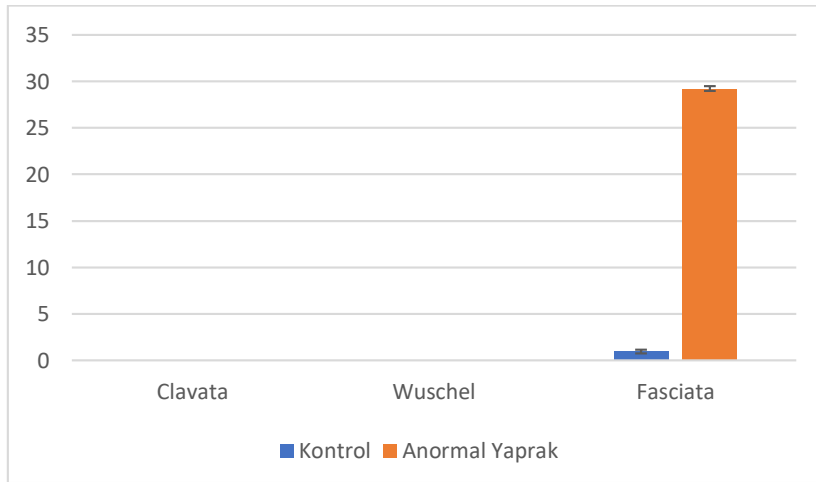
Şekil 3. %2'lik jel elektroforez görüntüsü

İlave olarak, izole edilen RNA'ların agaroz jel görüntüleri incelendiğinde genomik DNA kontaminasyonunun olmadığı görülmektedir. Bu nedenle, gDNA'nın ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu sırasında amplifiye edilme gibi bir durum oluşmayacağından izole edilen RNA'lar cDNA sentezi için kullanılmıştır. Toplam RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve ardından qRT-PCR analiz sonucunun güvenilirliği açısından en belirleyici faktörlerden biridir. Bu örneklerden cDNA sentezi gerçekleştirilmiş ve sentez sonrası elde edilen cDNA'lar kantitatif RT-PCR analizinde ana materyal olarak kullanılmıştır.

Bitlis-76 fasulye genotipinde yapraklarında oluşan anormal morfolojilerin sebepleri hakkında moleküler olarak daha fazla bilgi edinmek amacı ile *WUS*, *CLV* ve *FAS* genlerinin ekspresyon seviyeleri RT-qPCR kullanılarak analiz edilmiştir. Anormal morfolojideki yaprak örneğinde *WUS*, *FAS* ve *CLV* ekspresyonları küçük miktarlardaki örnekleri belirtmek için daha kullanışlı olduğu düşünülen 96 kuyucuklu plakta toplam 20 µl hacimde qRT-PCR ile araştırılmıştır. Bu veriler, ekspresyon çalışmasının belirli bir gen grubu üzerinde odaklanılmasına yardımcı olmaktadır. qRT-PCR analizi sırasında, Fabaceae familyasında tanımlanan 18S rRNA (Song, 2005; Tablo 1), PCR

reaksiyonlarının sonuçlarını analiz etmek için dahili referans olarak kullanılmıştır ve lineer fazda düşük döngü sayısında hedeflenen genlerin ekspresyon seviyelerinin nicelleştirilmesi için önemlidir.

Gen ekspresyon analizi sonucunda, anormal morfoloji gösteren birleşik yapraktaki *FAS* geninin ekspresyon seviyesinin kontrol bitkisine göre 29,24 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4). Fakat, *CLV* ve *WUS* genlerinin hem kontrol bitkisine ait yaprak materyalinde hem de birleşik yaprak materyalinde ifade seviyelerinin çok düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4).



Şekil 4. Bitlis-76 genotipinde kontrol yaprağında ve anormal morfoloji gösteren yaprağındaki *WUS*, *FAS* ve *CLV* genlerinin ekspresyon profilleri

WUS ve *CLV* genlerinin kontrol materyalinde de seviyelerinin çok düşük olmasının nedeni olarak; (1) RT-qPCR sırasında primer bağlanma sorunun yaşanmış olabileceği, (2) bu genlerin yaprak dokusunda ifade düzeylerinin *FAS* geninin ifadesinden etkilenmiş olabileceği ve (3) yaprak dokusu gelişim aşamasında *FAS* ekspresyon seviyesinin keskin bir şekilde artış gösterdiği ve bu nedenle *WUS* ve *CLV* gen ekspresyonunu inhibe edilebileceği şeklinde yorumlanmıştır. İlave olarak, ilgilenilen genlerin çok düşük bir seviyede eksprese edilmesi veya geçici olarak eksprese edilmesi durumunda, transkript miktarının qRT-PCR sırasında sinyali tespit etmek için çok düşük olması da olasıdır. Bu nedenle, *WUS* ve *CLV* genlerinin ekspresyonu üzerine çalışma farklı primerler kullanılarak derinleştirilmelidir. Bununla birlikte, *FAS* geninin birleşik yaprak dokusunda yüksek ekspresyon seviyesinde bulunmasının yapraklarda anormal morfolojilere sebep olabileceği düşünülmektedir.

FAS mutantlarında sürgün apikal meristeminde (SAM) farklı fonksiyonel bölgelerin generatif hücre katmanlarının bozulmasına sebep olduğu bildirilmiştir (Kaya ve ark., 2001; Sinjushin 2013). Bu sonuç, *FAS* genlerinin SAM'de bulunan hücrelerel organizasyonun korunmasında rol aldığını göstermektedir. Ayrıca, SAM'de *WUS* ekspresyonunun ve kök apikal meristemi'nde *SCARECROW*

(*SCR*) ekspresyonunun stabil bir şekilde korunmadığı bildirilmiştir (Kaya ve ark., 2001). *FAS* genleri ağırlıklı olarak apikal meristemlerde eksprese edilmektedir (Leyser ve Furner, 1992). Leyser ve Furner (1992), *Arabidopsis*'in *fas1* ve *fas2*'sini, kök fasiyasyonuna, anormal filotaksiye ve daha kısa köklere neden olan mutasyonlar olarak tanımlanmışlardır (Leyser ve Furner, 1992) ve benzer bulgular Reinholz (1966) yayınında da belirtilmiştir (Reinholz, 1966). Bozulmuş filotaksi ile ilişkili gövde fasiyasyonu, çeşitli bitkilerde bildirilen bir anormalliktir ve bu anormallikler SAM'de meydana gelen kusurlarla ilişkilendirilmiştir (Gorter, 1965). Ayrıca, Kaya ve ark. (2001), *Arabidopsis* T87 ve tütün BY-2 hücreleri kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada, *FAS1* ekspresyonunun G1/S geçişi ile ilişkili olduğunu raporlamışlardır (Kaya ve ark., 2001). Kaya ve ark. (2001) çalışmasının aksine, bu çalışmada *FAS* gen ekspresyonunun kontrol bitkisine göre yüksek çıktığı tespit edilmiştir. *FAS* geninin SAM de bulunan hücrelerin farklılaşmasında ve gelişmesinde rol oynadığı bilinmekte (Kaya ve ark., 2001) olup bu bilgi, bizim çalışmamız sonucunda Bitlis-76 fasulye genotipinde oluşan anormal yaprak yapısının *FAS* geninin aşırı ekspresyonundan kaynaklı olabileceğini destekler niteliktedir. Kaya ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada elde ettikleri *FAS* mutant bitkilerden yola çıkarak *FAS* geninin SAM'deki hücrel organizasyonu bozduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen bulgular yüksek seviyede *FAS* geninin ekspresyonunun SAM'deki hücrel organizasyonu değiştirerek anormal yaprak oluşumuna neden olabileceği ihtimalini göstermektedir.

Sonuç

Yaprakta ve baklada oluşan anormallikler verim düşüşlerine neden olmaktadır. Fasulyenin besin değerinin yüksek ve insanların beslenme sağlığı açısından önemini düşünecek olursak verimde oluşabilecek azalmaların sebeplerini anlamak ve sıcaklık ile tetiklenen stres durumunda fasulye genotiplerinde anormal morfoloji oluşumunun moleküler mekanizmasını araştırmak adına bu çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmadan elde edilen bilgiler bitkilerin anormal morfoloji gelişimleri üzerine yapılacak çalışmalar için kaynak niteliğindedir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Kaynaklar

Adak MS, Güler M, Kayan N., 2010. Yemelik baklagillerin üretimini artırma olanakları. Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, 11-14 Ocak 2010, Ankara: Türkiye.

Akça İ, Tekdal D., 2023. Farklı fasulye (*phaseolus vulgaris l.*) genotipinin Mersin İli iklim koşullarındaki gelişim durumunun morfolojik olarak incelenmesi. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6(3): 1981-1989.

Anonim., 2022a. World population prospects-Population division-United Nations. Department of International Economics. Retrieved from <https://population.un.org/wpp/>. (Accession date: 14.11.2022).

Anonim., 2022b. Protein and amino acid requirements in human nutrition: Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43411> (Accession date: 14.11.2022).

Bäurle I, Laux T., 2003. Apical meristems: the plant's fountain of youth. BioEssays, 25(10): 961-970.

Erdal İ, Küçükyumuk Z, Taplamacıoğlu D, Toftar B., 2014. Kireçli bir toprakta humik ve fulvik asit uygulamalarının domatesin gelişimi ve beslenmesine etkileri. Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Dergisi, 2(2): 70-74.

Foyer CH, Lam HM, Nguyen HT, Siddique KHM, Varshney RK, Colmer TD, Conside MJ., 2016. Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. Nature Plants, 2(8): 1-10.

Gallois JL, Nora FR, Mizukami Y, Sablowski R., 2004. WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. Genes and Development, 18(4): 375-380.

Godfray HCJ, Aveyard P, Garnett T, Hall JW, Key TJ, Lorimer J, Jebb SA., 2018. Meat consumption, health, and the environment. Science, 361(6399): eaam5324.

Gorter CJ., 1965. Origin of fasciation. W Ruhland (Ed.), Encyclopedia of Plant Physiology, Springer, Berlin: Ed. Ruhland W) 330-351.

Kaplan L., 2003. Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico and Central America. Economic Botany, 57(3): 421-421.

Kaya H, Shibahara K, Taoka K, Iwabuchi M, Stillman B, Araki T., 2001. FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. Cell, 104(1): 131-142.

- Laux T, Mayer KF, Berger J, Jürgens G., 1996. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 122(1): 87-96.
- Leyser HMO, Furner IJ., 1992. Characterisation of three shoot apical meristem mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 116(2): 397-403.
- Mayer KFX, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G, Laux T., 1998. Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell*, 95(6): 805-815.
- Poore J, Nemecek T., 2018. Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, 360(6392): 987-992.
- Reddy GV., 2008. Live-imaging stem-cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Current Opinion in Plant Biology*, 11, 88-93.
- Reinholz E., 1966. Radiation induced mutants showing changed inflorescence characteristics. *Arab Information Management Services*, 3, 19-20.
- Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KF, Jürgens G, Laux T., 2000. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell*, 100(6): 635-644.
- Sinjushin A., 2013. Origin and variation of polymeric gynoecia in Fabaceae: evidence from floral mutants of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Systematics and Evolution*, 300, 717-727.
- Şehirli S., 1988. Yemelik dane baklagiller. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara.
- Song J., 2005. Genetic diversity and flowering in *Clanthus* and New Zealand *Sophora* (Fabaceae). Massey University Plant Molecular Biology, Palmerston North, New Zealand Doctoral dissertation.
- Tekdal D., 2015. Studies on molecular and genetic characterization of the genes responsible for the multicarpellary gynoecium in *Thermopsis turcica*. Sabanci University Biological Sciences and Bioengineering Doctoral dissertation, İstanbul, Turkey.
- Veit B., 2004. Determination of cell fate in apical meristems. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(1): 57-64.
- Zuo J, Niu QW, Frugis G, Chua NH., 2002. The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 30(3): 349-359.

Solution of Initial Boundary Value Problems for the Nonlinear Stationary Quasi-Optical Equation with Special Gradient Term

Gabil YAGUB¹, Mehmet VURAL^{2*}

¹Kafkas University Faculty of Science and Literature, Department of Mathematics, Kars Türkiye

²Hatay Mustafa Kemal University Faculty of Science and Literature, Department of Mathematics, Hatay Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0002-8343-4087>

²<https://orcid.org/0000-0002-0977-7479>

*Corresponding author: mvural@mku.edu.tr

Research Article

ABSTRACT

Article History:

Received: 11.01.2025

Accepted: 04.02.2025

Available online: 17.03.2025

Keywords:

Quantum mechanics

Nonlinear quasi-optical equation

Initial boundary value

Problem

Existence and uniqueness

Gradient term analysis

This study examines a fundamental problem in quantum mechanics: the initial boundary value problem for a stationary, nonlinear quasi-optical equation with a specific gradient. This complex equation, which surpasses the previously studied nonstationary linear Schrödinger equation, offers more accurate models of particle behavior at the microscopic level. The research defines the problem as a first-kind problem, then meticulously formulates the necessary and sufficient conditions for its solution. Theorems on the existence and uniqueness of the solution are proven, and an estimate of the solution is obtained. This work is significant for quantum mechanics and optics, particularly in understanding electromagnetic wave propagation when wavelengths are comparable to the optical system's dimensions. The findings contribute to optical design and engineering applications, offering new insights beyond classical physics.

Özel Gradyent Terimli Doğrusal Olmayan Durgun Kuazi-Optik Denklemi İçin Başlangıç Sınır Değer Problemlerinin Çözümü

Araştırma Makalesi

ÖZ

Makale Tarihçesi:

Geliş tarihi: 11.01.2025

Kabul tarihi: 04.02.2025

Online Yayınlanma: 17.03.2025

Anahtar Kelimeler:

Kuantum mekaniği

Doğrusal olmayan yarı-optik

Denklem başlangıç sınır değeri

Problem

Varoluş ve benzersizlikler

Gradyan terim analizi

Bu çalışma, kuantum mekaniğindeki temel bir problemi incelemektedir: belirli bir gradyana sahip durağan, doğrusal olmayan yarı-optik bir denklem için başlangıç sınır değer problemi. Daha önce çalışılan durağan olmayan doğrusal Schrödinger denklemini aşan bu karmaşık denklem, mikroskobik düzeyde parçacık davranışının daha doğru modellerini sunmaktadır. Araştırma, problemi birinci türden bir problem olarak tanımlıyor, ardından çözümü için gerekli ve yeterli koşulları titizlikle formüle ediyor. Çözümün varlığı ve teklifi üzerine teoremler kanıtlanıyor ve çözümün bir tahmini elde ediliyor. Bu çalışma kuantum mekaniği ve optik için, özellikle de dalga boyları optik sistemin boyutlarıyla karşılaştırılabilir olduğunda elektromanyetik dalga yayılımını anlamak açısından önemlidir. Bulgular, klasik fiziğin ötesinde yeni anlayışlar sunarak optik tasarım ve mühendislik uygulamalarına katkıda bulunmaktadır.

To Cite: Yagub G, Vural M., 2025. Solution of initial boundary value problems for the nonlinear stationary quasi-optical equation with special gradient term. Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi Dergisi, 5(1): 70-105.

Introduction

Initial boundary value problems for linear and nonlinear stationary quasi-optical or non-stationary Schrödinger equations often arise in quantum mechanics, nuclear physics, nonlinear optics and various contemporary areas of physics and technology, and the study of these problems is of both theoretical and practical importance (Butkovsky, 1973; Zhuravle, 2001). One such problem is the problem of the motion of charged particles. As is well known, if charged particles move in a constant homogeneous magnetic field and the direction of the magnetic field is along the z -axis, then the motion of such particles takes place in the $(x, y) \in E_2$ plane, and this motion is usually described by the two-dimensional linear non-stationary Schrödinger equation with a special gradient term (see (Butkovsky, 1973) page 182, (Zhuravlev, 2001)).

Initial boundary value problems for linear and nonlinear quasi-stationary quasi-optical or non-stationary Schrödinger equations without special gradient term were first considered in (Iskenderov and Yagubov, 1988; Iskenderov and Yagubov, 2012) and initial boundary value problems for linear and non-linear quasi-optical or non-stationary Schrödinger equations with special gradient term were first considered in (Toyaoğlu, 2012; Zengin, 2021). It should be noted that the initial boundary value problems for the non-stationary linear Schrödinger equation without special gradient term or for the stationary linear-quasi, quasi-optical equation without special gradient term in the case where the coefficients of the equation are measurable bounded functions depending only on the time variable, but not necessarily differentiable with respect to the time variable, have been previously studied in (Iskenderov and Yagubov, 2012). It should be noted that the non-stationary linear Schrödinger equation with special gradient term and complex potential or the second kind of initial boundary value problem for the linear stationary quasi-optical equation with a special gradient term was first considered in (Yagubov et al., 2022). However, the initial boundary value problems for the nonlinear stationary quasi-optical equation with a special gradient term have not been investigated when the refraction and absorption coefficients of the nonlinear stationary quasi-optical equation are measurable bounded functions depending only on its variable. Therefore, the topic of this study on the initial boundary value problems for the nonlinear stationary quasi-optical equation with special gradient term is topical and of theoretical and practical importance.

The Statement of the Initial Boundary Value Problem of First Kind

Let B be a Banach space and $0 < l, 0 < L$ be given real numbers. $C^k([0, L], B)$ is the Banach space of functions defined on the interval k times continuously differentiable and whose values belong to the Banach space B , $L_p(0, l)$ is the Lebesgue space of functions for which the p -th power of their absolute value is Lebesgue integrable, $L_2(0, L; B)$ is the Banach space of square integrable functions defined on the interval $(0, L)$, whose values belong to the Banach space B , $L_\infty(0, L; B)$ is the Banach space of measurable bounded functions defined on the interval $(0, L)$ whose values belong to the Banach space B and $W_p^k(0, l), W_p^{k,m}(\Omega)$ (where $1 \leq p, 0 \leq k, 0 \leq m$), $\Omega = \Omega_t = (0, l) \times (0, t)$ is the Sobolev spaces and have been defined, for example, in (Ladyzhenskaya and Salonnikov, 1967; Lions, 1967).

Let $0 \leq x \leq l$ and $0 \leq z \leq L$. Consider the following initial boundary value problem related to finding the function $\psi = \psi(x, z)$.

$$i \frac{\partial \psi}{\partial z} + a_0 \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + i a_1(x, z) \frac{\partial \psi}{\partial x} - a(x) \psi + v_0(z) \psi + i_1(z) \psi + a_2 |\psi|^2 \psi = f(x, z) \quad (2.1)$$

$$\psi(x, 0) = \varphi(x) \quad (2.2)$$

$$\psi(0, z) = \psi(l, z) = 0 \quad (2.3)$$

where $(x, z) \in \Omega, x \in (0, l), t \in (0, L), 0 < a_0 \in \mathbb{R}, a_2 \in \mathbb{C}$ with

$$a_2 = \text{Re} a_2 + i \cdot \text{Im} a_2, \text{Im} a_2 > 0, \text{Re} a_2 < 0, \text{Im} a_2 \geq 2 |\text{Re} a_2| \quad (2.4)$$

$a(x), a_1(x, z), v_0(z), v_1(z)$ are real-valued measurable functions and satisfy the following conditions

$$0 \leq a(x) \leq \mu_1, \left| \frac{da(x)}{dx} \right| \leq \mu_2, \left| \frac{d^2 a(x)}{dx^2} \right| \leq \mu_3 \quad (2.5)$$

$$|a_1(x, z)| \leq \mu_4, \left| \frac{\partial a_1(x, z)}{\partial x} \right| \leq \mu_5, \left| \frac{\partial^2 a_1(x, z)}{\partial x^2} \right| \leq \mu_6 \quad (2.6)$$

$$|v_s(z)| \leq b_s \quad (2.7)$$

where $\forall x \in (0, l), \mu_1, \mu_2, \mu_3 = \text{const} > 0, \forall (x, z) \in \Omega, a_1(0, z) = a_1(l, z) = 0, z \in (0, T)$

$\mu_3, \mu_4, \mu_5, \mu_6 = \text{const} > 0, s = 0, 1, \forall z \in (0, L), b_0, b_1 = \text{const} > 0$ $\varphi(x), f(x, z)$ are complex valued measurable functions and satisfy the following conditions

$$\varphi \in W_2^2(0, l), f \in W_2^{2,1}(\Omega) \quad (2.8)$$

The solution of the initial boundary value problem (2.1) – (2.3) is a function $\psi \in W_2^{0,1}(\Omega)$ satisfying equation (2,1) $\forall (x, z) \in \Omega$, initial value condition (2,2) $\forall x \in (0, l)$ and boundary value condition (2,3) $\forall z \in (0, L)$.

The Solution of the Initial Boundary Value Problem of First Kind

In this section we will use Galerkin's method to prove the existence and uniqueness theorem for the solution of the initial boundary value problem (2.1) - (2.3).

Theorem 3.1. Suppose that the complex number a_2 and the functions $a(x), a_1(x, z), \varphi(x), f(x, z)$ satisfy the conditions (2,4 – 2,8). Then the initial boundary value problem (2.1)-(2.3) has only one almost everywhere solution that belongs to the space $W_2^{0,2,1}$. Moreover the following inequality holds.

$$\|\psi\|_{W_2^{0,2,1}(\Omega)}^2 \leq c_0 \left(\|\varphi\|_{W_2^{0,2}(0,l)}^2 + \|f\|_{W_2^{0,2,0}(\Omega)}^2 + \|\varphi\|_{W_2^{0,1}(0,l)}^6 + \|f\|_{W_2^{0,1,0}(\Omega)}^6 \right) \quad (3.1)$$

where $0 < c_0$ is a constant.

Proof. Consider any system of functions $u_k = u_k(x), k = 1, 2, \dots$ belongs to $W_2^{0,2,1}(0, l)$ which is orthonormal in $L_2(0, l)$. Let us take the solutions of the eigenvalue problem

$$\Lambda X(x) = \lambda X(x), x \in (0, l), X(0) = X(l) = 0 \quad (3.2)$$

corresponding to the eigenvalues $\lambda = \lambda_k, k = 1, 2$ of the eigenvalue problem (3,2) as a system of functions. The operator Λ in (3.2) defined as below,

$$\Lambda = -a_0 \frac{d^2}{dx^2} + a(x) \quad (3.3)$$

It must be said that the eigenvalue problem (3,2) is studied in (Ladyzhenskaya and Salonnikov, 1967) and it has been shown that the problem (3,2) has solutions $X = u_k(x), k = 1, 2, \dots$ for $\lambda = \lambda_k, k = 1, 2, \dots$. Moreover, these solutions form a basis for $W_2^{0,1}(0, l), W_2^{0,2}(0, l)$. On the other hand, these solutions satisfy the conditions of orthonormality in $L_2(0, l)$ and orthogonality in $W_2^{0,1}(0, l), W_2^{0,2}(0, l)$. In other words, it provides the following relations,

$$(u_k, u_m)_{L_2(0,l)} = \int_0^l u_k(x)u_m(x)dx = \delta_k^m \quad (3.4)$$

$$[u_k, u_m] = (\Lambda u_k, u_m)_{L_2(0,l)} = \int_0^l \left(a_0 \frac{du_k}{dx} \frac{du_m}{dx} + a(x)u_k u_m \right) dx = \lambda_k \delta_k^m, \quad (3.5)$$

$$\{u_k, u_m\} = (\Lambda u_k, \Lambda u_m)_{L_2(l)} = \lambda_k \delta_k^m \quad (3.6)$$

where $k, m = 1, 2 \dots$ δ_k^m is the Kronecker constants defined as below

$$\delta_k^m = \begin{cases} 1, & k = m \\ 0, & k \neq m, k, m = 1, 2 \end{cases} \quad (3.7)$$

according to our assumption, since the condition $0 \leq a(x)$ is satisfied, the eigenvalues $\lambda = \lambda_k, k = 1, 2 \dots$ are real, positive and satisfy the conditions $\lambda_i \leq \lambda_j \dots$ whenever $i \leq j$ and $\lim_{k \rightarrow \infty} \lambda_k = +\infty$.

In addition, let us assume that $\|u_k\|_{W_{W_2(0,l)}^2} \leq \tilde{d}_k < +\infty$ is finite for any $k = 1, 2, \dots$ holds where \tilde{d}_k is a positive constants.

According to the Galerkin's method, we will search for an approximate solution of the initial boundary value problem (2.1)-(2.3) in the following form

$$\psi^N(x, z) = \sum_{k=1}^N c_k^N(z) u_k(x) \quad (3.8)$$

the coefficients $c_k^N(t) = (\psi^N(\cdot, t), u_k)_{L_2(0,l)}, k = 1, 2, \dots, N$ are found from the following conditions:

$$\begin{aligned} i \frac{d}{dz} (\psi^N(\cdot, z), u_k)_{L_2(0,l)} - (\Lambda \psi^N(\cdot, z), u_k)_{L_2(0,l)} + i \left(a_1(\cdot, z) \frac{\partial \psi^N(\cdot, z)}{\partial x}, u_k \right)_{L_2(0,l)} \\ + (a_2 |\psi^N(\cdot, z)|^2 \psi^N(\cdot, z), u_k)_{L_2(0,l)} = f_k(z) \end{aligned}$$

where $f_k(z) = (f(\cdot, z), u_k)_{L_2(0,l)}, \varphi_k = (\varphi, u_k)_{L_2(0,l)}, k = 1, 2, \dots, N$.

As can be seen, the system (3,9) is a system of a number of nonlinear first order ordinary differential equations with variable coefficients and right-hand side of each equations is f_k which is in $L_2(0, L)$. As known from the theory of ordinary differential equations (3.9), (3.10)

is a Cauchy problem and has at least one solution that belongs to $W_2^1(0, L)$ (Alekseyev, 1979; Vasilyev, 1980).

Lemma 3.2. For the solution of the system (3.9) - (3.10) the following inequality holds

$$\int_0^L \sum_{k=1}^N |c_k^N(z)|^2 dz + \int_0^L \sum_{k=1}^N \left| \frac{dc_k^N(z)}{dz} \right|^2 dz \leq \|\psi^N\|_{W_2^{0,2,1}(\Omega)}^2 \leq \quad (3.11)$$

$$\leq c_0 \left(\|\varphi\|_{W_2^{0,2}(0,l)}^2 + \|f\|_{W_2^{0,2,0}(\Omega)}^2 + \|\varphi\|_{W_2^{0,1}(0,l)}^6 + \|f\|_{W_2^{0,1,0}(\Omega)}^6 \right), \quad N = 1, 2, \dots$$

Proof. Let us multiply the k^{th} equation of (3,9) by $c_k^{-N}(z)$, add the obtained equations from 1 to N over k and integrate from 0 to L over $z \leq L$. If we apply partial integration to the obtained equation by using the conditions $u_k(0) = u_k(l) = 0$, we find the following equation $\forall z \in [0, L]$.

$$\int_{\Omega_z} \left(i \frac{\partial \psi^N}{\partial z} \bar{\psi}^N - a_0 \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 + i a_1(x, \tau) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \bar{\psi}^N - a(x) |\psi^N|^2 \right) dx d\tau +$$

$$+ \int_{\Omega_z} (v_0(\tau) |\psi^N|^2 + i v_1(\tau) |\psi^N|^2 + a_2 |\psi^N|^4) dx d\tau = \int_{\Omega_z} f(x, \tau) \bar{\psi}^N(x, \tau) dx d\tau$$

if we subtract its complex conjugate from this equation, we obtain the following equation

$$i \int_{\Omega_z} \left(\frac{\partial \psi^N}{\partial z} \bar{\psi}^N + \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial z} \psi^N \right) dx d\tau + i \int_{\Omega_x} \left(a_1(x, \tau) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \bar{\psi}^N + a_1(x, \tau) \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} \psi^N \right) dx d\tau +$$

$$+ 2i \int_{\Omega_z} v_1(\tau) |\psi^N|^2 dx d\tau + 2i \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^4 dx d\tau = 2i \int_{\Omega_z} \text{Im}(f \psi^N) dx d\tau, \quad \forall z \in [0; L]$$

using the differentiability of the function $a_1(x, z)$, we can write the following equation from the last equation $\forall z \in [0, L]$

$$\int_{\Omega_x} \frac{\partial}{\partial z} |\psi^N|^2 dx d\tau + \int_{\Omega_x} \frac{\partial}{\partial x} (a_1(x, \tau) |\psi^N|^2) dx d\tau + 2 \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^4 dx d\tau = \quad (3.12)$$

$$= \int_{\Omega_x} \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} |\psi^N|^2 dx d\tau - 2 \int_{\Omega_x} v_1(\tau) |\psi^N|^2 dx d\tau + 2 \int_{\Omega_x} \text{Im}(f \bar{\psi}^N) dx d\tau$$

it is clear that the second term on the left hand side of this equation is equal to zero since the function $\psi_N(x, z)$ satisfies the conditions $\psi^N(0, z) = \psi^N(l, z) = 0, z \in (0, L)$.

Therefore, using the conditions satisfied by the coefficients, we can easily obtain the following inequality from equation (3.12):

$$\begin{aligned} \|\psi^N(., z)\|_{L_2(0,l)}^2 + 2\text{Im}a_2 \int_{\Omega_x} |\psi^N|^4 dx d\tau \leq & \|\psi^N(., 0)\|_{L_2(0,l)}^2 + \|f\|_{L_2(a)}^2 + \\ & + (\mu_5 + 2b_1 + 1) \int_0^z \|\psi^N(-\tau)\|_{L_2(0,l)}^2 d\tau \forall t \in [0, T] \end{aligned} \quad (3.13)$$

Using the formula (3.8) we can write the following relation:

$$\|\psi^N(., 0)\|_{L_2(0,l)}^2 = \sum_{k=1}^N |c_k^N(0)|^2 \leq \sum_{k=1}^{\infty} |\varphi_k|^2 = \|\varphi\|_{L_2(0,\lambda)}^2 \quad (3.14)$$

with the help of this relation, we obtain the following inequality from the inequality (3.13) :

$$\begin{aligned} \|\psi^N(., z)\|_{L_2(0,l)}^2 + 2\text{Im}a_2 \int_{\omega_z} |\psi^N|^4 dx d\tau \leq & \|\varphi\|_{L_2(0,\lambda)}^2 + \|f\|_{L_2(a)}^2 + \\ & + (\mu_5 + 2b_1 + 1) \int_0^z \|\psi^N(., \tau)\|_{L_2(0,l)}^2 d\tau, \forall z \in [0, L]. \end{aligned} \quad (3.15)$$

since the second term on the left-hand side of this inequality is non-negative, we can write the following inequality:

$$\|\psi^N(., z)\|_{L_2(0,l)}^2 \leq \|\varphi\|_{L_2(0,\lambda)}^2 + \|f\|_{L_2(a)}^2 + (\mu_5 + 2b_1 + 1) \int_0^z \|\psi^N(-\tau)\|_{L_2(0,l)}^2 d\tau \forall z \in [0, L]$$

from this, with the help of Gronwall's lemma, we obtain that the following estimate holds:

$$\|\psi^N(., z)\|_{L_2(0,l)}^2 \leq c_2 (\|\varphi\|_{L_2(0,l)}^2 + \|f\|_{L_2(\Omega)}^2) \forall z \in [0, L] \quad (3.16)$$

using this estimate, we also find the following estimate from inequality (3.15) $\forall z \in [0, L]$

$$\|\psi^N(., z)\|_{L_2(0,l)}^2 + 2\text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^4 dx d\tau \leq c_3 (\|\varphi\|_{L_2(0,f)}^2 + \|f\|_{L_2(\Omega)}^2) \quad (3.17)$$

Now let us try to evaluate the derivative of $\frac{\partial \psi^N}{\partial x}$. To this end, let us multiply the k^{th} equation of (3.9) by $\lambda_k c_k^{-N}(z)$, add the obtained equations from 1 to N over k and integrate them from zero to L over $z \leq L$.

We then obtain the following equality:

$$\begin{aligned} & \int_{\Omega_z} \left(i \frac{\partial \psi^N}{\partial z} \Lambda \bar{\psi}^N - |\Lambda \psi^N|^2 + i a_1(x, \tau) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \Lambda \bar{\psi}^N \right) dx d\tau + \\ & \quad + \int_{\Omega_z} \left(v_0(\tau) \psi^N \Lambda \bar{\psi}^N + i v_1(\tau) \psi^N \Lambda \bar{\psi}^N + a_2 |\psi^N|^2 \psi^N \Lambda \bar{\psi}^N \right) dx d\tau = \\ & \quad = \int_{\Omega_z} f(x, \tau) \Lambda \bar{\psi}^N(x, \tau) dx d\tau, \forall z \in [0, L]. \end{aligned} \quad (3.18)$$

from this equation we deduce its complex conjugate and find the following equation:

$$\begin{aligned} & \int_{\Omega_z} \left(i \left(\frac{\partial \psi^N}{\partial z} \Lambda \bar{\psi}^N + \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial z} \Lambda \psi^N \right) + i a_1(x, \tau) \left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \Lambda \bar{\psi}^N + \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} \Lambda \psi^N \right) \right) dx d\tau + \\ & \quad + \int_{\Omega_x} \left(v_0(\tau) (\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N - \bar{\psi}^N \Lambda \psi^N) + i v_1(\tau) (\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N + \bar{\psi}^N \Lambda \psi^N) \right) dx d\tau + \\ & \quad + \int_{a_x} \left(a_2 |\psi^N|^2 \psi^N \Lambda \bar{\psi}^N - \bar{a}_2 |\psi^N|^2 \bar{\psi}^N \Lambda \psi^N \right) dx d\tau = \\ & \quad = \int_{a_x} \left(f(x, \tau) \Lambda \bar{\psi}^N(x, \tau) - \bar{f}(x, \tau) \Lambda \psi^N(x, \tau) \right) dx d\tau, \forall z \in [0, L] \end{aligned} \quad (3.19)$$

using the formula (3.3) for the operator Λ and the partial integration formula, we can write the following equations with the help of the conditions $u_k(0) = u_k(l) = 0, k = 1, 2, \dots$

$$\begin{aligned} & \int_{\Omega_x} i a_1(x, \tau) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \Lambda \bar{\psi}^N dx d\tau = \\ & \quad = - \int_{a_x} i a_0 a_1(x, \tau) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \frac{\partial^2 \bar{\psi}^N}{\partial x^2} dx d\tau + \int_{a_x} i a(x) a_1(x, \tau) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \bar{\psi}^N dx d\tau \end{aligned} \quad (3.20)$$

$$\begin{aligned}
\int_{a_x} (a_2 |\psi^N|^2 \psi^N \Pi \bar{\psi}^N - \bar{a}_2 |\psi^N|^2 \bar{\psi}^N \Lambda \psi^N) dx d\tau &= \\
&= 2i \text{Im} a_2 \int_{\Omega_x} a(x) |\psi^N|^4 dx d\tau + \\
&+ a_0 \text{Re} a_2 \int \left[\frac{\partial}{\partial x} (|\psi^N|^2 \psi^N) \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} - \frac{\partial}{\partial x} (|\psi^N|^2 \bar{\psi}^N) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right] dx d\tau
\end{aligned} \tag{3.21}$$

Considering equations (3.20) - (3.24), we obtain the following equation from equation (3.19):

$$\begin{aligned}
\int_{\Omega_x} (v_0(\tau) \psi^N \Lambda \bar{\psi}^N + i v_1(\tau) \psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau &= \\
&= \int_{a_x} v_0(\tau) \psi^N \left(-a_0 \frac{\partial^2 \bar{\psi}^N}{\partial x^2} + a(x) \bar{\psi}^N \right) + \\
&+ i v_1(\tau) \psi^N \left(-a_0 \frac{\partial^2 \bar{\psi}^N}{\partial x^2} + a(x) \bar{\psi}^N \right) dx d\tau = \\
&= \int_{a_x} \left(a_0 v_0(\tau) \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 + v_0(\tau) a(x) |\psi^N|^2 \right) dx d\tau + \\
&+ \int_{a_x} \left(i a_0 v_1(\tau) \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 + i v_1(\tau) a(x) |\psi^N|^2 \right) dx d\tau
\end{aligned} \tag{3.22}$$

$$\begin{aligned}
\int_{a_x} (a_2 |\psi^N|^2 \psi^N \Pi \bar{\psi}^N - \bar{a}_2 |\psi^N|^2 \bar{\psi}^N \Lambda \psi^N) dx d\tau &= \\
&= 2i \text{Im} a_2 \int_{\Omega_x} a(x) |\psi^N|^4 dx d\tau + \\
&+ i a_0 \text{Im} a_2 \int \left[\frac{\partial}{\partial x} (|\psi^N|^2 \psi^N) \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} + \frac{\partial}{\partial x} (|\psi^N|^2 \bar{\psi}^N) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right] dx d\tau + \\
&+ a_0 \text{Re} a_2 \int \left[\frac{\partial}{\partial x} (|\psi^N|^2 \psi^N) \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} - \frac{\partial}{\partial x} (|\psi^N|^2 \bar{\psi}^N) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right] dx d\tau
\end{aligned} \tag{3.23}$$

$$\begin{aligned}
\int_{a_x} f(x, \tau) \Lambda \bar{\psi}^N(x, \tau) dx d\tau &= \tag{3.24} \\
&= \int_{a_x} f(x, \tau) \left(-a_0 \frac{\partial^2 \bar{\psi}^N(x, \tau)}{\partial x^2} + a(x) \bar{\psi}^N(x, \tau) \right) dx d\tau = \\
&= \int_{a_x} \left(a_0 \frac{\partial f(x, \tau)}{\partial x} \frac{\partial \bar{\psi}^N(x, \tau)}{\partial x} + a(x) f(x, \tau) \bar{\psi}^N(x, \tau) \right) dx d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

Considering equations (3.20) - (3.24), we obtain the following equation from equation (3.19):

$$\begin{aligned}
i \int_{\Omega_z} a_0 \left(\frac{\partial^2 \psi^N}{\partial z \partial x} \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} + \frac{\partial^2 \bar{\psi}^N}{\partial z \partial x} \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right) dx d\tau + i \int_{\Omega_z} a(x) \left(\frac{\partial \psi^N}{\partial z} \bar{\psi}^N + \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial z} \psi^N \right) dx d\tau - \tag{3.25} \\
-i \int_{\Omega_z} a_0 a_1(x, \tau) \left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \frac{\partial^2 \bar{\psi}^N}{\partial x^2} + \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} \frac{\partial^2 \psi^N}{\partial x^2} \right) dx d\tau + \\
+i \int_{\Omega_z} a(x) a_1(x, \tau) \left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \bar{\psi}^N + \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} \psi^N \right) dx d\tau + \\
+2i \int_{\Omega_z} \left(a_0 v_1(\tau) \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 + v_1(\tau) a(x) |\psi^N|^2 \right) dx d\tau + 2i \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} a(x) |\psi^N|^4 dx d\tau + \\
+ia_0 \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} \left[\frac{\partial}{\partial x} (|\psi^N|^2 \psi^N) \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} + \frac{\partial}{\partial x} (|\psi^N|^2 \bar{\psi}^N) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right] dx d\tau + \\
+a_0 \text{Re} a_2 \int_{\Omega_z} \left[\frac{\partial}{\partial x} (|\psi^N|^2 \psi^N) \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} - \frac{\partial}{\partial x} (|\psi^N|^2 \bar{\psi}^N) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right] dx d\tau = \\
= 2i \int_{\Omega_z} a_0 \text{Im} \left(\frac{\partial f(x, \tau)}{\partial x} \frac{\partial \bar{\psi}^N(x, \tau)}{\partial x} \right) dx d\tau + \\
+2i \int_{\Omega_z} a(x) \text{Im} \left(f(x, \tau) \bar{\psi}^N(x, \tau) \right) dx d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

It is evident that the following equations hold:

$$\begin{aligned}
ia_0 \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} \left[\frac{\partial}{\partial x} (|\psi^N|^2 \psi^N) \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} + \frac{\partial}{\partial x} (|\psi^N|^2 \bar{\psi}^N) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right] dx d\tau &= \tag{3.26} \\
= i4a_0 \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau + i2a_0 \text{Im} a_2 \int_{\Omega_t} \text{Re} \left[(\psi^N)^2 \left(\frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} \right)^2 \right] dx d\tau
\end{aligned}$$

$$a_0 \text{Re} a_2 \int_{\Omega_z} \left[\frac{\partial}{\partial x} (|\psi^N|^2 \psi^N) \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} - \frac{\partial}{\partial x} (|\psi^N|^2 \bar{\psi}^N) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right] dx d\tau$$

with the help of these equations, we can easily obtain the following equation from equation (3.25):

$$\begin{aligned}
& \int_{\Omega_z} a_0 \frac{\partial}{\partial z} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau + \int_{\Omega_z} a(x) \frac{\partial}{\partial z} |\psi^N|^2 dx d\tau - \tag{3.28} \\
& - \int_{\Omega_z} a_0 \frac{\partial}{\partial x} \left(a_1(x, \tau) \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 \right) dx d\tau + \int_{\Omega_z} a_0 \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau + \\
& + \int_{\Omega_z} \frac{\partial}{\partial x} (a(x) a_1(x, \tau) |\psi^N|^2) dx d\tau - \int_{\Omega_z} \frac{\partial}{\partial x} (a(x) a_1(x, \tau)) |\psi^N|^2 dx d\tau + \\
& + 2 \int_{\Omega_z} \left(a_0 v_1(\tau) \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 + v_1(\tau) a(x) |\psi^N|^2 \right) dx d\tau + 2 \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} a(x) |\psi^N|^4 dx d\tau \\
& + 4 a_0 \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau + 2 a_0 \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} \text{Re} \left[(\psi^N)^2 \left(\frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} \right)^2 \right] dx d\tau + \\
& + 2 a_0 \text{Re} a_2 \int_{\Omega_z} \text{Im} \left[(\bar{\psi}^N)^2 \left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right)^2 \right] dx d\tau = \\
& = 2 \int_{\Omega_z} a_0 \text{Im} \left(\frac{\partial f(x, \tau)}{\partial x} \frac{\partial \bar{\psi}^N(x, \tau)}{\partial x} \right) dx d\tau + \\
& + 2 \int_{\Omega_z} a(x) \text{Im} \left(f(x, \tau) \bar{\psi}^N(x, \tau) \right) dx d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

The third and fifth terms on the left side of this equation are equal to zero due to the conditions $a_1(0, z) = a_1(l, z) = 0, z \in (0, L)$. Taking this into consideration, we can write the equation (3.28) in the following form:

$$\begin{aligned}
& \int_{\Omega_z} a_0 \frac{\partial}{\partial z} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau + \int_{\Omega_z} a(x) \frac{\partial}{\partial z} |\psi^N|^2 dx d\tau + 2\text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} a(x) |\psi^N|^4 dx d\tau + \\
& \quad + 4a_0 \text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau = - \int_{\Omega_z} a_0 \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau + \\
& + \int_{\Omega_z} \frac{\partial}{\partial x} (a(x) a_1(x, \tau)) |\psi^N|^2 dx d\tau - 2 \int_{\Omega_z} \left(a_0 v_1(\tau) \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 + v_1(\tau) a(x) |\psi^N|^2 \right) dx d\tau - \\
& - 2a_0 \text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} \text{Re} \left[(\psi^N)^2 \left(\frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} \right)^2 \right] dx d\tau - 2a_0 \text{Re}a_2 \int_{\Omega_z} \text{Im} \left[(\bar{\psi}^N)^2 \left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right)^2 \right] dx d\tau + \\
& + 2 \int_{\Omega_z} a_0 \text{Im} \left(\frac{\partial f(x, \tau)}{\partial x} \frac{\partial \bar{\psi}^N(x, \tau)}{\partial x} \right) dx d\tau + 2 \int_{\Omega_z} a(x) \text{Im}(f(x, \tau) \bar{\psi}^N(x, \tau)) dx d\tau, \forall z \in [0, L]
\end{aligned}$$

from this equality we easily obtain the following inequality:

$$\begin{aligned}
& a_0 \int_0^l \left| \frac{\partial \psi^N(x, z)}{\partial x} \right|^2 dx + \int_0^l a(x) |\psi^N(x, z)|^2 dx + 2\text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} a(x) |\psi^N|^4 dx d\tau + \\
& + 4a_0 \text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau \leq a_0 \int_0^l \left| \frac{\partial \psi^N(x, 0)}{\partial x} \right|^2 dx + \int_0^l a(x) |\psi^N(x, 0)|^2 dx + \\
& + a_0 \iint_{\Omega_z} \left| \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} \right| \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau + \int_{\Omega_z} \left(a(x) \left| \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} \right| + \left| \frac{da(x)}{dx} \right| a_1(x, \tau) \right) |\psi^N|^2 dx d\tau + \\
& + 2 \int_{\Omega_z} \left(a_0 |v_1(\tau)| \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 + a(x) |v_1(\tau)| |\psi^N|^2 \right) dx d\tau + \\
& + 2a_0 (\text{Im}a_2 + |\text{Re}a_2|) \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau + 2a_0 \iint_{\Omega_z} \left| \frac{\partial f(x, \tau)}{\partial x} \right| \left| \frac{\partial \psi^N(x, \tau)}{\partial x} \right| dx d\tau + \\
& + 2 \int_{\Omega_z} a(x) |f(x, \tau)| |\psi^N(x, \tau)| dx d\tau, \forall z \in [0, L]
\end{aligned}$$

from this inequality, using the Cauchy-Bujakowski inequality with the help of the condition (2.4) and the conditions satisfied by the coefficients of the equation, we get that the following inequality holds:

$$\begin{aligned}
a_0 \left\| \frac{\partial \psi^N(\cdot, z)}{\partial x} \right\|_{L_2(0,l)}^2 &+ a_0 \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau \leq a_0 \left\| \frac{\partial \psi^N(\cdot, 0)}{\partial x} \right\|_{L_2(0,l)}^2 + \mu_1 \|\psi^N(\cdot, 0)\|_{L_2(0,l)}^2 + \\
&+ a_0(\mu_5 + 2b_1 + 1) \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau + (\mu_2 \mu_4 + \mu_1 \mu_5 + 2\mu_1 b_1 + \mu_1) \int |\psi_{\Omega_z}^N|^2 dx d\tau + \\
&+ a_0 \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial f(x, \tau)}{\partial x} \right|^2 dx d\tau + \mu_1 \int |f(x, \tau)|_{\Omega_z}^2 dx d\tau, \forall z \in [0, L]. \quad (3.29)
\end{aligned}$$

With the help of the formula (3.8) we easily obtain the following inequality:

$$\left\| \frac{\partial \psi^N(\cdot, 0)}{\partial x} \right\|_{L_2(0,l)}^2 \leq c_4 \|\varphi\|_{W_2(0,l)}^2 \quad (3.30)$$

with the help of this inequality, the relation (3.14) and the estimation (3.17), we can write the following inequality from inequality (3.29):

$$\begin{aligned}
\left\| \frac{\partial \psi^N(\cdot, z)}{\partial x} \right\|_{L_2(0,l)}^2 &+ 2 \frac{\mu_0}{a_0} \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^4 dx d\tau + \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau \leq \quad (3.31) \\
&\leq c_5 \left(\|\varphi\|_{W_{W_2(0,l)}^1}^2 + \|f\|_{W_2(\Omega)}^2 \right) + c_6 \int_0^z \left\| \frac{\partial \psi^N(\cdot, \tau)}{\partial x} \right\|_{L_2(0,l)}^2 d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

Since the second and third terms on the left-hand side of this inequality are nonnegative, we obtain the following inequality:

$$\left\| \frac{\partial \psi^N(\cdot, z)}{\partial x} \right\|_{L_2(0,l)}^2 \leq c_7 \left(\|\varphi\|_{W_{W_2(0,l)}^1}^2 + \|f\|_{W_2(\Omega)}^2 \right) + c_8 \int_0^z \left\| \frac{\partial \psi^N(\cdot, \tau)}{\partial x} \right\|_{L_2(0,l)}^2 d\tau, \forall z \in [0, L].$$

Hence, with the help of Gronwall's Lemma, we derive that the following prediction holds:

$$\left\| \frac{\partial \psi^N(\cdot, z)}{\partial x} \right\|_{L_2(0,l)}^2 \leq c_9 \left(\|\varphi\|_{W_2(0,l)}^2 + \|f\|_{W_{W_2(\Omega)}}^2 \right), \forall z \in [0, L]. \quad (3.32)$$

with the help of this estimation, we can also write the following estimation from inequality (3.31):

$$\left\| \frac{\partial \psi^N(\cdot, z)}{\partial x} \right\|_{L_2(0,l)}^2 + 2 \frac{\mu_0}{a_0} \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^4 dx d\tau + \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau \leq (3.33)$$

$$\leq c_{10} (\|\varphi\|_{W_2(0,l)}^2 + \|f\|_{W_2(\Omega)}^2), \forall z \in [0, L].$$

Now let us investigate the derivative of $\frac{\partial^2 \psi^N}{\partial x^2}$. For this purpose, let us multiply the k -th equation of (3.9) by $\lambda_k^2 \bar{c}_k^N(z)$ and sum the obtained equations over k from $k = 1$ to $k = N$. Then we get the following equation:

$$\begin{aligned} & i \sum_{k=1}^N \int_0^l \frac{\partial \psi^N(x,z)}{\partial z} u_k(x) dx \lambda_k^2 \bar{c}_k^N(z) - \sum_{k=1}^N \int_0^l \Lambda \psi^N(x,z) u_k(x) dx \lambda_k^2 \bar{c}_k^N(z) + \\ & + i \sum_{k=1}^N \int_0^l a_1(x,z) \frac{\partial \psi^N(x,z)}{\partial x} u_k(x) dx \lambda_k^2 \bar{c}_k^N(z) + \sum_{k=1}^N \int_0^l v_0(z) \psi^N(x,z) u_k(x) dx \lambda_k^2 \bar{c}_k^N(z) + \\ & + i \sum_{k=1}^N \int_0^l v_1(z) \psi^N(x,z) u_k(x) dx \lambda_k^2 \bar{c}_k^N(z) + \sum_{k=1}^N \int_0^l a_2 |\psi^N(x,z)|^2 \psi^N(x,z) u_k(x) dx \lambda_k^2 \bar{c}_k^N(z) = \\ & = \sum_{k=1}^N \int_0^l f(x,z) u_k(x) dx \lambda_k^2 \bar{c}_k^N(z) \end{aligned}$$

with the help of the relation $\Lambda u_k = \lambda_k u_k$ we can write the following equation using the partial integration formula:

$$\begin{aligned} & i \sum_{k=1}^N \int_0^l \frac{\partial}{\partial z} (\Lambda \psi^N(x,z)) u_k(x) dx \lambda_k \bar{c}_k^N(z) - \sum_{k=1}^N \int_0^l \Lambda (\Lambda \psi^N(x,z)) u_k(x) dx \lambda_k \bar{c}_k^N(z) + \\ & + i \sum_{k=1}^N \int_0^l \Lambda \left(a_1(x,z) \frac{\partial \psi^N(x,z)}{\partial x} \right) u_k(x) dx \lambda_k \bar{c}_k^N(z) + \sum_{k=1}^N \int_0^l v_0(z) \Lambda \psi^N(x,z) u_k(x) dx \lambda_k \bar{c}_k^N(z) + \\ & + i \sum_{k=1}^N \int_0^l v_1(z) \Lambda \psi^N(x,z) u_k(x) dx \lambda_k \bar{c}_k^N(z) + \sum_{k=1}^N \int_0^l \Lambda (a_2 |\psi^N(x,z)|^2 \psi^N(x,z)) u_k(x) dx \lambda_k \bar{c}_k^N(z) = \\ & = \sum_{k=1}^N \int_0^l \Lambda f(x,z) u_k(x) dx \lambda_k \bar{c}_k^N(z) \end{aligned}$$

Let us still use the relation $\Lambda u_k = \lambda_k u_k$ and the formula (3.8) to integrate the resulting equation over z from zero to $z \leq L$. Then we obtain the following equation:

$$\begin{aligned}
& i \int_{\Omega_z} \frac{\partial}{\partial z} (\Lambda \psi^N) \Lambda \bar{\psi}^N dx d\tau - \int_{\Omega_z} \Lambda (\Lambda \psi^N) \Lambda \bar{\psi}^N dx d\tau + i \int_{\Omega_z} \Lambda \left(a_1(x, \tau) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right) \Lambda \bar{\psi}^N dx d\tau + \\
& + \int_{\Omega_z} v_0(\tau) |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau + i \int_{\Omega_z} v_1(\tau) |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau + \int_{\Omega_z} \Lambda (a_2 |\psi^N|^2 \psi^N) \Lambda \bar{\psi}^N dx d\tau = (3.34) \\
& = \int_{\Omega_z} \Lambda f(x, \tau) \Lambda \bar{\psi}^N(x, \tau) dx d\tau, \forall z \in [0, L]
\end{aligned}$$

Let us try to transform the second, third and sixth terms on the left-hand side of this equation. In this case

$$\Lambda (\Lambda \psi^N) = -a_0 \frac{\partial}{\partial x^2} (\Lambda \psi^N) + a(x) \Lambda \psi^N \quad (3.35)$$

using the formula, we can write the following equation with the help of the partial integration formula:

$$\int_{\Omega_z} \Lambda (\Lambda \psi^N) \Lambda \bar{\psi}^N dx d\tau = \int_{\Omega_z} a_0 \left| \frac{\partial}{\partial x} (\Lambda \psi^N) \right|^2 dx d\tau + \int_{\Omega_z} a(x) |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau, \forall z \in [0, L]. \quad (3.36)$$

In order to transform the third term on the left-hand side of equation (3.34), first transform $\Lambda \left(a_1(x, z) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right)$. With the help of the formula for the operator Λ we obtain the following equation:

$$\begin{aligned}
& \Lambda \left(a_1(x, z) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right) = -a_0 \frac{\partial^2}{\partial x^2} \left(a_1(x, z) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right) + a(x) a_1(x, z) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} = \\
& = -a_0 \frac{\partial^2 a_1(x, z)}{\partial x^2} \frac{\partial \psi^N}{\partial x} - 2a(x) \frac{\partial a_1(x, z)}{\partial x} \frac{\partial \psi^N}{\partial x} - a_1(x, z) \frac{da(x)}{dx} \frac{\partial \psi^N}{\partial x} + \\
& (3.37) \\
& + 2 \frac{\partial a_1(x, z)}{\partial x} \Lambda \psi^N + a_1(x, z) \frac{\partial}{\partial x} (\Lambda \psi^N).
\end{aligned}$$

Now let us transform the sixth term on the left side of equation (3.34). We can still write the following equation with the help of the formula for the operator Λ :

$$\Lambda (a_2 |\psi^N|^2 \psi^N) = -a_0 \frac{\partial^2}{\partial x^2} (a_2 |\psi^N|^2 \psi^N) + a_2 a(x) |\psi^N|^2 \psi^N = \quad (3.38)$$

$$= 2a_2 |\psi^N|^2 \Lambda \psi^N - a_2 a(x) |\psi^N|^2 \psi^N - 4a_0 a_2 \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 \psi^N - 2a_0 a_2 \left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right)^2 \bar{\psi}^N$$

Thus, with the assistance of equations (3.36) - (3.38), we obtain the following equation from equation (3.34):

$$\begin{aligned} & i \int_{\Omega_z} \frac{\partial}{\partial z} (\Lambda \psi^N) \Lambda \bar{\psi}^N dx d\tau - \int_{\Omega_z} a_0 \left| \frac{\partial}{\partial x} (\Lambda \psi^N) \right|^2 dx d\tau - \int_{\Omega_z} a(x) |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau - \quad (3.39) \\ & -i \int_{\Omega_z} a_0 \frac{\partial^2 a_1(x, \tau)}{\partial x^2} \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \Lambda \bar{\psi}^N dx d\tau - i \int_{\Omega_z} \left(2a(x) \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} + a_1(x, \tau) \frac{da(x)}{dx} \right) \psi^N \Lambda \bar{\psi}^N dx d\tau + \\ & + i \int_{\Omega_z} 2 \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau + i \int_{\Omega_z} a_1(x, \tau) \frac{\partial}{\partial x} (\Lambda \psi^N) \Lambda \bar{\psi}^N dx d\tau + \\ & + \int_{\Omega_z} v_0(\tau) |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau + i \int_{\Omega_z} v_1(\tau) |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau + 2a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau + \\ & + 2a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau - a_2 \int_{\Omega_z} a(x) |\psi^N|^2 \psi^N \Lambda \bar{\psi}^N dx d\tau - 4a_0 a_2 \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 \psi^N \Lambda \bar{\psi}^N dx d\tau - \\ & - 2a_0 a_2 \int_{\Omega_z} \left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right)^2 \bar{\psi}^N \Lambda \bar{\psi}^N dx d\tau = \int_{\Omega_z} \Lambda f(x, \tau) L \bar{\psi}^N(x, \tau) dx d\tau, \forall z \in [0, L] \end{aligned}$$

if we subtract its complex conjugate from this equation, we find the following equation:

$$\begin{aligned}
& i \iint_{\Omega_z} \left(\frac{\partial}{\partial z} (\Lambda \psi^N) \Lambda \bar{\psi}^N + \frac{\partial}{\partial z} (\Lambda \bar{\psi}^N) \Lambda \psi^N \right) dx d\tau + \tag{3.40} \\
& + 4i \int_{\Omega_z} \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau + i \int_{\Omega_z} a_1(x, \tau) \left(\frac{\partial}{\partial x} (\Lambda \psi^N) \Lambda \bar{\psi}^N + \frac{\partial}{\partial x} (\Lambda \bar{\psi}^N) \Lambda \psi^N \right) dx d\tau - \\
& \quad - i \int_{\Omega_z} a_0 \frac{\partial^2 a_1(x, \tau)}{\partial x^2} \left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \Lambda \bar{\psi}^N + \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial x} \Lambda \psi^N \right) dx d\tau - \\
& \quad - i \int_{\Omega_z} \left(2a(x) \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} + a_1(x, \tau) \frac{da(x)}{dx} \right) (\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N + \bar{\psi}^N \Lambda \psi^N) dx d\tau + \\
& \quad + 2i \int_{\Omega_z} v_1(\tau) |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau + 4i \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau - \\
& \quad - 2i \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} a(x) |\psi^N|^2 \text{Re}(\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau - 2i \text{Re} a_2 \int_{\Omega_z} a(x) |\psi^N|^2 \text{Im}(\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau - \\
& \quad - 8i a_0 \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 \text{Re}(\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau - 8i a_0 \text{Re} a_2 \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 \text{Im}(\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau - \\
& \quad - 4i a_0 \text{Im} a_2 \int_{\Omega_z} \text{Re} \left(\left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right)^2 \bar{\psi}^N \Lambda \bar{\psi}^N \right) dx d\tau - 4i a_0 \text{Re} a_2 \int_{\Omega_z} \text{Im} \left(\left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right)^2 \bar{\psi}^N \Lambda \bar{\psi}^N \right) dx d\tau = \\
& \quad = 2i \int_{\Omega_z} \text{Im}(\Lambda f(x, \tau) \Lambda \bar{\psi}^N(x, \tau)) dx d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

Now let us transform the third term on the left-hand side of this equation. It is clear that the following equation holds:

$$\begin{aligned}
i \int_{\Omega_z} a_1(x, \tau) \left(\frac{\partial}{\partial x} (\Lambda \psi^N) \Lambda \bar{\psi}^N + \frac{\partial}{\partial x} (\Lambda \bar{\psi}^N) \Lambda \psi^N \right) dx d\tau &= i \int_{\Omega_z} \frac{\partial}{\partial x} (a_1(x, \tau) |\Lambda \psi^N|^2) dx d\tau - \tag{3.41} \\
& - i \int_{\Omega_z} \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau
\end{aligned}$$

if we consider this equation on the left hand side of equation (3.40), we can write the following equation:

$$\begin{aligned}
& i \int_{\Omega_z} \frac{\partial}{\partial z} |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau + i \int_{\Omega_z} \frac{\partial}{\partial x} (a_1(x, \tau) |\Lambda \psi^N|^2) dx d\tau + \\
& + 3i \int_{\Omega_z} \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau - 2i \int_{\Omega_z} a_0 \frac{\partial^2 a_1(x, \tau)}{\partial x^2} \operatorname{Re} \left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \Lambda \bar{\psi}^N \right) dx d\tau - \\
& - 2i \int_{\Omega_z} \left(2a(x) \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} + a_1(x, \tau) \frac{da(x)}{dx} \right) \operatorname{Re}(\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau + \\
& + 2i \int_{\Omega_z} v_1(\tau) |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau + 4i \operatorname{Im} a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau - \\
& - 2i \operatorname{Im} a_2 \int_{\Omega_z} a(x) |\psi^N|^2 \operatorname{Re}(\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau - 2i \operatorname{Re} a_2 \int_{\Omega_z} a(x) |\psi^N|^2 \operatorname{Im}(\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau - \\
& - 8ia_0 \operatorname{Im} a_2 \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 \operatorname{Re}(\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau - 8ia_0 \operatorname{Re} a_2 \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 \operatorname{Im}(\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau - \\
& - 4ia_0 \operatorname{Im} a_2 \int_{\Omega_z} \operatorname{Re} \left(\left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right)^2 \bar{\psi}^N \Lambda \bar{\psi}^N \right) dx d\tau - 4ia_0 \operatorname{Re} a_2 \int_{\Omega_z} \operatorname{Im} \left(\left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right)^2 \bar{\psi}^N \Lambda \bar{\psi}^N \right) dx d\tau = \\
& = 2i \int_{\Omega_z} \operatorname{Im} \left(\Lambda f(x, \tau) \Lambda \bar{\psi}^N(x, \tau) \right) dx d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

According to the conditions $a_1(0, z) = a_1(l, z) = 0, z \in (0, L)$, the second term on the left side of this equation is equal to zero. Therefore, from the last equation we obtain the following equality:

$$\begin{aligned}
& \int_0^1 |\Lambda \psi^N(x, z)|^2 dx - \int_0^1 |\Lambda \psi^N(x, 0)|^2 dx + \\
& + 3 \int_{\Omega_z} \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau - 2 \int_{\Omega_z} a_0 \frac{\partial^2 a_1(x, \tau)}{\partial x^2} \operatorname{Re} \left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \Lambda \bar{\psi}^N \right) dx d\tau - \\
& - 2 \int_{\Omega_z} \left(2a(x) \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} + a_1(x, \tau) \frac{da(x)}{dx} \right) \operatorname{Re}(\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau + \\
& + 2 \int_{\Omega_z} v_1(\tau) |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau + 4 \operatorname{Im} a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau - \\
& - 2 \operatorname{Im} a_2 \int_{\Omega_z} a(x) |\psi^N|^2 \operatorname{Re}(\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau - 2 \operatorname{Re} a_2 \int_{\Omega_z} a(x) |\psi^N|^2 \operatorname{Im}(\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau - \\
& - 8a_0 \operatorname{Im} a_2 \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 \operatorname{Re}(\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau - 8a_0 \operatorname{Re} a_2 \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 \operatorname{Im}(\psi^N \Lambda \bar{\psi}^N) dx d\tau - \\
& - 4a_0 \operatorname{Im} a_2 \int_{\Omega_z} \operatorname{Re} \left(\left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right)^2 \bar{\psi}^N \Lambda \bar{\psi}^N \right) dx d\tau - 4a_0 \operatorname{Re} a_2 \int_{\Omega_z} \operatorname{Im} \left(\left(\frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right)^2 \bar{\psi}^N \Lambda \bar{\psi}^N \right) dx d\tau = \\
& = 2 \int_{\Omega_z} \operatorname{Im}(\Lambda f(x, \tau) \Lambda \bar{\psi}^N(x, \tau)) dx d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

Using the formula $\Lambda\psi^N(x, 0) = \sum_{k=1}^N c_k^N(0)\Lambda u_k(x)$ and the condition (3.10) we can write the following equation

$$\Lambda\psi^N(x, 0) = \sum_{k=1}^N c_k^N(0)\Lambda u_k(x) = \sum_{k=1}^N \varphi_k \Lambda u_k(x) = \sum_{k=1}^N \lambda_k \varphi_k u_k(x) \quad (3.42)$$

on the other hand, it is also clear that the following equation holds:

$$\sum_{k=1}^N \lambda_k \varphi_k u_k(x) = \sum_{k=1}^N \lambda_k \int_0^l \varphi(\xi) u_k(\xi) d\xi u_k(x) = \sum_{k=1}^N \int_0^l \varphi(\xi)(x) \Lambda u_k(\xi) d\xi u_k(x)$$

with the help of the partial integration formula, we obtain the following equation:

$$\sum_{k=1}^N \lambda_k \varphi_k u_k(x) = \sum_{k=1}^N \int_0^1 \Lambda \varphi(\xi)(x) u_k(\xi) d\xi u_k(x)$$

taking this equation into account in equation (3.42), we obtain the following equation:

$$\Lambda\psi^N(x, 0) = \sum_{k=1}^N \int_0^l \Lambda \varphi(\xi)(x) u_k(\xi) d\xi u_k(x) = \sum_{k=1}^N (\Lambda \varphi)_k u_k(x) \quad (3.43)$$

using this equality, we can write the following inequality:

$$\|\Lambda\psi^N(\cdot, 0)\|_{L_2(0,l)}^2 = \sum_{k=1}^N |(\Lambda \varphi)_k|^2 \leq \sum_{k=1}^{\infty} |(\Lambda \varphi)_k|^2 = \|\Lambda \varphi\|_{L_2(0,l)}^2 \quad (3.44)$$

from this relation we can easily obtain the following inequality with the help of the operator Λ

$$\|\Lambda\psi^N(\cdot, 0)\|_{L_2(0,l)}^2 \leq c_{11} \|\varphi\|_{W_2(0,l)}^2 \quad (3.45)$$

with the help of this inequality, we can conclude from equality (3.42) that the following inequality holds

$$\begin{aligned}
& \|\Lambda\psi^N(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)}^2 + 4\text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda\psi^N|^2 dx d\tau \leq c_{11} \|\varphi\|_{W_2(0,l)}^2 + \tag{3.46} \\
& + 3 \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} \right| |\Lambda\psi^N|^2 dx d\tau + 2a_0 \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial^2 a_1(x, \tau)}{\partial x^2} \right| \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right| |\Lambda\psi^N| dx d\tau + \\
& + 2 \int_{\Omega_z} \left(2a(x) \left| \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} \right| + |a_1(x, \tau)| \left| \frac{da(x)}{dx} \right| \right) |\psi^N| |\Lambda\psi^N| dx d\tau + 2 \int_{\Omega_t} |v_1(\tau)| |\Lambda\psi^N|^2 dx d\tau + \\
& + (2\text{Im}a_2 + 2|\text{Re}a_2|) \int_{\Omega_z} a(x) |\psi^N|^2 |\psi^N| |\Lambda\psi^N| dx d\tau + \\
& + (12a_0\text{Im}a_2 + 12a_0|\text{Re}a_2|) \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 |\psi^N| |\Lambda\psi^N| dx d\tau + \\
& + 2 \int_{\Omega_z} |\Lambda f(x, \tau)| |\Lambda\psi^N(x, \tau)| dx d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

Taking into account the conditions provided by the coefficients of the equation, we obtain the following inequality from the last inequality with the help of the CauchyBunjakowski inequality:

$$\begin{aligned}
& \|\Lambda\psi^N(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)}^2 + 4\text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda\psi^N|^2 dx d\tau \leq c_{11} \|\varphi\|_{W_2^2(0,l)}^2 + \\
& + (3\mu_5 + a_0\mu_6 + 2\mu_1\mu_5 + \mu_2\mu_4 + 2b_1 + 1) \int_{\Omega_z} |\Lambda\psi^N|^2 dx d\tau + \\
& + a_0\mu_6 \iint_{\Omega_z} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau + (2\mu_1\mu_5 + \mu_2\mu_4) \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 dx d\tau + \\
& + (\text{Im}a_2 + |\text{Re}a_2|)\mu_1^2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^4 dx d\tau + (\text{Im}a_2 + |\text{Re}a_2|) \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda\psi^N|^2 dx d\tau \\
& + (12a_0\text{Im}a_2 + 12a_0|\text{Re}a_2|) \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 |\psi^N| |\Lambda\psi^N| dx d\tau + \\
& + \int_{\Omega_z} |Lf(x, \tau)|^2 dx d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

Hence, with the help of the condition (2.4) and the ε -Cauchy inequality, we can derive the following inequality:

$$\begin{aligned}
& \|\Lambda\psi^N(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)}^2 + \frac{5}{2}\text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda\psi^N|^2 dx d\tau \leq c_{11} \|\varphi\|_{W_2^2(0,l)}^2 + \\
& + (3\mu_5 + a_0\mu_6 + 2\mu_1\mu_5 + \mu_2\mu_4 + 2b_1 + 1) \int_{\Omega_z} |\Lambda\psi^N|^2 dx d\tau + \\
& + a_0\mu_6 \iint_{\Omega_z} \left| \frac{\partial\psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau + (2\mu_1\mu_5 + \mu_2\mu_4) \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 dx d\tau + \\
& + \frac{3}{2}\text{Im}a_2\mu_1^2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^4 dx d\tau + 9a_0\text{Im}a_2\varepsilon \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda\psi^N|^2 dx d\tau + \\
& + \frac{9a_0\text{Im}a_2}{\varepsilon} \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial\psi^N}{\partial x} \right|^4 dx d\tau + \int_{\Omega_z} |\Lambda f(x, \tau)|^2 dx d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

By choosing from this inequality $\varepsilon = \frac{1}{6a_0}$ we find the following inequality:

$$\begin{aligned}
& \|\Lambda\psi^N(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)}^2 + \text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda\psi^N|^2 dx d\tau \leq c_{11} \|\varphi\|_{W_2^2(0,l)}^2 + \tag{3.47} \\
& + (3\mu_5 + a_0\mu_6 + 2\mu_1\mu_5 + \mu_2\mu_4 + 2b_1 + 1) \int_{\Omega_z} |\Lambda\psi^N|^2 dx d\tau + \\
& + a_0\mu_6 \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial\psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau + (2\mu_1\mu_5 + \mu_2\mu_4) \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 dx d\tau + \frac{3}{2}\text{Im}a_2\mu_1^2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^4 dx d\tau + \\
& + 54a_0^2\text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial\psi^N}{\partial x} \right|^4 dx d\tau + \int_{\Omega_z} |\Lambda f(x, \tau)|^2 dx d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

According to the inequality we know from the studies of (Ladyzhenskaya,1967 and Ladyzhenskaya,1973) we can write the following inequality:

$$\int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial\psi^N}{\partial x} \right|^4 dx d\tau \leq \beta \int_0^z \left\| \frac{\partial^2\psi^N(\cdot, \tau)}{\partial x^2} \right\|_{L_2(0,l)} \left\| \frac{\partial\psi^N(\cdot, \tau)}{\partial x} \right\|_{L_2(0,l)}^3 d\tau, \forall z \in [0, L]. \tag{3.48}$$

Here $\beta > 0$ is a known constant. If we apply the Cauchy-Bunjakowski inequality to the right hand side of this inequality, we get the following inequality:

$$\int_{\Omega_z} \left| \frac{\partial\psi^N}{\partial x} \right|^4 dx d\tau \leq \frac{\beta}{2} \int_0^z \left\| \frac{\partial^2\psi^N(\cdot, \tau)}{\partial x^2} \right\|_{L_2(0,l)}^2 d\tau + \frac{\beta}{2} \int_0^z \left\| \frac{\partial\psi^N(\cdot, \tau)}{\partial x} \right\|_{L_2(0,l)}^6 d\tau, \forall z \in [0, L] \tag{3.49}$$

Taking this inequality into consideration, we get the following inequality from the inequality (3.47):

$$\begin{aligned}
& \|\Lambda\psi^N(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)}^2 + \text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda\psi^N|^2 dx d\tau \leq c_{11} \|\varphi\|_{W_2(0,l)}^2 + \\
& + (3\mu_5 + a_0\mu_6 + 2\mu_1\mu_5 + \mu_2\mu_4 + 2b_1 + 1) \int_{\Omega_z} |\Lambda\psi^N|^2 dx d\tau + \\
& + a_0\mu_6 \iint_{\Omega_z} \left| \frac{\partial\psi^N}{\partial x} \right|^2 dx d\tau + (2\mu_1\mu_5 + \mu_2\mu_4) \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 dx d\tau + \frac{3}{2} \text{Im}a_2\mu_1^2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^4 dx d\tau + \\
& + 27a_0^2 \text{Im}a_2\beta \int_0^z \left\| \frac{\partial\psi^N(\cdot, \tau)}{\partial x} \right\|_{L_2(0,l)}^6 d\tau + 27a_0^2 \text{Im}a_2\beta \int_0^z \left\| \frac{\partial^2\psi^N(\cdot, \tau)}{\partial x^2} \right\|_{L_2(0,l)}^2 d\tau + \\
& + \int_{\Omega} |\Lambda f(x, \tau)|^2 dx d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned} \tag{3.50}$$

It follows that the estimates of (3.17), (3.33) and

$$\|\Lambda f\|_{L_2(\Omega)}^2 \leq c_{12} \|f\|_{W_2(\Omega)}^2 \tag{3.51}$$

with the help of the inequality, we obtain the following inequality:

$$\begin{aligned}
& \|\Lambda\psi^N(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)}^2 + \text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda\psi^N|^2 dx d\tau \leq \\
& + c_{13} \left(\|\varphi\|_{W_2(0,l)}^2 + \|f\|_{W_2(\Omega)}^2 + \|\varphi\|_{W_2(0,l)}^6 + \|f\|_{W_2(\Omega)}^6 \right) + c_{14} \int_0^z \int \frac{\partial^2\psi^N(\cdot, \tau)}{\partial x^2} \left\| \frac{\partial^2\psi^N(\cdot, \tau)}{\partial x^2} \right\|_{L_2(0,l)}^2 d\tau + \\
& + c_{15} \int_0^z \|\Lambda\psi^N(\cdot, \tau)\|_{L_2(0,l)}^2 d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned} \tag{3.52}$$

Using the formula for the operator Λ , we can write the following inequality:

$$\begin{aligned}
\|\Lambda\psi^N(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)} &= \left\| -a_0 \frac{\partial^2\psi^N(\cdot, z)}{\partial x^2} + a(\cdot)\psi^N(\cdot, z) \right\|_{L_2(0,l)} \geq \\
&\geq a_0 \left\| \frac{\partial^2\psi^N(\cdot, z)}{\partial x^2} \right\|_{L_2(0,l)} - \|a(\cdot)\psi^N(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)}
\end{aligned}$$

from this we deduce the following inequality

$$\left\| \frac{\partial^2\psi^N(\cdot, z)}{\partial x^2} \right\|_{L_2(0,l)} \leq \frac{1}{a_0} \|\Lambda\psi^N(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)} + \frac{\mu_1}{a_0} \|\psi^N(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)} \tag{3.53}$$

considering this inequality and the estimation of (3.17), we obtain the following inequality from inequality (3.52):

$$\begin{aligned}
& \left\| \Lambda \psi^N(\cdot, z) \right\|_{L_2(0, l)}^2 + \operatorname{Im} a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau \leq \quad (3.54) \\
& \leq c_{16} \left(\left\| \varphi \right\|_{W_2(0, l)}^2 + \left\| f \right\|_{W_2(\Omega)}^2 + \left\| \varphi \right\|_{W_2(0, l)}^6 + \left\| f \right\|_{W_2(\Omega)}^6 \right) + \\
& \quad + c_{17} \int_0^z \left\| \Lambda \psi^N(\cdot, \tau) \right\|_{L_2(0, l)}^2 d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

Considering that the term on the left-hand side of this inequality is non-negative, we can write the following inequality:

$$\begin{aligned}
& \left\| \Lambda \psi^N(\cdot, z) \right\|_{L_2(0, l)}^2 \leq c_{16} \left(\left\| \varphi \right\|_{W_2(0, l)}^2 + \left\| f \right\|_{W_2(\Omega)}^2 + \left\| \varphi \right\|_{W_2(0, l)}^6 + \left\| f \right\|_{W_2(\Omega)}^6 \right) + \\
& \quad + c_{17} \int_0^z \left\| \Lambda \psi^N(\cdot, \tau) \right\|_{L_2(0, l)}^2 d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

From this, with the assistance of Gronwall's lemma, we obtain that the following prediction holds:

$$\left\| \Lambda \psi^N(\cdot, z) \right\|_{L_2(0, l)}^2 \leq c_{18} \left(\left\| \varphi \right\|_{W_2(0, l)}^2 + \left\| f \right\|_{W_2(\Omega)}^2 + \left\| \varphi \right\|_{W_2(0, l)}^6 + \left\| f \right\|_{W_2(\Omega)}^6 \right), \forall z \in [0, L]. \quad (3.55)$$

Given this estimate, we also find that the following estimate from inequality (3.54) holds:

$$\begin{aligned}
& \left\| \Lambda \psi^N(\cdot, z) \right\|_{L_2(0, l)}^2 \leq c_{16} \left(\left\| \varphi \right\|_{W_2(0, l)}^2 + \left\| f \right\|_{W_2(\Omega)}^2 + \left\| \varphi \right\|_{W_2(0, l)}^6 + \left\| f \right\|_{W_2(\Omega)}^6 \right) + \quad (3.56) \\
& \quad + c_{17} \int_0^z \left\| \Lambda \psi^N(\cdot, \tau) \right\|_{L_2(0, l)}^2 d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

From the inequality (3.53) with the help of the estimates (3.17) and (3.55) we obtain the following estimate:

$$\begin{aligned}
& \left\| \Lambda \psi^N(\cdot, z) \right\|_{L_2(0, l)}^2 + \operatorname{Im} a_2 \int_{\Omega_z} |\psi^N|^2 |\Lambda \psi^N|^2 dx d\tau \leq \quad (3.57) \\
& \leq c_{19} \left(\left\| \varphi \right\|_{W_2(0, l)}^2 + \left\| f \right\|_{W_2(\Omega)}^2 + \left\| \varphi \right\|_{W_2(0, l)}^6 + \left\| f \right\|_{W_2(\Omega)}^6 \right), \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

By adding the estimates (3.16), (3.32) and (3.57) side by side, we can write the following estimate:

$$\|\psi^N(\cdot, z)\|_{W_2(0,L)}^2 \leq c_{21} \left(\|\varphi\|_{W_2(0,L)}^2 + \|f\|_{W_2(\Omega)}^2 + \|\varphi\|_{W_2(0,L)}^6 + \|f\|_{W_2(\Omega)}^6 \right), \forall z \in [0, L]. \quad (3.58)$$

Now let us evaluate the derivative of $\frac{\partial \psi^N}{\partial z}$. For this purpose, let us multiply the k -th equation of (3.9) by $\frac{d\bar{c}_k^N(z)}{dz}$ and sum the obtained equations over k from $k = 1$ to $k = N$. If we integrate both sides of the obtained equation over the interval $(0, L)$, we obtain the following equation:

$$\begin{aligned} & \int_{\Omega} \left(i \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial z} \right|^2 + a_0 \frac{\partial^2 \psi^N}{\partial x^2} \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial z} + ia_1(x, z) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial z} - a(x) \psi^N \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial z} \right) dx dz + \\ & + \int_{\Omega} \left(v_0(z) \psi^N \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial z} + iv_1(z) \psi^N \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial z} + a_2 |\psi^N|^2 \psi^N \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial z} \right) dx dz = \int_{\Omega} f \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial z} dx dz \end{aligned}$$

from this we can derive the following equation:

$$\begin{aligned} & \int_{\Omega} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial z} \right|^2 dx dz = -i \int_{\Omega} \left(-a_0 \frac{\partial^2 \psi^N}{\partial x^2} - ia_1(x, z) \frac{\partial \psi^N}{\partial x} + a(x) \psi^N \right) \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial z} dx dz - \\ & = -i \int_{\Omega} \left(-v_0(z) \psi^N - iv_1(z) \psi^N - a_2 |\psi^N|^2 \psi^N + f(x, z) \right) \frac{\partial \bar{\psi}^N}{\partial z} dx dz \end{aligned}$$

from this equation, with the help of the Cauchy-Bunjakowski inequality, we obtain the following inequality:

$$\begin{aligned} & \int_{\Omega} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial z} \right|^2 dx dz \leq 7a_0^2 \int_{\Omega} \left| \frac{\partial^2 \psi^N}{\partial x^2} \right|^2 dx dz + 7\mu_4^2 \int_{\Omega} \left| \frac{\partial \psi^N}{\partial x} \right|^2 dx dz + \\ & + 7(\mu_1^2 + b_0^2 + b_1^2) \int_{\Omega} |\psi^N|^2 dx dz + 7|a_2|^2 \int_{\Omega} |\psi^N|^6 dx dz + 7 \int_{\Omega} |f|^2 dx dz \end{aligned} \quad (3.59)$$

now let us consider the fourth term on the right hand side of this inequality. According to the inequality we know from (Lions,1972; Yagubov,Ibrahimov and Suleymanov,2022) we can write the following inequality:

$$\|\psi^N(\cdot, z)\|_{L_\infty(0,l)} \leq \tilde{\beta} \left\| \frac{\partial \psi^N(\cdot, z)}{\partial x} \right\|_{L_2(0,l)}^{\frac{1}{2}} \|\psi^N(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)}^{\frac{1}{2}}, \forall z \in [0, L]. \quad (3.60)$$

Here $\tilde{\beta} > 0$ is a known constant. From this inequality, with the help of (3.16) and (3.32) we obtain the following estimate:

$$\|\psi^N(\cdot, z)\|_{L_\infty(0,l)}^6 \leq c_{22} \left(\|\varphi\|_{W_2(0,l)}^6 + \|f\|_{W_2(\Omega)}^6 \right), \forall z \in [0, L] \quad (3.61)$$

With the help of this estimate and the estimate of (3.58), we find the following estimate from the inequality (3.59):

$$\left\| \frac{\partial \psi^N}{\partial z} \right\|_{L_2(\Omega)}^2 \leq c_{23} \left(\|\varphi\|_{W_2(0,l)}^2 + \|f\|_{W_2(\Omega)}^2 + \|\varphi\|_{W_2(0,l)}^6 + \|f\|_{W_2(\Omega)}^6 \right), \forall z \in [0, L]. \quad (3.62)$$

If we integrate both sides of the estimate (3.58) over the interval $(0, L)$ and add the resulting estimate with the estimate (3.62), we obtain the following estimate:

$$\|\psi^N\|_{W_2^{2,1}(\Omega)}^2 \leq c_{24} \left(\|\varphi\|_{W_2(0,l)}^2 + \|f\|_{W_2(\Omega)}^2 + \|\varphi\|_{W_2(0,l)}^6 + \|f\|_{W_2(\Omega)}^6 \right), \forall z \in [0, L], N = 1, 2, \dots \quad (3.63)$$

Here the constant $c_{24} > 0$ is independent of N . Using this estimate and choosing $c_0 = c_{24}$, we prove that the lemma holds. Lemma 3.2 is proved. Now let us continue the proof of the theorem. By (3.11) or (3.63) we can choose a subsequence $\{\psi^N(x, z)\}$ from the sequence $\{\psi^{N_m}(x, z)\}$ which converges to the function $\psi(x, z)$ in the space $W_0^{2,1} W_2(\Omega)$. Let us show that this limit function (2.1) - (2.3) is the solution of the initial boundary value problem in the sense of Definition 2.1. To this end, let us first show that the function $\psi(x, z)$ almost satisfies equation (2.1) for $(x, z) \in \Omega$. Therefore, when $N = N_m$ (3.9), the k -th Fourier coefficient of any function $\bar{\eta}(x, z)$ belonging to the space $L_2(\Omega)$ is the k -th Fourier coefficient. Multiply by the function $\bar{\eta}_k(z) = (\bar{\eta}(\cdot, z), u_k)_{L_2(0,l)}$. Let us multiply the obtained equations over k from $k = 1$ to $N' \leq N_m$ and integrate over the interval $(0, L)$. Then for any function $\bar{\eta}_k^{N'}(x, z) = \sum_{k=1}^{N'} \bar{\eta}_k(z) u_k(x) N' \leq N_m$ we obtain the following integral equivalence:

$$\int_{\Omega} \left(i \frac{\partial \psi^{N_m}}{\partial z} + a_0 \frac{\partial^2 \psi^{N_m}}{\partial x^2} + i a_1(x, z) \frac{\partial \psi^{N_m}}{\partial x} - a(x) \psi^{N_m} + \right. \quad (3.64)$$

$$\left. + v_0(z) \psi^{N_m} + i v_1(z) \psi^{N_m} + a_2 |\psi^{N_m}|^2 \psi^{N_m} - f(x, z) \right) \bar{\eta}^{N'}(x, z) dx dz = 0$$

from the compact embedding of the space $W_2^{0,2,1}(\Omega)$ into the space $L_2(\Omega)$ we can write the following limit relation:

$$\text{For } m \rightarrow \infty, \psi^{N_m} \rightarrow \psi \text{ is strongly convergent in } L_2(\Omega) \quad (3.65)$$

if this is the case, we can choose a subsequence $\{\psi^{N_m}(x, z)\}$ which converges almost immediately to $\psi(x, z)$ in the Ω region. For simplicity, let us denote the convergent subsequence again by $\{\psi^{N_m}(x, z)\}$. Then we can express the following limit relation:

For $m \rightarrow \infty$, $|\psi^{N_m}(x, z)|^2 \psi^{N_m}(x, z) \rightarrow |\psi(x, z)|^2 \psi(x, z)$ (3.66), weakly in $L_2(\Omega)'$ for almost every $(x, z) \in \Omega$. On the other hand, by embedding the space $W_2^{0,2,1}(\Omega)$ into the space $L_{\infty}(0, L; W_2^1(0, l))$ (see [25]), we obtain the following inequality:

$$\left\| \psi^{N_m} \right\|_{L_{\infty}\left(0, L; W_2^{0,1}(0, l)\right)} \leq c_{25} \left\| \psi^{N_m} \right\|_{W_2^{0,2,1}(\Omega)}$$

then with the help of the estimation (3.11) we can write the following inequality when $N = N_m, m = 1, 2, \dots$.

$$\left\| \psi^{N_m} \right\|_{L_{\infty}\left(0, L; W_2^{0,1}(0, l)\right)} \leq c_{26}, m = 1, 2, \dots \quad (3.67)$$

it is obvious that for $m = 1, 2, \dots$ the following inequality applies:

$$\left\| |\psi^{N_m}|^2 \psi^{N_m} \right\|_{L_2(\Omega)}^2 = \int_0^L \left\| |\psi^{N_m}(\cdot, z)|^2 \psi^{N_m}(\cdot, z) \right\|_{L_2(0, l)}^2 dz \leq \int_0^L \left\| \psi^{N_m}(\cdot, z) \right\|_{L_6(0, l)}^6 dz, m = 1, 2, \dots \quad (3.68)$$

on the other hand, from the inequality (3.60) we obtain the following inequality when $N = N_m, m = 1, 2, \dots$:

$$\begin{aligned} \int_0^L \|\psi^{N_m}(\cdot, z)\|_{L_6(0,l)}^6 dz &\leq l \int_0^L \|\psi^{N_m}(\cdot, z)\|_{L_\infty(0,l)}^6 dz \leq c_{26} \int_0^L \|\psi^{N_m}(\cdot, z)\|_{W_2^{0,1}(0,l)}^6 dz \leq \\ &\leq c_{27} \|\psi^{N_m}\|_{L_\infty(0,L;W_2^{0,1}(0,l))}^6, m = 1, 2, \dots \end{aligned}$$

Then, with the help of this inequality and the inequality (3.67), we find from the inequality (3.68) that the following inequality holds:

$$\| |\psi^{N_m}|^2 \psi^{N_m} \|_{L_2(\Omega)}^2 \leq c_{28}, m = 1, 2, \dots \quad (3.69)$$

therefore, based on this inequality and the lemma known from (Ladyzhenskaya, 1967) we can conclude that the following limit relation holds:

$$\text{For } m \rightarrow \infty, |\psi^{N_m}|^2 \psi^{N_m} \rightarrow |\psi|^2 \psi, \text{ converges weakly in } L_2(\Omega). \quad (3.70)$$

Taking into account this limit relation and the weak convergence of the subsequence $\psi^{N_m}(x, z)$ to the function $\psi(x, z)$ in the space $W_2^{0,1}(\Omega)$ by passing to the limit in the integral identity (3.64) over $Nm, m = 1, 2, \dots$, we obtain that the following integral identity holds for any function

$$\begin{aligned} \bar{\eta} k^{N'}(x, z) &= \sum_{k=1}^{N'} k = 1^{N'} \bar{\eta} k(z) u_k(x) : \int_{\Omega} \left(\psi(x, z) \frac{\partial \bar{\eta} k^{N'}}{\partial x} - \bar{\eta} k^{N'}(x, z) \frac{\partial \psi}{\partial x} \right) dx dz = 0 \\ &\int_{\Omega} \left(i \frac{\partial \psi}{\partial z} + a_0 \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + i a_1(x, z) \frac{\partial \psi}{\partial x} - a(x) \psi + \right. \\ &\left. + v_0(z) \psi + i v_1(z) \psi + a_2 |\psi|^2 \psi - f(x, z) \right) \bar{\eta}^{N'}(x, z) dx dz = 0 \\ \bar{\eta}_k^{N'}(x, z) &= \sum_{k=1}^{N'} \bar{\eta}_k(z) u_k(x) \text{ is a partial sum of the series } \bar{\eta}(x, z) = \sum_{k=1}^{\infty} \bar{\eta}_k(z) u_k(x) \end{aligned}$$

since $N' \rightarrow \infty$ the partial sum $\bar{\eta}_k^{N'}(x, z)$ converges to the function $\bar{\eta}(x, z)$ in the space $L_2(\Omega)$. If This then in the last identity N' If we take the limit for $\rightarrow \infty$, we can conclude that the limit function $\psi(x, z)$ satisfies the following integral identity for any function $\eta = \eta(x, z)$ belonging to the space $L_2(\Omega)$:

$$\begin{aligned} \int_{\Omega} \left(i \frac{\partial \psi}{\partial z} + a_0 \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + i a_1(x, z) \frac{\partial \psi}{\partial x} - a(x) \psi + \right. \\ \left. + v_0(z) \psi + i v_1(z) \psi + a_2 |\psi|^2 \psi - f(x, z) \right) \bar{\eta}(x, z) dx dz = 0 \end{aligned} \quad (3.71)$$

From this, we obtain that the function $\psi(x, z)$ satisfies the equation (2.1) for almost every $(x, z) \in \Omega$.

Now let us show that the limit function $\psi(x, z)$ satisfies the initial value condition (2.2) for almost every $x \in (0, l)$, that is, the condition $\psi(x, 0) = \varphi(x), \forall x \in (0, l)$. Taking into account that the space $W_2^{0,2,1}(\Omega)$ is compactly embedded into the space $C^0([0, L], L_2(0, l))$, we can write the following limit relation, uniformly with respect to $z \in [0, L]$:

$$\text{For } m \rightarrow \infty, \|\psi^{N_m}(\cdot, z) - \psi(\cdot, z)\|_{L_2(0, l)} \rightarrow 0 \quad (3.72)$$

on the other hand, it is evident that the following inequality holds:

$$\|\psi(\cdot, 0) - \varphi\|_{L_2(0, l)} \leq \|\psi(\cdot, 0) - \psi^{N_m}(\cdot, 0)\|_{L_2(0, l)} + \|\psi^{N_m}(\cdot, 0) - \varphi\|_{L_2(0, l)} \quad (3.73)$$

when $z = 0$, using the limit relation (3.72), the first term on the right-hand side of this inequality approaches zero for $m \rightarrow \infty$. Therefore, let us show that the second term on the right-hand side of inequality (3.73) also approaches zero for $m \rightarrow \infty$. Using the formula (3.8) we can write the following formula:

$$\psi^{N_m}(x, 0) = \sum_{k=1}^{N_m} c_k^{N_m}(0) u_k(x) = \sum_{k=1}^{N_m} \varphi_k u_k(x) = \varphi^{N_m}(x)$$

the $\varphi^{N_m}(x)$ function is the partial sum of the Fourier series of the function $\varphi = \varphi(x)$ belonging to the space $W_2^{0,2}(0, l)$. Taking this into account, if we take limit for $m \rightarrow \infty$ in the second term on the right-hand side of the inequality (3.73), we obtain the following limit relation

$$\text{For } m \rightarrow \infty, \|\psi^{N_m}(\cdot, 0) - \varphi\|_{L_2(0, l)} \rightarrow 0 \quad (3.74)$$

thus, if we take this limit relation and the limit relation (3.72) when $z = 0$ and limit for $m \rightarrow \infty$ on both sides of the inequality (3.73), we find the following relation:

$$\|\psi(\cdot, 0) - \varphi\|_{L_2(0, l)} = 0$$

from this, we obtain that the limit function $\psi(x, z)$ satisfies the initial value condition (2.2) for almost every $x \in (0, l)$, that is, the condition $\psi(x, 0) = \varphi(x), \forall x \in (0, l)$. Finally, let us show that the limit function $\psi(x, z)$ satisfies the boundary value conditions (2.3) for almost every $z \in (0, L)$. From the compact embedding of the space $W_2^{2,1}(\Omega)$ into the space $C^0([0, l], L_2(0, L))$, we can write the following limit relation, uniformly with respect to $x \in [0, l]$:

$$\text{For } m \rightarrow \infty, \|\psi^{N_m}(x, \cdot) - \psi(x, \cdot)\|_{L_2(0, L)} \rightarrow 0, \forall x \in [0, l]. \quad (3.75)$$

On the other hand, it is apparent that the following inequality holds:

$$\|\psi(s, \cdot)\|_{L_2(0, L)} \leq \|\psi(s, \cdot) - \psi^{N_m}(s, \cdot)\|_{L_2(0, L)} + \|\psi^{N_m}(s, \cdot)\|_{L_2(0, L)}, s = 0, l \quad (3.76)$$

if we use the limit relation (3.75) when $x = 0, x = l$, we can see that the first term on the right hand side of this inequality approaches zero for $m \rightarrow \infty$. Therefore, let us show that the second term on the right-hand side of the inequality (3.76) also approaches zero for $m \rightarrow \infty$. Using the formula (3.8), we can indeed write the following inequalities:

$$\psi^{N_m}(s, z) = \sum_{k=1}^{N_m} c_k^{N_m}(z) u_k(s), s = 0, l \quad (3.77)$$

if we consider the boundary value conditions $u_k(0) = u_k(l) = 0$, we obtain the following relations:

$$\psi^{N_m}(0, z) = \psi^{N_m}(l, z) = 0 \quad (3.78)$$

thus, if we use these relations and the limit relation (3.75) when $x = 0, x = l$ and limit for $m \rightarrow \infty$ on both sides of the inequality (3.76), we get the following relations:

$$\|\psi(s, \cdot)\|_{L_2(0, L)} = 0, s = 0, l \quad (3.79)$$

from these relations, we obtain that the following boundary value conditions are valid:

$$\psi(0, z) = \psi(l, z) = 0, \forall z \in (0, L).$$

Thus, we have proved that the limit function $\psi(x, z)$ is a solution of the initial boundary value problem (2.1) – (2.3) in the sense of Definition 2.1 belonging to the space $W_2(\Omega)$, and for this solution, the estimate (3.1) holds. Indeed, taking into account the convergence property of the subsequence $\psi^{N_m}(x, z)$ to the function $\psi(x, z)$ in the estimate (3.11), and setting $N = N_m, m = 1, 2, \dots$, we find that the estimate (3.1) holds by taking the limit as $m \rightarrow \infty$. Now, let us show that the solution of the initial boundary value problem (2.1) - (2.3) is unique. Suppose that $\psi(x, z)$ and $\phi(x, z)$ are any two solutions of the initial boundary value problem (2.1) - (2.3). Let $w(x, z) = \psi(x, z) - \phi(x, z)$. Then, it is clear that the function $w = w(x, z)$ is a solution of the following initial boundary value problem:

$$i \frac{\partial w}{\partial z} + a_0 \frac{\partial^2 w}{\partial x^2} + ia_1(x, z) \frac{\partial w}{\partial x} - a(x)w + v_0(z)w + iv_1(z)w + \quad (3.80)$$

$$+ a_2(|\psi|^2 + |\phi|^2)w + a_2\psi\phi\bar{w} = 0, (x, z) \in \Omega$$

$$w(x, 0) = 0, x \in (0, l) \quad (3.81)$$

$$w(0, z) = w(l, z) = 0, z \in (0, L) \quad (3.82)$$

Since the functions $\psi(x, z)$ and $\phi(x, z)$ are solutions of the initial boundary value problem (2.1) – (2.3) belonging to the space $W^{0,2,1}(\Omega)$, the function $w = w(x, z)$ must satisfy the identity

$$\int_{\Omega_z} \left(i \frac{\partial w}{\partial z} + a_0 \frac{\partial^2 w}{\partial x^2} + ia_1(x, \tau) \frac{\partial w}{\partial x} - a(x)w + v_0(\tau)w + iv_1(\tau)w + \quad (3.83) \right. \\ \left. + a_2(|\psi|^2 + |\phi|^2)w + a_2\psi\phi\bar{w} \right) \bar{\eta}(x, \tau) dx d\tau = 0, \forall z \in [0, L].$$

It is evident that $w(x, z)$ satisfies the integral identity and the initial condition (3.81) for almost every $x \in (0, l)$, and the boundary condition (3.82) for almost every $z \in (0, L)$. In this integral identity, let us take the function $w(x, z)$ belonging to the space $W_2^{0,2,1}(\Omega)$ instead of $\eta(x, z)$. Then, with the help of the partial integration formula, we obtain the following equality:

$$\int_{\Omega_z} \left(i \frac{\partial w}{\partial z} + a_0 \frac{\partial^2 w}{\partial x^2} + ia_1(x, \tau) \frac{\partial w}{\partial x} - a(x)w + v_0(\tau)w + iv_1(\tau)w + \quad (3.84) \right.$$

$$\left. + a_2(|\psi|^2 + |\phi|^2)w + a_2\psi\phi\bar{w} \right) \bar{\eta}(x, \tau) dx d\tau = 0, \forall z \in [0, L]$$

if we subtract its complex conjugate from this equation, we can write the following equation:

$$\begin{aligned}
& \int_{\Omega_z} \left(\frac{\partial w}{\partial z} \bar{w} + \frac{\partial \bar{w}}{\partial z} w \right) dx d\tau + \int_{\Omega_z} \left(a_1(x, \tau) \frac{\partial w}{\partial x} \bar{w} + a_1(x, \tau) \frac{\partial \bar{w}}{\partial x} w \right) dx d\tau + 2 \int_{\Omega_z} v_1(\tau) |w|^2 dx d\tau + \\
& + 2\text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} (|\psi|^2 + |\phi|^2) |w|^2 dx d\tau + 2\text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} \text{Re}(\psi\phi(\bar{w})^2) dx d\tau + \\
& + 2\text{Re}a_2 \int_{\Omega_z} \text{Im}(\psi\phi(\bar{w})^2) dx d\tau = 0, \forall z \in [0, L]. \tag{3.84}
\end{aligned}$$

If we transform the second term on the left hand side of this equation, we get the following equation:

$$\begin{aligned}
& \int_{\Omega_z} \left(a_1(x, \tau) \frac{\partial w}{\partial x} \bar{w} + a_1(x, \tau) \frac{\partial \bar{w}}{\partial x} w \right) dx d\tau \\
& = \int_{\Omega_z} \frac{\partial}{\partial x} (a_1(x, \tau) |w|^2) dx d\tau - \int_{\Omega_z} \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} |w|^2 dx d\tau
\end{aligned}$$

under the boundary value conditions of (3.82), the first term on the right hand side of this equation is equal to zero. We can therefore write the following equation:

$$\int_{\Omega_z} \left(a_1(x, \tau) \frac{\partial w}{\partial x} \bar{w} + a_1(x, \tau) \frac{\partial \bar{w}}{\partial x} w \right) dx d\tau = - \int_{\Omega_z} \frac{\partial a_1(x, \tau)}{\partial x} |w|^2 dx d\tau$$

considering this equation, we obtain the following equation from equation (3.84):

$$\begin{aligned}
& \int_{\Omega_z} \left(\frac{\partial w}{\partial z} \bar{w} + \frac{\partial \bar{w}}{\partial z} w \right) dx d\tau + 2\text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} (|\psi|^2 + |\phi|^2) |w|^2 dx d\tau = \\
& = -2 \int_{\Omega_z} v_1(\tau) |w|^2 dx d\tau - 2\text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} \text{Re}(\psi\phi(\bar{w})^2) dx d\tau - 2\text{Re}a_2 \int_{\Omega_z} \text{Im}(\psi\phi(\bar{w})) dx d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

From this equation, and with the help of the initial value condition (3.81), we find that the following inequality holds:

$$\begin{aligned}
& \|w(\cdot, z)\|_{L_2(0, l)}^2 + 2\text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} (|\psi|^2 + |\phi|^2) |w|^2 dx d\tau \leq \\
& \leq 2 \int_{\Omega_z} |v_1(\tau)| |w|^2 dx d\tau + 2(\text{Im}a_2 + |\text{Re}a_2|) \int_{\Omega_z} |\psi||\phi| |w|^2 dx d\tau, \forall z \in [0, L].
\end{aligned}$$

Hence, from the condition for $2|\psi||\phi| \leq |\psi|^2 + |\phi|^2$ and the function $v_1(z)$ we obtain the following inequality:

$$\begin{aligned} & \|w(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)}^2 + 2\text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} (|\psi|^2 + |\phi|^2)|w|^2 dx d\tau \leq \\ & \leq 2b_1 \int_{\Omega_z} |w|^2 dx d\tau + (\text{Im}a_2 + |\text{Re}a_2|) \int_{\Omega_z} (|\psi|^2 + |\phi|^2) |w|^2 dx d\tau, \forall z \in [0, L]. \end{aligned}$$

From this inequality, with the condition (2.4), we find the following inequality:

$$\|w(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)}^2 + \frac{1}{2}\text{Im}a_2 \int_{\Omega_z} (|\psi|^2 + |\phi|^2)|w|^2 dx d\tau \leq 2b_1 \int_{\Omega_z} |w|^2 dx d\tau, \forall t \in [0, T].$$

Provided that the second term on the left-hand side of this equation is non-negative, we can write the following inequality:

$$\|w(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)}^2 \leq 2b_1 \int_0^z \|w(\cdot, \tau)\|_{L_2(0,l)}^2 d\tau, \forall z \in [0, L].$$

Applying Gronwall's lemma, we obtain the following relation:

$$\|w(\cdot, z)\|_{L_2(0,l)}^2 = 0, \forall z \in [0, L].$$

From this we get the following relation:

$$w(x, z) = 0, \forall x \in (0, l), \forall z \in [0, L].$$

From this relation and the formula $w(x, z) = \psi(x, z) - \phi(x, z)$ it follows that the solution of the initial boundary value problem (2.1) - (2.3) is unique. Theorem 3.1 is proved.

Setting and Solution of the Second Kind of Initial Boundary Value Problem

Consider the following second kind of initial boundary value problem for finding the function $\psi = \psi(x, z)$:

$$i \frac{\partial \psi}{\partial z} + a_0 \frac{\partial^2 \psi}{\partial x^2} + ia_1(x, z) \frac{\partial \psi}{\partial x} - a(x)\psi + v_0(z)\psi + iv_1(z)\psi + a_2|\psi|^2 = f(x, z), (x, z) \in \Omega$$

$$\psi(x, 0) = \varphi(x), x \in (0, l) \tag{4.2}$$

$$\frac{\partial \psi(0, z)}{\partial x} = \frac{\partial \psi(l, z)}{\partial x} = 0, z \in (0, L) \tag{4.3}$$

Here where $i = \sqrt{-1}$; $a_0 > 0$ is a given number, a_2 is a complex number and satisfies the following conditions:

$$a_2 = \text{Re}a_2 + i\text{Im}a_2, \text{Im}a_2 > 0, \text{Re}a_2 < 0, \text{Im}a_2 \geq 2|\text{Re}a_2| \quad (4.4)$$

$a(x), a_1(x, z), v_0(z), v_1(z)$ are real-valued measurable functions and satisfy the following conditions:

$$\mu_0 \leq a(x) \leq \mu_1, \left| \frac{da(x)}{dx} \right| \leq \mu_2, \left| \frac{d^2a(x)}{dx^2} \right| \leq \mu_3, \forall x \in (0, l), \mu_0, \mu_1, \mu_2, \mu_3 = \text{const} > 0 \quad (4.5)$$

$$|a_1(x, z)| \leq \mu_4, \left| \frac{\partial a_1(x, z)}{\partial x} \right| \leq \mu_5, \left| \frac{\partial^2 a_1(x, z)}{\partial x^2} \right| \leq \mu_6, \forall (x, z) \in \Omega \quad (4.5)$$

$$4.6) \quad (4.6)$$

$$a_1(0, z) = a_1(l, z) = 0, z \in (0, L), \mu_3, \mu_4, \mu_5, \mu_6 = \text{const} > 0 \quad (4.7)$$

$$4.7) |v_s(z)| \leq b_s, s = 0, 1, \forall z \in (0, L), b_0, b_1 = \text{const} > 0$$

$\varphi(x), f(x, z)$ - are complex-valued measurable functions satisfying the following conditions:

$$\varphi \in W_2^2(0, l), \frac{d\varphi(0)}{dx} = \frac{d\varphi(l)}{dx} = 0 \quad (4.8)$$

$$f \in W_2^{2,0}(\Omega), \frac{\partial f(0, z)}{\partial x} = \frac{\partial f(l, z)}{\partial x} = 0, z \in (0, L) \quad (4.9)$$

Definition 4.1. The solution of the initial boundary value problem (4.1) - (4.3) is defined as the equation (4.1) for almost $(x, z) \in \Omega$, the initial value condition (4.2) for almost $x \in (0, l)$, and the boundary value condition (4.3) for almost $z \in (0, L)$, we will understand the function $\psi = \psi(x, z)$.

In this section we prove the following theorem which shows the existence and uniqueness of the solution of the second kind of initial boundary value problem (4.1) - (4.3).

Theorem 4.2. Suppose that the functions $a(x), a_1(x, t), \varphi(x), f(x, t)$ of the complex number a_2 satisfy the conditions (4.4) - (4.9). Then the initial boundary value problem (4.1) - (4.3) has only one immediate solution in the space $W_2^{2,1}(\Omega)$ and the following estimate holds:

$$\|\psi\|_{W_2^{2,1}(\Omega)}^2 \leq c_{29} \left(\|\varphi\|_{W_2^2(0,l)}^2 + \|f\|_{W_2^{2,0}(\Omega)}^2 + \|\varphi\|_{W_2^1(0,l)}^6 + \|f\|_{W_2^{1,0}(\Omega)}^6 \right) \quad (4.10)$$

Where $c_{29} > 0$ is a constant.

The proof of this theorem is equivalent to the proof of Theorem 3.1. For the proof of this theorem, the basis functions are the functions from the space of functions $W_2^2(0, l)$ and orthonormal in the space $L_2(0, l)$ and

$$\Lambda X(x) = \lambda X(x), x \in (0, l), \frac{dX(0)}{dx} = \frac{dX(l)}{dx} = 0 \quad (4.11)$$

The system of functions $u_k = u_k = u_k(x), k = 1, 2, \dots$, corresponding to the solutions of the eigenvalue problem $\lambda = \lambda_k, k = 1, 2, \dots$ is used. Here the operator Λ is defined by the formula (3.3).

Acknowledgement

The author thanks the referees and Editor for their valuable comments.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Aksoy NY., 2009. Optimal control problems with unbounded coefficients of nonlinear schrödinger equation and their finite difference approximation. Doctoral Thesis, Erzurum, page: 150.

Akbaba GD., 2011. Optimal control problem with a gradient term for the schrödinger equation with virtual coefficients using lions functional analysis. Master's Thesis, Kars, page: 71.

Baudouin L, Kavian O, Puel JP., 2005. Regularity for a schrödinger equation with singular potentials and application to bilinear optimal control. Journal of Differential Equations, 216, 188-222.

Butkovsky AG, Samoilenko YI., 1984. Control of quantum mechanical processes. Nauka Press, Moscow.

İbrahimov NS., 2010a. Solvability of initial-boundary value problems for a linear stationary equation of quasi-optics. International Journal of Caucasian University Mathematics and Informatics, 1(29): 61-70.

İbrahimov NS., 2010b. Solvability of initial-boundary value problems for a multidimensional nonlinear stationary quasi-optics equation with a purely imaginary coefficient in the nonlinear part. News of Baku State University Series Physical Mathematical Sciences, 3, 72-84.

Isgandarov A, Yagubov G., 2007. Optimal control problem with unbounded potential for multidimensional, nonlinear, and nonstationary schrödinger equation. Proceedings of the Lankaran State University Natural Sciences Series, 3, 3-56.

Iskenderov AD, Yagubov GY., 1988. A variational method for solving the inverse problem of determining the quantum-mechanical potential. Doklady AN USSR, 303(5): 1044-1048.

Iskenderov AD, Yagubov GY., 1989. Optimal control of nonlinear quantum-mechanical systems. Automatic and Telemechanics, 12, 27-38.

Iskenderov AD, Yagubov GY, Musaeva MA., 2012. Identification of quantum mechanical potentials. Chashyoglu Publishing, Baku.

Iskenderov A, Yagub G, Salmanov V., 2018. Solvability of initial boundary value problem for a nonlinear schrödinger equation with special gradient term and complex potential. Scientific Proceedings of Nakhchivan State University Mathematical and Natural Sciences Series, 4(93): 28-43.

Ladyzhenskaya OA, Solonnikov VA, Uraltseva NN., 1967. Linear and quasilinear parabolic equations. Nauka Press, Moscow.

Toyoglu F., 2012. Optimal control problems and their numerical solution for the two-dimensional schrödinger equation. Doctoral Thesis, Erzurum, sayfa no: 110.

Vorontsov MA, Shmalgauzen VI., 1985. Principles of adaptive optics. Nauka Press, Moscow.

Yagub G, İbrahimov NS, Zengin M., 2015. Solvability of the initial-boundary value problems for the nonlinear schrödinger equation with special gradient terms. XXV International Conference Problems of Decision Making Under Uncertainties (PDMU-2015), Skhidnytsia, Ukraine, p: 53-54.

Yagub G, İbrahimov NS, Aksoy NY., 2016. On the initial-boundary value problems for the nonlinear schrödinger equation with special gradient terms. XXVII International Conference Problems of Decision Making Under Uncertainties (PDMU-2016), Tbilisi-Batumi, Georgia, p: 170-171.

Yagub G, İbrahimov NS, Zengin M., 2018. The solvability of the initial-boundary value problems for a nonlinear schrödinger equation with a special gradient term. *Journal of Mathematical Physics Analysis Geometry*, 2, 214-232.

Yagub G, İbrahimov N, Suleymanov N., 2022. The second initial-boundary value problem for a linear one-dimensional schrödinger equation with a special gradient term and time dependent measurable boundary complex potential. *Scientific Proceedings of Lankaran State University Mathematical and Natural Sciences Series*, 1, 13-30.

Yagub G, Salmanov V, Yagubov V, Zengin M., 2017. Solution of initial boundary value problems for the nonlinear two-dimensional schrödinger equation. *Scientific Proceedings of Nakhchivan State University Mathematical and Natural Sciences Series*, 4(85): 7-21.

Yagubov GY, Musayeva MA., 1997. On the identification problem for nonlinear schrödinger equation. *Differential Equations*, 33(12): 1691-1698.

Zengin M., 2021. Well-posedness and necessary conditions for the solution of boundary functional optimal control problems for linear and nonlinear multidimensional schrödinger equations with special gradient terms. *Doctoral Thesis, Kars*, sayfa no: 263.

Zhuravlev VM., 2001. *Nonlinear waves and diffusion in dispersive multicomponent systems*. UIGU Press, Ulyanovsk.

The Effect of Algae on Some Quantitative Characteristics of Dwarf and Normal Periwinkle

Ali HASHEMI^{1*}, Abdolali HESAMI², Mosa ZANDIFARD³

^{1,2,3}Department of Horticulture, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran

¹<https://orcid.org/0000-0002-1044-9632>

²<https://orcid.org/0000-0002-3876-6483>

³<https://orcid.org/0009-0002-7805-5776>

*Corresponding author: hashemi@pgu.ac.ir

Research Article

Article History:

Received: 07.01.2025

Accepted: 28.01.2025

Available online: 17.03.2025

Keywords:

Dwarf

Red algae

Green algae

Brown algae

Periwinkle

ABSTRACT

Periwinkle is a shrubby or herbaceous plant that is grown and farmed in the tropics. Seaweed contains a high concentration of salts and mineral compounds, which meet plant nutritional requirements and play an essential role in soil fertility. In this study, the addition of algae in the growth medium was found to be an effective factor in boosting the quality and quantity of two species, Periwinkle Rosea and Burgundy, using a factorial design with three replications. The studies were carried out at the greenhouse of Persian Gulf University's College of Agriculture and Natural Resources in Borazjan, Iran's Bushehr Province. Green, red, and brown algae were created at volume levels of 0, 10, 25, 35, and 50% for this investigation. A few traits were documented, including the number of leaves, stem height, root length, total weight of plants with wet basis (WW) and dry basis (WD). Periwinkle flowers cultivated in the substrate with 50% green algae and 10% red algae had the maximum concentration; for brown algae, dwarf periwinkles had a 25% concentration, while normal periwinkles had a 35% concentration. The substrate with no algae has the most lateral branches of any of the three forms of algae. The substrate with 50% green algae, 35% brown algae, and 10% red algae produced the high amounts of height of periwinkle, root length, number of leaves, total periwinkle plant weight with wet (WW) and dry (WD) basis.

Algelerin Cüce ve Normal Pervane Çiçeğinin Bazı Kantitatif Özellikleri Üzerindeki Etkisi

Araştırma Makalesi

ÖZ

Makale Tarihi:

Geliş tarihi: 07.01.2025

Kabul tarihi: 28.01.2025

Online Yayınlanma: 17.03.2025

Anahtar Kelimeler:

Cüce

Kırmızı yosun

Yeşil yosun

Kahverengi yosun

Pervane çiçeği

Pervane çiçeği, tropik bölgeler ile çiftliklerde yetiştirilen çalimsı veya otsu bir bitkidir. Deniz yosunu, bitki besin gereksinimlerini karşılayan ve toprak verimliliğinde önemli bir rol oynayan yüksek konsantrasyonda tuz ve mineral bileşikleri içermektedir. Bu çalışmada, üç tekrarlamalı faktöriyel tasarım kullanılarak, büyüme ortamına alg eklenmesinin Rosea ve Burgundy adlı iki türün kalitesini ve miktarını artırmada etkili bir faktör olduğu tespit edilmiştir. Çalışmalar, İran'ın Bushehr Eyaleti, Borazjan'daki Basra Körfezi Üniversitesi Tarım ve Doğal Kaynaklar Koleji'nin serasında yürütülmüştür. Bu araştırma için %0, 10, 25, 35 ve 50 seviyelerinde yeşil, kırmızı ve kahverengi algler kullanılmıştır. Yaprak

sayısı, gövde yüksekliği ve kök uzunluğu dahil olmak üzere birkaç özellik saptanmıştır. %50 yeşil alg ve %10 kırmızı alg içeren substratta yetiştirilen pervane çiçeklerinin maksimum konsantrasyona sahip olduğu görülmüş; kahverengi algler için, cüce pervane çiçeği %25 konsantrasyona sahipken, standart pervane çiçeği %35 konsantrasyona sahip olmuştur. Alg içermeyen substratın, üç alg formunun en fazla yan dalına sahip olduğu görülmüştür. %50 yeşil alg, %35 kahverengi alg ve %10 kırmızı alg içeren substrat, ıslak ve kuru bazda yüksek miktarda pervane çiçeği yüksekliği, kök uzunluğu, yaprak sayısı, toplam pervane çiçeği bitki ağırlığı üretmiştir.

To Cite: Hashemi A, Hesami A, Zandifard M., 2025. The effect of algae on some quantitative characteristics of dwarf and normal periwinkle. *Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi Dergisi*, 5(1): 106-122.

Introduction

The expansion of urbanization and population in recent years has forced cities to face a lack of space, and as a result, living in apartments has increased. As a result of these changes, green space in cities has diminished (Salehifard and Alizadeh, 2008). The periwinkle plants impart a characteristic smell to their surroundings. It is due to the presence of volatile compounds in their leaves and flowers. The leaves contained 0.05% of essential oils, while flowers 0.07%. There were 52 leaves essential oil compounds and 41 compounds of the flower essential oil (Salari et al., 2016).

In addition to physical health, suitable green spaces in cities promote mental relaxation, increased productivity, and a higher quality of life (Ebrahim-Zadeh et al., 2008). Using chemical fertilizers has resulted in numerous environmental issues, including soil erosion, water pollution, and a decline in crop output over time. To address these issues, plants' nutritional requirements and the long-term viability of agricultural systems should be considered.

One of the most effective strategies to safeguard the environment is to utilize organic fertilizers. Organic matter is an essential component of soil. It serves variety of functions in agriculture, including preventing soil compaction, increasing the source of carbon and energy for microorganisms, maintaining and stabilizing soil particles, improving root penetration conditions, increasing the quality of saline soils, providing soil's ability to store and transfer water, reducing soil adhesion, and reducing pesticide's negative environmental effects (Cooperband, 2002). Seaweed products promote plant development and yield (Metting et al., 1990).

Algae is an organic component that has long been utilized in agriculture (Dhargalkar and Neelam, 2005; Abdel-Raouf et al., 2012). Seaweed is one of the organic and natural compounds used in agriculture because it contains growth hormones like auxin and cytokine

and nutritional elements like iron, copper, zinc, molybdenum, manganese, vitamins, and amino acids (Uthirapandi et al., 2018; Uthirapandi et al., 2019).

Seaweeds contain micro and macro elements, auxin, gibberellin, and cytokinin (Taiz and Zeiger, 1998; Mukherjee and Patel, 2020). The increase in the growth characteristics of the branch may be due to the content of auxin in seaweed, which has an effective role in cell division, and this factor leads to an increase in plant stem growth (Thomas, 1996). Elements such as nitrogen, potassium, and phosphorus in seaweeds have very important roles in plants' nutrition, growth, and development (Attememe, 2009).

The use of algae increases chlorophyll levels, which leads to increased photosynthetic activity and plant growth (Geeta et al., 2016). The use of seaweed can increase photosynthesis by increasing the amount of chlorophyll, which can increase growth and, ultimately, the diameter and length of the stem (Eris et al., 1995; Paul and Yuvaraj, 2014; Sharma et al., 2014). Rathore et al., (2009) in their experimental test on soybean plants reported that increasing algae concentration the height of the plant is increased.

According to Preza (2019), applying algae on the portulaca grandiflora flower can increase its height. According to Herrera et al. (2014) and Crouch and Staden (1993), green algae affect tomato growth. Popescu and Popescu (2014) found that treatments with algae extract increased the height of grapevine plants compared to the control group. Al-Shareefi et al. (2019) showed that using algae increased the height of the stem in freesia flowers. Because phosphorus is very absorbent in soil, it does not migrate to the roots, so the roots must develop through the soil to obtain the phosphorus that the plant requires. Seaweeds promote root growth and boost beneficial fungi in the soil (Kuwada et al., 2006).

The use of algae in decorative plant bedding can naturally improve plant growth, health, and crop output by improving nutrient absorption. Algae include uncommon carbohydrates, vitamins, and hormones. Algae can stimulate plants' physiological and biochemical processes, resulting in the generation of biologically active chemicals. In this approach, primary and secondary metabolism can be modified, resulting in products that are more resistant to various living and non-living stimuli. Algae can also impact plant development media, causing root growth and nutrient availability (Paul and Yuraj, 2014).

The stimulating effect of seaweed extract on growth traits can be attributed to its basic function in strengthening cell division because it contains more amounts of micro and macronutrients, vitamins, hormones, and antioxidants. These compounds also play an important role in plant protection (Soliman et al., 2000). These compounds play an important role in protecting plants, improving cell division and biosynthesis of organic matter (Stirk and

Van Staden, 1997). Providing food and stimulating growth, on the one hand, causes the production of leaves, and on the other hand, their protective role causes the preservation of leaves, which together leads to an increase in the number of leaves.

Using organic compounds like humic acid and marine algae in poor soils has positive effects on the physicochemical properties of the soil, increases the quality of soils, and organic matter over time can reduce the consumption of chemical fertilizers (Mao et al., 2008; Chojnacka et al., 2015). Numerous research has demonstrated that using seaweed promotes plant development, stimulates root growth, and enhances tolerance to environmental challenges such as drought, salinity, and high temperatures (Khan et al., 2009; Battacharyya et al., 2015; Mukherjee and Patel, 2020). Turan and Kose (2004) found that seaweed extracts improve N, P, K, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, and Zn absorption under optimal nutritional element circumstances. This study examined how green, red, and brown algae affected same characteristics of dwarf and normal Periwinkle.

Material and Methods

To assess the influence of green, red, and brown algae on the growth and yield of dwarf and normal Periwinkle plants, a factorial experiment with three replications was conducted. The studies were carried out at Persian Gulf University's College of Agricultural and Natural Resources in Borazjan, located in the center of Bushehr province, 75 meters above sea level, and is semi-desert and tropical. The faculty's latitude and longitude coordinates on the map are 29 degrees and 22 minutes north and 51 degrees and 24 minutes east. The substrates were a combination of dirt and algae green, red, and brown (Figure 1) in quantities of 0, 10, 25, 35, and 50 percent by volume.



Figure 1 (a) Red algae, (b) Green algae (c) Brown algae

The algae under study were gathered from the Persian Gulf Sea in Bushehr Province. The algae were collected, cleaned with seawater, and washed twice with water before being dried in the shade and ground into powder. The field soil was then sieved until it was uniform, and the soil and algae were mixed in volume ratios of 10:90, 25:75, 35:65, and 50:50 to

produce beds containing 10, 25, 35, and 50% green, red, and brown algae, respectively. Finally, two types of Periwinkle seeds (Rosea and Burgundy) were planted in the pots, and all of the pots were moved to the greenhouse.



Figure 2 (a) regular periwinkle (b) Dwarf periwinkle

The height of the plants was measured weekly beginning the first week after planting, using a ruler with a one millimeter accuracy from the crown of the plants. The dirt around the roots was cleansed to measure root length, and the lengths were measured with a one millimeter accuracy ruler. In order to measure the weight of the plants, the plants were cut from the collar and the roots were removed from the soil. Then, the shoots and roots were washed with distilled water and after removing the excess water due to washing, they were weighed based on wet (WW) and recorded using a digital scale (AND EK_1200A) with an accuracy of 0.001 grams. To measure the weight with dry basis (WD), plants were kept in oven at 70°C for 48 hours, then the dry weight of plants were measured.

Results and Discussion

The comparison of the average effect of algae levels on Periwinkle flowers revealed that the highest and lowest lengths were obtained in periwinkle flowers growing in the substrate containing 50% green and red algae, 32.12 cm and 19.30 cm, respectively. The findings of the study of the influence of algae levels on the height of the periwinkle flower revealed that the periwinkle flowers produced in the substrate containing 50% green algae had the longest stem length (43.93 cm) and the shortest stem length in the substrate containing 50% red algae (27.4 cm). Periwinkle flowers cultivated in soil containing 50% red algae show a significant decrease in plant length when compared to the control, and periwinkle flowers grown in a bed containing 10, 35, and 50% brown algae, and all levels of green algae have a significant increase in length compared to control samples. The length of plants for dwarf periwinkle flower had a downward trend with increasing the concentration of red algae, and increasing the concentration of brown algae from 35% to 50% algae the length of plants decreased. The

highest and lowest length of dwarf periwinkle 20.31, and 11.21 cm, were found in a bed containing 50% green and red algae, respectively. It was also discovered that dwarf periwinkle green algae have no noticeable variation in height from the control. Both plants grew longer as the concentration of green algae rose. In the instance of brown algae, dwarf and standard periwinkle flowers reached their maximum length in substrates containing 25% and 35% algae, respectively. There was also a significant difference in the flowers of Periwinkle in the substrate containing 25, 35, and 50% brown algae, all levels of green algae, and control (Table 1).

Table 1. Comparison of the average effect of green, red, and brown algae on the flower height of dwarf and normal Periwinkle

Supplement added to the soil	Percentage of algae	Normal periwinkle	Dwarf periwinkle	Mean
The height of periwinkle				
Red algae	0	32.95 ^(ed)	12.98 ^(ed)	22.92 ^F
	10	34.70 ^(cd)	13.53 ^(ed)	24.11 ^{EF}
	25	30.36 ^(ef)	12.79 ^(ed)	21.58 ^{GF}
	35	29.80 ^(ef)	11.49 ^(e)	20.64 ^{GH}
	50	27.4 ^(f)	11.21 ^(e)	19.30 ^G
Brown algae	10	34.9 ^(cd)	13.48 ^(ed)	24.19 ^{EF}
	25	37.6 ^(cb)	15.02 ^(cd)	26.31 ^{ED}
	35	40.36 ^(ab)	14.87 ^(cd)	27.62 ^C
	50	38.03 ^(cb)	14.55 ^(cd)	26.29 ^{ED}
Green algae	10	40.96 ^(ab)	16.83 ^(cb)	28.9 ^{BC}
	25	42.00 ^(ab)	19.08 ^(ab)	30.54 ^A
	35	42.80 ^(ab)	20.10 ^(a)	31.54 ^A
	50	43.93 ^(a)	20.31 ^(a)	32.12 ^A
Mean		36.6 ^A	15.09 ^B	

The letters above the numbers show the comparison of means based on Duncan's test. Averages with common letters are statistically not significantly different from each other at the 1% probability level.

Himanshu Kaushik et al. (2013) reported that applying algae and nitrogen fertilizer to parsley flowers resulted in an increase in height in all treatments when compared to the control. Kartikian et al. (2009) found that using nutrient-rich substances increased the height of periwinkle plants relative to the control group. The preceding research is compatible with the current study's findings on the use of algae in the culture media and its effect on the height of the flower periwinkle. Dominican (2019) reported that treating the Naz Sobani flower with algae increased its height. According to Soumia et al. (2017), using algae increased the height of Mina grass. The maximum concentration was recorded by Jatnayaji and Anbazhgan (2009)

using brown algae. According to Vijayanand et al. (2014), while varying the brown algae concentration applied, the bean plants' height increases with the concentration. According to Selvam et al. (2013), when using algae on *Vigna mungo*, increasing the concentration of algae initially causes the stem to grow longer, but higher concentrations inhibit this effect. In Ramya et al. (2010)'s investigation into the impact of brown and green algae concentrations on guar plants, the plant's height initially grew as the concentration of algae increased, but at high concentrations, the plant's height declined. Our findings were consistent with earlier investigations on other plants (Crouch and Staden, 1993; Jothinayagi and Anbazhagan 2009; Sridhar and Rengasamy, 2010; Zodape et al., 2011; Paul and Yuraj, 2014; El-Alsayed et al., 2018; Sumangala et al., 2019; Velasco et al., 2020).

Table 2. Comparison of the average effect of green, red, and brown algae on the root length of Periwinkle (cm)

Supplement added to the soil	Percentage of algae	Normal periwinkle	Dwarf periwinkle	Means
The length of the root of periwinkle flower (cm)				
	0	8.3 ^(ef)	7.05 ^(cd)	7.67 ^{EF}
Red algae	10	8.43 ^(efd)	7.26 ^(c)	7.85 ^E
	25	7.70 ^(efg)	6.43 ^(d)	7.06 ^{GF}
	35	7.13 ^(fg)	6.35 ^(de)	6.74 ^{GH}
	50	6.55 ^(g)	5.66 ^(e)	6.1 ^H
Brown algae	10	8.70 ^(ecd)	7.36 ^(c)	8.03 ^{ED}
	25	9.75 ^(cd)	8.16 ^(ab)	8.95 ^C
	35	11.76 ^(b)	7.7 ^(cab)	9.73 ^B
	50	9.9 ^(c)	7.46 ^(cb)	8.68 ^{CD}
Green algae	10	11.8 ^(b)	8.17 ^(ab)	9.98 ^B
	25	12.15 ^(ab)	8.23 ^(ab)	10.19 ^{AB}
	35	12.6 ^(ab)	8.33 ^(a)	10.46 ^{AB}
	50	13.16 ^(a)	8.43 ^(a)	10.8 ^A
Mean		9.84 ^A	7.43 ^B	

The letters above the numbers show the comparison of means based on Duncan's test. Averages with common letters are statistically not significantly different from each other at the 1% probability level.

The results of the analysis of the average influence of algal levels on root length showed that the highest and lowest root length was observed in the periwinkle flowers grown in the substrate containing 50% green and red algae 10.80 cm and 6.1 cm, respectively. It was found that the length of the roots increased as the amount of green algae-containing substrate increased. The findings indicated an inverse connection between root length and red algae-containing substrate. In a substrate containing 35% brown algae, the maximum root length

(11.76 cm) of periwinkle flower was observed. In normal and low periwinkle, the highest root lengths, 13.16 and 8.43, were observed in the substrate containing 50% green algae, and the lowest root lengths were observed in the substrate containing 50% red algae, 6.55 and 5.66 cm, respectively. This flower exhibited the inverse link between red algae concentration and root length, as well as the direct relationship between green algae concentration and root depth. In normal and low Periwinkle, maximum root lengths of 11.76 and 8.16 cm were reported in substrates harboring brown algae at 35% and 25%, respectively. Periwinkle flowers produced in all concentrations of green algae and concentrations of 25, 35, and 50% of brown algae showed enhanced root length compared to the control (Table 2). Seaweed chemicals generate highly strong polar groups, causing soil masses to form and increasing soil aggregates and porosity, all of which promote root growth (Brownlee et al. 2012). Crouch and Staden (1993) and Hernandez-Herrera et al. (2014) reported that the application of different concentrations of algae in the tomato cultivation bed increases the length of the root of the plant. Our results corroborated previous studies on various plants (Erulan et al., 2009; Karthikeyan et al., 2009; Selvam et al., 2013; Prisa, 2019; Velasco-Ramirez et al., 2020).

Table 3. Comparison of the average effect of green, red, and brown algae on the number of leaves of Periwinkle flower

Supplement added to the soil	Percentage of algae	Normal periwinkle	Dwarf periwinkle	Means
Number of Leaves				
	0	30 ^(e)	30 ^(cde)	30 ^{EF}
Red algae	10	32 ^(cde)	31.33 ^(cde)	31.66 ^{CD}
	25	27.33 ^(e)	29.66 ^(cde)	28.5 ^D
	35	18.66 ^(fg)	29 ^(f)	23.83 ^E
	50	18.5 ^(f)	27.33 ^(e)	22.91 ^E
Brown algae	10	32 ^(cde)	32 ^(cdbe)	32 ^{CD}
	25	33.5 ^(cdeb)	33.66 ^(cadbe)	33.58 ^{CB}
	35	35 ^(cab)	32 ^(cadbe)	33.5 ^{CB}
	50	34.66 ^(cdb)	30 ^(cde)	32.33 ^{CD}
Green algae	10	39.66 ^(ab)	36.50 ^(cadb)	38.08 ^{AB}
	25	38.5 ^(cab)	37 ^(cab)	37.75 ^{CB}
	35	41.66 ^(ab)	39.33 ^(ab)	40.5 ^A
	50	43.00 ^(a)	40.33 ^(a)	41.66 ^A
mean		32.65 ^B	32.93 ^A	

The letters above the numbers shows the compare of means based on Duncan's test. Averages with common letters are statistically not significantly different from each other at the 1% probability level.

The average effect of algae levels on the number of leaves was compared, with the highest number of leaves in periwinkle flowers grown in the substrate containing 50% green

algae (41.66 leaves) and the lowest number in the substrate containing 50% red algae (22.91 leaves). Naturally, it should be mentioned that periwinkle flowers grown in beds containing 35 and 50% red algae showed a significant decrease in the number of leaves compared to the control, and flowers grown in beds containing 10, 35, and 50% green algae showed a significant increase in leaves compared to the control, but the difference was observed in brown algae did not show significance compared to the control in the number of leaves. When periwinkle flowers were cultivated in red algal-containing substrate, the number of leaves fell as the concentration of algae grew, whereas in green algae-containing substrate, the number of leaves increased as the concentration of algae increased.

In the substrate containing brown algae for dwarf periwinkle, the highest number of leaves (33.66) was observed in the substrate containing 25% algae, and for normal periwinkle the highest number of leaves (35) was found in the substrate containing 35% algae.

The findings of the comparison of the average in the case of dwarf periwinkle revealed the largest number of leaves in the dwarf flowers produced in the substrate containing 50% green algae (40.33 leaves) and the lowest number of leaves in the substrate containing 50% red algae (27.33 leaves), and only The number of leaves in the beds containing 35 and 50% green algae was significantly different from the control, but no significant change was seen in any of the brown or red algae concentrations compared to the control. In a substrate containing red algae, the number of leaves declined as the concentration of algae grew, whereas in a substrate containing green algae, the number of leaves fell as the concentration of algae climbed from 10 to 25% and from 35 to 50%.

The findings of the comparison of the average in the case of normal periwinkle flowers revealed that the periwinkle flowers in the substrate containing 50% green and red algae had the highest and lowest number of leaves, 43 and 18.5, respectively. The number of leaves in periwinkle flowers grown in beds containing 10 and 50% red algae decreased significantly, whereas in beds containing 35% brown algae and all levels of green algae, the number of leaves increased significantly as compared to the control. Abou El-Yazied (2012) found that algae treatment resulted in the largest number of leaves in green bean cultivation on a substrate containing 10% algae. Our results corroborated with the previous studies on various plants (Safinaz and Ragaa, 2013; Prisa, 2019; Velasco-Ramirez et al., 2020).

Table 4. Comparison of the average effect of green, red, and brown algae on total weight of Periwinkle flower with wet basis

Supplement added to the soil	Percentage of algae	Normal periwinkle	Dwarf periwinkle	Mean
The total weight of periwinkle with wet basis (g)				
Red algae	0	17.18 ^(cdb)	13.41 ^(d)	15.29 ^D
	10	17.67 ^(cb)	13.74 ^(d)	15.71 ^D
	25	16.68 ^(cde)	11.26 ^(e)	12.97 ^E
	35	13.34 ^(de)	11.01 ^(e)	12.17 ^E
	50	12.76 ^(e)	9.66 ^(e)	11.21 ^E
Brown algae	10	17.62 ^(cb)	13.66 ^(d)	15.64 ^D
	25	18.29 ^(cab)	16.18 ^(bc)	17.23 ^{CD}
	35	20.62 ^(ab)	16.10 ^(bc)	18.36 ^{CB}
	50	19.05 ^(ab)	14.34 ^(dc)	16.69 ^{CD}
Green algae	10	20.80 ^(ab)	16.46 ^(b)	18.63 ^{CAB}
	25	21.08 ^(ab)	18.48 ^(a)	19.78 ^{AB}
	35	21.39 ^(ab)	19.05 ^(a)	20.22 ^{AB}
	50	21.94 ^(aa)	19.44 ^(a)	20.69 ^A
Mean		18.18 ^A	14 ^{B83}	

The letters above the numbers show the comparison of means based on Duncan's test. Averages with common letters are statistically not significantly different from each other at the 1% probability level.

The comparison of the average effect of algae levels on Periwinkle flowers revealed that the highest and lowest weight with wet basis (WW) were obtained in periwinkle flowers growing in the substrate containing 50% green and red algae, 20.69 g and 11.21 g, respectively. The findings of the study of the influence of algae levels on the (WW) of the periwinkle plants revealed that the normal periwinkle plants produced in the substrate containing 50% green algae had the highest weight (21.94 g) and the lowest weight in the substrate containing 50% red algae (12.74 g). The (WW) of plants for dwarf periwinkle flower had a downward trend with increasing the concentration of red algae, and increasing the concentration of brown algae from 35% to 50% algae the (WW) of plants decreased. The highest and lowest (WW) of dwarf periwinkle 19.44, and 9.66 g, were found in a bed containing 50% green and red algae, respectively. It was also discovered that dwarf periwinkle in green algae have a significant difference of (WW) with the control. In the instance of brown algae, normal and dwarf periwinkle plants reached their maximum (WW) in substrates containing 35% and 25% algae, respectively (Table 4).

Table 5. Comparison of the average effect of green, red, and brown algae on total weight of Periwinkle flower with dry basis (WD)

Supplement added to the soil	Percentage of algae	Normal periwinkle	Dwarf periwinkle	Mean
The total weight of periwinkle with dry basis (WD)				
Red algae	0	2.54 ^(efd)	2.05 ^(d)	2.29 ^{ED}
	10	2.76 ^(ecd)	2.10 ^(d)	2.43 ^{CD}
	25	2.12 ^(egf)	1.72 ^(e)	1.92 ^{EF}
	35	1.86 ^(gf)	1.68 ^(e)	1.77 ^F
	50	1.69 ^(g)	1.48 ^(e)	1.58 ^F
Brown algae	10	2.65 ^(ecfd)	2.09 ^(d)	2.37 ^{CD}
	25	3.02 ^(cd)	2.48 ^(bc)	2.75 ^C
	35	3.97 ^(ab)	2.46 ^(bc)	3.22 ^B
	50	3.37 ^(cb)	2.20 ^(dc)	2.78 ^C
Green algae	10	4.01 ^(ab)	2.52 ^(b)	3.26 ^B
	25	4.16 ^(ab)	2.83 ^(a)	3.49 ^{AB}
	35	4.26 ^(a)	2.92 ^(a)	3.59 ^{AB}
	50	4.46 ^(a)	2.97 ^(a)	3.72 ^A
Mean		3.14 ^A	2.27 ^B	

The letters above the numbers show the comparison of means based on Duncan's test. Averages with common letters are statistically not significantly different from each other at the 1% probability level.

Results of comparison of the average effect of algae levels on Periwinkle plants defined that the highest and lowest weight with dry basis (WD) were determined in periwinkle plants growing in the substrate containing 50% green and red algae, 3.72 g and 1.58 g, respectively. The findings of the study of the influence of algae levels on the (WD) of the periwinkle plants showed that the normal's periwinkle plants produced in the substrate containing 50% green algae had the highest weight (4.46 g) and the lowest weight in the substrate containing 50% red algae (1.69 g). The (WD) of plants for dwarf periwinkle plants had a downward trend with increasing the concentration of red algae and increasing the concentration of brown algae from 35% to 50% algae the (WD) of plants decreased. The highest and lowest (WD) of dwarf periwinkle 2.97 g, and 1.48 g, were found in a substrate containing 50% green and 50% red algae, respectively. In a substrate containing 10% and 50% red algae the (WD) of dwarf periwinkle were 2.10 g and 1.48 g, respectively. For substrate containing 10% and 50% brown algae the (WD) of dwarf periwinkle were 2.65 g and 3.37, respectively. Results showed that the substrate containing 10% and 50% green algae the (WD) of dwarf periwinkle were 2.97 g and 2.52 g, respectively. It was also discovered that dwarf periwinkle green algae have a significant difference in (WD) from the control (Table 5).

Seaweed extract comprehensively improved growth of tomato plant root and shoot dry weight and increased plant yield productivity (Hussain et al., 2021).

Norrie and Keathley (2006), indicated that the weight and yield of Thompson Seedless grapes treated with *Ascophyllum nodosum* seaweed increased by 39% and 60.4%, respectively, compared with the control.

Aminifard et al., (2021) reported that the highest leaf dry weight of corn (0.092 g per plant) were obtained at 30 L ha⁻¹ of algae extract, while the lowest amounts leaf dry weight (0.076 g per plant) and were gained in the control treatment. Basimfar et al., (2015) reported that the highest foliar biomass of mung bean was produced by 4 times seaweed spraying, using vermicompost treatment and Partoo variety with 6240 kg ha⁻¹, 5880 kg ha⁻¹ and 5880 kg ha⁻¹ respectively. According to their results, seaweed extract spraying increased the vegetative growth. Haider et al., (2012) concluded that application of seaweed extract after 30 + 60 days of planting of potato plant significantly increased plant growth and yield. Our results corroborated with the previous studies on various plants (Norrie and Keathley, 2006; Basimfar et al., 2015; Aminifard et al., 2021; Hussain et al., 2021).

Conclusion

In general, the use of green algae in both experiments (dwarf and normal periwinkle plants) increased the level of plant performance, and with increase in the amount of algae, the plant traits also increased. In dwarf periwinkle, the highest yield was observed in the substrate containing brown algae at a concentration of 25%, and with the increase in algae concentration, the upward trend was not observed in other characteristics of plants compared to lower concentrations of algae. This situation was observed in normal periwinkle in the substrate containing 35% algae, and when it increased to 50%, a decrease in traits was observed. In red algae, the best performance was recorded in the substrate containing 10% algae, and with the increase in algae concentration, a drop in performance was observed, and the best performance was obtained at the lowest concentration of algae. In the comparison between the three used algae, different concentrations of brown and green algae and 10% of red algae caused the growth of the measured traits. So that the best levels of brown algae, which was 25% to 35%, were equal to the level of 10% of green algae.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Authors' Contributions

The authors declare that they have contributed equally to the article.

References

- Abou El-Yazied A, El-Gizawy AM, Ragab MI, Hamed ES., 2012. Effect of seaweed extract and compost treatments on growth, yield, and quality of snap bean. *Journal of American Science*, 8(6): 1-20.
- Abdel-Raouf N, Al-Homaidan AA, Ibraheem IBM., 2012. Agricultural importance of algae. *African Journal of Biotechnology*, 11(54): 11648-11658.
- Al-Shareefi MJ, Kadhim ZK, Hakim RA., 2019. Effect of algae extract and bio-fertilizer on vegetative growth and flowering of *freesia hybrida* L. *Journal of Kerbala for Agricultural Sciences*, 6(3): 16-23.
- Aminifard MH, Kveh H, Khandan DAS, Fallahi HR., 2021. Effects of different levels of algae extract and mother corm weight on photosynthetic pigment content, growth and yield of saffron. *Journal of Saffron Research*, 9(2): 296-309.
- Attememe JYA., 2009. The effect of humic acid and seaweed extracts on the growth, chemical characteristics and oil characteristics of *Rosmarinus officinalis* L. In the 6th Scientific Conference, 1-17.
- Basimfar R, Nasri M, Zargari K., 2015. Effect of seaweed extract and vermicompost on yield and yield components and phosphor and chlorophyll of Mung bean in Varamin region. <https://sanad.iau.ir/journal/kavir/Article/541416?jid=541416&lang=en>
- Battacharyya D, Babgohari MZ, Rathor P, Prithiviraj B., 2015. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 39-48.
- Brownlee I, Fairclough A, Hall A, Paxman J., 2012. The potential health benefits of seaweed and seaweed, extract. In: POMIN, Vitor H., (ed.) *Seaweed: ecology, nutrient composition and medicinal uses*. *Marine Biology: Earth Sciences in the 21st Century*. Hauppauge, New York, Nova Science Publishers, 119-136.
- Cardozo KH, Guaratini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, Lopes NP, Pinto E., 2007. Metabolites from algae with economic impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1-2): 60-78.
- Chojnacka K, Michalak I, Dmytryk A, Gramza M, Słowiński A, Górecki H., 2015. Algal extracts as plant growth biostimulants. *Marine Algae Extract: Processes, products, and applications*. 189-212.

Cooperband L., 2002. Building soil organic matter with organic amendments. Center for Integrated Agricultural Systems (CIAS), College of Agricultural and Life Sciences, University of Wisconsin-Madison.

Crouch IJ, Van Staden J., 1993. Effect of seaweed concentrate from *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss on *Meloidogyne incognita* infestation on tomato. *Journal of Applied Phycology*, 5, 37-43.

Dhargalkar VK, Neelam P., 2005. Seaweed: promising plant of the millennium. *Science and Culture* 71, 60–66.

Ebrahim-Ebrahim-Zadeh Ebrahim-Zadeh E, Ebadi Jokandan E., 2008. The spatial analysis of the allocation of greenbelt utilization of the third givil zone of Zahedan. *Geography and Development*, 6(11): 39-58.

El-Alsayed SG, Ismail S, Eissa D., 2018. Impact of seaweed extract and phosphorus application on productivity of dahlia plants. *Assiut Journal of Agricultural Sciences*, 49(1): 159-188.

Eris A, Sivritepe HÖ, Sivritepe N., 1995. The effect of seaweed (*Ascophyllum nodosum*) extract on yield and quality criteria in peppers. In *International Symposium on Solanacea for Fresh Market* 412, 185-192.

Erulan V, Soundarapandian P, Thirumaran G, Ananthan G., 2009. Studies on the effect of *Sargassum polycystum* (C. Agardh, 1824) extract on the growth and biochemical composition of *Cajanus cajan* (L.) Mill sp. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 6(4): 392-399.

Geeta BL, Siddappa MM, Raj L, Totad M., 2016. Influence of NPK and biofertilizers on growth, yield and quality of China aster (*Callistephus chinensis* L. Nees) for cut flower production. *Research in Environmental Life Science*, 9(10): 1236-1238.

Haider MW, Ayyub CM, Pervez MA, Asad HU, Manan A, Raza SA, Ashraf I., 2012. Impact of foliar application of seaweed extract on growth, yield and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Soil & Environment*, 31(2): 157-162.

Hernández-Herrera RM, Santacruz-Ruvalcaba F, Ruiz-López MA, Norrie J, Hernández-Carmona G., 2014. Effect of liquid seaweed extracts on growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Applied Phycology*, 26, 619-628.

Himanshu Kaushik HK, Singh JP, Braj Mohan BM, Rajbeer R, Nathiram N., 2013. Effect of inorganic fertilizer (nitrogen) and bio-fertilizer (*Azospirillum*) on growth and flowering in African marigold (*Tagetes erecta* L.) cv. Pusa Narangi Gaiinda, 189-192.

Hussain HI, Kasinadhuni N, Arioli T., 2021. The effect of seaweed extract on tomato plant growth, productivity and soil. *Journal of Applied Phycology*, 33(2): 1305-1314.

Jothinayagi N, Anbazhagan C., 2009. Effect of seaweed liquid fertilizer of *Sargassum wightii* on the growth and biochemical characteristics of *Abelmoschus esculentus* (L.) *Medikus*. *Recent Research in Science and Technology*, 1(4): 155-158.

Khan W, Rayirath UP, Subramanian S, Jithesh MN, Rayorath P, Hodges DM, Prithiviraj B., 2009. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 386-399.

Karthikeyan B, Jaleel CA, Azooz MM., 2009. Individual and combined effects of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* on biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. *Academic Journal of Plant Sciences*, 2(2): 69-73.

Kuwada K, Wamocho LS, Utamura M, Matsushita I, Ishii T., 2006. Effect of red and green algal extracts on hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi, and on mycorrhizal development and growth of papaya and passionfruit. *Agronomy Journal*, 98(5): 1340-1344.

Mao J, Olk DC, Fang X, He Z, Schmidt-Rohr K., 2008. Influence of animal manure application on the chemical structures of soil organic matter as investigated by advanced solid-state NMR and FT-IR spectroscopy. *Geoderma*, 146(1-2): 353-362.

Metting B, Zimmerman WJ, Crouch I, Van Staden J., 1990. Agronomic uses of seaweed and microalgae. In Akatsuka I (ed.), *Introduction to Applied Phycology*. SPB Academic Publishing, The Hague, 269-307.

Mukherjee A, Patel JS., 2020. Seaweed extract: biostimulator of plant defense and plant productivity. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17(1): 553-558.

Norrie J, Keathley JP., 2005. Benefits of *ascophyllum nodosum* marine-plant extract applications to â thompson seedlessâ grape production. In X International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production 727, 243-248.

Omid Beigi R., 2007. *Approaches to production and processing of medicinal plants*. Second edition, Astan Quds Razavi Publishing House.

Paul J, Yuvaraj P., 2014. Effect of seaweed liquid fertilizer of *Colpomenia sinuosa* (Mert. ex Roth) derbes & solier (Brown seaweed) on *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek, Koothankuzhi, Tirunelveli district, Tamil Nadu, India. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 2, 177-184.

Popescu GC, Popescu M., 2014. Effect of the brown alga *Ascophyllum nodosum* as biofertilizer on vegetative growth in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Currents Trends National Science* 3, 61-67.

Prisa D., 2019. Possible use of spirulina and klamath algae as biostimulants in *Portulaca grandiflora* (Moss Rose). *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 3(2): 001-006.

Ramya SS, Nagaraj S, Vijayanand N., 2010. Biofertilizing efficiency of brown and green algae on growth, biochemical and yield parameters of *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. *Recent Research in Science and Technology*, 2(5): 45-52.

Rathore SS, Chaudhary DR, Boricha GN, Ghosh A, Bhatt BP, Zodape ST, Patolia JS., 2009. Effect of seaweed extract on the growth, yield and nutrient uptake of soybean (*Glycine max*) under rainfed conditions. *South African Journal of Botany*, 75(2): 351-355.

Safinaz AF, Ragaa AH., 2013. Effect of some red marine algae as biofertilizers on the growth of maize (*Zea mayz* L.) plants. *International Food Research Journal*, 20(4): 1629.

Salehifard M, Alizadeh SD., 2008. An investigation of social and psychological dimensions of urban green spaces with an urban management approach, 19-33.

Salari K, Hosseini SA, Talebi A, Gilasian E, Ziegler J., 2016. Molecular characterization of partial coat protein gene of wheat streak mosaic virus in North Khorasan and Golestan Provinces. *Iranian Plant Protection Congress*, 27-30 August 2016, p:1.

Selvam GG, Sivakumar K., 2013. Effect of foliar spray from seaweed liquid fertilizer of *Ulva reticulata* (Forsk.) on *Vigna mungo* L. and their elemental composition using SEM–energy dispersive spectroscopic analysis. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2(2): 119-125.

Sharma HS, Fleming C, Selby C, Rao JR, Martin T., 2014. Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology*, 26, 465-490.

Soliman AII, Hussein MH, Dessouki SAS, Torky Y., 2000. Production of phytohormones by using some blue green algae used as soil inoculants for rice fields in Egypt *Journal of Union Arab Biologist Cairo. Physiology and Algae*, 88, 83-102.

Sridhar S, Rengasamy R., 2010. Effect of seaweed liquid fertilizer on the growth, biochemical constituents and yield of *Tagetes erecta*, under field trial. *Journal of Phytology*, 2(6): 61-68.

Stirk WA, Van Staden J., 1997. Screening of some South African seaweeds for cytokinin-like activity. *South African Journal of Botany*, 63(3): 161-164.

Sumangala K, Srikrishnah S, Sutharsan S., 2019. Roses growth and flowering responding to concentration and frequency of seaweed (*Sargassum crassifolium L.*) liquid extract application. *Current Agriculture Research Journal*, 7(2): 236-244.

Taiz L, Zeiger E., 1998. *Plant physiology*. 2nd ed Sinauer Associates. Inc., Publ. Saunderland, Massachusetts. 792p.

Thomas SCL., 1996. Nutrient weeds as soil amendments for organic cally growth herbs. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plant*, 4(1): 3-8.

Turan M, Köse C., 2004. Seaweed extracts improve copper uptake of grapevine. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*, 54(4): 213-220.

Uthirapandi V, Suriya S, Boomibalagan P, Eswaran S, Ramya SS, Vijayanand N, Kathiresan D., 2018. Biofertilizing potential of seaweed liquid extracts of marine macro algae on growth and biochemical parameters of *Ocimum sanctum*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(3): 3528-3532.

Uthirapandi V, Boomibalagan P, Eswaran S, Ramya SS, Vijayanand N, Rathinavel S, Kathiresan D., 2019. Biofertilizing potential of seaweed liquid extracts of marine macro algae on growth and biochemical parameters of *Andrographis paniculata*. *Plants Archives*, 19(2): 3201-3206.

Velasco-Ramírez A, Velasco-Ramírez AP, Hernández-Herrera RM, García-Contreras FM, Maldonado-Villegas MM., 2020. Effect of liquid seaweed extract on potted growth of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinnars. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 23(2): 44.

Vijayanand N, Ramya SS, Rathinavel S., 2014. Potential of liquid extracts of *Sargassum wightii* on growth, biochemical and yield parameters of cluster bean plant. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 3(2): 150-155.

Zodape ST, Gupta A, Bhandari SC, Rawat US, Chaudhary DR, Eswaran K, Chikara J., 2011. Foliar application of seaweed sap as biostimulant for enhancement of yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum Mill.*). *Journal of Scientific Industrial Research*, 70(3): 215-219.

The Efficiency of the Reductase Enzyme in Producing Silver Nanoparticles (AgNPs) and Its Role in Inhibiting the Pathogenic fungus *Fusarium solani*

Saif Saadallah HASSAN^{1*}

¹Seed Inspection and Certification Department, Ministry of Agriculture, Iraq

¹<https://orcid.org/0009-0008-1091-9199>

*Corresponding author: saifnassrei@gmail.com

Research Article

Article History:

Received: 19.01.2025

Accepted: 13.02.2025

Available online: 17.03.2025

Keywords:

Silver nanoparticles

Biosynthesis

Nanotechnology

Fusarium solani

Wheat crop

ABSTRACT

A laboratory study was conducted during the year 2024 In the laboratories of the Plant Protection Department, College of Agriculture, Tikrit University, Iraq, Saladin The study dealt with the production of biotinylated silver nanoparticles from the *Fusarium solani*, using four parts that included the filtrate, the biomass, the hot extract, and the cold extract of the biomass. The results of the laboratory study demonstrated the formation of silver nanoparticles from the *F. solani*. This is done by detecting it by the color contrast of the leachate The color of the mushroom filtrate, the biomass, and its hot and cold extract of the biomass changed from yellow to brown. The highest absorption peaks were recorded (using the photoanalyzer) for the silver nanoparticles within the wavelengths of 350- 475 nm, as the lowest wavelength reached 350 nm for the prepared silver nanoparticles. From the hot extract, the highest wavelength reached 475 nanometers For silver nanoparticles prepared from cold extract for the fungus *Fusarium solani*. Electron microscope images showed the sizes of the nanoparticles synthesized by the fungus *F. solani* in semi-spherical shapes whose diameters ranged from 30-70 nanometers. This indicates the efficiency of the biosynthesis of silver particles. Laboratory results showed that no significant differences were recorded for the concentrations of silver nanoparticles in the germination rates of wheat seeds (Sham 6 variety) for all concentrations and types of silver nanoparticles prepared from all types of *F. solani* fungi studied. All concentrations and types of silver nanoparticles prepared showed an effect of inhibiting the pathogenic fungus. *F. solani* Compared to the control, the highest rate of inhibition was reached at a concentration of 1.5 mM in the filtrate of the studied mushrooms, reaching 0.64% compared to the control in which no rate of inhibition was recorded. While all concentrations and types of prepared silver nanoparticles showed the highest activity of the nitrate reductase enzyme compared to the control, the highest effectiveness was reached at the concentration of 1.5 mM in the filtrates of the studied mushrooms, reaching 0.63 units/ml compared to the control, which reached 0.055 units/ml.

Redüktaz Enziminin Gümüş Nanopartiküller (AgNP) Üretmedeki Etkinliği ve Patojenik Mantar *Fusarium solani*'yi Engellemedeki Rolü

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 19.01.2025

Kabul tarihi: 13.02.2025

Online Yayınlanma: 17.03.2025

ÖZ

2024 yılında özel laboratuvarlarda bir laboratuvar çalışması yürütülmüştür. Çalışma, süzüntü, biyokütle, sıcak özüt ve biyokütlenin soğuk özütünü içeren dört parça kullanılarak *Fusarium solani*'den biyotinlenmiş gümüş nanopartiküllerinin üretimiyle ilgili bir çalışmadır. Laboratuvar çalışmasının

Anahtar Kelimeler:

Gümüş nanopartiküller
Biyosentez
Nanoteknoloji
Fusarium solani
Buğday mahsulü

sonuçları, *F. solani*'den gümüş nanopartiküllerinin oluşumunu göstermiştir. Bu, sızıntı suyunun renk kontrastı ile tespit edilerek yapılmıştır. fungus süzütüsünün, biyokütlenin ve biyokütlenin sıcak ve soğuk özütünün rengi sarıdan kahverengiye değişmiştir. En yüksek emilim pikleri (fotoanalizör kullanılarak) 350-475 nm dalga boylarındaki gümüş nanopartiküller için kaydedilmiş, hazırlanan gümüş nanopartiküller için en düşük dalga boyu 350 nm'ye ulaşmıştır. Süzütünün soğuk özütünden hazırlanan gümüş nanopartiküller için sıcak özütten en yüksek dalga boyu 475 nanometreye ulaşmıştır. Elektron mikroskobu görüntüleri, *F. solani* fungus tarafından sentezlenen ve çapları 30-70 nanometre arasında değişen yarı küresel şekillerdeki nanopartiküllerin boyutlarını göstermiştir. Bu, gümüş parçacıklarının biyosentezinin verimliliğini gösteren bir ölçüttür. Laboratuvar sonuçları, çalışılan tüm *F. solani* mantar türlerinden hazırlanan tüm gümüş nanopartikül konsantrasyonları ve türleri için buğday tohumlarının (Sham 6 çeşidi) çimlenme oranlarında gümüş nanopartikül konsantrasyonları için önemli bir fark kaydedilmediğini göstermiştir. Hazırlanan tüm gümüş nanopartikül konsantrasyonları ve türleri patojenik mantarı inhibe etme etkisi göstermiştir. *F. solani* kontrol ile karşılaştırıldığında, en yüksek inhibisyon oranı, hiçbir inhibisyon oranının kaydedilmediği kontrol ile karşılaştırıldığında %0,64'e ulaşarak, çalışılan mantarların süzütüsünde 1,5 mM'lik bir konsantrasyonda elde edilmiştir. Hazırlanan gümüş nanopartiküllerin tüm konsantrasyonları ve tipleri nitrat redüktaz enziminin kontrol ile karşılaştırıldığında en yüksek aktivitesini gösterirken, incelenen mantarların süzütülerinde en yüksek etkinliğe 1,5 mM konsantrasyonda 0,63 ünite/ml'ye ulaşırken, kontrol ise 0,055 ünite/ml'ye ulaşmıştır.

To Cite: Hassan SS., 2025. The efficiency of the reductase enzyme in producing silver nanoparticles (AgNPs) and its role in inhibiting the pathogenic fungus *Fusarium solani*. Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi Dergisi, 5(1): 123-144.

Introduction

Silver nanoparticles (AgNPs) have several processes in affecting the cell wall of plant pathogenic fungi through their direct effect on the protein and nucleic acids inside the pathogenic fungus, which leads to a significant growth inhibition process (Min et al., 2009). The role of fungi in the synthesis of nanoparticles, including effective silver, attracts the attention of researchers around the world because these organisms have the ability to produce nanoparticles well and also have many biological activities, as fungi can be used as an excellent source of various external enzymes that affect the synthesis of nanoparticles. Fungi have been identified as a superior alternative to bacteria and plants as nanofactories (Pradhan, 2013). Vanaja et al. (2013) indicated that the mechanisms that lead to the production of nanoparticles by fungi are limited to the use of mushroom extract, which leads to the reduction of metals, including silver, into metal particles. Thus, the synthesis of nanoparticles, and the process of ensuring the synthesis of nanoparticles takes place through several methods, including a method of biosynthesis known as green synthesis, which is characterized by being environmentally friendly. It produces materials that act as reductants and stabilizers for nanoparticles, as well as providing nanoparticles of a fixed size and stability (Gupta and Chauhan, 2017). The fungus *Fusarium solani* is one of the most common parasitic pathogens

that infect a large number of different crop plants in warm parts of the world, reaching more than 50 plant species belonging to different plant families, causing losses ranging between 30-80% (Haq et al., 2012). It is also one of the most dangerous causes of wheat seedling death and drop, root rot and wilting in tomato crops (Kipngeno et al., 2015).

So the aim of the research is to:

1. Biosynthesis of AgNPs from the fungus *Fusarium solani* using the green construction method and studying their properties.
2. Evaluating the efficiency of these particles in controlling seedling death and drop disease caused by the fungus *F. solani* on some Iraqi wheat varieties.
3. Testing the effectiveness of the reductase enzyme in producing AgNPs from the fungus *F. solani*.

Material and Methods

Preparing different concentrations of silver nitrate

Different concentrations of silver nitrate were prepared by adding AgNO₃ silver nitrate powder to sterile distilled water in liter-sized beakers, as follows:

1. Prepare a concentration of 0.5 mM by dissolving 0.085 g/L of water
2. Prepare a 1 mM concentration by dissolving 0.17 g/L of water
3. Prepare a 1.5 mM concentration by dissolving 0.25 g/L of water
4. Prepare a 2 mM concentration by dissolving 0.34 g/L of water

After obtaining the required concentrations the beakers containing the different concentrations of silver nitrate were covered with aluminum foil and stored at a temperature of 4°C.

Solutions for the determination of nitrate reductase enzyme. The solutions were prepared according to the method Hassan and Hassan., (2021):

- a) Preparation of solution (A): Prepare the solution from 30 mM AgNO₃ with 25 ml propanol, 5% concentration, in a liter of phosphate buffer.
- b) Preparation of solution (B): Prepare the solution from (58 mM sulphaniamide and 0.05 mM N-(1-naphthyl ethylene diamine dihydrochloride (NEED)

Preparation of solid fungal medium: Potato Dextrose Agar (PDA)

Prepare the solid medium Potato Dextrose Agar (PDA) by dissolving 39 g of the prepared medium (Indian Media Hi Company) in one liter of distilled water according to the prepared company's instructions, then sterilize the medium in an autoclave at a temperature of 121°C and a pressure of 1.5 bar for 20 minutes afterwards. The medium was cooled to a temperature of 40°C, then the antibiotic Ampiclox was added at a rate of 100 mg/liter to the medium, and finally the medium was poured into Petri dishes and left to solidify at room temperature, and after solidifying, it was placed in the laboratory refrigerator.

Preparation of liquid fungal medium: Potato Sucrose Broth (PSB)

Prepare the liquid fungal medium, Potato Sucrose Broth (PSB), by adding 200 g of potato pieces to 2 liters of distilled water, taking into account the amount of water evaporated. Place the mixture in a 2-liter beaker on a heat source for 60 minutes. After the specified period of time has passed, it was Filter the mixture using filter paper to obtain the aroma. Complete the volume to one liter using distilled water Then 20 grams of sucrose were added to it, then it was stirred continuously for 30 seconds, after which the liquid fungal medium (PSB) was obtained. The medium was placed in 500 ml flasks, 250 ml/medium for each flask, then sterilized in an autoclave at a temperature of 121 °C and a pressure of 1.5 bar for 20 minutes later, the medium was cooled to a temperature of 30°C, then the antibiotic Ampiclox was added at a rate of 100 ml/liter of medium.

Inoculation of liquid medium (PSB) with the fungus *Fusarium solani*

The fungus *Fusarium solani* was inoculated by adding small pieces of the fungal colony, 1 cm in diameter, using a cork drill to the previously prepared liquid nutrient medium (PSB), The flasks were incubated in the incubator for seven days at a temperature 27 °C, taking care to move the flasks 3 times a day. Growth was monitored daily until a complete colony was obtained.

Preparation of silver nanoparticles from the fungus *Fusarium solani* according to the previously used method (Hassan and Hassan, 2019)

Preparation of silver nanoparticles from the filtrate, biomass and hot and cold extract of the fungus *Fusarium solani*

Filter the *F. solani* mushrooms growing in the liquid medium (PSB) using separate filter paper. After separating the biomass from the filtrate and obtaining the mushroom filtrate, the filtrate was placed in 10 ml tubes. Then the tubes were placed in the centrifuge for 10 minutes at a rate of 5000 rpm for the purpose of separation. The sediment from the liquid was collected in 5 ml and placed in 10 ml tubes. Then different concentrations of previously prepared silver nitrate (0.5, 1, 1.5, 2 mM) were added to it, each concentration separately in the form of drops, at the rate of 5 ml for each concentration, with the control treatment, which did not contain any of the concentrations mentioned, only the fungal filtrate clearing, which serves as Zero concentration, and finally the tubes were incubated according to the optimum temperature. For 72 hours in the dark, the tubes were followed for different time periods and the color change of the different concentrations was recorded.

Prepare the hot extract of the biomass of the fungus *Fusarium solani* by adding 1 gram of biomass/5 ml of distilled water at a temperature of 70°C. Place the mixture in a ceramic mortar. The mixture is crushed until reaching a state of homogeneity and obtaining the hot extract of the biomass. The extract was filtered using filter paper and transferred to 10 ml tubes. Then the tubes were placed in the centrifuge for 10 minutes at a rate of 5000 rpm for the purpose of separating the precipitate from the eluent. The eluent was collected in an amount of 5 ml and placed in 10 ml tubes, then different concentrations of silver nitrate (0.5, 1, 1.5, 2 mM) in the form of drops, 5 ml for each concentration, with the control treatment, which did not contain any of the concentrations, only biomass drippings from the hot extract, which is considered a zero concentration. The tubes were incubated in the dark for 72 hours, and the color variation for each concentration was recorded.

Prepare the cold extract of the cold biomass by adding 1 gram of biomass / 5 ml of distilled water at a temperature of 5 °C. Place the mixture in a ceramic mortar. The mixture is crushed until reaching a state of homogeneity and obtaining the cold extract of the biomass. Filter the extract using filter paper. Place the extract. In tubes with a capacity of 10 ml, the tubes were placed in the centrifuge for 10 minutes and at a rate of 5000 revolutions for the purpose of separating the sediment from the clear. The liquid was collected in a quantity of 5 ml, and the liquid was placed in 10 ml tubes, then different concentrations of silver nitrate (0.5, 1, 1.5, 2 mM), previously prepared in the form of drops, were added to it in the amount of 5 ml for each concentration, along with the control treatment that did not contain At any of the mentioned concentrations, only the biomass of the cold extract was detected, which is considered a zero concentration. The tubes were incubated in the dark for 72 hours for the purpose of obtaining color contrast.

Biomass was prepared by adding 1 gram of biomass/10 ml concentration of previously prepared silver nitrate (0.5, 1, 1.5, 2 mM), each concentration separately, except for the control treatment, which contained 1 gram of biomass/10 ml of distilled water. The tubes were incubated for 48 hours in the dark at room temperature, and after obtaining a color change, the mass was separated from the filtrate. The tubes were placed in the centrifuge for 10 minutes and at a rate of 5000 revolutions for the purpose of separating the precipitate from the eluent. The eluent was collected in an amount of 5 ml, then placed in 10 ml tubes and incubated at a temperature of 25 °C in the dark for 72 hours for the purpose of obtaining the color contrast.

Silver nanoparticle formation test

Chromatic contrast

Silver nanoparticles were detected by chromatography by changing their color state after 72 hours of incubation at a temperature of 25 °C, through changing the color of the filtrate from white to yellow and brown according to the concentration added to the fungal filtrate, the hot extract of the fungal biomass, and the cold extract of the fungal biomass and the mass. The vital activity of fungi individually (Al-Naimi, 2018).

Spectroscopic analysis using a spectrophotometer-uv-vis

The optical properties of silver nanoparticles resulting from mushroom filtrate, hot and cold extracts of biomass, and mushroom biomass were determined using a spectrophotometer. The sample was prepared by taking 2 ml of the previously prepared solutions. The samples were placed for examination with the above-mentioned device at a wavelength of 200-500 nanometers, and the values were recorded. Absorbance at each wavelength (Al-Shammari, 2015) .

Scanning electron microscope (SEM)

The structural characteristics of the sample were determined in terms of shape and size. The sample was prepared by placing drops of the previously prepared silver nanoparticle solution on a glass slide and drying it at a temperature of 60°C for 30 minutes. It was then dyed with crystal violet dye for 1 minute, then washed. With distilled water, the sample was fixed using a solution of Camza dye for 1 minute, after which the sample was plated with gold in a saturated gas surrounding. Arcon under a pressure of 50 Pascals and a current of 50 mA for 50 seconds. Then the sample was examined with a scanning electron microscope (SEM) at

75.000 X magnification. The experiment was used at the University of Technology at the Nanocenter according to the method used before (Elamawi et al., 2018).

Concentrations of silver nanoparticles prepared from the fungus *Fusarium solani* in the germination process of wheat seeds

Wheat seeds, variety (Sham 6), were treated with concentrations of silver nanoparticles from the fungus *Fusarium solani*, previously prepared for the fungal filtrate, and hot and cold extracts for biomass and fungal biomass at concentrations (0, 0.5, 1, 1.5, 2 mM). The wheat seeds were soaked in the above-mentioned treatments. The tubes were left for 2 hours, after which the seeds were placed in petri dishes containing filter papers moistened with water. The plates were then incubated at a temperature of 25 °C, and the plates were followed after which the percentage of germination was recorded according to the following equation.

$$\text{Germination rate \%} = \frac{\text{Number of germinated seeds}}{\text{Total number of seeds}} \times 100$$

Pathogenicity of the fungus *Fusarium solani*:

The pathogenicity of the fungus *Fusarium solani* was studied, estimated by the germination rate of wheat seeds, by placing a disk of a newly growing colony of the pathogenic fungus with a diameter (1 cm) in the middle of a Petri dish containing solid nutrient medium (PDA) using a cork drill. After the fungal colony grew and before it reached the edge of the dish, it was placed. The wheat seeds were then incubated in the plates in the incubator at a temperature of 25 °C. Growth was monitored for different periods of time (4, 6, 8 days), and then pathogenicity was estimated based on the germination rates of the seeds (Al-Obaidi, 2012).

Estimating the effectiveness of the nitrate reductase enzyme

The effectiveness of the nitrate reductase enzyme was estimated following the method approved by (Hassan and Hassan, 2019), which is summed up by adding 2.5 ml of previously prepared concentrations of silver nanoparticles for each of (the fungal filtrate, the hot extract, the cold extract, and the fungal biomass, each separately, to 2.5 ml of solution (A) Previously prepared at pH 7.5, the mixture was incubated at 25 °C for 60 minutes, then 1.25 ml of solution (B) was added to it. To stop the reaction and note the color change to dark pink, the absorbance of the solution was measured at a wavelength of 540 nm using a

spectrophotometer, and the enzyme activity units were estimated based on the absorbance and according to the following equation:

$$\text{Enzymatic activity (units/ml)} = \frac{\text{Absorbance at a wavelength of 540 nm}}{2.5 \times 60}$$

60 = reaction time (minutes)

2.5 = Added enzyme solution (ml)

Studying the effect of concentrations of silver nanoparticles on the fungus *Fusarium solani*, which causes seedling death and drop disease

The effect of concentrations of silver nanoparticles prepared in this study on the growth of the pathogenic fungus *Fusarium solani* was studied by placing a piece of the pathogenic fungus with a diameter of 1 cm in the middle of dishes containing solid nutrient medium (PDA) using a cork culturer, and upon the arrival of the fungal colonizer at a distance (1 cm) from the middle of the dish. The dishes were treated with different concentrations of silver nanoparticles (0.5, 1, 1.5, 2 mM). By making four holes at a distance of 2 cm from the fungal colony, concentrations of 0.1 ml were placed in the holes and incubated at a temperature of 25 °C. When the mushrooms had completed growing in the control treatment (distilled water instead of silver nanoparticles) to the end of the dish, the distance from the end of the dish was measured. Colony edge to pits containing silver nanoparticles (mm).

Statistical analysis

The research experiments were applied according to a completely randomized design (CRD) with a factorial experiment, and the results were analyzed using the Statistical Analysis System -SAS (2012). The averages were compared according to the least significant difference (LSD) test under the 0.05 level (Al-Rawi and Abdel Aziz, 2000).

Results and Discussion

Detection of silver nanoparticles by contrast chromatography

The results are shown in Figure (1) to detect the biosynthesis of silver nanoparticles using color variation to change the color of the mushroom filtrate, the mushroom biomass, and the hot and cold extract of the fungus *Fusarium solani* biomass from colorless to yellow and brown with increasing concentration after 72 hours of adding silver nitrate. To mushroom filtrate, mushroom biomass, and hot and cold extracts of *Fusarium solani* fungal biomass,

This is evidence of confirmation of the synthesis of ultra-small silver nanoparticles by color change within the solution, while no color change appeared in the control solution.

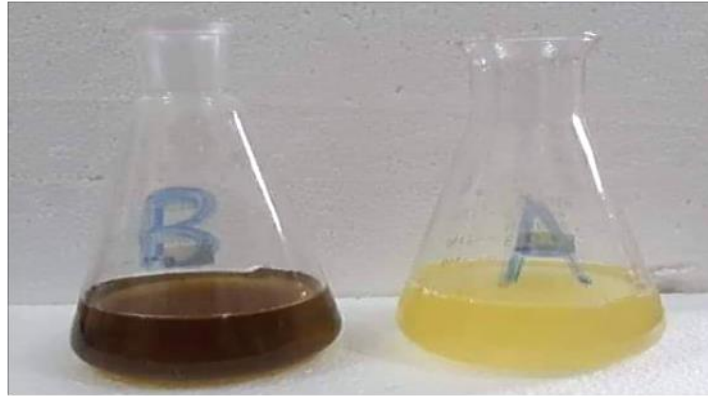


Figure 1. Color variation of *Fusarium solani* fungus filtrate 72 hours after adding silver nitrate

The explanation for this phenomenon is attributed to the phenomenon of surface plasmon resonance. This phenomenon has a property that occurs in many metals, including silver, as a result of the diameter of its particles reaching the nanometer scale. Therefore, the Spectrophotometer UV.VIS spectrophotometer is used at different wavelengths to prove the formation of Silver nanoparticles (Krishnaraj et al., 2010; Bamsoud and Bahwirth, 2017). This result was consistent with (Mahmoud, 2017) When he noticed a color change in the filtrate of the fungus *Entomophthora muscae* after adding a solution of silver nitrate after 72 hours, from colorless to yellow-brown, which confirmed the formation of silver particles at wavelength 420 using a spectrophotometer.

The optical spectrum of the studied fungi

Optical spectrum of cold *Fusarium solani* extract

The results of the optical spectrum in Figure (2) for the cold extract of the *Fusarium solani* show that there is an increase in the absorbance values with increasing concentration of the cold mushroom extract. The results also show that the highest range of absorption was within the wavelength 400_450, as the highest absorbance value reached 0.71 at the wavelength 450 for concentration 2 mM, followed by 0.66, 0.61, and 0.5 for concentrations of 1.5, 1, and 0.5 mM, respectively, at the same wavelength.

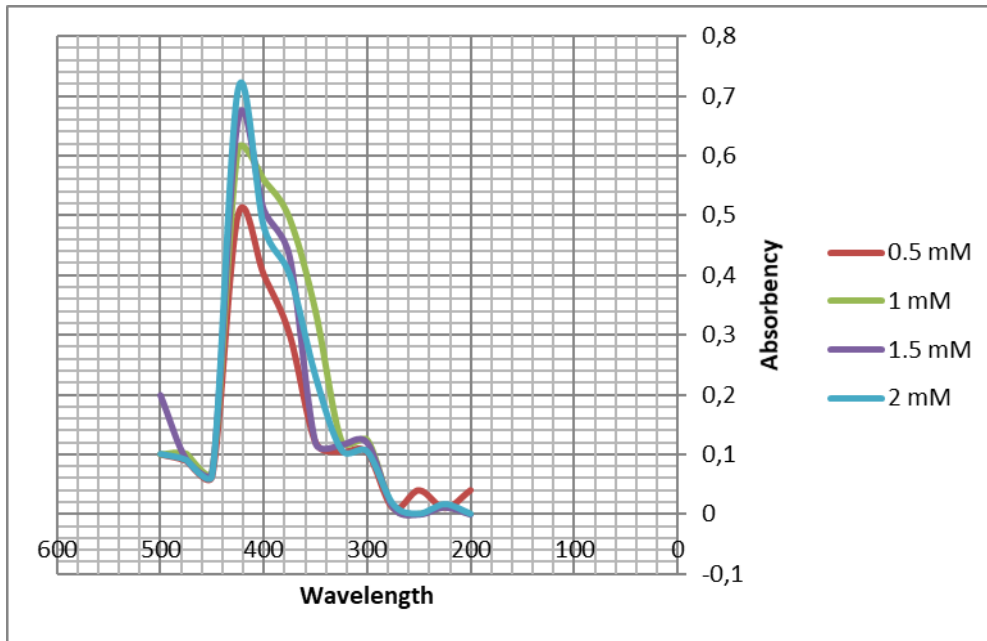


Figure 2 of the cold extract of the fungus *Fusarium solani*

Optical spectrum of *Fusarium solani* extract:

The results in Figure (3) show that there is an increase in absorbance values with increasing concentration of the hot *Fusarium solani* extract, that is, there is a direct relationship between absorbance and concentration, that is, the higher the absorbance, the higher the concentration. It is noted from the results in this figure that the highest range of absorption was within the wavelength. 375_425, as the highest absorbance value was 0.81 at wavelength 400 for the concentration of 2 mM, followed by concentrations of 1.5, 1, and 0.5 mM, as the absorbance reached 0.73, 0.63, and 0.55, respectively, at the same wavelength.

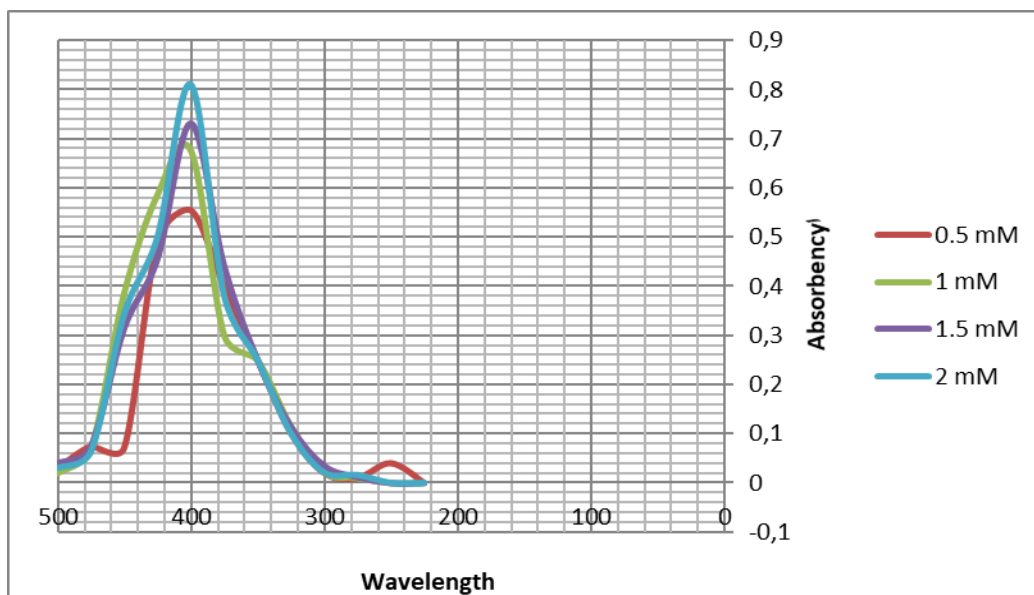


Figure 3. Optical spectrum of hot extract *Fusarium solani*

Optical spectrum of *Fusarium solani* fungus filtrate

The results of the spectrophotometric analysis show that the highest absorption range was within the wavelength 400-450, as the highest absorption value reached 1.78 for the concentration of 2 mM at the wavelength of 425, followed by 1.66, 1.61, and 1.55 for the concentrations of 1.5, 1, and 0.5 mM, respectively, at the same wavelength of filtrate. *Fusarium solani* As the results in Figure (4) show, there is an increase in absorbance values with increasing concentration of the fungal filtrate at all wavelengths.

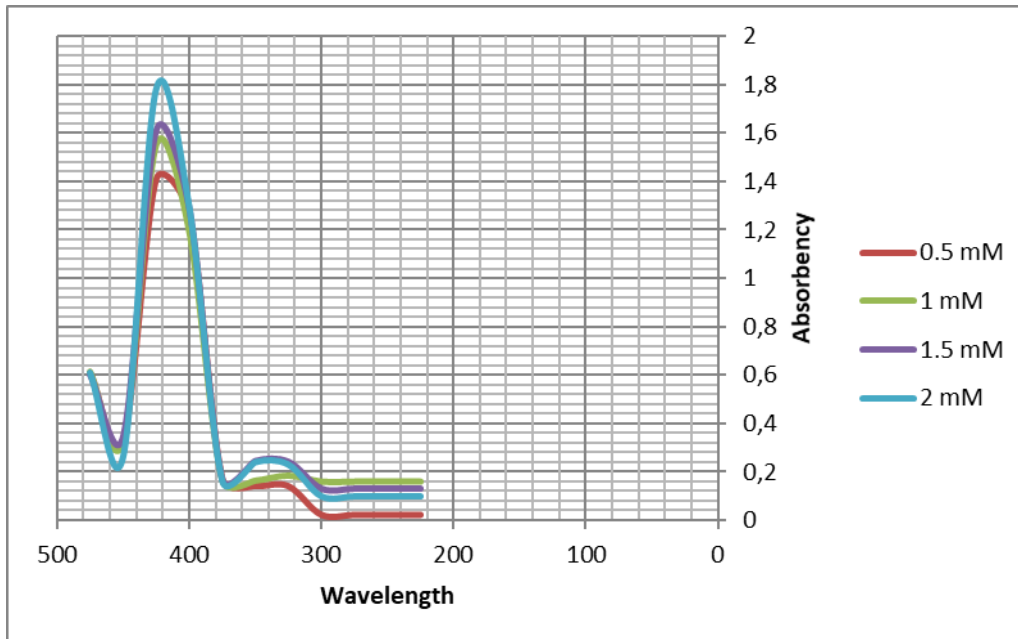


Figure 4. Optical spectrum of the fungus *Fusarium solani* filtrate

Optical spectrum of biomass of the fungus *Fusarium solani*

The results are shown in Figure (5). When the concentration increases, the absorbance values increase at all wavelengths of the *Fusarium solani* fungus biomass extract. The results of the optical spectroscopic analysis of the fungus biomass extract show that the highest range of absorption was within the 400-450 wavelength, as the highest absorbance value reached 2.037 at the wavelength. 425 for the concentration of 2 mM, followed by 1.96, 1.89, and 1.77 for the concentrations of 1.5, 1, and 0.5 mM, respectively, at wavelength 425.

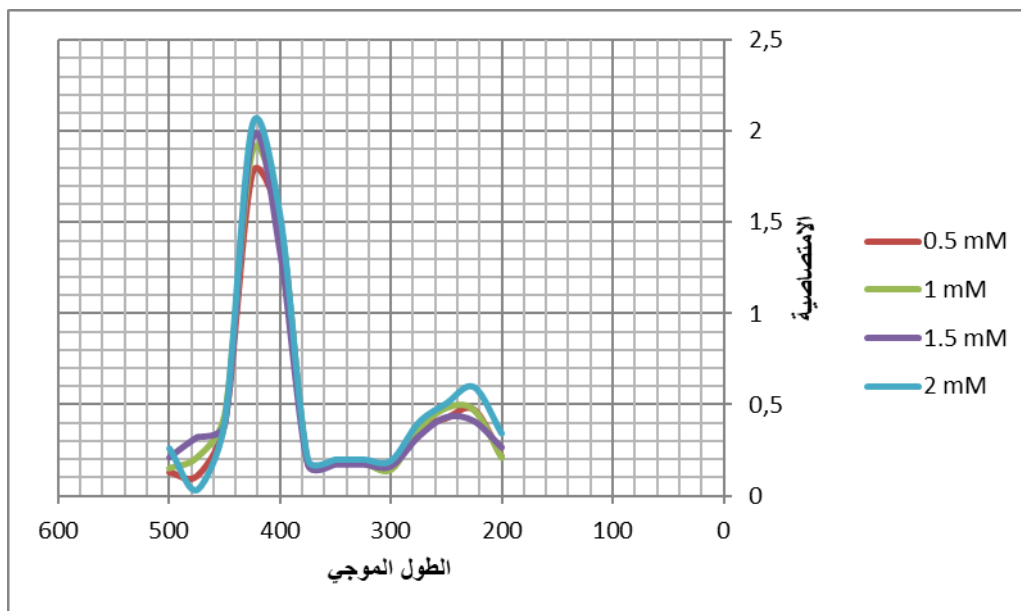


Figure 5. Optical spectrum of the biomass extract of the fungus *Fusarium solani*

The results above explain that the most important reason for the increase in absorbance with increasing concentration may be attributed to the fact that these fungi have a high effectiveness in the synthesis of silver nanoparticles, and according to the concentrations studied, the higher the concentration, the greater the result of an increase in the synthesis of Ag nanoparticles and thus an increase in the silver particles formed, as the higher the concentration, the greater the The value of absorbance and the intensity of absorbed light, i.e. there is a direct relationship between them (Bhattacharyya et al., 2012). The most important range of wavelengths for silver particles falls within (390-475), which achieves nanoparticle sizes within 5_100 nanometers manufactured by fungi (Soni and Prakash, 2013). The results of previous studies indicated that the nanoscale dimensions of (5- 100) and according to the wavelengths of the nanoparticles manufactured by fungi for (cold extract, biomass, and filtrate), which were within the nanoscale range of (10 - 100), and this is what achieves the formation of silver nanoparticles in The three cases. These results were consistent with (Bhainsa and D'Souza, 2006) after they obtained the highest absorbance at a wavelength of 420 nm from the fungus *Aspergillus fumigatus*, which indicates the formation of silver nanoparticles in the solution of the leachate, biomass, and cold extract. These results also agreed with Vahabi et al., (2011) when silver particles were formed from the fungus *Trichoderma* sp at wavelength 420.

As for the hot extract, it was smaller in size than the nanoscale (10-100) in some cases due to the formation of silver nanoparticles. The reason for this is due to the lack of reduction of silver nitrate by the nitrate reeducates enzyme that is released by in the solution of the hot

mass extract. Which has the ability to reduce metals, especially silver nitrate (Al-Shammari, 2015). The reason for this is also due to the lack of irritation of plasmon vibrations at the metal surface, which led to the non-formation of silver nanoparticles of their normal sizes (Adebayo and Oloke, 2017).

Scanning electron microscope (TEM)

The results in Figure (6) show the detection of silver nanoparticles by scanning electron microscopy (TEM), the formation and determination of the shape and size of silver nanoparticles in oval and spherical shapes, and the size of silver nanoparticles at nanosizes of 30-70 nm.

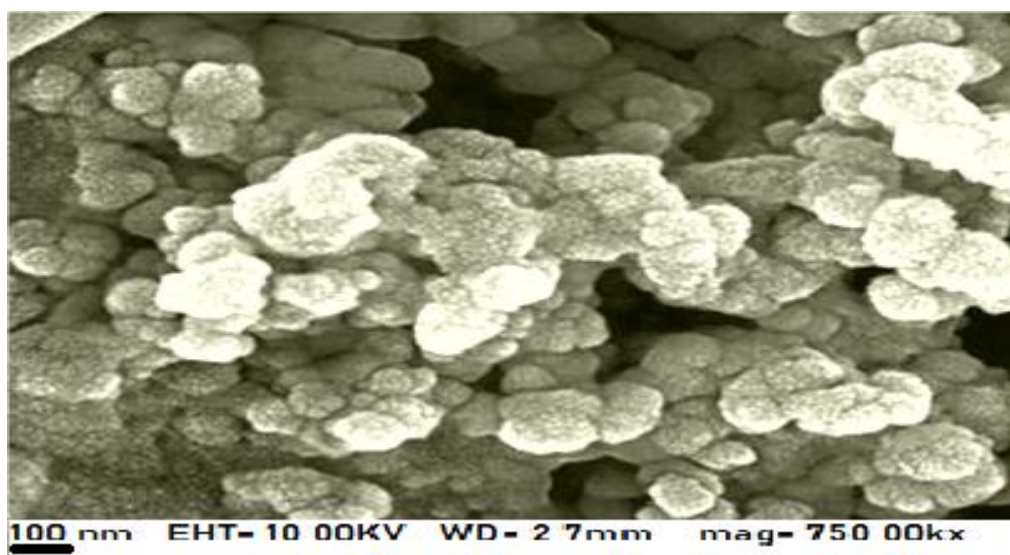


Figure 6. Scanning electron microscope of silver nanoparticles (AgNPs) at 75,00kx magnification

The above results prove the formation of silver nanoparticles at sizes 30-70 nanometers, and this is what was stated in the study (Gopinath and Velusamy, 2013), which confirms that nanoparticle sizes fall between 5-100 nanometers, and these results are consistent with (Duran et al., 2005) and also agreed with (Al-Naimi, 2018).

Effect of concentrations of silver nanoparticles prepared from the fungus *Fusarium solani* on germinating seeds of wheat variety (Sham 6) %

The results in Table (1) indicate the effect of concentrations of silver nanoparticles prepared from *Fusarium solani* on the percentage of germination of seeds of wheat variety (Sham 6), as the fungal biomass treatment outperformed the rest of the treatments, reaching 97.01%, with no significant differences with the hot extract treatment of the mass. The vitality

of the mushrooms reached 97.00% compared to the treatments of cold extract of mushroom biomass and mushroom filtrate, which reached 96.85% and 96.71%, respectively.

With regard to concentrations, the 0.5 mM concentration showed the highest seed germination rate, reaching 97.54%, with no significant differences with the 1 mM concentration, which reached 97.33%, compared to the 1.5 and 2 mM concentrations, which gave 96.85 and 96.78%. As for the interaction The treatment with mushroom filtrate at a concentration of 0.5 mM showed the highest seed germination rate, reaching 98.08%, with significant differences with the treatment consisting of cold extract of biomass, which showed the lowest seed germination rate, giving 95.10%.

Table 1. Effect of concentrations of silver nanoparticles prepared from the fungus *Fusarium solani* on the germination process of wheat seeds (Sham 6) %

Transactions of silver nanoparticles	Concentrations mM					Transaction rate
	0	0.5	1	1.5	2	
The filtrate	96.36	98.08	97.95	95.84	95.34	96.71
Biomass	96.74	97.61	97.66	96.24	96.83	97.01
Cold extract	95.10	96.88	96.82	97.69	97.79	96.85
Hot extract	95.67	97.60	96.96	97.63	97.17	97.00
Concentration rate	95.96	97.54	97.33	96.85	96.78	96.89
Minimum significant difference L.S.D. _{0.05} for treatments 0.39 for concentrations 0.44 Interaction 0.95						

The interpretation of the above results is that the concentrations of silver nanoparticles did not have any negative effect on the germination process of wheat seeds in all fungal treatments of silver nanoparticles, and that silver nanoparticles have the ability to increase the water content, which in turn leads to an increase in moisture content. Moreover, Silver nanoparticles increase cell division, which leads to a higher germination rate in plants (Farooq et al., 2005). The reasons for the decrease or increase in germination % may also be attributed to other compounds present in the fungal filtrate, biomass, or both hot and cold extracts, and such compounds (alkaloids, phenols, enzymes). The presence of such compounds or their interference with the concentrations of silver nanoparticles may encourage or discourage germination. Seed germination (Wuttipong et al., 2017). On the other hand, the studied fungi are different species and therefore there is a difference in their genetic structure and physiological behavior, which is reflected in the production of medicinal compounds that may encourage or inhibit seed germination (Chang and Miles, 2004).

The pathogenicity of the fungus *Fusarium solani*, which causes death and fall of wheat seedlings, estimated by the percentage of germination of wheat seeds, Sham 6 variety

The results in Figure (6) show the pathogenicity of the pathogenic fungus *Fusarium solani* on the germination rate of wheat seeds (Sham variety 6), as it is noted that the pathogenic fungus has a high impact on the germination rate starting after four days of incubation, as the germination rate of wheat seeds reached 52.67%. After six days of incubation, the germination rate decreased due to the influence of the pathogenic fungus, reaching 26.6%. After eight days, the effect of the pathogenic fungus was very high, as the germination percentage decreased to 11.48%.

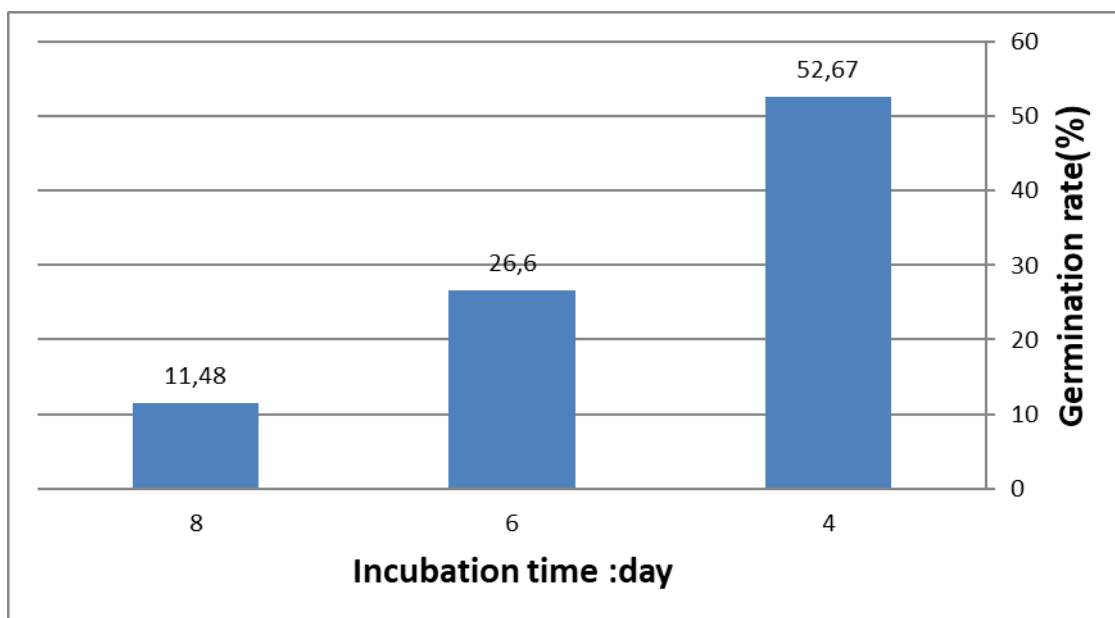


Figure 6. Pathogenicity of the fungus *Fusarium solani* estimated by the percentage of germination of wheat seeds, Sham 6 variety. (LSD $_{0.05}$: 9.15)

The reason for this is that the pathogenic fungus *Fusarium solani* has high virulence in attacking its plant hosts. The fungus showed high virulence towards seeds through direct penetration due to mechanical pressure by the appressorium, which in turn works to penetrate the cells of the epidermis and cuticle through mechanical penetration as a result of the pressure of the fungus on the epidermis and also Through the production of cell wall-degrading enzymes, it kills the tissue by producing enzymes and hydrolytic toxins that lead to dissolution, including Lytic enzymes, which work to completely destroy and collapse the cell walls of the infected grains in the penetration area to help the fungus spores penetrate (Schroeder et al., 2013).

Estimation of the activity of the nitrate reductase enzyme using concentrations of silver nanoparticles prepared from the fungus *Fusarium solani*

The results of the effectiveness of the nitrate reductase enzyme using concentrations of silver nanoparticles prepared from the fungus *Fusarium solani* in Table No. (2) show that filtrate treatment was superior to the other treatments. The results also show that the 1.5 mM concentration in the filtrate treatment was superior to the rest of the concentrations of the treatments, as it showed the highest rate of enzymatic activity, reaching 0.63 units/ml, followed by the same concentration from the same treatment, reaching 0.52 units/ml, compared to the 0 mM concentration of Treatment of the hot extract of biomass reached 0.02 units/ml. The results also showed an increase in the activity of the enzyme for all treatments by increasing the concentration up to a concentration of 1.5 mM, then the activity decreased at a concentration of 2 mM.

Table 2. Estimation of the effectiveness of the nitrate reductase enzyme using concentrations of silver nanoparticles prepared from the fungus *Fusarium solani*

Transactions of silver nanoparticles	Concentrations mM					Transaction rate
	0	0.5	1	1.5	2	
The filtrate	0.055	0.42	0.49	0.63	0.47	0.41
Biomass	0.027	0.24	0.31	0.37	0.34	0.25
Cold extract	0.032	0.36	0.43	0.52	0.38	0.34
Hot extract	0.022	0.15	0.21	0.26	0.18	0.16
Concentration rate	0.033	0.29	0.36	0.44	0.34	0.29

Minimum significant difference L.S.D._{0.05} for treatments 0.017 for concentrations 0.011 Treatments x concentrations 0.21

The above results explain that the enzyme nitrate reductase, released by microorganisms, is one of the most important factors in the synthesis of silver nanoparticles. Studies have shown that NADH- and NADH-dependent enzymes, especially nitrate reductase, are important factors in the biosynthesis of metal nanoparticles (Hassan and Hassan, 2021). During the reduction process, nitrate is converted to nitrite which in turn transfers electron to silver ions and as a result, silver ions are converted into silver nanoparticles (Ghorbani, 2012). The reason for the superiority of the filtrate as having the highest enzyme activity is that the fungus produces the enzyme in its extracellular form to a greater extent than from the inside of the cell. As for the cold extract of the biomass, the cooling conditions preserved the effectiveness of the enzyme, which led to the enzymatic activity of the cold extract being higher than that of the hot extract, which in turn was affected by the heat because the enzyme

consists of a protein and a mineral part. The reason for the decrease in the enzymatic activity of the biomass is that the biomass Limited enzyme production for biomass in the presence of different concentrations of silver nitrate compared to the filtrate, in which the enzyme is produced by the fungus throughout the incubation period (Anil et al., 2007).

The reason for the decrease in enzymatic activity at a concentration of 2 mM is due to the presence of compounds within the filtrate, the hot and cold extract, and the biomass of the fungus, which have the effect of interfering with high concentrations of silver nanoparticles, which led to a decrease in the effectiveness of the enzyme and such compounds (alkaloids, phenols, enzymes, and (products fungal), The materials resulting from enzymatic activity are determined by two factors: the first is the enzyme and the second is the concentration of the base material with some reaction conditions. Whenever the silver ions increase to the highest limit of the amount of the enzyme in the samples, this means that the enzyme is unable to convert higher concentrations, and with changing reaction conditions (time + pH) it affects This negatively affects the work of the enzyme as well, and this leads to a decrease in the enzyme activity at a concentration of 2 mM, and the reason for the decrease in concentration is 0 mM. Due to the absence of the base material for the enzyme, the reason for the maximum enzymatic activity at the concentration of 1.5 mM is due to the high enzymatic activity of the nitrate reductase enzyme, which converts silver ions into silver nanoparticles (Hamedia et al., 2017).

Effect of concentrations of silver nanoparticles prepared from filtrate, mass, hot and cold extracts of *Fusarium solani* on inhibition of growth of the pathogenic fungus *Fusarium solani*

The results are shown in Figure (3) of the effect of concentrations of silver nanoparticles prepared from filtrate, mass, and hot and cold extracts of the fungus *Fusarium solani* in inhibiting the growth of the pathogenic fungus *Fusarium solani*, until there is an increase in the rate of inhibition when the concentration increases up to a concentration of 1.5 mM in all treatments, as the results show. To the superiority of all treatments in inhibiting the pathogenic fungus *Fusarium solani* over the treatment of hot extract of the fungus biomass The results also show that the mushroom filtrate recorded the highest rate of inhibition at the concentration of 1.5 mM, reaching 0.64 mM, compared to the hot extract treatment at the concentration of 0.5 mM, reaching 0.11 mM.

Table 3. Effect of concentrations of silver nanoparticles prepared from filtrate, bulk, and hot and cold extract of *Fusarium solani* fungus

Transactions of silver nanoparticles	Concentrations mM					Rate
	0	0.5	1	1.5	2	
The filtrate	0	0.14	0.26	0.64	0.48	0.30
Biomass	0	0.16	0.23	0.41	0.25	0.21
Cold extract	0	0.18	0.26	0.55	0.43	0.28
Hot extract	0	0.11	0.16	0.17	0.13	0.11
Concentration rate	0	0.15	0.23	0.44	0.32	0.23

Minimum significant difference L.S.D. _{0.05} for treatments 0.053 for concentrations 0.059 Treatments x concentrations 0.11

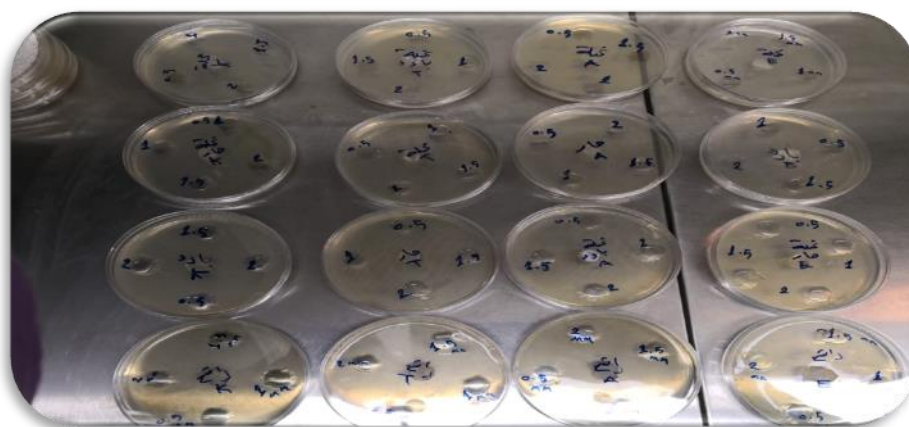


Figure 7. Experiment on the effect of concentrations and treatments of silver nanoparticles on inhibiting the pathogenic fungus *Fusarium solani*

The reason for the inhibition of fungi by concentrations of silver nanoparticles is that silver nanoparticles have the ability to affect the DNA of the pathogenic fungus by causing the DNA to lose its ability to copy and replicate, which leads to a defect in the process of cloning the DNA strand (Kim et al., 2012). It also has the ability To penetrate the cell walls (Al-Wakeel, 2103). This is because silver nanoparticles have the ability to adhere to the walls of fungal cells and then penetrate, analyze and absorb the cell walls through interaction with the metabolic and biological processes within the fungus, which leads to influencing the regulatory processes of the proteins and enzymes of the fungus and thus inhibiting the fungus (Narayanan and Hyun, 2011). They also have an effective role in damaging the proteins, fats, and nucleic acids of fungal cells. Nanoparticles can also bind directly to the fungal cell membrane, leading to the destruction of spores, fungal hyphae, and reproductive structures of the pathogenic fungus (Hwang et al., 2008).

Conclusions

1. The high ability of the pathogenic fungus *Fusarium solani* to produce silver nanoparticles.
2. Silver nanoparticles biosynthesized from the pathogenic fungus *Fusarium solani* have no effect on the germination rate of wheat seeds.
3. High efficiency of the reductase enzyme in the process of synthesis of silver nanoparticles.

Recommendation:

1. The use of biosynthetic silver nanoparticles from the fungus *Fusarium solani* to inhibit plant fungal pathogens.
2. Use of silver nitrate in the synthesis of nanoparticles
3. Using fungi in the biosynthesis of nanoparticles because of their high ability in the biosynthesis process.
4. Testing the effectiveness of the reductase enzyme in using the biosynthesis process of nanoparticles for the compatibility process between the particle production process.

References

Adebayo EA, Oloke JK., 2017. Oyster mushroom (pleurotus species) A natural functional food. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 7(3): 254-264.

Al-Naimi MT, Abdel-Sattar S., 2018. The effect of silver nanoparticles manufactured by the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) on the roles and development of the hairy grain beetle *Trogoderma granarium* (Everts), PhD thesis. University of Baghdad College of Science.

Al-Obaidi I, Muhammad AF., 2012. Nanobiotechnology and its advanced applications in medicine, genetic engineering, and molecular biology. Iraqi Library and Documentation House First Edition, 4(2): 27-44.

Al-Rawi KM, Khalaf A, Abdul Aziz M., 2000. Design and analysis of agricultural experiments. Second edition. Dar Al-Kutub for Printing and Publishing. University of Mosul.

Al-Shammari HA., 2015. The effect of the predator *Dicrodiplosis manihoti* Harris Diptera: Cecidomyiidae and silver nanoparticles prepared by biological methods on some biological aspects of the citrus mealybug *Planococcus citri* (Risso) Hemiptera: *Pseudococcidae*, Doctoral thesis. College of Agriculture. University of Baghdad.

Al-Wakil MA., 2013. The effect of ultrafine particles on soil structure and its components. *Journal of Environmental Sciences and Technology*, 22(4): 15-20.

Anil KS, Abyaneh MK, Gosavi SW, Kulkarni SK, Pasricha R, Ahmad A, Khan MI., 2007. Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO₃. *Biotechnol Letter*, 29(3): 43-45.

Bamasoud SF, Bahwairth MA., 2017. The effect of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* and *Prosopis juliflora* leaves extract on the germination and growth of seedlings of the zucchini plant *Cucurbita Pepo*. *Journal of the Arab American University*, 3(2): 34-47.

Bhainsa CK, D'Souza FS., 2006. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Colloids Surf B*, 47(3): 160-164.

Bhattacharyya A, Bhaumik A, Usha RP, Mandal S, Epiidi TT., 2012. Nanoparticles a recent approach to insect pest control. *Afr J Biotechnol*, 9(2): 3489-3493.

Chang ST, Miles PG., 2004. Mushrooms, cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. CRC press. Boca Raton, 2(6): 451-457.

Duran PD, Marcato OL, Alves GIH, De Souza JE., 2005. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporium*. *Strains Nanobiotechnol*, 23(3): 1-7.

Elamawi R, Raida E, Al-Harbi R, Awatif H., 2018. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Journal of Biological Pest Control*, 28(28): 1-11.

Farooq M, Basra SMA, Ahmad N, Hafeez K., 2005. Thermal hardening: A new seed vigor enhancement tool in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(2): 187-193.

Ghorbani HR., 2012. Silver nanoparticles biologically synthesized using extract of *E. coli*. *Minerva Biotechnologica*, 24(2): 58-61.

Gupta ST, Chauhan PG., 2017. Mushrooms, cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. CRC press, Boca Raton, 12(2): 451-464.

Hamedia S, Masumeh G, Soheila S, Seyed Abbas S., 2017. Controlled biosynthesis of silver nanoparticles using nitrate reductase enzyme induction of filamentous fungus and their antibacterial evaluation. *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*, 45(8): 1588-1596.

Hassan SS, Hassan AA., 2019. The effect of biosynthetic silver nanoparticles from mushrooms *Pleurotus eryngii* in inhibiting the growth of fungi *Pythium aphanidermatum* Cause of death disease And the fall of the wheat plant. *Syrian Journal of Agricultural Research*, 7(4): 422-432.

Hassan SS, Hassan AA., 2021. Enzyme effectiveness use silver nitrate reductase particles biosynthetic nanoparticles from the two fungi *Pleurotus ostreatus var ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* and its effect on fungus *Pythium aphanidermatum*. Arab Journal of Scientific Research, 3(1): 1-9.

Hwang ET, Lee YJ, Chae YS, Kim BC, Kim BI, Sang MB., 2008. Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. Small, 4(2): 746-750,

Haq N, Ullah G, Bibi S, Kanwal M.S, Ahmad, B, Mirza., 2012. Antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical analysis of *Euphorbia wallichii* root extract and its fractions. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 11(2): 241-249

Kim SW, Jung K, Lamsal YS, Kim JS, Min YS., 2012. Antifungal effects of silver nanoparticles (AgNPs) against various plant pathogenic fungi. Mycobiology, 40(2): 53-58.

Krishnaraj C, Jagan EG, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan PT, Mohan N., 2010. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. Colloids and Surfaces Biointerfaces, 76(1): 50–56.

Kipngeno P, Losenge T, Maina N, Kahangi E, Juma P., 2015. Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma asperellum* against *Pythium aphanidermatum* in tomatoes. Biological Control, 90(3): 92–95.

Min JS, Kim KS, Kim SW, Jung JH, Lamsal K, Kim SB, Jung M, Lee YS., 2009. Effects of colloidal silver nanoparticles on sclerotium-forming phytopathogenic fungi. Plant Pathology, 25(2): 376–380.

Narayanan KB, Hyun HP., 2014. Antifungal activity of silver nanoparticles synthesized using turnip leaf extract (*Brassica rapa* L.) pathogens. European Journal of Plant Pathology, 140(2): 88-108.

Pradhan S., 2013. Comparative analysis of silver nanoparticles prepared from different plant extracts (*Hibiscus rosa sinensis*, *Moringa oleifera*, *Acorus calamus*, *Cucurbita maxima*, *Azadirachta indica*) through green synthesis method. Thesis submitted to National Institute of Technology. Rourkela for the Partial Fulfilment of Master degree in Life science. College of Science, 23(3): 340-344.

Scheuerell SJ, Sullivan DM, Mahaffee WF., 2005. Suppression of seedling damping-off caused by *Pythium ultimum*, *P. irregulare*, and *Rhizoctonia solani* in container media amended with a diverse range of Pacific Northwest compost sources. Phytopathology, 95(3): 306-315.

Soni N, Prakash S., 2013. Possible mosquito control by silver nanoparticles synthesized by soil fungus (*Aspergillus niger* 2587). *AdvNanoparticles*, 2(3): 125-132.

Vahabi K, Mansoori GA, Karimi R., 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles by Fungus *Trichoderma reesei*. *Inscience Journal*, 1(1): 65-79,

Vanaja M, Rajeshkumer S, Paulkumar K, Gnanajobitham G, Malarkodi C, Annadurai G., 2013. Kinetic study on green synthesis of silver nanoparticles using *coleus aromaticus* leaf extract. *Adv Appl Science*, 4(3): 50-55.

Wuttipong M, Ajit K, Sarmah S, Maensiri PT., 2017. Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. *Scientific Reports*, 7(2): 826-829.

A Preliminary Investigation of Rainwater Harvesting Potential in Emergency Healthcare Facilities: Case Study of Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Hospital

Tevfik Denizhan MUFTUOĞLU^{1*}

¹Istanbul Aydın University, Engineering Faculty, Civil Engineering (English) Department, 34295, Istanbul

¹<https://orcid.org/0000-0001-5836-3689>

* Corresponding author: tmuftuoglu@aydin.edu.tr

Research Article

ABSTRACT

Article History:

Received: 13.01.2025

Accepted: 19.02.2025

Available online: 17.03.2025

Keywords:

Istanbul

Rainwater harvesting

Sustainable water management

Sustainability

Sustainable cities and communities

Rainwater harvesting (RWH) is a sustainable approach to addressing water scarcity and promoting efficient water management in critical infrastructure. This study evaluates the RWH potential of Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Emergency Hospital, a 1000-bed facility, using a simplified analytical approach. Satellite imagery and regional precipitation data were employed, categorizing roof sections based on size, type, and material, with aggregated segments simplifying the calculations. The analysis estimated an average monthly RWH potential of 1261.00 m³, with December and January demonstrating the highest potential at 2273.57 m³ and 2053.77 m³, respectively, and July recording the lowest at 515.16 m³. Seasonal variability was quantified through a standard deviation of 586.94 m³, a coefficient of variation (CV) of 46.54%, a positive skewness of 0.50, and a kurtosis of -1.36, indicating moderate variability and relatively stable harvesting conditions. The study also shows that RWH can contribute between 2.77% and 12.22% of the hospital's monthly water demand, translating into thousands of cubic meters of annual water savings. While these percentages may appear modest, the benefits of RWH extend beyond immediate water contributions, providing resilience during droughts or water supply disruptions and fostering sustainable practices within healthcare management. This preliminary assessment, conducted under conservative assumptions such as treating sloped roofs as flat surfaces, underscores the feasibility of implementing RWH systems even with limited data. Future studies incorporating precise roof measurements, material analyses, and dynamic rainfall simulations are expected to reveal even greater potential. By demonstrating the viability of RWH, this study provides a foundation for decision-makers, including government authorities and hospital management, to integrate RWH into emergency healthcare infrastructure, advancing sustainable water management practices.

Acil Sağlık Tesislerinde Yağmur Suyu Hasadı Üzerine Bir Ön Araştırma: Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Hastanesi Örneği

Araştırma Makalesi

ÖZ

Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 13.01.2025

Kabul tarihi: 19.02.2025

Online Yayınlanma: 17.03.2025

Yağmur suyu hasadı (YSH), su kıtlığını ele almak ve kritik altyapılarda su yönetiminin verimliliğini artırmak için sürdürülebilir bir yaklaşımdır. Bu çalışma, 1.000 yatak kapasiteli Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Acil Durum Hastanesi'nin YSH potansiyelini basitleştirilmiş bir analitik yaklaşım

Anahtar Kelimeler:

İstanbul
Yağmur suyu hasadı
Sürdürülebilir su yönetimi
Sürdürülebilirlik
Sürdürülebilir şehirler ve toplumlar

kullanarak değerlendirmektedir. Uydu görüntüleri ve bölgesel yağış verileri kullanılarak çatı bölümleri boyut, tür ve malzeme bazında kategorize edilmiş ve hesaplamaları kolaylaştırmak için benzer segmentler birleştirilmiştir. Analiz, ortalama aylık YSH potansiyelinin 1261,00 m³ olduğunu ve Aralık (2273,57 m³) ile Ocak (2053,77 m³) aylarının en yüksek hasat potansiyelini, Temmuz'un ise en düşük potansiyeli (515,16 m³) kaydettiğini göstermiştir. Mevsimsel değişkenlik, 586,94 m³ standart sapma, %46,54 değişim katsayısı (CV), 0,50 pozitif çarpıklık ve -1,36 basıklık değeri ile hesaplanmış ve bu durum, orta düzeyde bir değişkenliğe ve nispeten sabit hasat koşullarına işaret etmektedir. Çalışma ayrıca YSH'nin hastanenin aylık su talebinin %2,77 ila %12,22'si arasında bir katkı sağlayabileceğini, bunun yıllık binlerce metreküp su tasarrufuna dönüştüğünü göstermektedir. Bu yüzdeler mütevazı görünebilse de, YSH'nin faydaları anlık su katkılarının ötesine geçerek kuraklık veya su teminindeki kesintiler sırasında direnç sağlamakta ve sağlık yönetiminde sürdürülebilir uygulamaları teşvik etmektedir. Eğimli çatılar düz yüzeyler olarak ele alınarak yapılan muhafazakâr varsayımlar altında gerçekleştirilen bu ön değerlendirme, sınırlı verilerle bile YSH sistemlerinin uygulanabilirliğini vurgulamaktadır. Gelecekteki çalışmalar, hassas çatı ölçümleri, malzeme analizleri ve dinamik yağış simülasyonlarını içerecek şekilde bu potansiyeli daha da geliştirebilir. Bu çalışmayla YSH'nin uygulanabilirliğini göstererek, hükümet yetkilileri ve hastane yönetimi gibi karar vericilere YSH'nin acil sağlık altyapısına entegrasyonunu teşvik edecek bir temel sağlanmakta ve sürdürülebilir su yönetim uygulamaları desteklenmektedir.

To Cite: Muftuoğlu TD., 2025. A preliminary investigation of rainwater harvesting potential in emergency healthcare facilities: Case study of Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Hospital. *Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi Dergisi*, 5(1): 145-172.

Introduction

The issue of water scarcity is one of the most significant problems faced by the world today, due to the rapid urbanization of cities, the increase in the world population, and global warming. Rainwater Harvesting (RWH) has become a sound and sustainable solution to the water shortage by collecting, storing, and reusing rainwater for nonpotable, and in some cases potable, use. RWH not only reduces dependence on conventional water supply systems but also mitigates urban flooding and enhances environmental sustainability. Despite its demonstrated benefits in various urban and rural settings, the application of RWH in emergency healthcare facilities has received limited attention in academic and practical domains. Given the large roof areas typically available in hospitals and the significant rainfall in many regions, these facilities present considerable opportunities for implementing RWH systems.

This study focuses on Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Emergency Hospital as a case study to assess the feasibility and potential of RWH in an emergency healthcare setting. Using a simplified analytical approach, the study integrates roof area, material type, and regional precipitation data to estimate RWH potential. Roof sections were categorized and grouped based on size, type, and material to streamline calculations, while assumptions such as flat roof surfaces were made to ensure a timely and preliminary assessment. Although these assumptions introduce some limitations, they highlight the significant promise of RWH, even under conservative conditions.

The primary aim of this study is to provide a foundational understanding of the potential benefits of RWH in emergency hospitals and to encourage decision-makers, including government authorities and hospital management, to integrate RWH strategies into healthcare infrastructure. By showcasing potential water savings and sustainability benefits, the findings serve as a stepping stone for future, more detailed analyses that incorporate roof slopes and precise dimensions. Ultimately, this research underscores the role of RWH in advancing sustainable water management practices within the healthcare sector.

RWH systems in healthcare facilities also support broader urban sustainability goals. RWH systems have demonstrated significant water and energy savings, particularly in hospital environments. Guidelines for water safety and quality in healthcare premises emphasize the importance of ensuring reliable water supply systems, which aligns with the potential of RWH systems to improve water management in hospital settings (Scottish Health Technical Memorandum 04-02, 2015).

RWH systems at hospital building sites have shown tremendous potential for both water and energy savings, especially when combined with metal roofs (with a runoff coefficient of 0.95) and optimum tank sizes. Yet cost and long payback times for larger, more efficient tanks suggest the importance of compromising with environmentally sustainable and economic feasibility (Nasif et al., 2016).

RWH systems in hospitals represent great potential for substantial freshwater and operational cost savings. For example, the University College Hospital Ibadan found that a 12 m³ tank could satisfy 78.1% of its water demand, resulting in savings of \$51,072 over a period of 50 years, with a quick one-year payback period (Lade and Oloke, 2017).

In large hospitals located in semi-arid areas, RWH systems, when paired with demand-side measures like low-flow fixtures and xeriscaping, have demonstrated external water savings of around 25%. This decrease is largely a function of several crucial design variables such as rain catchment area, facility dimensions, and storage tank characteristics (Fulton, 2018).

All hospitals can benefit from water management goals through RWH systems, upon which they can rely: increase groundwater recharge, stormwater management (leads to less flooding), reduce potable water consumption. For example, a case study at AIIMS Hospital, Raipur, brought out the primary design factors and their associated costs and the twofold purposes of the urban water level management system serving both as a water system and a groundwater recharge system (Das, 2019).

RWH systems have shown a great promise to meet emergency water needs in health care facilities. For example, at Dilla University Referral Hospital in Ethiopia, RWH can provide

94.5–238.5% of emergency water demand, which suggests that RWH is a reliable alternative water source during public health emergencies like the pandemic of COVID-19 (Kanno et al., 2021).

Rainwater for drinking (RFD) systems in the hospital, especially in relatively rural regions, serves as a tool to increase the reliability of water supply by implementing a rigorous training and monitoring system. These systems have been used for increased confidence in operations and assurance in meeting drinking-water standards, addressing SDG 6 (Lee et al., 2021).

Assumptions and Limitations

This study is based on several key assumptions to facilitate the preliminary assessment of rainwater harvesting (RWH) potential. First, sloped roof surfaces were treated as flat to simplify calculations, which may underestimate the actual harvesting potential. Second, the runoff coefficients were derived from literature values for similar roofing materials, as on-site verification was not feasible. Third, the analysis relied on satellite imagery for roof area measurements, which may introduce minor inaccuracies compared to precise on-site measurements. Additionally, the study did not account for potential losses due to evaporation, leakage, or first-flush diversion. These assumptions and limitations highlight the need for future studies to incorporate detailed roof measurements, dynamic rainfall simulations, and on-site validation to refine the estimates further.

Material and Methods

Case study hospital

Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Emergency Hospital, located in Istanbul, Turkey, was established to address critical healthcare needs during emergencies, including pandemics and natural disasters. Constructed in just 52 days on the grounds of Istanbul Atatürk Airport, the hospital spans 125,000 square meters, with a covered area of 75,000 square meters. It features 1,008 beds, including 432 intensive care units, 16 operating theaters, and around 100 dialysis units (Wikipedia, 2020). Named after Prof. Dr. Murat Dilmener, a prominent physician who passed away due to COVID-19, the facility symbolizes Turkey's commitment to enhancing healthcare infrastructure (Ministry of Health, 2020). In Figure 1, the geographical location of Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Emergency Hospital is presented. In Figure 2, the satellite image of the hospital is given.

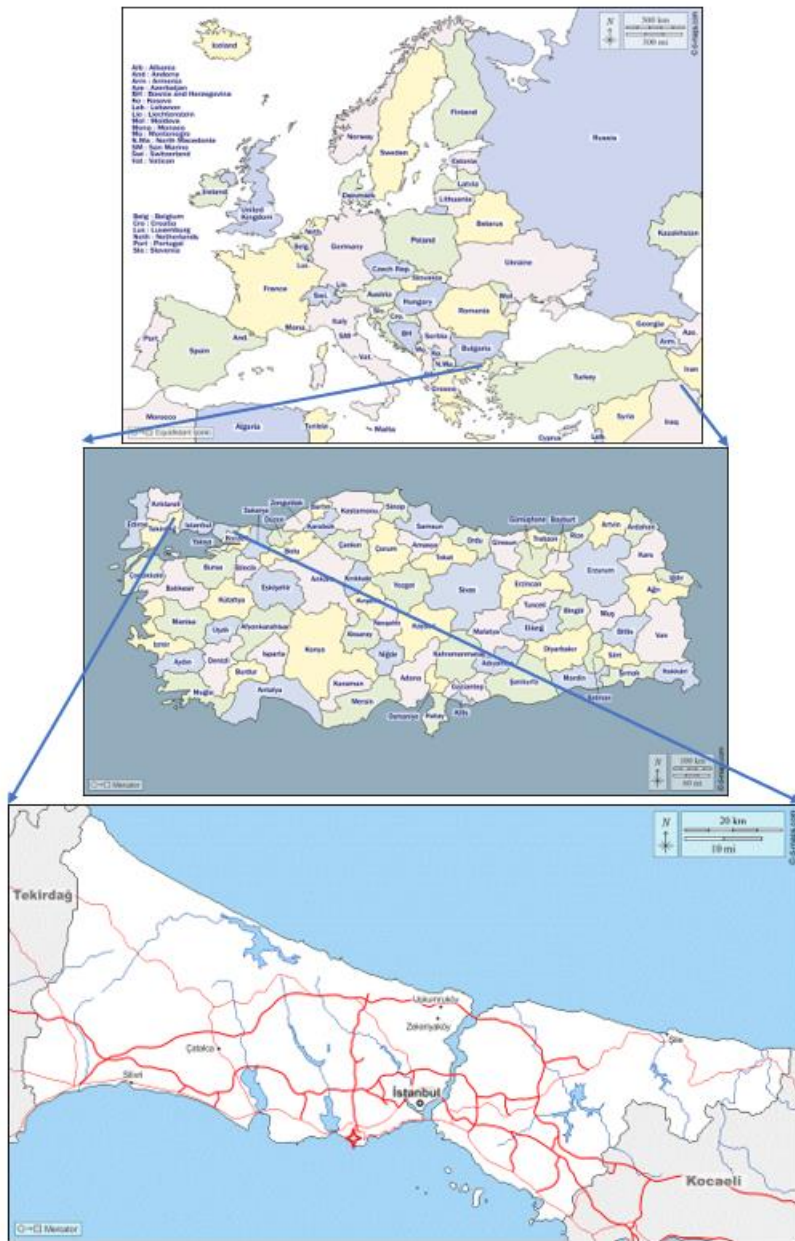


Figure 1. Location of the case study hospital



Figure 2. Satellite image of the case study hospital

Water consumption of the case study hospital

Accurate data on the water consumption of Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Emergency Hospital is unavailable due to constraints in accessing detailed operational records. Comprehensive water consumption records often require formal requests and processing through administrative channels, which can be time-intensive and were not feasible within the timeline of this study. Therefore, an estimated consumption range is derived based on established benchmarks for hospitals in similar settings.

Studies and guidelines indicate that water consumption in healthcare facilities varies depending on factors such as geographical location, services provided, and facility size. For instance, the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) reports that the median hospital uses approximately 315 gallons (about 1192 liters) of water per bed per day (U.S. Environmental Protection Agency, 2012). In a similar vein, the Central Public Health and Environmental Engineering Organisation in India prescribes 450 liters per bed per day for hospitals that have a bed count larger than a hundred. (Central Public Health and Environmental Engineering Organisation, 2016) A study conducted in Turkey on 118 public hospitals calculated the average water consumption per year to be about 192.26 m³ per bed, which is approximately 526.74 L/bed/day (Teksoy and Altan, 2022). We have taken this value as a reference in this article because the assumptions would be specific for Turkey's water usage system and facilities in public hospitals, therefore the results could be localized.

At Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Emergency Hospital, a scenario-based method was employed to analyze water use and water impact for calculating RWH potential. When examining three different situations:

Base Scenario: Based on the national statistic average for Turkish public hospitals of 526.74 liters per bed per day.

Moderate Demand Scenario: We calculate this amount to be 600 liters per bed per day to allow for higher water consumption like what is expected in emergency medical treatment units.

High Demand scenario: assuming 800 liters/bed/day, which is peak water demand in any of the world's comparable facility.

A moderate load case of 600 L/b/d was used as the main basis for the calculations. This estimate represents a compromise between the amount of water required to operate an emergency healthcare facility and the capacity to realize its RWH potential. The study highlights the realistic role of RWH in satisfying water demand with this value by showing that it is neither overestimating nor requiring strictly institutional-type data. Future studies with full hospital records input could potentially minimize these estimates to determine the best method of contributing to sustainable water management.

Climatic conditions of the case study hospital location

Istanbul's distinctive climate, shaped by its strategic position at the crossroads of Europe and Asia and its proximity to the Black Sea and the Mediterranean, exhibits considerable variability. Table 1 provides meteorological data for Istanbul spanning from 1950 to 2022, emphasizing the importance of precipitation patterns in evaluating the potential for rainwater harvesting.

Table 1. Rainfall records for Istanbul from 1950 to 2022 (Turkish State Meteorological Service).

Period	Average Monthly Total Rainfall (mm)
January	89.7
February	70.5
March	63.1
April	47.5
May	32.6
June	27.9
July	22.5
August	24.6
September	40.5
October	66.7
November	76.0
December	99.3
Annualy	660.9

Assessment of rainwater harvesting potential for the case study hospital

The RWH potential of the hospital's roof is calculated using the equation 1 provided by Gould and Nissen-Petersen (1999):

$$S = R \times A \times Cr \quad (1)$$

Here, S represents the RWH potential in cubic meters, R denotes the monthly rainfall in meters, A is the roof area in square meters, and Cr is the runoff coefficient. Monthly rainfall data are already obtained from Table 1.

The sloped roof surfaces of Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Emergency Hospital have been treated as flat in this study due to the absence of precise measurements for ridge height and slope angles. While sloped roofs typically offer a larger effective harvesting area and thus higher RWH potential, assuming flat surfaces provides a conservative estimate. This approach ensures straightforward calculations while still showcasing the significant RWH potential of the hospital. By demonstrating considerable harvesting possibilities under these simplified conditions, the results emphasize the importance of integrating RWH strategies. Future studies, incorporating slope measurements and ridge heights, would likely reveal even greater potential, further validating the need for sustainable water management practices.

The roof area was determined using satellite imagery and the polygon measurement tool in Google Earth Pro, a practical method given the infeasibility of on-site measurements. High-resolution images were utilized to accurately identify roof boundaries, with sloped surfaces assumed flat for simplicity. This conservative assumption simplifies calculations while delivering a reliable preliminary estimate of RWH potential.

Using the polygon tool, roof perimeters were traced directly on satellite images, allowing the tool to automatically compute enclosed areas in square meters. To streamline the process, roofs were grouped based on geometry, size, and connectivity. Identical or similar sections were aggregated into single measurements, simplifying the overall calculation without compromising accuracy. The total roof area was then obtained by summing the measurements and applied as the A parameter in the RWH potential equation.

The hospital roof is assumed to consist of metal sandwich panels, as indicated by Teknopanel, the supplier for both Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener and Sancaktepe Emergency Hospitals. According to Teknopanel, these panels are composed of stone wool insulation and metal cladding, likely made of galvanized steel or aluminum. While the exact type of metal is unspecified, the difference in runoff coefficients between galvanized steel and aluminum is negligible compared to materials such as wood or concrete. Both metals generally have runoff coefficients exceeding 0.90, making them highly efficient for RWH applications.

This durable and impermeable roofing material further highlights the suitability of the hospital's roof for rainwater collection. The runoff coefficient values were applied as the Cr parameter in the RWH potential equation, alongside the total roof area.

To facilitate the analysis, the hospital's main buildings were grouped into eight categories based on geometry, size, and material composition. Buildings with identical shapes and dimensions were grouped together for simplicity, and materials were classified into sandwich panels (likely metal or aluminum) and concrete. This grouping enables a streamlined yet accurate evaluation of the RWH potential.

Assuming these roof materials enables the study to proceed without requiring on-site verification, delivering practical and reliable insights into the hospital's RWH potential. Future investigations incorporating detailed material analyses and slope measurements could refine these estimates and further enhance the accuracy of RWH potential assessments.

Figure 3 presents an overview of the grouped roof sections, while Figures 4–11 illustrate each roof section in detail. Table 2 summarizes the roof numbers along with their respective areas and material types, and Table 3 provides the runoff coefficients for various roofing materials.



Figure 3. Overview of the grouped sections

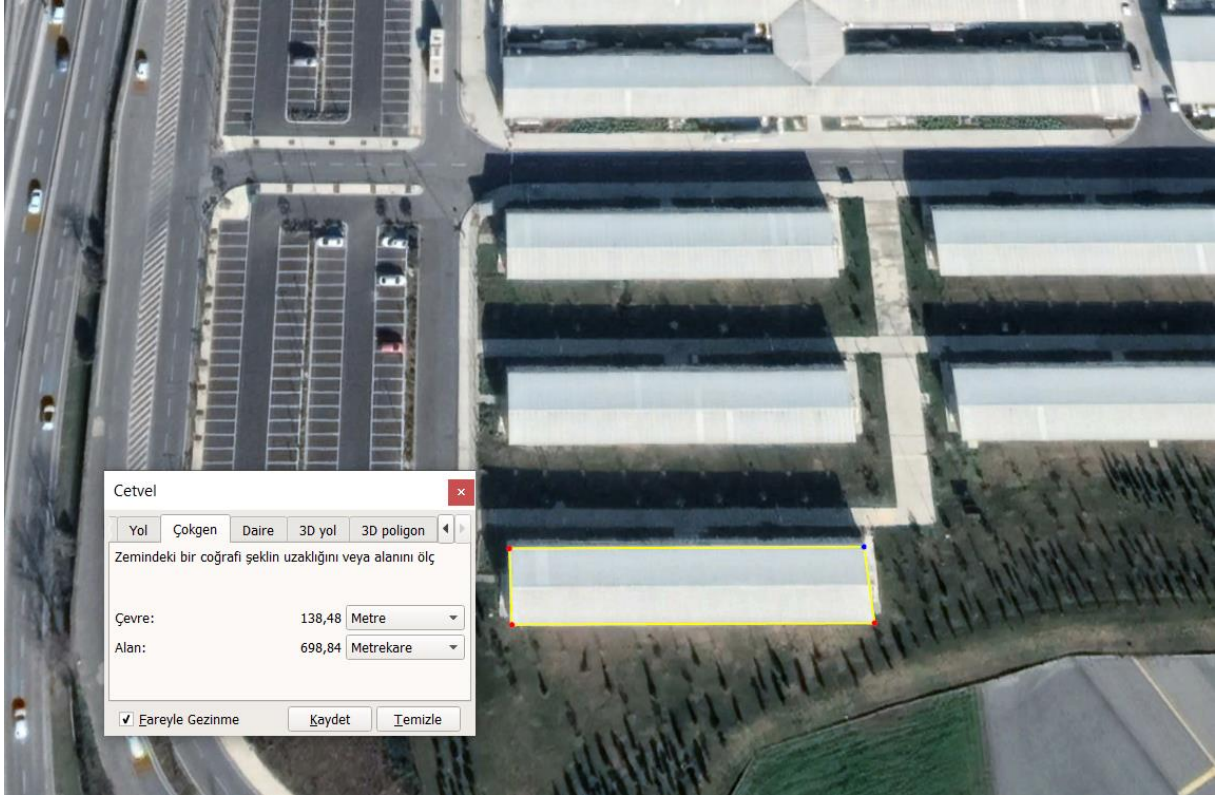


Figure 4. Roof group 1 and its polygon area measurement

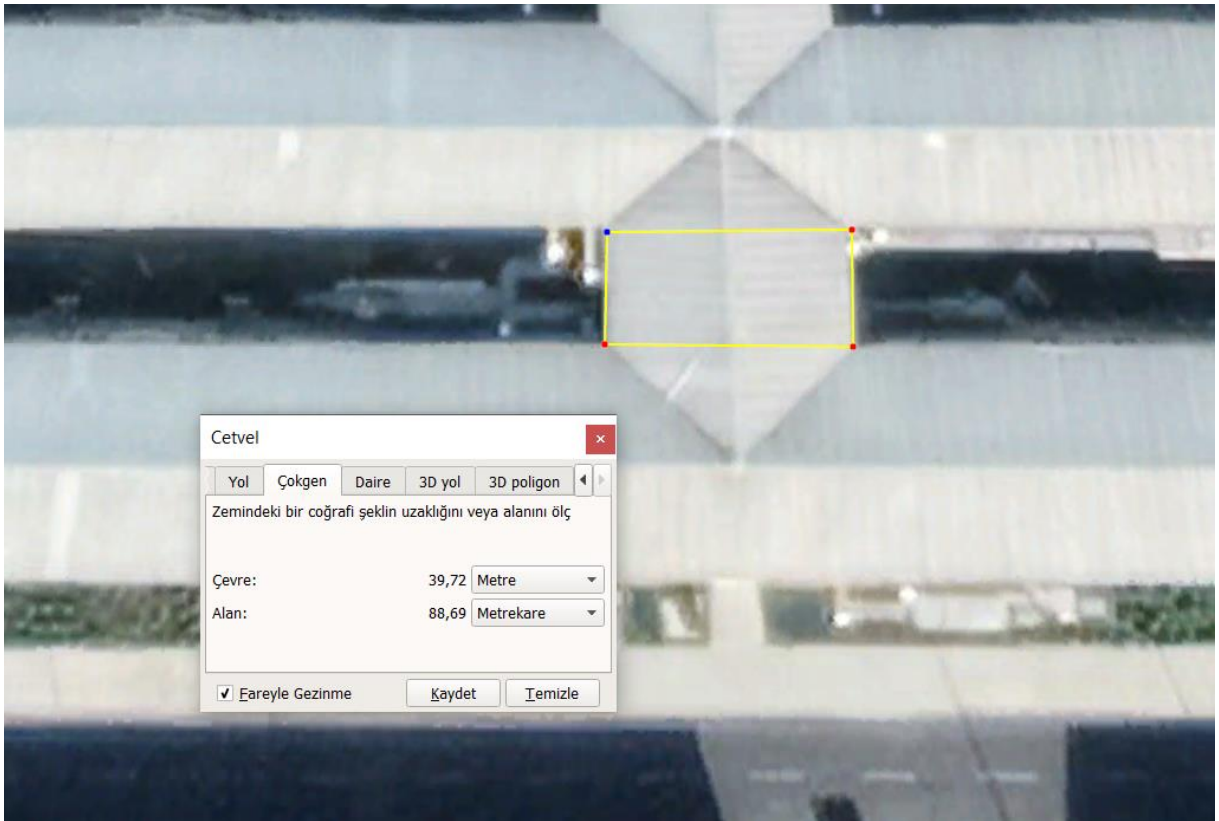


Figure 5. Roof group 2 and its polygon area measurement



Figure 6. Roof group 3 and its polygon area measurement

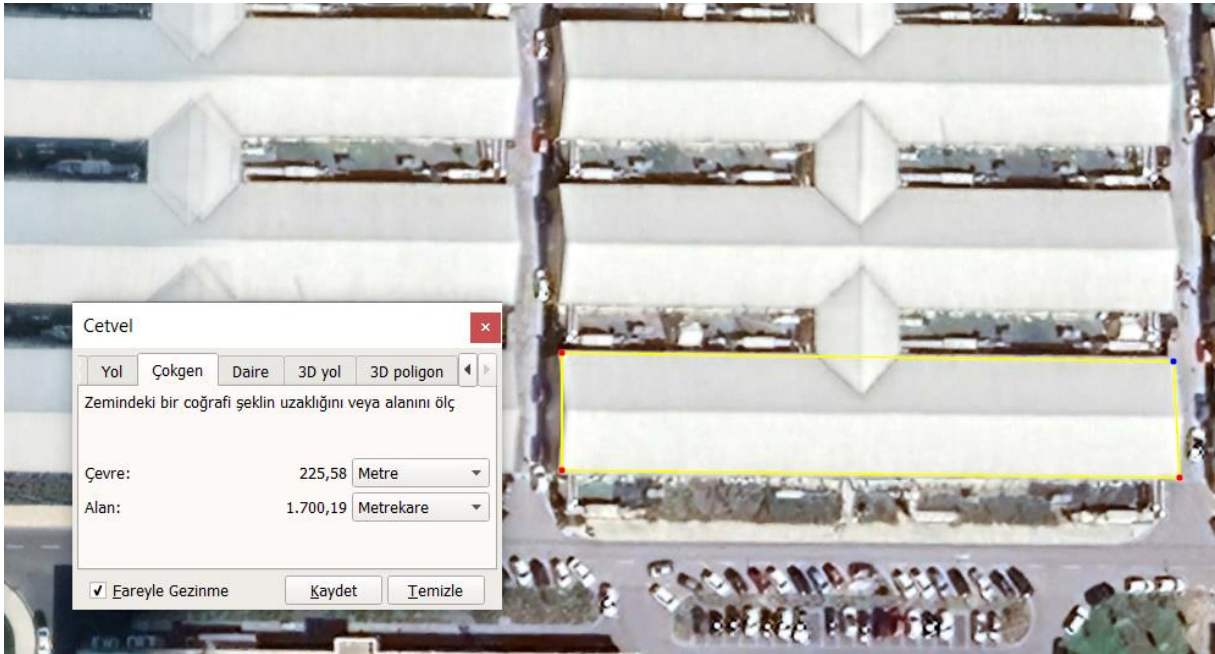


Figure 7. Roof group 4 and its polygon area measurement

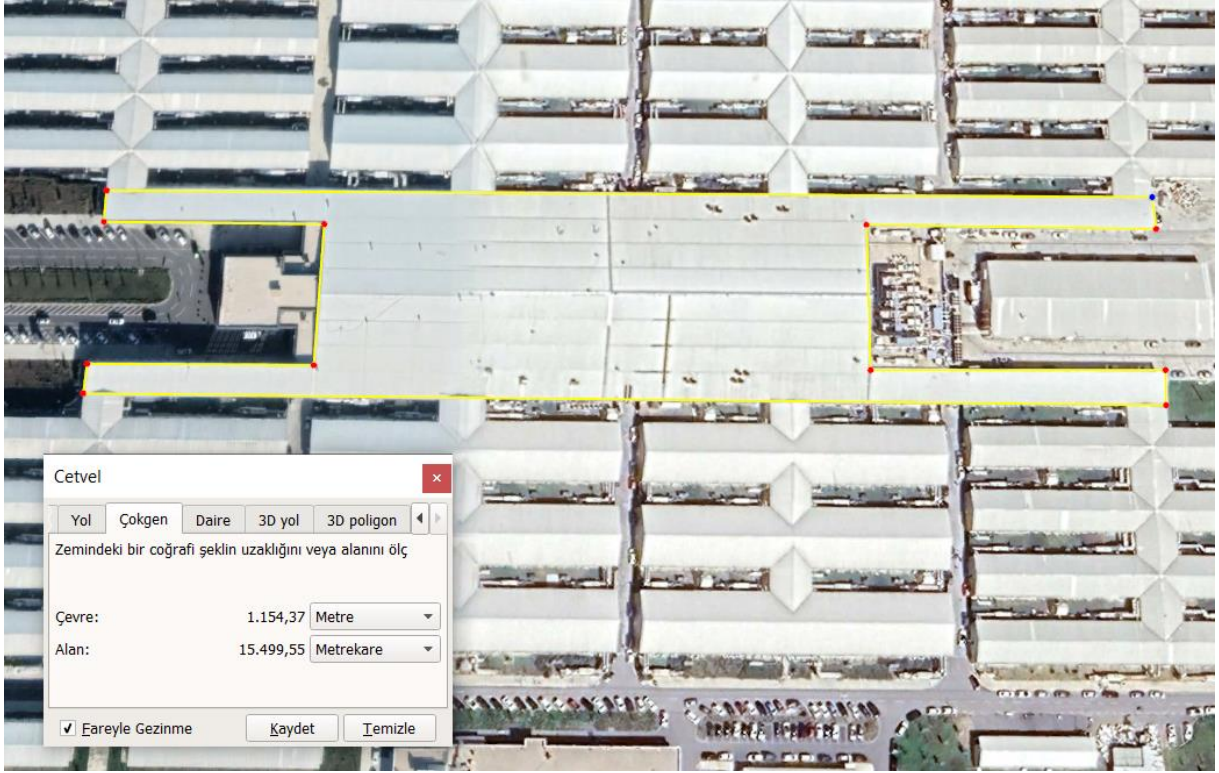


Figure 8. Roof group 5 and its polygon area measurement

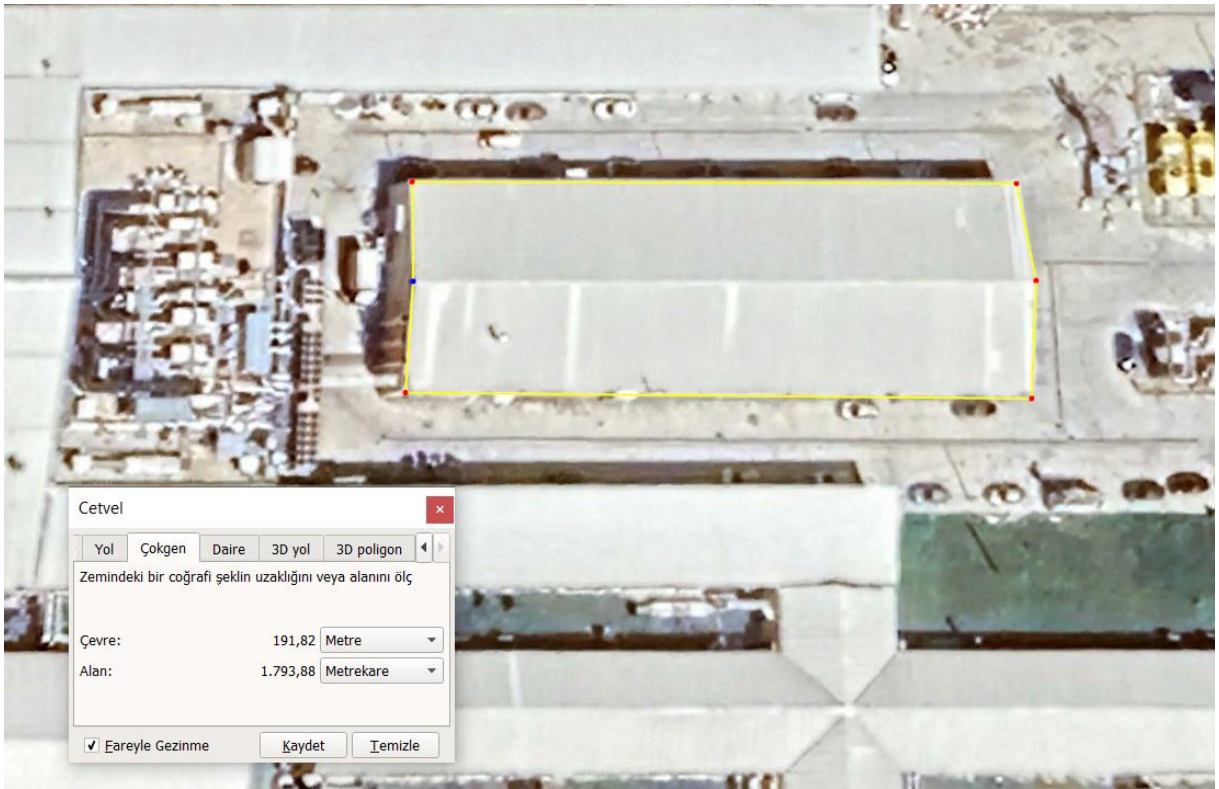


Figure 9. Roof group 6 and its polygon area measurement

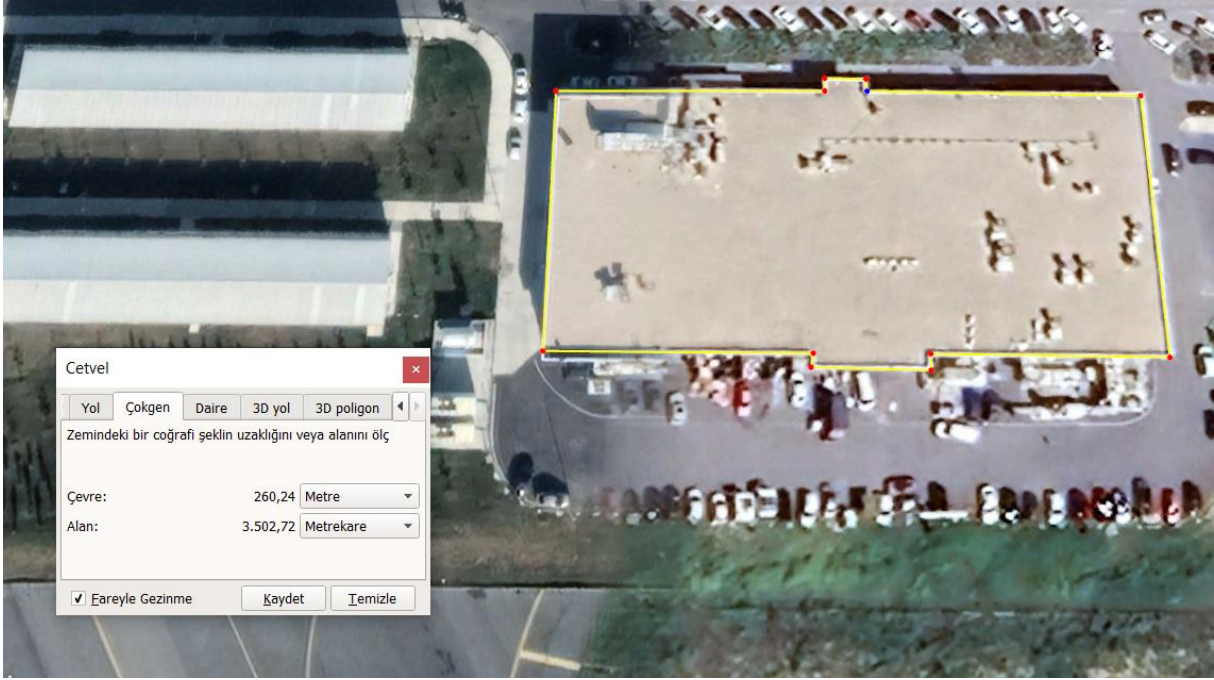


Figure 10. Roof group 7 and its polygon area measurement

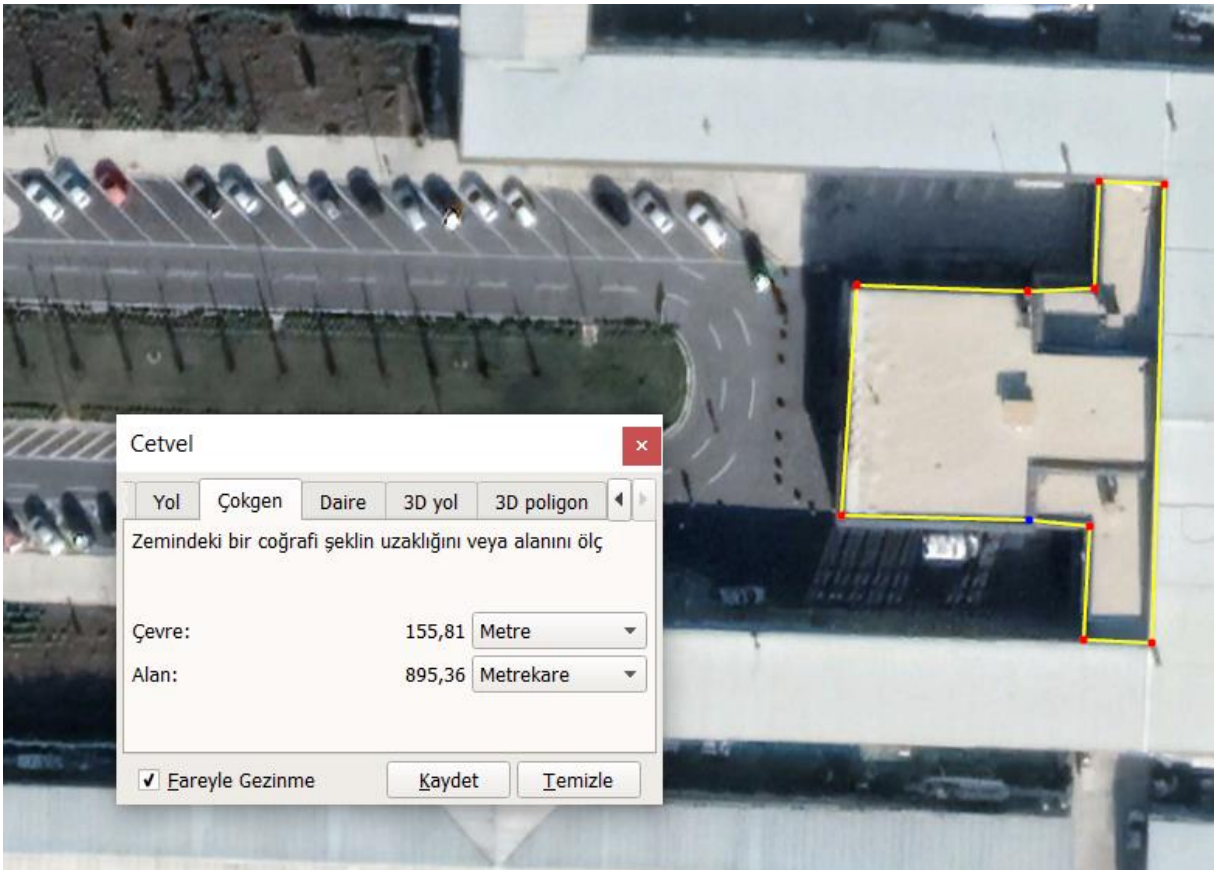


Figure 11. Roof group 8 and its polygon area measurement

Table 2. Categorization of hospital roofs by shape, size, and material type

Roof Number	Roof Material	Roof Area (m ²)
1	Sandwich panel (galvanized steel / iron or aluminum)	≈ 700
2	Sandwich panel (galvanized steel / iron or aluminum)	≈ 90
3	Sandwich panel (galvanized steel / iron or aluminum)	≈ 1450
4	Sandwich panel (galvanized steel / iron or aluminum)	≈ 1700
5	Sandwich panel (galvanized steel / iron or aluminum)	≈ 15500
6	Sandwich panel (galvanized steel / iron or aluminum)	≈ 1800
7	Sandwich panel (galvanized steel / iron or aluminum)	≈ 3500
	7 SECTIONS TOTAL	≈ 24740
8	Concrete	≈ 900
	1 SECTION TOTAL	≈ 900
	8 SECTIONS GRAND TOTAL	≈ 25640

Table 3. Runoff coefficient for different roof types (AFPRO-UNICEF, 2006)

Roof Type	Runoff Coefficient
Galvanized Iron Sheet	0.90
Asbestos Sheet	0.80
Tiled Roof	0.75
Concrete	0.70

To validate the results, the RWH potential estimates were compared with findings from Nasif et al. (2016) and Kanno et al. (2021), both of which examined RWH potential in hospital settings. The comparison showed that the estimated percentage of water demand met by RWH closely aligns with their reported ranges, supporting the credibility of the results within a healthcare facility context.

Future research is recommended to incorporate dynamic rainfall simulations and scenario-based modeling to enhance the analysis of RWH potential under various climatic conditions. Such simulations could capture temporal rainfall variability and provide insights into the system's performance during extreme weather events.

The fundamental rwh system components

A RWH system tailored for the roof groups of Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Emergency Hospital utilizes practical and effective components. The process begins on the roof, where the selection of roofing material is pivotal for ensuring water quality.

The hospital's roofs are assumed to consist of metal sandwich panels, likely composed of galvanized steel or aluminum, based on supplier information. These materials are advantageous for RWH as they resist corrosion and minimize debris accumulation, unlike materials such as asphalt shingles, which can release contaminants over time and compromise water quality.

Figure 12 illustrates the fundamental components of the proposed RWH system, showcasing the flow of harvested rainwater from the roof surface to the storage system and emphasizing its efficient and straightforward design.

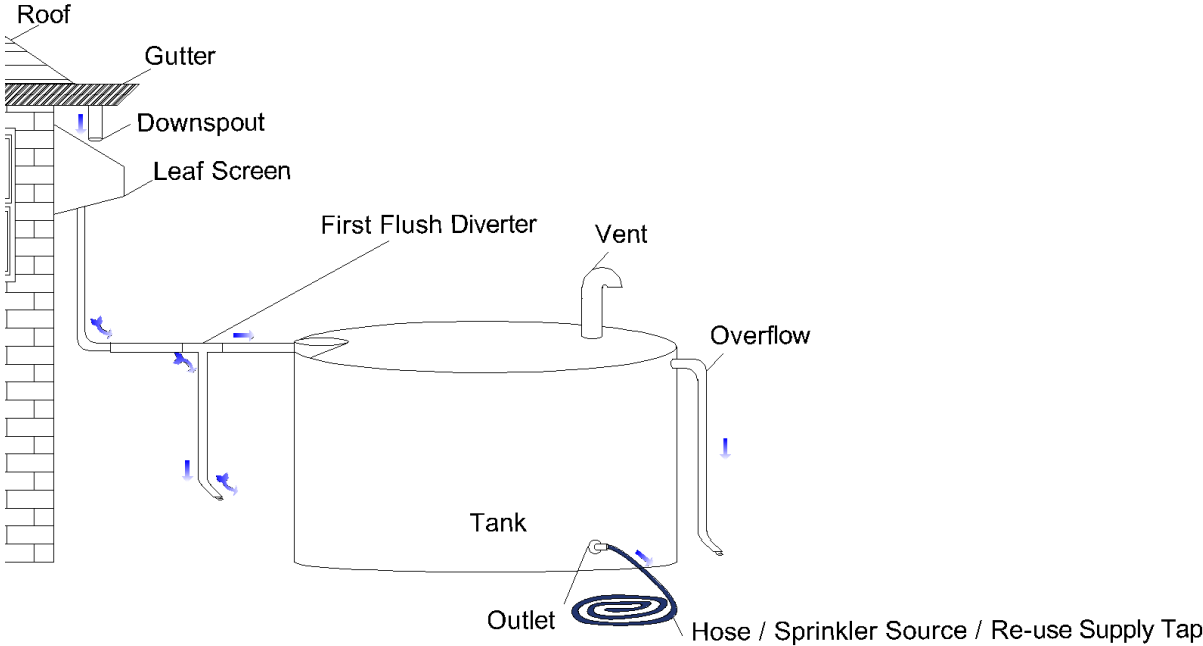


Figure 12. Fundamental RWH components (Muftuoglu and Oral, 2024)

Rainwater from the roof is directed into gutters specifically designed to accommodate heavy rainfall, as illustrated in Figure 13. To prevent blockages, a mesh leaf screen is installed to filter out larger debris such as leaves and twigs. While the screen effectively captures most contaminants, finer particles may still pass through. Featuring a mesh size capable of filtering particles larger than 1–2 mm, the screen ensures that cleaner water enters the storage system while minimizing the risk of downspout blockages. The flow capacity of this design depends on the dimensions and specifications of the mesh and screen, allowing for adaptability to varying rainfall intensities.



Figure 13. The leaf screen

The water passes through a first flush diverter on its way to the storage tank, effectively removing heavier pollutants that may have bypassed the leaf screen. Figure 14 provides an illustration of this diverter.

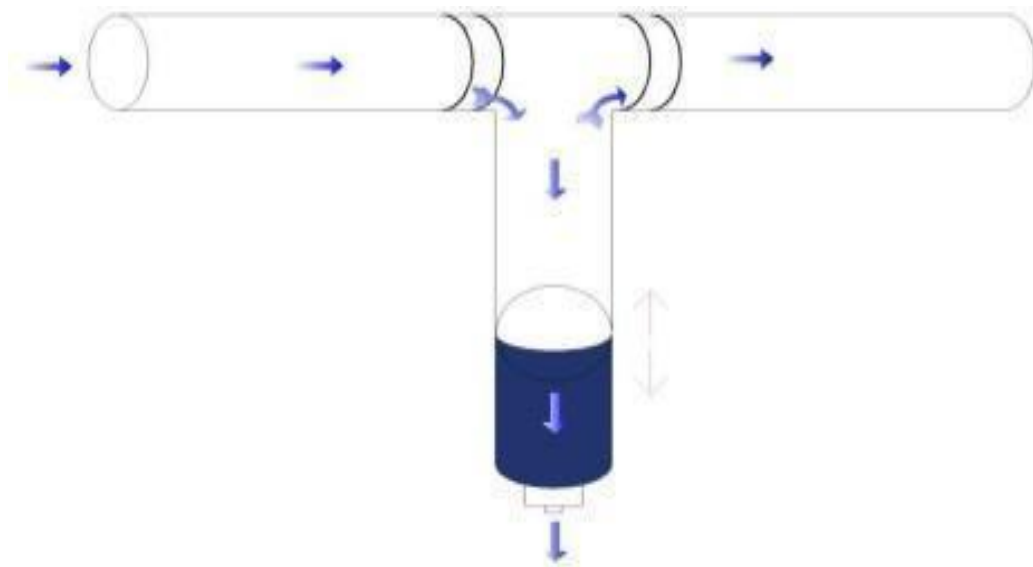


Figure 14. The first flush diverter system (Müftüoğlu, 2024)

The first flush diverter, incorporating a ball valve within a vertical pipe, plays a crucial role in separating contaminated water from the clean flow directed to the storage tank. When the ball valve reaches its capacity, it seals the pipe, effectively capturing dirt and impurities.

The trapped water can then be repurposed for irrigation using a slow-release valve or nozzle. While this method does not ensure complete purification, it significantly improves water quality. Additional filtration, desalination, or purification processes can further enhance the water's usability.

Water storage tanks, commonly constructed from materials such as plastic, concrete, or metal, share several essential features. The first critical component is the access port, which enables regular maintenance, cleaning, and repairs. The second is the ventilation opening, designed based on fluid mechanics principles to prevent vacuum formation and potential implosion when water flows in or out. The third vital element is the overflow opening, fitted with a pipe equal to or larger than the inflow, ensuring excess water is safely discharged during heavy rainfall. This overflow can also be linked to adjacent tanks for additional storage and to prevent spillage.

The fourth essential feature is the outlet, which facilitates water distribution for various applications. For instance, a hose can be attached for irrigation, or the system can be connected to sprinklers through pumping equipment. The tank material must endure environmental conditions such as humidity and sunlight, resist chemicals, and prevent biological growth, including mold and algae, which could compromise water quality. Sludge accumulation at the tank base can reduce efficiency; positioning the outlet above the sludge or at the tank's base can help mitigate clogging. Additionally, extending the inlet pipe beyond the first flush diverter and maintaining a gap minimizes sludge buildup.

The key components of the storage tank are depicted in Figure 15.

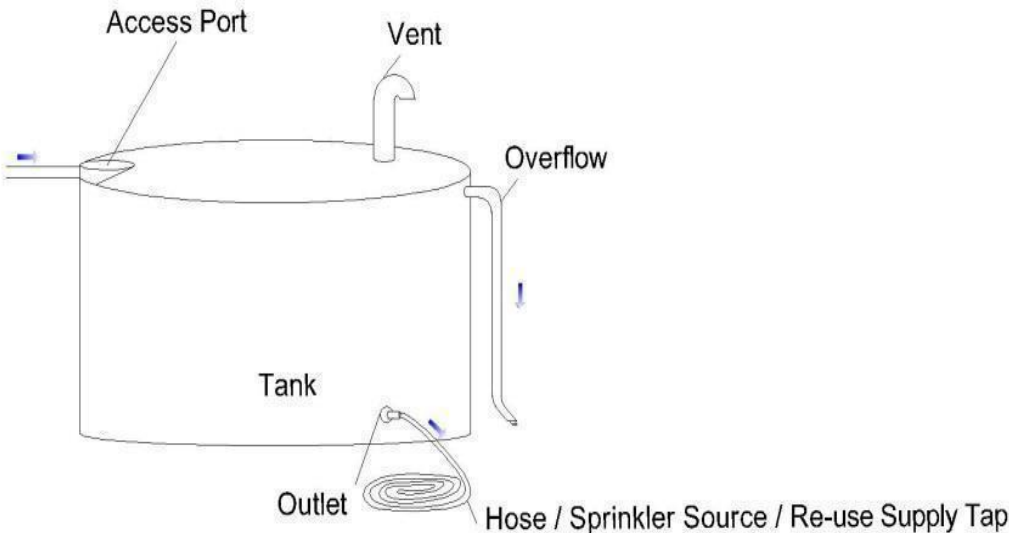


Figure 15. The tank and its associated components (Müftüoğlu, 2024)

Results

The rainwater harvesting potential for the roof sections of the case study hospital is calculated using Eq. (1) and presented in Table 4.

Table 4. Rainwater Harvesting Potential of the Hospital Roof (7 metal sections and 1 concrete section)

Months	RWH Potential (m ³)
January	2053.77
February	1614.16
March	1444.73
April	1087.56
May	746.40
June	638.79
July	515.16
August	563.24
September	927.28
October	1527.16
November	1740.09
December	2273.57

Statistical analysis offers meaningful information about possible trends, patterns, and variation in RWH potential during various months. Descriptive statistics specifically are essential for summarizing and understanding important features of a dataset. Common measures included mean, medians, standard deviation, range, variance, coefficient of variation (CV), skewness, and kurtosis.

The mean, which provides an average for all the variables in a population, is a measure of central tendency. On RWH analysis, average monthly value is the average amount of rainwater harvesting potential received in one average month. It is essential for planning and resource criteria in RWH systems. Based on the values provided in Table 4, the mean monthly RWH potential for the hospital is calculated as approximately 1260.997 m³. This average reflects a reasonable baseline for understanding the overall water harvesting capacity throughout the year. However, deviations from this mean, such as the significantly higher potential in December and January, or lower potential in July, highlight the importance of flexible strategies to accommodate seasonal variations in rainwater availability. The simple expression for obtaining the mean is presented in eq. (2).

$$Mean(\mu) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (2)$$

Where:

x_i is the individual value (e.g. monthly rainwater potential)

n is the number of values (12 for months in this case)

The median represents the middle value in a dataset when all data points are arranged in ascending order. In this study, the monthly rainwater harvesting (RWH) potential values provided in Table 4 were sorted, yielding the following sequence (in m³): 515.16, 563.24, 638.79, 746.40, 927.28, 1087.56, 1444.73, 1527.16, 1614.16, 1740.09, 2053.77, 2273.57. As there are 12 data points, an even number, the median is calculated as the average of the sixth and seventh values in the ordered dataset, 1087.56 m³ and 1444.73 m³. The resulting median value is 1266.15 m³.

Unlike the mean, which is 1260.997 m³, the median is less influenced by months with extremely high or low rainwater harvesting potential. This makes the median a more robust indicator of a "typical" month's potential, particularly when extreme values are present. The similarity between the median and mean values suggests a relatively balanced distribution of rainwater harvesting potential across the months. This balance is indicative of moderate variability in monthly rainfall, making it feasible to design rainwater harvesting systems that can accommodate the observed trends without extensive adjustments for extreme months.

The standard deviation quantifies the dispersion or variability of data points around the mean, providing insight into the degree of fluctuation in rainwater harvesting (RWH) potential across different months. Based on the data provided in Table 4, the standard deviation of monthly RWH potential is calculated as 573.62 m³. This value indicates the average deviation of monthly RWH potential from the mean value, which is 1260.997 m³.

A higher standard deviation, like the one observed here, suggests significant variability in monthly rainwater harvesting potential. For instance, while some months, such as July (515.16 m³), exhibit low harvesting potential, others, such as December (2273.57 m³), show considerably higher potential. This variability necessitates the implementation of flexible rainwater harvesting system designs that can accommodate fluctuations, such as storage tanks with sufficient capacity for high-rainfall months and contingency measures for low-rainfall periods.

Conversely, a lower standard deviation would indicate more consistent RWH potential, making system design and management simpler. However, in this case, the observed variability underscores the importance of incorporating robust planning strategies to ensure the system can handle periods of extreme deviations effectively, ensuring both efficiency and sustainability. Obtaining the standard deviation can easily be done by performing the Eq. (3).

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2} \quad (3)$$

Where:

σ is the standard deviation

μ is the mean

x_i is the individual value

n is the number of values

The range is a measure of the spread in a dataset, calculated as the difference between the maximum and minimum values. This simple yet powerful metric highlights the total variation within a dataset. In the context of rainwater harvesting, the range indicates the disparity between the months with the highest and lowest rainfall. Such information is essential for determining the required storage capacity and developing effective usage strategies. In this study, the range spans from 515.16 m³ in July, the driest month, to 2273.57 m³ in December, the wettest month, as shown in Table 4. This significant variation emphasizes the need for adaptable storage solutions to accommodate fluctuations in rainwater harvesting potential throughout the year. Understanding the range allows for better anticipation and management of these fluctuations, ensuring the system's efficiency and reliability. Expression of the range is given in Eq. (4) below.

$$Range = x_{max} - x_{min} \quad (4)$$

Where:

x_{max} is the maximum value

x_{min} is the minimum value

Variance measures the average of the squared deviations from the mean, offering a numerical assessment of how far individual data points diverge from the mean value. Unlike standard deviation, which is expressed in the same units as the measured variable (e.g., m³), variance represents this dispersion in squared terms. Although slightly more abstract in interpretation, variance is a fundamental metric for understanding overall variability within a dataset and serves as the basis for numerous statistical analyses.

In the context of rainwater harvesting, a calculated variance of 369479.3 m⁶ (as derived from Table 4) reflects significant variability in potential across different months. This high variance indicates uneven rainfall distribution, with some months exhibiting harvesting potential far below or above the mean. Such variability underscores the need for flexible system

designs capable of adapting to inconsistent rainfall patterns. Recognizing and accounting for variance is vital for optimizing resource allocation, ensuring storage adequacy, and maintaining efficient water management throughout the year. The calculation of the variance is given by Eq. (5) below.

$$\sigma^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2 \quad (5)$$

Where:

σ^2 is the variance

μ is the mean

x_i is the individual value

n is the number of values

The coefficient of variation (CV) is another statistical measure, which is the ratio of the standard deviation to the mean, expressed as a percentage. It allows for a comparison of datasets with different means or scales by giving a relative measure of variability in terms of the mean. The CV for the rainwater harvesting potential data shown in Table 4 is about 45.52%, which is the standard deviation (573.58 m³) divided by the mean (1260.997 m³) expressed as a percentage. This is a relatively high CV and, hence, shows lots of variation in the potential for rainwater harvesting from month to month; therefore, it will be important to plan accordingly. Strategic techniques must be employed to manage the collection and use of the water in order to ensure continuous availability of the resource over the course of the year, given that the rainfall experienced during any given month can be a significant percentage of the total received within a particular year. In relation to rainwater harvesting, CV demonstrates the degree of variation in harvesting potential against the mean monthly potential. Meaning there is a large variation from month to month of rainwater harvesting potential (high CV), when indicated that there must be a systematic planning of balancing of water harvested and water consumed. By scheduling it that way, optimal management of resources is guaranteed all year long, regardless of rain levels fluctuating. The simple calculation of CV is given in Eq. (6) below.

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} \times 100 \quad (6)$$

Where:

σ is the standard deviation

μ is the mean

Skewness is a statistical measure that describes the asymmetry of a data distribution. A skewness value close to zero indicates a symmetrical distribution, while positive or negative

skewness reflects an imbalance. Understanding skewness is essential for interpreting the central tendency and distribution of a dataset.

In the context of rainwater harvesting potential, a positive skewness value of 0.55, as calculated from Table 4, indicates a slightly right-skewed distribution. This suggests that certain months, such as December (2273.57 m³) and January (2053.77 m³), exhibit exceptionally high harvesting potential compared to the overall average. Conversely, months with lower-than-average potential, such as July (515.16 m³) and August (563.24 m³), contribute less to the distribution's tail.

Recognizing this positive skewness highlights the need for planning strategies that account for peak harvesting periods while managing resources effectively during lower-potential months. Such insights help optimize water storage and usage throughout the year, ensuring sustainable water management practices. Skewness parameter can be obtained by the Eq. (7) given below.

$$Skewness = \frac{n}{(n-1)(n-2)} \sum_{i=1}^n \left(\frac{x_i - \mu}{\sigma} \right)^3 \quad (7)$$

Where:

n is the number of values

μ is the mean

σ is the standard deviation

x_i is the individual value

Kurtosis is a statistical measure that characterizes the "tailedness" of a data distribution, reflecting the extent to which extreme values occur compared to a normal distribution. A high kurtosis value indicates the presence of more outliers or data points that significantly deviate from the mean, while a low kurtosis suggests a distribution with lighter tails and fewer extremes.

For rainwater harvesting potential, the calculated kurtosis value of -0.69 from Table 4 reveals a slightly platykurtic distribution. This suggests that extreme values, such as the highest potential in December (2273.57 m³) and the lowest in July (515.16 m³), occur less frequently than expected in a typical distribution. The relatively low kurtosis value implies that most monthly harvesting potentials are closer to the mean, with fewer drastic deviations.

Understanding kurtosis helps in preparing for unexpected rainfall events by identifying the likelihood of extreme months. While this study shows limited occurrence of such extremes, planning for peak and trough periods remains essential to ensure resource availability and

sustainable water management throughout the year. Kurtosis parameter can be obtained by following the Eq. (8) below.

$$Kurtosis = \frac{n(n+1)}{(n-1)(n-2)(n-3)} \sum_{i=1}^n \left(\frac{x_i - \mu}{\sigma} \right)^4 - \frac{3(n-1)^2}{(n-2)(n-3)} \quad (8)$$

Where:

n is the number of values

μ is the mean

σ is the standard deviation

x_i is the individual value

Table 5 presents the descriptive statistics for the rainwater harvesting potential data.

Table 5. Descriptive statistics for the rainwater harvesting potential of the hospital

Statistic	Value
Mean	1261.00 m ³
Median	1206.63 m ³
Standard Deviation	586.94 m ³
Variance	344509.43 m ⁶
Range	1758.41 m ³
Minimum	515.16 m ³
Max	2273.57 m ³
Coefficient of Variation	46.54 %
Skewness	0.76
Kurtosis	-1.14

Assuming a water consumption rate of 600 liters per bed per day as previously stated, the daily water demand for Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Emergency Hospital, a 1,000-bed facility, is 600 cubic meters per day, calculated from a water consumption rate of 600 liters per bed per day. The percentage of water consumption compensated by the rainwater harvesting potential for each month is presented in Table 6.

Table 6. Compensation percentages

Months	RWH Potential (m ³)	Water Consumption (m ³)	Percentage (%)
January	2053.77	18600	11.04
February	1614.16	18600	9.61
March	1444.73	18600	7.77
April	1087.56	18600	6.04
May	746.4	18600	4.01
June	638.79	18600	3.55
July	515.16	18600	2.77
August	563.24	18600	3.03
September	927.28	18600	5.15
October	1527.16	18600	8.21
November	1740.09	18600	9.67
December	2273.57	18600	12.22

In Figure 16 below, the monthly rainwater harvesting (RWH) potential is presented using a line graph. The graph highlights the variability in RWH potential throughout the year, with the highest values observed in December (2273.57 m³) and January (2053.77 m³), and the lowest in July (515.16 m³). This seasonal fluctuation corresponds to regional rainfall patterns, emphasizing the importance of storage capacity for peak months to offset shortages during drier periods.

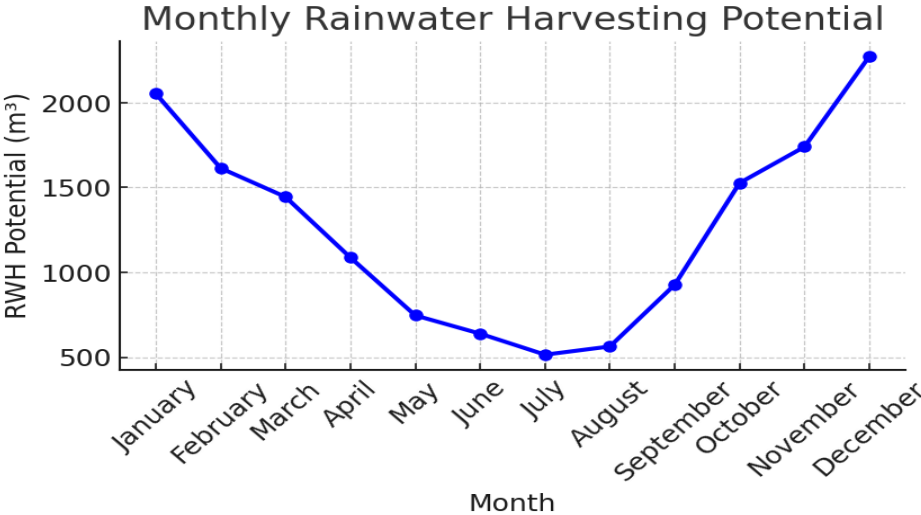


Figure 16. The monthly rwh potential

In Figure 17 below, the monthly RWH potential is compared to the hospital’s total water consumption. A bar chart represents the consistent monthly water consumption (18600 m³), while the overlaid line graph depicts the RWH potential. The comparison highlights that RWH can meet a maximum of 12.22% of the hospital’s water demand in December and a minimum of 2.77% in July. This visualization underscores the contribution of RWH to water savings and its limitations during dry months.

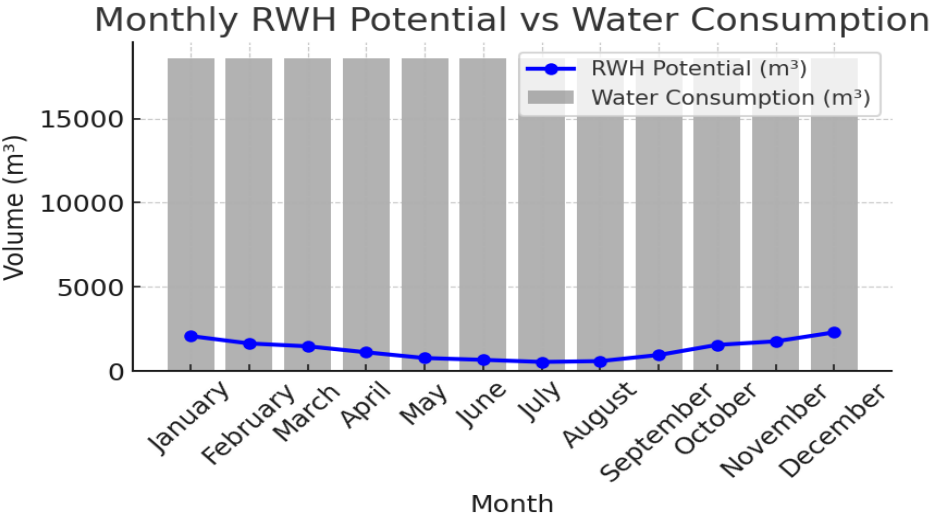


Figure 17. The comparison of monthly rwh potential and water consumption

In Figure 18 below, a bar chart displays the percentage of the hospital’s water consumption covered by RWH each month. The highest coverage occurs in December (12.22%) and January (11.04%), while the lowest is in July (2.77%). This chart effectively illustrates the seasonal dependence of RWH and reinforces the importance of integrating storage and supplementary water sources to maintain supply continuity throughout the year.

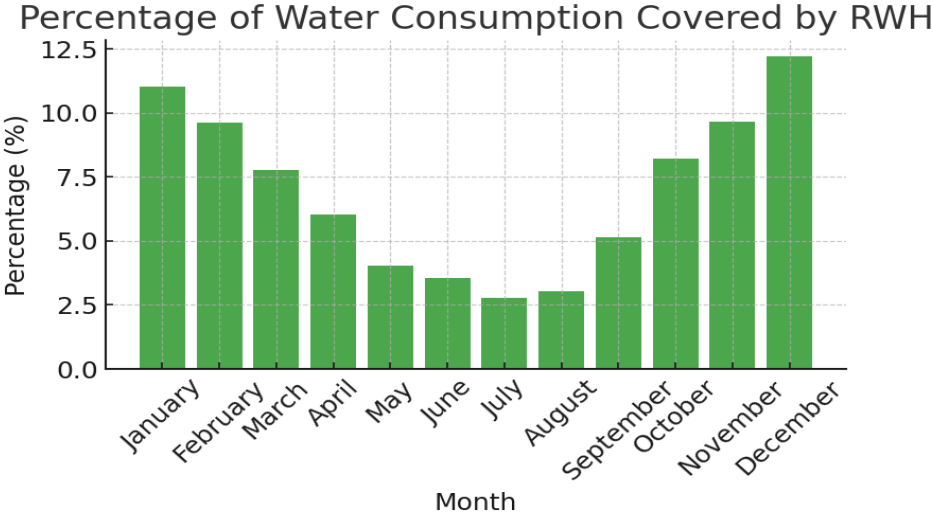


Figure 18. The percentage of water consumption covered by rwh

A cost-benefit analysis was conducted using insights from Lade and Oloke (2017), who reported that a 12 m³ tank system covered 78.1% of the water demand at the University College Hospital, Ibadan, resulting in \$51.072 in savings over 50 years with a one-year payback period. Applying this context to the RWH potential at Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Hospital, the projected water savings, particularly in peak months such as December (2273.57 m³) and January (2053.77 m³), demonstrate the potential for significant cost savings. While site-specific installation costs and operational expenses may differ, this case highlights the economic viability of RWH systems in healthcare facilities. A detailed cost analysis based on local construction and maintenance costs is recommended for future research to refine the payback period and return on investment.

Currently, this study focuses on RWH potential based on satellite-derived roof area and average monthly water consumption. Although no direct comparison with other healthcare facilities was performed, future research should validate these results by comparing them with findings from similar studies. Such comparisons will help contextualize the estimated RWH potential and its contribution to water savings in healthcare settings.

Conclusion

This study assessed the RWH potential of Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Emergency Hospital using a simplified analytical framework that incorporated satellite imagery, regional precipitation data, and assumptions regarding roof material and geometry. Although conservative assumptions, like considering slanted rooftops as flat planes, were used, the results demonstrate the large utility of RWH in emergency medical centers.

The analysis showed that the mean monthly RWH potential was 1261.00 m³, and the month of December had the greatest harvesting potential at 2273.57 m³, followed by January at 2053.77 m³. July, on the other hand, had a minimum potential of 515.16 m³, highlighting great seasonal changes. This discrepancy of 1758.41 meters cubed between the top and bottom months reveals the necessity for flexible storage and water distribution systems to distribute water throughout the year uniformly. The statistical analyses also confirmed these results. The standard deviation is 586.94 m³ and the CV is 46.54%, again showing marked variability from month to month in rainfall patterns. A positive skewness of 0.50 means that although some months receive moderate rain, there are some that receive very high amounts of precipitation, and every excess drop can be saved as rainwater. On the other hand, with a kurtosis of -1.36, this result shows that it is a rather flat distribution without major extreme cases, which means that RWH systems will be able to work well year-round.

RWH comprises as little as 2.77% to as much as 12.22% of the monthly water usage of the hospital, yet the importance of RWH exceeds these values. I was looking at sustainable water management terms, they are only four little dollars, but they are also thousands of cubic meters of water every year. These savings help lessen the burdens placed on municipal water systems, especially in areas with water shortages.

RWH systems are particularly important in critical times, like in case of droughts or silences of municipal water supply, where each liter of harvested water plays a vital role in maintaining hospital operations. For places such as emergency healthcare facilities, where constant water supply is essential, RWH offers a higher level of reliability.

Furthermore, RWH drives the promulgation of other sustainable practices in healthcare. Awareness is brought up, reliance on water from other areas is decreased, and more water management is incorporated. And then as infrastructure matures, as your system multiplies and other systems grow around it, the role of RWH increases with time, especially with the inclusion of other supplicant facets (such as gray water reuse or simple water-economizing technology).

Overall, this study emphasizes that the benefit of RWH is not only in the direct water savings realized immediately, but also in the potential long-term benefits of decreasing the

dependence on outside supplies, increasing water security, and increasing sustainability in vital healthcare facilities. Future studies should perfect this by revealing the roof measurements, the type of materials present, and more mobile forms of rainfall. The study seeks to promote the implementation of RWH systems in healthcare infrastructure by illustrating their feasibility and advantages, contributing to sustainable water resource management.

Conflict of Interest Statement

The author of the article declares that there is no conflict of interest.

Contribution Statement Summary

The author declares sole responsibility for the entirety of the article.

References

Central Public Health and Environmental Engineering Organisation (CPHEEO)., 1999. Manual on water supply and treatment. Third Edition – Revised and Updated. Ministry of Urban Development, New Delhi, India. Retrieved from https://jalshakti-ddws.gov.in/sites/default/files/Manual_on_Water_Supply_and_Treatment_CPHEEO_MoUD_1999.pdf on 21 January 2025.

Das DB., 2019. A case study of rainwater harvesting: Its design, factors affecting, and cost installation of AIIMS hospital, Raipur. Factors Affecting and Cost Installation of AIIMS Hospital, Raipur, 1: 30 January 2019.

Farreny R, Morales-Pinzón T, Guisasola A, Tayà C, Rieradevall J, Gabarrell X., 2011. Roof selection for rainwater harvesting: Quantity and quality assessments in Spain. *Water Research*, 45(10): 3245-3254.

Fulton LV., 2018. A simulation of rainwater harvesting design and demand-side controls for large hospitals. *Sustainability*, 10(5): 1659.

Kanno GG, Lagiso ZA, Abate ZG, Areba AS, Gondol BN, Temesgen H, Aregu MB., 2021. Estimation of rainwater harvesting potential for emergency water demand in the era of COVID-19: The case of Dilla town, Southern Ethiopia. *Environmental Challenges*, 3: 100077.

Lade O, Oloke D., 2017. Performance evaluation of a rainwater harvesting system: A case study of University College Hospital, Ibadan City, Nigeria. *Current Applied Science and Technology*, 25: 1-14.

Lee H, Son TH, Dzung DA, Lee J, Han M, Anh NV., 2021. Enhancing the resilience of the rainwater for drinking (RFD) system through systematic monitoring: A case study at the Ly

Nhan rural hospital in Vietnam. *Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development*, 11(6): 1048-1061.

Ministry of Health., 2020. Yeşilköy Acil Durum Hastanesi Hizmete Açıldı. Retrieved from <https://www.saglik.gov.tr/TR%2C65789/yesilkoy-acil-durum-hastanesi-hizmete-acildi.html> on 21 January 2025.

Müftüoğlu TD., 2024. Evaluating rainwater harvesting potential of concrete and tile roofings for detached houses in Aydın, Turkey. *Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(3): 1096-1115.

Nasif MS, Kumar AGA, Roslan R., 2016. An effective optimization of rainwater harvesting system in hotel and hospital buildings. *Journal of Water Resources Planning and Management*, 142(6): 04016039.

Scottish Health Technical Memorandum. Water safety and water quality in healthcare premises. NHS Scotland. Retrieved from <https://www.nss.nhs.scot/media/1790/shtm-04-02-part-c-v10-jul-2015.pdf> on 21 January 2025.

Teksoy A, Altan K., 2022. Assessment of sustainable water management in public hospitals: The case of Turkey. *Environmental Engineering and Management Journal (EEMJ)*, 21(11): 1751.

U.S. Environmental Protection Agency., 2012. DataTrends: Water use tracking. ENERGY STAR Portfolio Manager. Retrieved from https://www.energystar.gov/sites/default/files/buildings/tools/DataTrends_Water_20121002.pdf on 21 January 2025.

U.S. Environmental Protection Agency., 2012. WaterSense at work: Best management practices for commercial and institutional facilities. Retrieved from <https://www.epa.gov/watersense> on 21 January 2025.

Water UK., 2009. Sustainability and water use in healthcare facilities. Retrieved from <https://www.water.org.uk> on 21 January 2025.

Wikipedia., 2020. Yeşilköy Prof. Dr. Murat Dilmener Emergency Hospital. Retrieved from https://en.wikipedia.org/wiki/Ye%C5%9Filik%C3%B6y_Prof._Dr._Murat_Dilmener_Emergency_Hospital on 21 January 2025.

Otomotiv Sektöründe İç Trim Üreticisi Olan İşletmede Simülasyon ve Yamazumi Uygulaması

İrem DÜZDAR^{1*}, Senanur ÇELİK²

¹Düzce Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Endüstri Mühendisliği Bölümü, Düzce

²Düzce Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Düzce

¹<https://orcid.org/0000-0002-7642-8121>

²<https://orcid.org/0000-0001-7683-0025>

*Sorumlu yazar: iremduzdar@gmail.com

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi:

Geliş tarihi: 09.09.2024

Kabul tarihi: 25.02.2025

Online Yayınlanma: 17.03.2025

Anahtar Kelimeler:

Simülasyon

Arena

Yalın üretim

Yamazumi

Hat dengeleme

ÖZ

Otomotiv sektörü ülkemizde, ekonomiye katkı sağlamış ve endüstriye öncülük eden sektörlerden biri olmuştur. Hat dengeleme, operatör ve makinelerin iş doluluklarını ve kapasitelerini ölçmede, birden çok operatörün bulunduğu istasyonda işgücünü eşit kullanmakta fayda sağlamıştır. Araştırmada amaç; pilot hat seçilerek üretim hattının bütün olarak incelenmesi, müşteri talebine göre israfların ortadan kaldırılarak üretim yapılması olmuştur. Otomotiv endüstrisinde iç trim parçaları üretimi yapan işletmenin üretim hattında simülasyon çalışması yapılarak mevcut durum analiz edilmiş, operatör iş dolulukları için Yamazumi grafiği ile iyileştirme çalışması yapılmış ve yalın üretim prensipleriyle mevcut durumda sürekli iyileştirme amaçlanmıştır. Arena yazılım programı kullanılarak hattın simülasyonu sağlanmış, mevcut üretim süreci raporlarla analiz edilmiştir. Simülasyon analiz edildikten sonra hat dengeleme çalışması için Yamazumi grafiği kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda pilot hat seçilerek veri analizi yapılmış, Arena yazılım programında model oluşturularak analiz edilen veriler modele aktarılmıştır. Model çalıştırılıp rapor incelendikten sonra iyileştirme aksiyonları belirlenmiştir. Yamazumi grafiği ile operatörlerin iş takibi yapılmış, yalın üretim teknikleri ile aksiyon planı hazırlanmıştır. Planlanan iyileştirmeler sonrası gelecek durum modeli oluşturulmuş, gelecek durum modeli ile mevcut durum modelinin raporları karşılaştırıldıktan sonra uygulama planı takip listesi hazırlanmıştır. Çalışma sonucunda maliyette 15.761₺ iyileştirme sağlanmıştır.

Simulation and Yamazumi Application in an Interior Trim Manufacturer in the Automotive Sector

Research Article

Article History:

Received: 09.09.2024

Accepted: 25.02.2025

Available online: 17.03.2025

Keywords:

Simulation

Arena

Lean manufacturing

Yamazumi

ABSTRACT

The automotive sector in our country has contributed to the economy and has become one of the leading industries. Line balancing has been beneficial in measuring the workload and capacity of operators and machines, as well as in utilizing the workforce equally in stations where multiple operators are present. The aim of the research was to examine the production line by selecting a pilot line and to eliminate waste according to customer demand while ensuring efficient production. A simulation study was conducted on the production line of a company manufacturing interior trim parts for the automotive industry, analyzing

the current state. Improvement efforts were carried out using the Yamazumi chart for operator workload, and continuous improvement was targeted through lean manufacturing principles. The Arena software program was used to simulate the line, allowing the current production process to be analyzed through reports. After the simulation was analyzed, the Yamazumi chart was used for line balancing. In this context, a pilot line was selected, and data analysis was conducted. A model was created in the Arena software, and the analyzed data was transferred to the model. The model was executed, and after reviewing the report, improvement actions were determined. Operators work tracking was carried out using the Yamazumi chart, and an action plan was prepared using lean manufacturing techniques. After the planned improvements were implemented, a future state model was created. The reports of the future state model were compared with those of the current state model, and an implementation plan follow-up list was prepared. As a result of the study, a cost improvement of 15,761₺ was achieved.

To Cite: Düzdar İ, Çelik S., 2025. Otomotiv sektöründe iç trim üreticisi olan işletmede simülasyon ve yamazumi uygulaması. Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi Dergisi, 5(1): 173-191.

Giriş

Otomotiv sektörü ülkemizin ekonomisine, istihdamına, vergi gelirlerine vb. katkı sağlamaktadır. Gelişmiş teknolojilerin ülkemize girişinin öncüsü de otomotiv sektörüdür. Otomotiv sektörü, Avrupa’da doğmuş, Japonya’nın başarısı ile de önemli bir konuma gelmiştir. Otomotiv endüstrisinde iç trim parçaları üretimi yapan işletmenin üretim hattında simülasyon çalışması yaparak mevcut durumun analiz edilmesi, operatör iş dolulukları için yamazumi diyagramı ile iyileştirme çalışması yapılması ve yalın üretim prensipleriyle mevcut durumda sürekli iyileştirme amaçlanmaktadır.

Süreçte sürekli iyileştirme yapmak için mevcut durum analizi yapılarak yürürlükte olan sistemin detaylı bir şekilde raporlanması gerekmektedir. Mevcut durum raporları incelenirken kaynak kullanım oranları, darboğazların belirlenmesi ve oluşabilecek sorunların önceden gözlemlenebilmesi avantajı simülasyon ile sağlanmaktadır. Girdi verileri, operasyonel süreçlerin analizi ve iş etüdü yapılarak elde edilmektedir (Sağlamcı ve Aslan, 2022).

Üretim adetlerinin yüksek olduğu işletmeler hat dengeleme problemleri nedeniyle verimsizlik yaşamakta ve büyük kayıplar vermektedir. Oluşan problemler üretimde aksama, kalitesizlik, darboğaz oluşumu ve verimsizlik gibi istenmeyen sonuçlar yaratmaktadır (Kuğu ve ark., 2023).

Kuğu ve ark. (2023), çalışmalarında beyaz eşya sektöründe üretim yapan firmanın kondenser üretim hattında Arena uygulamasıyla hat dengeleme yapmışlardır. İşletmelerde verimsizlikler yüksek kayıplara neden olmaktadır. Hat dengeleme problemleri büyük bir kısmı oluşturmaktadır. Hat akışı ve hat yerleşimi değiştirilmeden Arena simülasyon programında mevcut ve gelecek durum simüle edilmiştir. Çevrim sürelerinde %28,5 iyileştirme sağlanmıştır.

Her iki çalışma da verimlilik artırmayı amaçlamaktadır, ancak bu çalışmada, operatör bazında daha detaylı bir analiz yaparak iş yüklerinin dengelenmesine odaklanmıştır.

Sağlamcı ve Aslan (2022), tekstil işletmesinde en çok üretilen ürünün aşamalarını Arena simülasyon yöntemiyle geliştirmişlerdir. Simülasyon, uzun dönemli karlılığı analiz edebilmek amacıyla 107 kez çalıştırılmıştır. Girdi verileri oluşturulurken, iş etüdü çalışması yapılmıştır. Animasyon oluşturulmuş olup bu yöntemle de doğrulama ve geçeleme yapılmıştır. Çalışma sonucunda darboğaz kaynaklar beslenmiştir. Gelecek durum senaryosunda, işletme 5 işçi daha az çalıştırmış ancak çıktısını %41 oranında arttırmıştır. Her iki çalışma da üretim verimliliğini artırmayı hedeflese de, farklı sektörlerdeki spesifik ihtiyaçlara odaklanılmıştır.

Masood (2006), üretim hattında yapılan hat dengeleme sonucunda çevrim süresini azaltmak ve makine kullanımını arttırmayı hedeflemektedir. Transfer hattında kritik istasyonlar belirlenmiştir. Simul8 yazılımını kullanılarak yapılan iyileştirme çalışmasında üretim kapasitesinde artış beklenmektedir. Yapılan çalışma sonucunda çevrim süresi %32 azalmıştır ve verim %65 oranında artmıştır. Araştırmada makine kullanımının arttırılmasına yönelirken bu çalışmada daha fazla insana yönelik analizler yapılmış ve operatör bazında daha fazla detay verilerek iş gücü verimliliği daha kapsamlı bir şekilde ele alınmıştır.

Bilget (2015), konfeksiyon üretim hatlarında simülasyon çalışması yaparak yalın üretim sistemlerini incelemiştir. Üç farklı ürünün üretim süreçleri analiz edilmiştir. Modelin geçerlemesi istatistiksel olarak günlük üretim adedi ile kontrol edilmiştir. Simülasyon ile hat dengelemesi yapıp algoritma geliştirilmiştir. “Kalp Algoritması” tüm modellere uygulanmış olup üretim kapasitesinin artmasını sağlamıştır.

Koçanalı (2009), televizyon üretimi yapan bir işletmede hat dengelemesi çalışması gerçekleştirmiştir. Hazırlık süreleri çalışmada baz alınmıştır. İstasyon ve iş atamaları arasında öncelik ilişkisi kurulmuştur. Mevcut sistem üzerinde dört uygulama gerçekleştirilmiş olup en uygun model araştırılmıştır. Koçanalı'nın yaklaşımı, daha çok hazırlık sürelerine odaklanırken, bu çalışmada operatör verimliliği ve çevrim sürelerinin simülasyonla iyileştirilmesi ön plandadır.

Özkıran ve Düşünür (2011), çalışmada darboğazların iyileştirilmesi üzerine araştırma yapmışlardır. Fren montaj hattında analiz yapılmıştır. Simülasyon modeli ile mevcut durum analiz edilerek sistemde değişiklikler önerilmiştir. İş adımlarının sıralamasında değişiklik mümkün değildir. İşlemlerde bir akış oluşması gerekmektedir. Çalışma sonucunda sistemde öneriler sunulmuştur.

Qattawi ve ark., (2019), çalışmada otomotiv sektöründe montaj hatlarının tasarımında yöntem geliştirmektedir. Mevcut durumdaki montaj hattının yeniden tasarlanmasına yönelik

araştırmada, kümeleme algoritması ve görev karşılıklık endeksi geliştirilmiştir. Mevcut ve gelecek durum, niceliksel performans parametreleri ve iş akış şeması kullanılarak açıklanmıştır. Yeni oluşturulan tasarımla beraber montaj süresinde iyileştirme sağlanmıştır. Qattawi ve ark., (2019) çalışmasında kümeleme algoritması ile montaj hattı yeniden tasarlanmış ve süreçte iyileştirme sağlanmıştır. Bu çalışmada ise, yalın üretim ve simülasyon teknikleriyle operatör doluluk oranları minimize edilmiştir. Her iki çalışma da montaj hattı verimliliğini artırmaya yönelik olsa da farklı teknikler ve yöntemlerle iyileştirme sağlamaktadır.

Tüm bu literatüre göre, bu çalışmada yapılan uygulama ile sürecin durumu simülasyon programında analiz edilerek iş yükü, alan, parça kalitesi gibi birçok alanda iyileştirme imkânı sunulmaktadır. Bu çalışmada simülasyon, yalın üretim teknikleri ve yamazumi diyagramı kullanılmıştır.

Bu çalışma, üretim süreçlerinin iyileştirilmesi amacıyla simülasyon, Yamazumi analizi ve yalın üretim tekniklerinin entegre edilmesini içeren kapsamlı bir yaklaşım sunmaktadır. Üretim hatlarında darboğazların tespiti, operatör doluluk oranlarının dengelenmesi ve çevrim sürelerinin minimize edilmesi amacıyla gerçekleştirilen analizler, üretim verimliliğini artırmaya yönelik önemli bulgular sağlamaktadır.

Simülasyon yöntemi sayesinde, sistemdeki darboğazlar tespit edilerek, üretim süreçlerine yönelik iyileştirme önerileri geliştirilmiştir. Yamazumi grafiği kullanılarak operatörlerin iş yükleri dengelenmiş ve gereksiz zaman kayıpları ortadan kaldırılarak süreçlerin daha etkin bir şekilde yönetilmesi sağlanmıştır. Çalışma sonucunda, üretim hattında operatör sayısının iyileştirilmesiyle maliyetlerin düşürülebileceği ve üretim kapasitesinin artırılacağı gösterilmiştir.

Bu bağlamda, araştırma literatüre üç temel katkı sunmaktadır:

1. **Üretim ve Süreç Verimliliği:** Simülasyon ve Yamazumi grafiği kullanımıyla üretim hatlarının dengelenmesi ve darboğazların azaltılması konusunda pratik bir yöntem sunulmuştur.
2. **Kaynak Yönetimi ve Maliyet Analizi:** Operatör sayısının iyileştirilmesi ve iş akışının daha verimli hale getirilmesiyle maliyet avantajı sağlanabileceği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma, üretim süreçlerinin simülasyon destekli analizi ile yalın üretim ilkelerinin daha etkin bir şekilde uygulanmasına katkı sağlamakta ve üretim yönetimi alanında yeni bir perspektif sunmaktadır.

Bu çalışma, literatürde eksik kalan bazı noktaları tamamlayarak üretim süreçlerinin iyileştirilmesine yönelik yeni bir bakış açısı sunmaktadır. Literatürdeki çalışmalar genellikle simülasyon veya yalın üretim tekniklerinden birini ele alırken, bu araştırma simülasyon,

Yamazumi analizi ve yalın üretimi birlikte kullanarak daha kapsamlı bir değerlendirme yapmaktadır.

Çalışmanın literatürdeki eksiklikleri tamamlayan başlıca katkıları şunlardır:

1. **Simülasyon ve Yamazumi Analizinin Entegrasyonu:** Literatürde simülasyon ve Yamazumi analizi çoğunlukla birbirinden bağımsız incelenmiştir. Bu çalışmada ise simülasyon aracılığıyla darboğazların belirlenmesi ve Yamazumi grafiğiyle operatör iş yüklerinin dengelenmesi bir arada ele alınarak sistematik bir süreç iyileştirme yöntemi sunulmuştur.
2. **Operatör Verimliliği ve Hat Dengeleme Üzerine Etkili Bir Yaklaşım:** Literatürde operatör verimliliği genellikle üretim adetleri veya genel zaman kayıpları üzerinden analiz edilmektedir. Bu çalışmada ise operatör bazında iş yükü dağılımı detaylı olarak ele alınmış ve Yamazumi diyagramı ile dengelenerek süreç iyileştirilmiştir.
3. **Maliyet Verimliliği ve Kaynak Yönetimi:** Simülasyon kullanılarak operatör sayısının nasıl iyileştirilebileceği, maliyetlerin nasıl düşürülebileceği ve üretim verimliliğinin nasıl artırılabilirliği somut verilerle ortaya konmuştur. Literatürde genellikle yalın üretim teknikleriyle ilgili teorik çerçeve sunulurken, bu çalışma gerçek bir üretim ortamında uygulanabilir bir model sunarak eksikliği gidermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma literatürde eksik kalan noktalara yönelik kapsamlı bir çözüm sunarak simülasyon destekli yalın üretim sistemlerinin daha verimli kullanılmasına yönelik önemli bir katkı sağlamaktadır.

Çalışmamızın birinci bölümünde, konunun teorik çerçevesi ele alınarak temel kavramlar ve literatürdeki ilgili çalışmalar incelenmiştir. İkinci bölümde, araştırmanın yöntemi detaylandırılmış; veri toplama süreçleri, analiz yöntemleri ve örneklem hakkında bilgi verilmiştir. Üçüncü bölümde, elde edilen bulgular sunulmuş ve analiz edilmiştir. Son olarak, dördüncü bölümde araştırmanın sonuçları tartışılmış, elde edilen bulgular ışığında değerlendirmeler yapılmış ve gelecekteki çalışmalar için önerilerde bulunulmuştur.

Materyal ve Yöntemler

Materyal

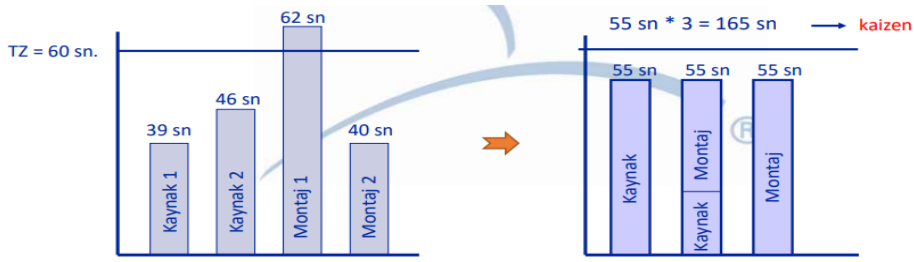
Araştırmada Yamazumi Grafiği, Simülasyon uygulamaları kullanılmıştır. Üretim tesisi araştırmada istasyonda iyileştirme ve geliştirme çalışması için tercih edilmiştir. Çalışmayla beraber tesisin verimliliğinin artırılması hedeflenmiştir.

Yöntem

Verimliliği arttırmak istenen üretim tesisi için pilot olarak seçilen üretim hattında zaman etüdü çalışması yapılarak veri seti hazırlanmıştır. Zaman etüdü ile veri hazırlama çalışması yapılırken; gün içi zaman aralıkları, performans vb. üretimi etkileyecek durumlar göz önüne alınarak çalışılmıştır.

Yamazumi Grafiği

Şekil 1’de Yamazumi grafiği örneği gösterilmiştir. İlk durumdaki grafikte montaj 1 hattının belirlenen takt zamanının üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu gözlem sonucunda ikinci durumda planlanan takt zamanı hatlarda eşit duruma getirilmiştir.



Şekil 1. Yamazumi grafiği örneği (Yalın Enstitü, 2020)

Prosesin bir döngüsünün tamamlandığı, adetlik ürün çıkardığı süre çevrim zamanı olarak tanımlanmaktadır. Operatörün işe başladığı ve işi bitirdiği süre olarak ifade edilmektedir. Hat dengeleme yöntemlerinden biri, Yamazumi çalışmasıdır. Her operatör için çevrim süreleri analiz edilerek grafik haline getirilir. Grafik ile takt zamanının aşımı incelenebilmektedir.

Ürünlerin takt zamanı, proses takt zamanına düşürülmelidir bunu sağlamak için aksiyon listesi hazırlanmalıdır. Yamazumi grafiğinde, proses içinde işlem gören tüm işlerin süresi alınmaktadır. Yamazumi analizi ile çevrim süresi azaltılır, israf ortadan kaldırılır, hat dengeleme yapılır. Grafik ile analiz eden kişinin kolay anlaması sağlanır (Kuğu ve ark., 2023).

Yamazumi grafiği çalışmada, operatör iş adımları takip edilerek belirlenen sürenin altında iş dağılımının yapılması üzerine çalışmada uygulanmıştır.

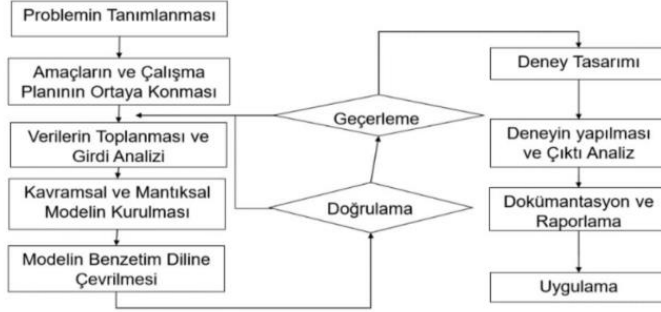
Simülasyon (Benzetim)

Çalışma, üretimde; materyal planlama sistemleri, seri üretim, stok, kontrol, güvenlik, bakım, fabrika düzeni ve makine tasarımını etkileyebilmektedir.

Simülasyon çalışması, sistemin takibini yapmak ve davranışsal durumları çözümleyebilmek, çözümlediği davranışlar için teori/hipotez kurgulayabilmek ve model

kullanarak gelecek durum hakkında bilgi olarak sistemde meydana gelen ya da gelebilecek değişiklikleri incelemek amacıyla yapılmaktadır.

Simülasyon, tasarım aşamasından seri üretimi takip eden tüm süreçlerde uygulanabilmektedir. Gerçek sürecin ya da planlanan sürecin analizinde raporlar sunarak uzman kişiye bilgi paylaşımı sağlamaktadır.



Şekil 2. Benzetim ve modelleme aşamaları (Tağman, 2021)

Şekil 2’de benzetim ve modelleme aşamalarının akış diyagramı görülmektedir. Problem tanımlanır ve probleme uygun amaçlar belirlenir. Amaçlar doğrultusunda veriler analiz edilir geçerleme adımı uygulanır, kavramsal ve mantıksal model oluşturulur. Model simülasyon programına aktarıldıktan sonra doğrulama ve geçerleme adımları gerçekleştirilir. Deney tasarımı yapılır, deneyin çıktıları analiz edilir. Raporlama yapılır ve uygulama aksiyonlarına geçilir. Çalışmada üretim hatlarına ait verilerin raporlarını incelemek için simülasyon uygulanmıştır.

Simülasyon, karmaşık sistemi raporlayabilmektedir. Sistemde planlanan değişiklikler simüle edilerek değişiklikler ve etkileri incelenebilir. Mevcut durumun simüle edilmesiyle elde edilen veriler sonucunda sürekli iyileştirme sağlanabilir. Girdi değişkenlerinin sanal ortamda düzenlenme kolaylığıyla fiziksel ortamda oluşabilecek aksiyonlar ve planlamalar incelenebilir. Analitik çözümde bilgi verici araç olarak kullanılıp, sonuçlar test edilebilir. Simülasyonla beraber fiziksel ortamda anlık değişikliğin zor olduğu durumlar simüle edilerek bilgi havuzu oluşturulabilir. Fiziksel değişiklik öncesi hataları analiz etmek için yardımcı olmaktadır. Simüle edilmiş modelde sistemin göstereceği performans hakkında fikir vermektedir.

Hat Dengeleme

Üretim hattında yapılan işlemler belirlenir. İş istasyonları ve operatörlerin mevcut iş yükü analiz edilir. Her istasyonda gerçekleştirilen faaliyetler için çevrim süreleri hesaplanır. Mevcut darboğazlar tespit edilir ve üretim sürecindeki verimsizlikler belirlenir. Operatörlerin iş adımları ve süreç süreleri ölçülerek veri seti oluşturulur. Zaman etüdü uygulanarak her işlemin

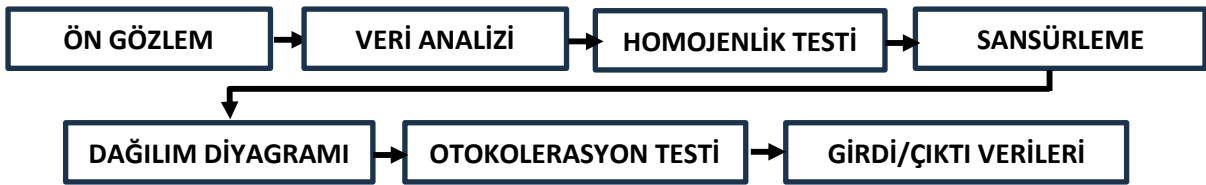
süresi belirlenir. Arena simülasyon programı kullanılarak mevcut üretim hattının simülasyonu oluşturulur. Simülasyon çıktıları analiz edilerek darboğaz noktaları belirlenir. Yamazumi grafiği kullanılarak operatörlerin iş yükleri görselleştirilir. İş adımları eşit dağıtılacak şekilde dengeleme çalışmaları yapılır. Hattın en verimli takt süresi belirlenir. İş istasyonları arasındaki operasyon süreleri dengelenerek verimsizlikler giderilir. Simülasyon sonuçlarına göre iş istasyonlarında düzenlemeler yapılır. Fazla yüklenen operatörlerden iş adımları diğer operatörlere aktarılır. Gereksiz iş adımları ve israflar ortadan kaldırılır. Operatör sayısı ve yerleşimi iyileştirilerek verimlilik artırılır. İyileştirilmiş hat yapısı simülasyon ortamında tekrar test edilir. Güncellenen çevrim süreleri ve iş dağılımı analiz edilerek performans değerlendirilir. Hat dengeleme çalışmasının getirdiği maliyet avantajları hesaplanır. İyileştirme planı üretim hattında uygulanır. Yeni sistemin performansı izlenerek gerekli düzeltmeler yapılır. Elde edilen veriler doğrultusunda sürekli iyileştirme sağlanır.

Araştırma Bulguları

Model kabulleri aşağıdaki gibidir:

- Model girdileri, gerçek sistem verileridir.
- Modelin çalışma süresinde duruşlar (makine arızası, bakım vb.) sisteme dahil edilmemiştir.
- İşletme günde 20 saat çalışmaktadır. İşletmede sürecin faydasını göstermek ve araştırma bilgilerini sunmak amaçlı Arena demo sistemi kullanıldığı için 1 saatlik gözlem yapılmıştır.

Veri Toplama aşağıdaki adımlar ile yapılmıştır.



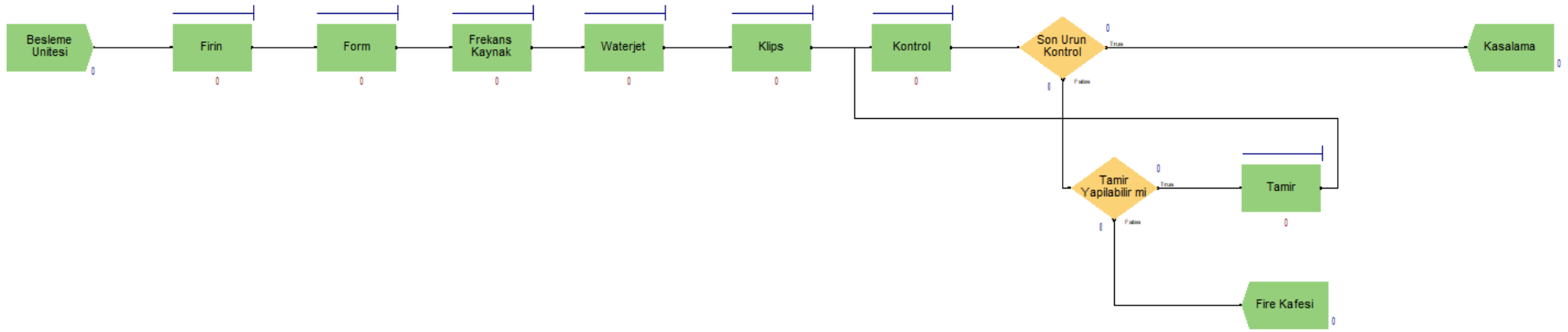
Şekil 3. Veri toplama adımları

Şekil 3’de verilen veri toplama adımlarında da bulunan ilk adım, ön gözlemdir. Gerçek veri toplamadan önce planlama yapılan aşamadır. Bu aşamada taslak oluşturulur ve formlar birkaç kez değiştirilebilir. Verilerin Analizi adımı, verilerin toplandıkça analiz ederek ihtiyaç duyulan dağılımı sağlayıp sağlamadığına emin olunması gerekir. Homojenlik Testinde homojen veri kümeleri birleştirmeye çalışılır ve homojenliği kontrol ederken, dağılımların denkliği test edilir. Sansürleme aşamasında analiz edilen olayın bütünüyle gözlemlenemediği olasılığının farkında olarak analiz yapılması gerekir. Dağılım Diyagramı, iki değişken arasında

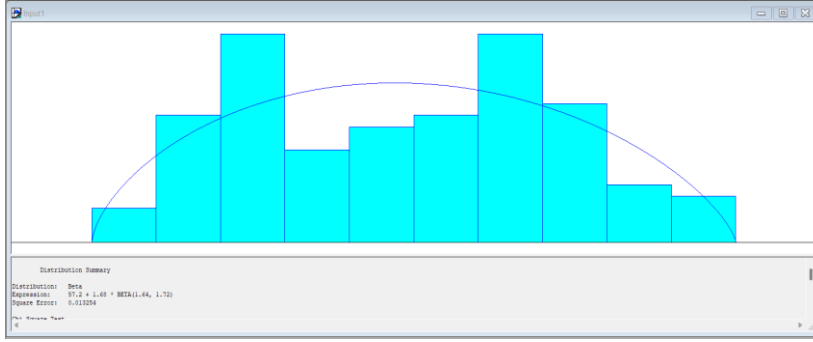
ilişki varlığını kontrol etmek için yapılır. Otokorelasyon testi yaparken, bağımsız gibi görünen dizinin otokorelasyona sahip olup olmadığının test edilmesi gerekir. Girdi ve çıktı verileri adımımda, girdi verileri, sistemi iyileştirmek için yapılan değişikliklerle değiştirilemeyecek olan belirsiz miktarı temsil eder. Çıktı verileri, sistemin performansını temsil eder.

Şekil 4’de Arena programında oluşturulan iş akış diyagramı verilmiştir. Ham madde besleme ünitesinden hat’a aktarılmaktadır. Besleme ünitesinde stoklanan ham madde vakum makinesi ile konveyör üzerine taşınmaktadır. Konveyöre taşınan ham madde termoplastik ürün olduğu için önce fırında ısıtılıp sonra formlama makinesinde şekil verilmektedir. Şekil verilen halıya fren ayak kısmının montajının yapılması için frekans kaynak makinesinde işlem yapılmaktadır. Waterjet makinesinde parçanın kesimi yapılmaktadır. Halıya koltuk montajlandığı bölgeye klips takmak için klips montaj ekipmanında parça işlem görmektedir. Tamamlanan ürün kontrol edilmektedir. Parçada kusur varsa tamir edilebilirse tamir edilir, tamir edilemezse fire kafesine ayrılmaktadır. Üründe hata yoksa kasaya konulmaktadır.

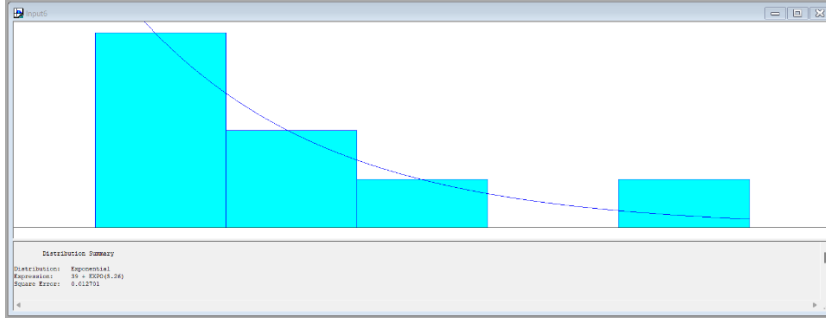
Arena modüllerinden create, process, decide ve dispose modülleri çalışmada kullanılmıştır. Create modülü ile ham maddenin üretime girişi gösterilmektedir. Process modülünde ham maddenin işlem gördüğü istasyonlar ifade edilmektedir.



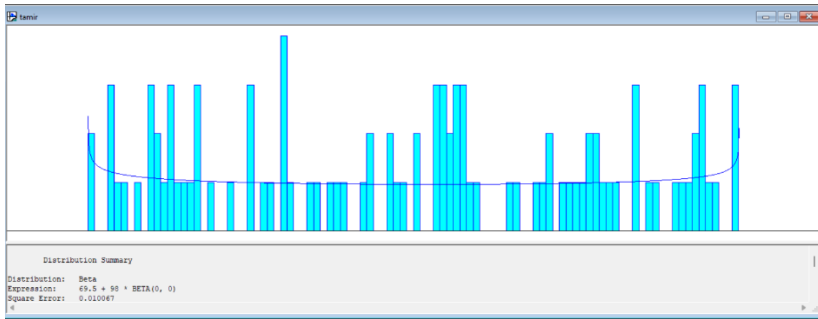
Şekil 4. Arena mevcut durum iş akış diyagramı



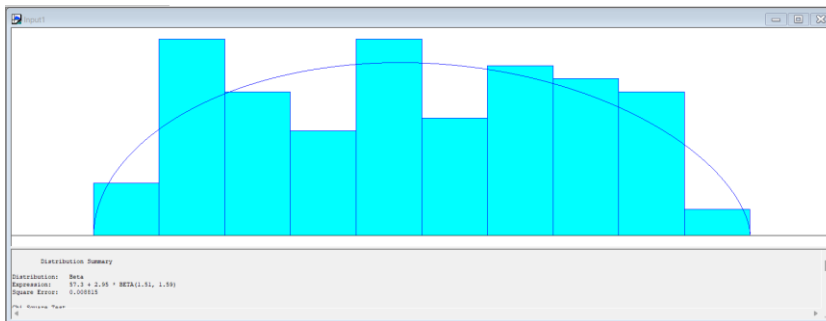
Şekil 5. Isıtcı Süreci Input Analyzer



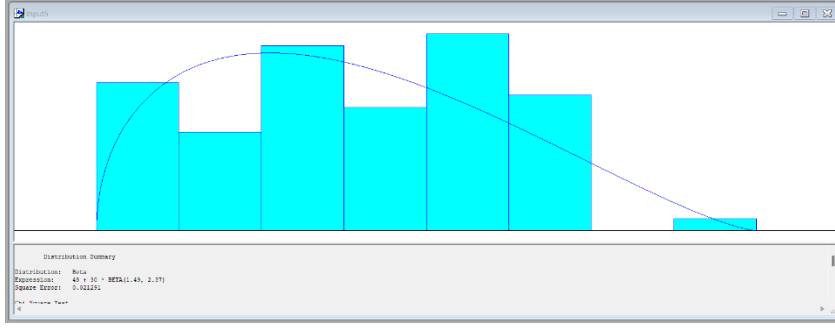
Şekil 6. Frekans Süreci Input Analyzer



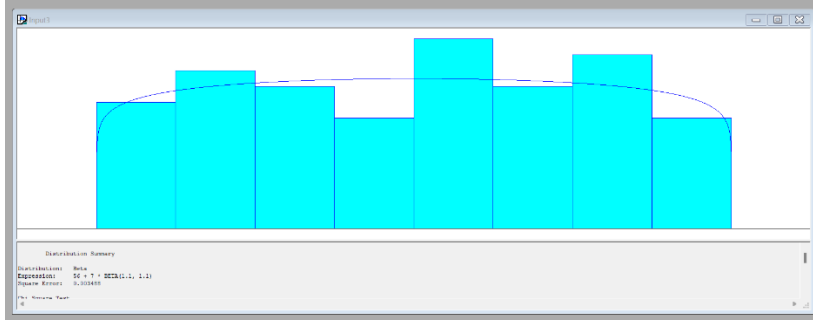
Şekil 7. Tamir Süreci Input Analyzer



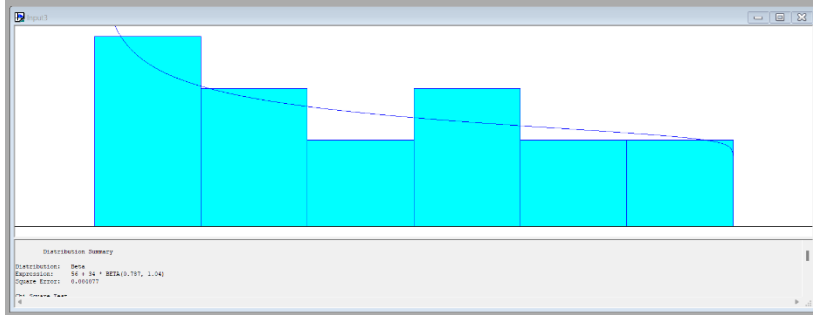
Şekil 8. Vakum Süreci Input Analyzer



Şekil 9. Waterjet Süreci Input Analyzer

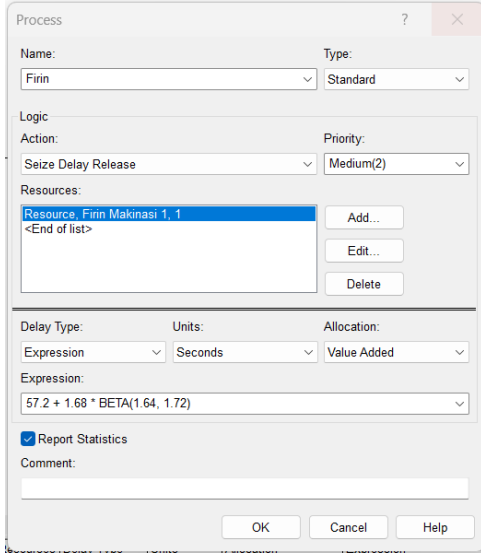


Şekil 10. Form Süreci Input Analyzer



Şekil 11. Frekans Süreci Input Analyzer

Process modülünün girdileri, fiziki olarak istasyondan tutmuş olduğumuz verilen Arena programında input analyzer ile dönüştürülmesiyle oluşmaktadır. Decide modülüyle, istasyonda yapılacak işleme karar verilmektedir. Dispose modülü, üretimin tamamlandığı aşamadır. Müşteriye sevk edilebilecek seviyede parçayı vermektedir.

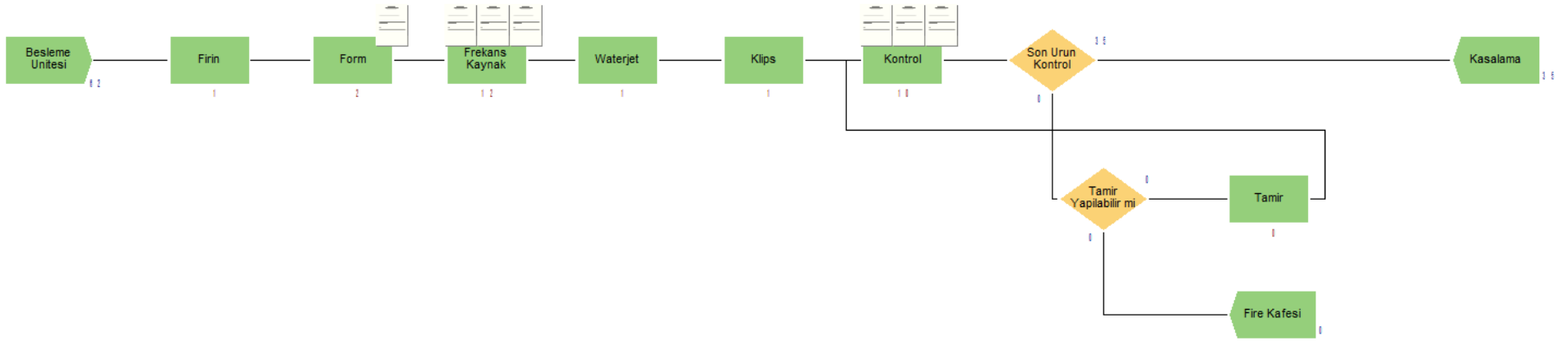


Şekil 12. Process Modülü

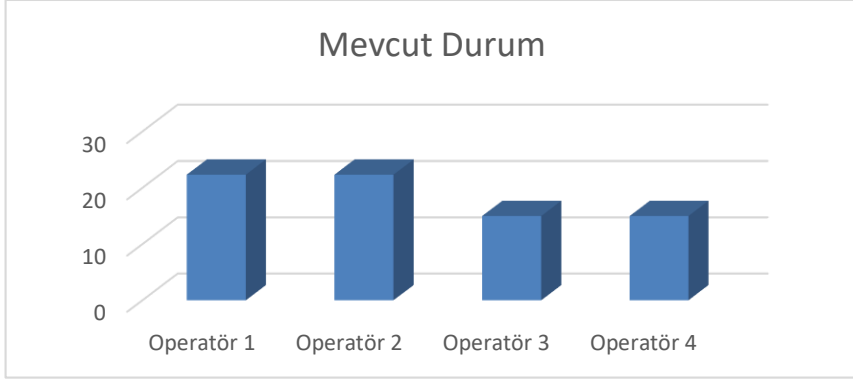
Şekil 12’ de yer alan process modülünde öncelikle istasyonun adı tanımlanmaktadır. İstasyonda kullanılan kaynaklar eklenmektedir. Şekil 12’de ifade edilen modülde fırın makinesi istasyona tanımlanmıştır. Expression değerlerin girildiği alanı ifade etmektedir. Seize, kaynağın meşgul edilmesini ifade etmektedir. Delay, işlem süresini ifade etmektedir. Release, işlem sürecinin tamamlanmasını ifade etmektedir. Programda bulunan Input Analyzer ile veriler işlenerek dağılım belirlenmektedir.

Şekil 13’de Arena çalıştırıldıktan sonraki durum gözlemlenmiştir. İşletme günde 20 saat çalışmaktadır. Programda 1 saatlik gözlem yapılmıştır ve 35 ürün üretilmiştir. Formlama, frekans kaynak ve kontrol proseslerinde dar boğaz gözlemlenmektedir.

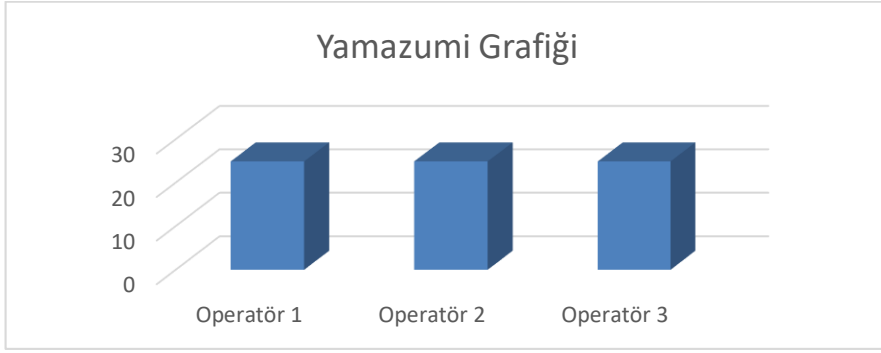
Şekil 14’de formlama hattında çalışan 4 operatörün dolulukları gösterilmiştir. Şekil 15’de yamazumi grafiği yardımıyla operatör doluluklarının eşitlenmesi hedeflenmektedir bu hedef doğrultusunda yapılan çalışmanın grafiği verilmiştir.



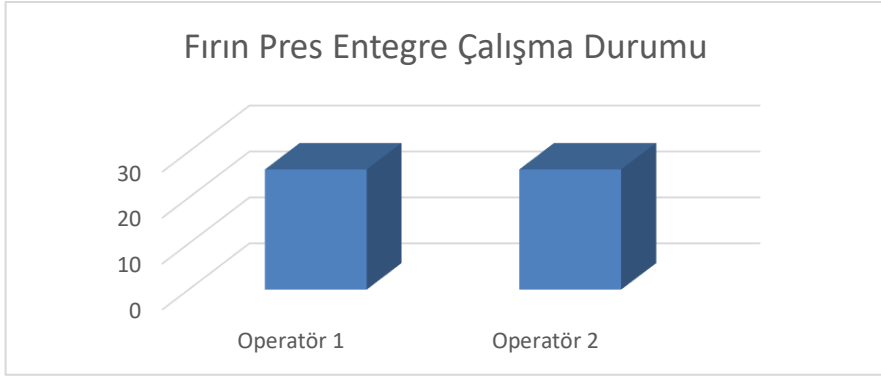
Şekil 13. Arena Çalışma akışı diyagramı



Şekil 14. Mevcut Durum



Şekil 15. Yamazumi Grafiği



Şekil 16. Fırın Pres Entegre Çalışma

Şekil 16’da fırın ve presin entegre çalışma durumunda operatör dolulukları gösterilmiştir. Makine tasarımıda fırın presin içerisine girebilmektedir ancak ham maddenin yanıcı olması nedeniyle mevcut durumda bu çalışma yapılamamaktadır. Hat dengeleme çalışması için kullanılan Yamazumi yöntemiyle yapılan düzenlemeler sonucunda 4 operatörle yürütülen üretim hattında iş yükü dengelemesi yapılarak 3 operatörle çalışılabilir hale getirilmiştir. Yamazumi grafiğiyle elde edilen yeni iş yükü dağılımında, tüm operatörlerin çevrim sürelerinin daha dengeli olduğu gözlemlenmiştir. İş yükü dağılımındaki bu iyileştirme sayesinde, operatör başına verimlilik artmış ve üretimde süreklilik sağlanmıştır.

Simülasyon çalışması Arena programı üzerinden yapılmıştır. Arena programı demo sürüm kullanıldığı için 1 saatlik analiz alınmış olup 62 replikasyon ile çalışmıştır. Excel üzerinden hat dengeleme çalışması ile de darboğaz tespiti yapılabilmektedir. Mevcut hat düzeninde veriler alınıp simülasyon programında ilgili modüller ile çalıştırılmıştır. Program çıktısında Şekil 13’de gözlemlendiği üzere formlama, frekans kaynak ve kontrol adımlarında darboğaz tespit edilmiştir. Çalışmada formlama ve frekans kaynak adımları arasında yer alan darboğaz üzerine analiz yapılmıştır.

Formlama hattında mevcut durumda 4 operatör çalışmaktadır. Operatörlerin iş adımlarını analiz etmek için Yamazumi grafiği çizilmiştir. Mevcut durum için çizilen Yamazumi grafiği sonrasında iş adımları operatörler arasında aktararak 3 operatörün çalıştığı durumu analiz etmek için Şekil 15’te yer alan grafik çizilmiştir. Fırın, formlama makinesinin içine girebilecek düzende tasarlanmıştır. Ancak mevcut kullanımdaki ham maddenin yanıcılığı nedeniyle entegre çalışma düzenine geçilememektedir. Ham madde maliyetleri nedeniyle ham madde revize edilememektedir.

Formlama hattında 1 operatör kazancı sağlanmıştır. İşletmede aynı hat düzeninden 3 hat bulunmaktadır. İyileştirme oranının fiziksel ortamda gözlemlenmek için çalıştığımız hat pilot olarak seçilmiştir.

Tablo 1. Maliyet hesaplaması

	Operatör Sayısı	Maliyet (Ay)
Mevcut Formlama Hattı	4	$15.761 * 4 = 63.044\text{₺}$
İyileştirilmiş Durumda Formlama Hattı	3	$15.761 * 3 = 47.283\text{₺}$
		$\text{Kazanç} = 63.044\text{₺} - 47.283\text{₺} = 15.761\text{₺}$

Sonuç

Bu çalışma, üretim sektörüne yönelik önemli katkılar sağlayarak sektördeki verimlilik sorunlarına çözüm üretmektedir. Özellikle yalın üretim ve simülasyon tekniklerini bir arada kullanarak, firmalara rekabet avantajı kazandırabilecek pratik ve uygulanabilir bir model sunmaktadır. Çalışmada, simülasyon ve Yamazumi analizi kullanılarak operatör iş yükleri dengelenmiş ve darboğazlar minimize edilmiştir. Hat dengeleme stratejileri sayesinde üretim süreleri kısaltılarak daha yüksek verim elde edilmiştir. Gereksiz iş gücü kullanımı ve üretim hattındaki dengesizlikler belirlenerek, gereksiz maliyetler minimize edilmiştir. İş gücü planlaması iyileştirilerek, işletmelerin daha düşük maliyetle daha yüksek üretim yapmasına olanak tanınmıştır. Simülasyon teknolojisinin kullanımı, firmaların dijital dönüşüm süreçlerini destekleyerek, Endüstri 4.0 ve akıllı üretim sistemlerine geçişi kolaylaştırmaktadır. Veri bazlı karar alma mekanizmalarının güçlendirilmesine katkı sağlamaktadır. Daha kısa üretim süreleri ve düşük maliyetlerle çalışabilen firmalar, pazarda daha rekabetçi hale gelmektedir. Üretim süreçlerindeki iyileştirmeler, müşteri taleplerine daha hızlı yanıt verilmesini sağlayarak müşteri memnuniyetini artırmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma sektörde üretim süreçlerinin iyileştirilmesi, maliyetlerin düşürülmesi, iş gücü yönetiminin iyileştirilmesi ve dijital dönüşüm süreçlerinin desteklenmesi açısından güçlü katkılar sağlamaktadır. Bu yönleriyle hem akademik hem de endüstriyel açıdan değerli bir model ortaya koymaktadır.

Sağlamcı ve Aslan (2022), tarafından araştırılan çalışmada da simülasyon yazılımı ile operatör kazancı sağlanmıştır. Sağlamcı ve Aslan çalışmalarında en çok üretilen ürünü

takip ederek çıktıyı %41 oranında arttırmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada hat düzenini baz alarak kapasite, darboğaz ve işgücü üzerine analiz yapılmıştır.

Yapılan iyileştirme çalışmasında 1 operatör kazancı sağlanmıştır. Bunun maliyet kazancı 15.761₺ (\$621.25)'dir. İşletmede aynı hat düzenden 3 sistem bulunmaktadır. Çalışma işletmede yaygınlaştırılabilmektedir.

Tablo 2. Yıllık maliyet hesaplaması

Tablo 1. İstasyon Bazlı Kazanç Hesabı: 15.761₺	Yıllık Kazanç
Aylık Kazanç (Tek İstasyon)	$15.761 * 12 = 189.132₺$
Yıllık Kazanç (İşletme)	$189.132 * 3 = 567.396₺$

Hat bazlı yıllık olarak kazanç 189.132₺'dir, işletmede aynı üretim hattından 3 sistem bulunmaktadır. İşletme bazlı yıllık kazanç 567.396₺'dir. Yapılan bu maliyet analizinin sonucunda istasyonda operatör kazancı sağlandığı için operatör ekstra üretim gücü olarak sisteme kazandırılmış olup üretim verimliliğinde artış gözlemlenmiştir.

Çalışmada operatör iş yükü dengelenmiş olsa da ergonomik faktörler ve çalışanların fiziksel/psikolojik yükleri derinlemesine incelenmemiştir. İş gücü memnuniyeti ve uzun vadeli çalışan verimliliği açısından detaylı ergonomik analizler yapılabilir. Çalışmanın devamlılığında, üretim süreçlerinin verimliliği için yapay zeka ve makine öğrenmesi teknikleri entegre edilerek, sistemin kendini adapte eden bir yapıya kavuşması sağlanabilir. Üretim sürecinin yanı sıra, hammadde tedariki ve ürün teslim süreçleri de modellenerek daha kapsamlı bir analiz yapılabilir. İş gücü üzerindeki fiziksel ve psikolojik yükler detaylı olarak incelenerek, insan merkezli üretim sistemleri tasarlanabilir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazar(lar), bilinen herhangi bir çıkar çatışması veya herhangi bir kurum/kuruluş ya da kişi ile ortak çıkar bulunmadığını onaylamaktadırlar.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazar 1, alışmanın Kavramsal ve/veya Tasarım Süreçlerinin Belirlenmesi, alışmanın Kavramsal ve/veya Tasarım Süreçlerinin Yönetimi, Fikirsel İeriğın Eleřtirel İncelemesi, Son Onay ve Tam Sorumluluk konusunda katkıda bulunmuştur. Yazar 2, alışmanın Kavramsal ve/veya Tasarım Süreçlerinin Belirlenmesi, Veri Toplama, Veri Analizi ve Yorumlama, Makale Taslağının Oluşturulması, Son Onay ve Tam Sorumluluk konusunda katkı sağlamıştır.

Kaynakça

Banks J, Jerry R., 1998. Principles of simulation. Handbook of Simulation, 12, 3-30.

Bilget S., 2015. Konfeksiyonda simülasyon tekniğıyle yalın üretim sistemlerinin incelenmesi (Yüksek lisans tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü).

Koçanalı F., 2009. Montaj hattı dengelemeye yönelik bir simülasyon modeli önerisi. Yüksek lisans tezi, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Kuğu S, Yolcan OO, Köse R., 2023. Kondenser üretim hattında Arena 16.1 destekli hat dengeleme alışması. Politeknik Dergisi, 1: 1.

Masood S., 2006. Otomatik üretim transfer hattının hat dengelemesi ve simülasyonu. Assembly Automation, 26(1): 69-74.

Özkıran A, Düşünür H., 2011. Otomotiv sektöründeki bir işletmede montaj hattının analizi ve dengeleme alışması. Dokuz Eylül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Endüstri Mühendisliğı Bölümü, İzmir.

Qattawi A, Chalil Madathil S., 2019. Yalın üretim ve dengeleme modellerinin hibrit yaklaşımını kullanarak montaj hattı tasarımı. Üretim ve Üretim Araştırması, 7(1): 125-142.

Sağlamcı Y, Aslan E., 2022. Simülasyon ile darboğazların tespit edilmesi ve süreç iyileştirme: Bir tekstil işletmesi örneğı. Journal of Academic Opinion, 2(1): 27-39.

Tağman AB., 2021. Sistem simülasyonu ile süreç iyileştirme: Bir tekstil işletme uygulaması. Doktora tezi, Karabük Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Endüstri Mühendisliğı Anabilim Dalı, Karabük.

Üreme Biyoteknolojisinde Kök Hücre ve Organ Kullanımı

Ramazan ÖRDEK^{1*}, Cengiz YILDIZ²

¹Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum, Jinekoloji ve Suni Tohumlama AD, Hatay

²Yalova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Yalova

¹<https://orcid.org/0000-0001-9741-2383>

²<https://orcid.org/0000-0002-9166-8836>

*Sorumlu yazar: ramazanordek074@gmail.com

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 19.07.2024

Kabul tarihi:28.10.2024

Online Yayınlanma: 17.03.2025

Anahtar Kelimeler

Hücre

Kök hücre

Transplantasyon

Spermatogonyal kök hücre

ÖZ

Zigotun oluşumundan trilyonlarca hücreye ulaşması ve farklılaşarak yeni özellikler kazanan hücrelerin bölünmelerindeki programlanma dikkatleri üzerine çekmektedir. Organizmada ömrünü tamamlayan ve ölen hücrelerin yerlerine yenileri meydana gelmektedir. Canlıların vücudundaki tüm hücrelerin ilk ana hücresine "kök hücre" denir ve bu hücreler farklı hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahiptirler. Kök hücreler normal hücrelerden 3 temel özellik bakımından ayrılmaktadır. Bunlar; kök hücreler sonsuz bölünme ve çoğalma yeteneğine sahiptir, özelleşmemiş hücrelerdir ve son olarak bu hücreler birçok değişik hücreye dönüşebilme özelliğine sahiptirler. Günümüzde kök hücreler standardize edilmiştir ve Uluslararası Kök Hücre Tedavisi Organizasyonu (ISCT) standartlarına tabidir. Transplantasyon işleminde kök hücre kaynağı olarak aynı hayvan (*ototransplantasyon*), aynı tür (*allograft*) veya farklı bir tür (*ksenotransplantasyon*) kullanılabilir. Kök hücre nakli; hücrel süspansiyonun (spermatogonyal kök hücre) veya dokuların transplantasyonu (testis ve ovaryum) şeklinde iki farklı yöntemle uygulanabilir. Kök hücrenin eldesi, transplantasyonu ve tedavi amacıyla kullanımı günümüzde en güncel konulardan biri olma yolunda ilerlemektedir. Günümüzde çözüm bulunamayan pek çok hastalığın tedavisinde kök hücre ve doku nakillerinden yararlanılabilmektedir. Yapılan çalışmalar kök hücrelerin veteriner hekimlik alanında kullanımının oldukça önemli olduğunu göstermektedir. Yakın bir gelecekte, veteriner hekimlikte bir takım hastalıkların tedavilerinde kök hücrenin çok önemli bir uygulama alanına sahip olacağı düşünülmektedir.

Stem Cell and Organ Use in Reproductive Biotechnology

Research Article

Article History:

Received: 19.07.2024

Accepted: 28.10.2024

Available online: 17.03.2025

Keywords:

Cell

Stem cell

Transplantation

Spermatogonial stem cell

ABSTRACT

The programming of the division of cells that differentiate and gain new characteristics from the formation of the zygote to trillions of cells draws attention. New cells are formed in the organism in place of cells that complete their lifespan and die. The first main cell of all cells in the body of living beings is called a "stem cell" and these cells have the ability to transform into different cell types. Stem cells differ from normal cells in terms of 3 basic characteristics. These are; stem cells have the ability to divide and multiply infinitely, they are unspecialized cells and finally these cells have the ability to transform into many different cells. Today, stem cells are standardized and subject to the standards of the International Organization for Stem Cell Therapy (ISCT). In the transplantation process, the same animal (autotransplantation), the same species (allograft) or a different

species (xenotransplantation) can be used as a stem cell source. Stem cell transplantation can be applied with two different methods as cellular suspension (spermatogonial stem cell) or tissue transplantation (testis and ovary). The acquisition, transplantation and use of stem cells for treatment purposes are on their way to becoming one of the most current topics today. Stem cell and tissue transplants can be used in the treatment of many diseases that have not been cured yet. Studies have shown that the use of stem cells in veterinary medicine is very important. It is thought that in the near future, stem cells will have a very important application area in the treatment of some diseases in veterinary medicine.

To Cite: Ördek R, Yıldız C., 2025. Üreme biyoteknolojisinde kök hücre ve organ kullanımı. Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi Dergisi, 5(1): 192-212.

Giriş

Zigotun oluşumundan başlayarak trilyonlarca hücreye ulaşması ve farklılaşarak yeni özellikler kazanan hücrelerin bölünmelerindeki programlanma bilim dünyasının dikkatini çekmektedir (Şahin ve ark., 2005; Sağsöz ve Ketani, 2008). Organizmada ömrünü tamamlayan ve ölen hücrelerin yerine yeni hücreler meydana gelmektedir. Ayrıca, yabancı antijenlere karşı koymak için organizma özel immun hücreler üretmektedir. Göz hücreleri görme, pankreas hücreleri salgı, akciğer hücreleri ise solunum için farklılaşırlar. Canlıların vücudundaki tüm hücrelerin ilk ana hücresine “kök hücre” denir ve bu hücreler farklı hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahiptirler (Sağsöz ve Ketani, 2008).

Hayvan fetal ve kordon kanı greftleriyle bir takım enfeksiyonların tedavisi üzerine çalışmalar yapan Süreyya Tahsin Aygün, insan yaşamını uzatma yolunun doğum sonrasında atılan plasenta ve kordon hücrelerinin tedavi amacıyla kullanılmasında olduğunu ifade etmiştir. Embriyonal karsinom hücresinin kültür ortamında üretilmesi, kök hücre alanındaki ilk önemli adımlardan biri olmuştur (Şahin ve ark., 2005; Sağsöz ve Ketani, 2008).

Bu derlemenin amacı, üreme biyoteknolojisinin ilgi alanına giren bazı kök hücre ve organ naklinin canlıların reproduktif yaşamları üzerindeki etkilerini anlayabilmektir.

Biyoteknolojinin tanımı

Sözlükte canlı üretim bilimi anlamına gelen biyoteknoloji terimi, biyo-tekno ve loji sözcüklerinin birleşmesiyle oluşmuş, farklı nitelikteki ürünlerin, canlı materyallerden faydalanılarak üretilmesi anlamına gelmektedir. Fakat biyoteknoloji denince ilk olarak mikroorganizmalardan farklı ürünlerin eldesi akla gelse de, kaydedilen son gelişmelerle mikroorganizmalardan veya gelişmiş canlılardan elde edilen parçalarla ortaya konulan üretimler de biyoteknolojinin kapsamı alanına girmektedir (Şahin, 1987).

Reprodüktif biyoteknolojinin tanımı, amacı, faydaları ve konuları

Canlılarda reprodüksiyon ile alakalı genetik materyali korumak, gelişimini sağlamak, kalıtsal özellikleri diğer bireylere aktarmak amacıyla bazı biyolojik bilgi ve tekniklerin uygulanması işlemine reprodüktif biyoteknoloji denir (Çevik, 2020).

Veteriner hekimliği ve hayvan yetiştiriciliği bakımından öncelikli amaç, in vivo ve in vitro şartlarda gen kaynaklarının uzun vadeli korunması ve sayıca fazla miktarda yavru elde edilmesidir (Pabuccuoğlu, 2021).

Reprodüktif biyoteknolojiden elde edilmesi beklenen faydalar şunlardır:

- Erkek ve dişi damızlıklardan sayıca fazla miktarda yavru elde edebilme
- Zorunlu kesime giden damızlık hayvanlardan kesimden sonra da yararlanabilme
- Biyo-reaktör üretimi ve klonlama gibi biyoteknolojileri gen transferi ile uygulayabilme

Reprodüktif biyoteknoloji konuları erkek ve dişi canlılar ayrı ayrı değerlendirildiğinde bir takım farklılıklar göstermektedir. Bu bağlamda dişilerde uygulanabilecek biyoteknolojik çalışmalar embriyo ve hormonal kontrol ile alakalı konular olarak ikiye ayrılabilir. Erkeklerde yapılacak çalışmalar ise başlıca sperma ve suni tohumlama ile ilgili konulardır (Pabuccuoğlu, 2021).

Hücrenin keşfi ve kök hücrenin tarihsel gelişimi

Hücre, organizmanın yapısal ve işlevsel özellikler gösteren en küçük yapı birimidir. Robert Hooke, mikroskopik inceleme sonucu şişe mantar parçasının yan yana dizilmiş bitişik kısımlardan oluştuğunu gözlemlemiş, etrafı çevrili ve iç kısımları boş olan bu yapı odaklarını hücre (Cellula: latince küçük odacık) olarak adlandırmıştır. Bu isme 1665 yılında yayınladığı Micrographia adlı kitapta da yer vermiştir. 1839'da Matthias Jakob Schleiden ve Theodor Schwann; "hücre teorisi"ni ortaya koymuşlardır. Bu teoriye göre:

1. Hücre, yaşamın en küçük işlevsel yapısıdır. Canlılar bir veya daha çok hücreden oluşur.
2. Oluşan yeni hücreler kendilerinden önceki hücrelerin bölünmesi sonucu oluşur.
3. Organizmanın bütün yaşam fonksiyonları kendi hücrelerinin içinde meydana gelir.
4. Tüm hücreler, kendi fonksiyonlarını regüle eden kalıtsal bilgiyi sonraki neslin hücrelerine aktarır (Ateş, 2016).

1878'de kök hücre kapsamında memeli ovumunun ilk kez canlı vücudu dışında döllenişle başlamış olan in vitro çalışmalar günümüzde organizmanın klonlanması ve organ üretimi konusunda da gelişme kaydetmiştir (Özen ve Gül Sancak, 2014).

1900 yılı başlarında araştırmacılar kan hücrelerinin hepsinin tek hücreden köken aldığını fark etmişlerdir (Ateş, 2016).

1960: Farelerde teratokarsinomaların embriyonik germ hücrelerinden kökenlendiği ve embriyonik karsinom hücrelerinin bir anaç hücre olduğu bulunmuştur (Ateş, 2016).

1963: Ernest McCulloch ve James Till; farelerdeki kemik iliği hücrelerinin nakil sonrası kendilerini yenileme kapasitelerinin bulunduğunu ifade etmişlerdir (Ateş, 2016).

1968: İlk insan ovumu in vitro ortamda döllenmiştir (Ateş, 2016).

1976: Mezenkimal kök hücreleri ilk kez tanımlanmıştır (Friedenstein, 1976).

1978: İlk IVF bebeği (tüp bebek) İngiltere’de dünyaya gelmiştir (Ateş, 2016).

1981: Evans ve Kaufman, blastosistlerin iç hücre kitlesinden (ICM) fare embriyonal kök hücrelerini (EKH) elde etmişler. Ayrıca, in vitro ortamda pluripotent özellikteki fare EKH’leri üretmek için gerekli olan kültür şartlarını hazırlamışlardır (Evans ve Kaufman, 1981).

1995-96: Rhesus maymunları ve marmosetlerden EKH’ler elde edilmiş ve elde edilen bu hücreler in vitro ortama yerleştirilmiştir (Thomson ve ark., 1995).

1998: IVF laboratuvarında kriyoprezerve ya da taze 36 tane embriyodan beş tane insan EKH serisi üretildiği raporlanmıştır (Thomson, 1998).

2000: İnsan embriyonik kök hücrelerinin pluripotent özellikte olduğu anlaşılmıştır (Sağsöz ve Ketani, 2008).

2003: Science Dergisi kök hücre alanındaki gelişmeleri en önemli 10 tıp olayı arasında göstermiştir (Ateş, 2016).

2004: Güney Koreli bilim insanları 30 adet insan embriyosunu klonlayarak blastosist seviyesine getirmişler, ancak bu embriyoların yalnızca birinden kök hücre elde edebilmişlerdir (Sağsöz ve Ketani, 2008).

2006: İndüklenebilir pluripotent kök hücreleri (iPSC)’nin viral veya viral olmayan vektörler kullanılarak, bazı maddelerin kültür ortamına ilave edilmesiyle genleri aktif hale getirilmiş ve geriye farklanmaları sağlanmıştır (2012 Nobel Ödülü) (Takahashi ve Yamanaka, 2006).

2010: Gazzon Muvdi ve Quinones, erişkin tip kök hücrelerin uygun ortamda farklılaşmadan veya özelleşmeden bulunduğunu ve kök hücrelerin sinyalleşmeler sonucu kendi aralarındaki ilişkiyi regüle ettiğini ispatlamışlardır (Gearhart ve Addis, 2010).

Kök hücre

Değişik hücre tiplerine dönüşebilme kabiliyeti (differensiyasyon), kendi kendini yenileme gücü (self-renewal) ve canlı kaldıkça yaşamlarını sürdürebilme karakteristiğine sahip olan hücrelere kök hücre denir (TÜBA, 2009; Andrades ve ark., 2011; Özen ve Gül Sancak, 2014). Bu tip hücreler birçok dokuda bulunmakla birlikte buldukları dokulardaki

dejenere olan hücrelerin yenilenmesinden sorumludurlar (Schatten, 2007). Bu hücrelerin herhangi bir dokuya has özellikleri bulunmaz ve uygun bir sinyalle karşılaşmadıklarında farklılaşmazlar. Kök hücrenin ne tür hücreye farklılaşacağını hücre çekirdeğindeki genler düzenler. Bu genlerden gelen uyarımlara göre farklı hücre tiplerine dönüşebilmektedirler (Güneş, 2005; Cannazik ve Polat, 2014).

Bir hücrenin kök hücre sınıfına girebilmesi için 5 kriter bulunmaktadır:

1. Bölünebilme özelliği uzun sürmeli ve kendini yenileyebilme kapasitesine sahip olmalı,
2. Özelleşmemiş olmalı,
3. Özelleşen hücrelere dönüşebilmeli,
4. Hasarlı dokuya transplante edildiğinde kaynak dokuyu işlevsel açıdan tekrar çoğaltabilmeli,
5. In vivo ortamda doku hasarı olmadığı durumlarda da farklılaşan kuşaklara destek sağlamalıdır (Ural, 2006; Erol ve Arıcan, 2008; Cannazik ve Polat, 2014).

Kök hücrenin özellikleri

Bölünme ve kendini yenileme (Self-Renewal)

Kök hücreler, buldukları dokularda onarım için yeni bir hücreye ihtiyaç oluncaya kadar özelleşmeden bölünebilme kabiliyetine sahiptirler (Erol ve Arıcan, 2008; Cannazik ve Polat, 2014). Hücrelerin bölünebilme yeteneklerini kromozomun uç kısımlarındaki telomer adındaki DNA zinciri belirler. Telomerlerin uzunluğu ne kadar fazla ise hücreler o ölçüde fazlaca bölünebilirler. Telomeraz enzimi telomerlerin uzun kalmasının devamlılığını sağlar. Bu enzim hücrede ne kadar aktif rol oynar ise telomerlerin uzunluğu da o ölçüde korunabilir. Fazla yoğun telomeraz enzimi aktivasyonundan kaynaklı kök hücreler çok sayıda bölünebilme özelliğine sahiptirler (Sağsöz ve Ketani, 2008; Thore ve ark., 2008).

Kök hücrelerin farklılaşması (Plastisite)

Dokulardan elde edilen kök hücrelerin, uygun ortam koşulları ve sinyallerle değişik doku hücrelerine dönüşebilmesi olayına plastisite (transdiferansiyasyon) denir (İnan ve Özbilgin, 2009). Kök hücreler farklılaşabilme potansiyeline göre; totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere 3 kategoriye ayrılmaktadırlar (Koerner ve ark., 2006; Cannazik ve Polat, 2014).

Totipotent kök hücreler

Totipotent özellik bir kök hücrenin sahip olabileceği en yüksek güç olarak tanımlanmaktadır. Spermatozoon ile yumurtanın fertilizasyonu (döllenme) sonucu oluşan

zigot, farklılaşma kapasitesi en yüksek olan totipotent kök hücredir. Üç germ tabakasındaki hücrelerin tamamını oluşturma kabiliyetine sahip olmakla birlikte uygun koşullarda fonksiyonel bir organizmayı en baştan oluşturabilecek tüm hücelere dönüşebilme özelliği bulunan hücre tipidirler. Embriyonal gelişim aşamasındaki hücreler, zigot oluşumundan sonra, ilk birkaç bölünmede totipotent olma kabiliyetini muhafaza ederler.

Pluripotent kök hücreler

Bu hücreler fertilizasyondan sonra, embriyonal hücre bölünmesinin dördüncü gününden itibaren (döllenmeden 16 blastomerli döneme kadar) totipotent olma özelliklerini kaybederek, daha düşük farklılaşma gücüne sahip olan pluripotent hücre tipine dönüşürler (Lanza ve ark., 2005; Morgani ve ark., 2013; Çerçi ve Erdost, 2019). Kısacası, preimplantasyon döneminin 4. gününde oluşan blastosist aşamasındaki embriyoda mevcut olan hücrelerdir. Embriyonal gelişimin dördüncü gününde, embriyo (blastosist aşamasında) üç temel katman meydana getirmektedir. Blastosist; trofoblast hücreleri, blastosöl ve iç hücre kitlesi (Inner Cell Mass, ICM) olarak üç temel yapıdan oluşur. Trofoblast, gelişim sürecinde plasentayı oluşturur. ICM'nin, gelişim aşamasında vücuttaki tüm dokuları oluşturma özelliği bulunmaktadır (Elçin, 2009). Bu hücreler germ yapraklarına (endoderm, ektoderm, mezoderm) ait doku ve organları oluşturabilme kabiliyetine sahip olmaları bakımından totipotent kök hücrelerle benzerlik gösterirler (Tekeli ve ark., 2016). Bu hücreler plasental yapıları oluşturamaz ve dolayısıyla yeni bir organizmayı meydana getiremezler. Hücreler, embriyonal gelişimin ileri dönemlerinde uterus duvarına implante oluncaya kadar pluripotenttirler.

Multipotent kök hücreler

Embriyonal gelişimin ileri aşamasına ait olan bu hücreler, implantasyondan sonra multipotent (üç germ yaprağına ait hücelere dönüşebilme) karakteristik kazanırlar. Bu hücrelerin, gelişim evresinde bölündükçe daha düşük kapasitede farklılaşma özelliği bulunur. Pluripotent özellikteki kök hücelere göre kısmen farklılaşmış kök hücre özelliği gösterirler. Bu hücrelerin başlıcaları, hematopoietik kök hücreler (HKH) ve mezenkimal kök hücrelerdir (MKH). Bu hücreler erişkin bireylerin tek bir germ yaprağına ait ve birbirine yakın hücelere farklılaşabilme özelliği bulunan hücrelerdir (Lynch, 2011).

Kök hücreler elde edildikleri kaynaklara göre; embriyonik, fetal ve erişkin tip kök hücreler olarak üç grupta toplanırlar (Özer, 2018).

Embriyonik kök hücreler

Blastosist aşamasındaki bir embriyoda implantasyon sonrası plasenta yapısını oluşturacak olan trofoblast hücrelerinden (trofektoderm) oluşan dış kısım ve nodus embriyonalis denen ICM'den meydana gelen iç kısım olmak üzere iki farklı hücre tipi bulunur. Bu hücreler, erken embriyonik evrede ICM'den elde edilir ve in vitro olarak tüm somatik hücre tiplerine dönüşebilme kabiliyeti bulunur. Bu kök hücre tipi embriyonun gövdesine ait bütün hücre tabakaları (endoderm, ektoderm, mezoderm) ile onlardan köken alacak organ ve sistemleri oluşturma yetkinliğine sahip pluripotent özellikteki kök hücrelerdir (Özer, 2018). Telomerleri uzun olduğundan bu hücrelerin çoğalma kapasiteleri epey fazla olmakla birlikte uzun süre bölünmeye devam edebilme özellikleri bulunur. Uygun laboratuvar koşullarında 2 yıl kadar yaşayabilirler (Şenel, 2002; Güneş, 2005; Karaşahin, 2012).

Günümüzde embriyonal kök hücrelerle ilgili çalışmalar etik kısıtlamalardan kaynaklı olarak sınırlandırılmıştır (Özen ve Gül Sancak, 2014).

Somatik hücre çekirdek transferi yöntemi (üreme amaçlı kopyalama) ile hastalara özel embriyonik kök hücre üretme imkanı bulunmaktadır. Bu yöntemde; somatik bir hücre çekirdeği, çekirdeği çıkartılmış bir ovum hücresine aktarılır. Şekillenen bu yeni hücrenin blastosist aşamasına kadar ilerlemesi sağlanır. Daha sonrasında da ICM'nin hücresel tedavi amacıyla kullanılması sağlanır. Ayrıca oluşan bu blastosist aşamasındaki embriyonun uterusu transferi ile (klonlama) yeni bir canlı meydana gelmesi de sağlanabilir. Dolly adındaki koyunun üretilmesi üreme amaçlı kopyalama yöntemiyle başarıyla gerçekleştirilmiş ve bu yöntem daha sonra diğer canlılarda da uygulanmıştır. Bu yöntem, somatik bir hücrenin embriyonik olarak yeniden programlanabileceğini sunması yönüyle önem taşımaktadır (Özen ve Gül Sancak, 2014).

Fötal kök hücreler

Fötal kök hücre kaynağı, kendiliğinden veya çeşitli anomaliler nedeniyle abortusla sonlanan ya da sonlandırılan gebeliklerden elde edilen fötuslardır. Sınırsız sayıda bölünebilme ve kendilerini yenileme gücüne sahiptirler. Embriyolardan elde edilen bu hücreler pluripotent özelliğe sahiptirler. Farklılaşp kromozom sayılarını yarıya indirerek ovum ve spermatozoona dönüşebilirler. Ancak bir başlarına yeni bir canlı oluşturamazlar. Kültür ortamında her türlü hücreye dönüşebilmeleri sebebiyle embriyonik kök hücreye alternatiflerdir. 5-10 haftalık fötusun gonadal çatısında bulunan primordiyal germ hücrelerinden köken aldıkları gibi amniyon sıvısı ve plasentadan da elde edilebilirler (Özer, 2018).

Erişkin tip kök hücreler (ETKH)

Kemik iliği, periferik kan, yağ doku, deri, kalp kası, nöron, amniyotik sıvı, göbek kordonu ve uterus gibi dokulardan köken alan kök hücrelerdir. Organizmanın çeşitli doku ve organlarında bulunan, gerektiğinde kendini çoğaltabilen, multipotent özellikteki farklılaşmamış kök hücrelerdir. Örneğin; beyin kök hücrelerinden kan ve kas hücreleri oluşturulabilir. İçinde buldukları dokuları onararak dokunun devamlılığını sağlamak başlıca görevleridir. Bu tip hücreler özelleşmiş hücrelere dönüşmeden önce sınırlı çoğalma özelliğine sahip olan progenitör veya öncül hücrelere dönüşürler (Özer, 2018).

Günümüzde hücresel tedavide; insan embriyonal kök hücresi (hESC) %13, fetal kök hücre %2, göbek kordonu kök hücresi %10 ve erişkin tip kök hücreler ise %75 oranlarında kullanım alanı bulmaktadır (George, 2011).

Kök hücrelerin işlevi

Hematopoietik kök hücre, karaciğer ve sinir kök hücrelerinde; hasarlı yere nakledildiğinde kaynak dokuyu işlevsel bakımdan yeniden fonksiyonel duruma getirir. Örneğin; kemik iliği mezenkimal hücreleri kalp dokusuna aktarıldığında bu hücreler kardiyomiyositlere farklılaşarak hasarlı dokuyu işlevsel hale getirebilirler (Kruse ve ark., 2008).

Kök hücre transplantasyonu

Kök hücre tedavisinde sistemik uygulamalar kılcallarda emboli oluşumuna sebebiyet verebileceğinden lokal uygulamalar tercih edilmiştir (Deak ve ark., 2010). Günümüzde kök hücreler standardize edilmiştir ve Uluslararası Kök Hücre Tedavisi Organizasyonu (ISCT) standartlarına tabidir (Dominici ve ark., 2006).

Transplantasyon işleminde kök hücre kaynağı olarak aynı hayvan (*ototransplantasyon*), aynı tür (*allograft transplantasyon*) veya farklı bir tür (*ksenotransplantasyon*) kullanılabilir (Gade ve ark., 2012). Vetstem, Medistem ve Histostem gibi bazı şirketler, ortopedik ve diğer yaralanmalarda kullanılmak üzere otolog, allojenik veya ksenojenik kök hücreler üretmektedirler (Dalgın ve Meral, 2017).

Kök hücre nakli; hücresel süspansiyonun (spermatogonyal kök hücre) veya dokuların transplantasyonu (testis ve ovaryum) şeklinde iki farklı yöntemle uygulanabilir.

Hücresel süspansiyon transplantasyonu

Fertil bir erkek farenin testis hücreleri (spermatogonyal kök hücre) doğrudan alıcı infertil bir erkeğin seminifer tübüllerinin lümenine mikroenjektör ile nakledilebilir; böylece spermatogenez oluşturulabilir ve donör haplotipini bir sonraki nesle aktaran spermatozoa üretilebilir. Fare ve ratlarla yapılan çalışmalarda süspansiyon halindeki donör kök hücrelerinin testiküler kullanımı için 3 mikroenjeksiyon yöntemi bulunmaktadır. İlk yöntemde hücresel süspansiyon bir mikropipet yardımıyla seminifer tubullere verilerek hücrelerin rete testisten geçişi olur ve diğer tubullere ulaşırlar. İkinci yöntemde hücresel süspansiyon mikropipet yardımıyla doğrudan rete testise aktarılır. Üçüncü yöntemde donör kök hücreleri direkt olarak rete testise giden efferent kanala verilir (Ogawa ve ark., 2003; Brinster ve Nagano, 1998). Kök hücrelerin testis içerisine verilmesinin başarılı olup olmadığını görebilmek amacıyla testislere triptan mavisi enjekte edilir. Transplantasyon sonrası testisteki donör kök hücrelerinin çoğalması histolojik olarak muayene edilir. Bilgisayar destekli görüntüleme yöntemleri de bu amaçla kullanılabilir (Dobrinski ve ark., 1999). Dişi germ hattındaki kök hücrelerin çoğalması doğum öncesi sona erdiğinden yetişkinlerde bulunan tek germ hattı kök hücreleri spermatogonyal kök hücrelerdir (Zheng ve ark., 2014; Akar ve ark., 2019).

Hücresel transplantasyon ilk kez Brinster ve Zimmermann (1994) tarafından farelerde denenmiştir. Bu çalışmada donör farenin testisinden alınan hücre süspansiyonu içerisindeki spermatogonyal kök hücre (SSC) infertil bir konak fareye verildiğinde spermatogenez olayının şekillendiği bildirilmiştir. Bu fareler çiftleştirildiğinde donör farenin kalıtsal özelliklerini taşıyan yavruların meydana geldiği ifade edilmiştir. Bu çalışma sonrası homolog türler arasında rat, keçi, domuz, köpek, koyun ve maymun gibi değişik canlılarda da bu nakil işlemi başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Böylece farklı türler arasında da SSC nakillerinin (ksenotransplantasyon) yapılabileceği gösterilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada rattan alınan SSC, fare seminifer tubullerinde kolonize olmuş ve bu hücrelerin farklılaşması sonucunda normal özelliklere sahip olan rat spermi üretilebilmiştir (Clouthier ve ark., 1996).

Spermatogonyal kök hücreler (SSC)

SSC'ler, belli bir türün genomunu bir nesilden bir nesile aktarabilen ve aynı zamanda pluripotent kök hücrelere dönüşme kapasitesine sahip olan tek yetişkin kök hücreleridir (Guan ve ark., 2006; Seandel ve ark., 2007; Kanatsu-Shinohara ve ark., 2008; Aponte, 2015). Ayrıca, temel üç embriyonik katmandan hücreler oluşturabilmektedirler.

SSC, canlının hayatı boyunca kök hücre havuzunun devamlılığını sağlamak için kendini yeniler, germ hücreye dönüşür ya da apoptoz sonucu hücrenin ölümü meydana gelir (Dym,

1994). Erişkin testisinde normal spermatogenez ve fertilitenin devamlılığı; spermatogonyal kök hücre yenilenmesi ve farklılaşması arasında bulunan dengeye bağlıdır. Bu iki süreç; kök hücre gen ekspresyonuyla intrinsik olarak ve niş adı verilen mikroçevreden gelen uyarımlar sonucu ekstrinsik olarak regüle edilir (Dadoune, 2007; Yanar ve ark., 2017). Kök hücrelerin bölünme ve farklılaşmalarında önemli bir yeri olan; bu hücrelerin içinde olduğu ve onların geleceğini belirleyen in vivo veya in vitro mikroçevreye kök hücre yuvası (Stem Cell Niche) adı verilmektedir. Niş adı verilen mikroçevre sertoli hücresi, peritubuler miyoid hücre ve Leydig (intersitisyel) hücresinden meydana gelir (Chen ve ark., 2005; Hess ve ark., 2006; Chen ve Liu, 2015; Heinrich ve DeFalco, 2019).

Sertoli hücreleri, SSC ve germ hücrelerinin beslenmelerini sağlayarak spermatogenezisi destekleyen uyarımları yönetmektedir. Bu hücreler, glial hücre hattı türevli nörotrofik faktörü (GDNF) ve bazik fibroblast büyüme faktörünü (bFGF) salmak suretiyle in vitro SSC yenilenmesine destek olurlar. Peritubuler miyoid hücre ve Leydig hücresi; koloni-stimulan faktör1 (CSF1) üretimi sayesinde GDNF ile sinerjistik olarak etkilerini gösterirler. Leydig hücreleri ise testosteron hormonu üretimi sayesinde gonadların gelişimi ve spermatogenezisin devamlılığını sağlarlar (Ateş, 2016).

SSC'lerin kendi kendini yenileme ve farklılaşması somatik hücrelerde çevresel kaynaklı dış (ektrinsik) etkenler ve germ hücrelerindeki iç (intrinsik) kalıtsal programlarla düzenlenmektedir (Düzağaç ve ark., 2013).

Testisteki seminifer epitelin germ kök hücreleri olan SSC'ler spermatogenezisin kurucu hücreleridir. Günümüze kadar SSC nakli; fare, rat, koyun, domuz, köpek ve maymun gibi değişik canlı türlerinde başarılı olarak uygulanmıştır (Ogawa ve ark., 2000; Kanatsu-Shinohara ve ark., 2003). Çeşitli hayvan çalışmaları, değişik yaştaki donörlerden alınan SSC'lerin kriyoprezervasyon yöntemiyle başarılı bir şekilde saklanabileceğini, çözülme ve nakil işlemi sonrasında spermatojenik potansiyellerini muhafaza ederek yeniden spermatogenez geçirmek suretiyle fonksiyonel yapılı işlevsel spermatozoonlar üretebileceğini göstermektedir (Dobrinski ve ark., 2000). Shetty ve ark. (2013), kemoterapiye maruz bırakılan maymunlar üzerinde yürüttükleri çalışmada; dondurma sonrası nakledilmiş SSC'lerde, GnRH antagonisti hormonla yapılan supresyon sonucu spermatogenezisin arttığını bildirmişlerdir. Kaydedilen bu gelişme insanların infertilite problemlerinin tedavisi için umut kaynağı olmuştur.

İnsanda SSC nakli ilk kez 1999'da gerçekleştirilmiştir. Manchester'da yapılan bu çalışma; lenfoma hastası 12 erkek üzerinde denenmiş ve bu hastaların üreme durumlarını içeren bir yayın yapılmıştır (Radford ve ark., 1999). Yapılan bir başka çalışmada, fare

testislerine insan SSC nakli uygulanmış ve sağlıklı proliferasyon sonucu bu hücrelerin 6 ay boyunca canlı kaldığı bildirilmiştir. Farklılaşmamış olan bu kök hücreler 1 ay sonra spermatogonyumlara dönüşmüşler fakat mayoz geçirememiş ve apoptoza uğramışlardır. Bu çalışmada; nakledilen insan SSC'leri fare sertoli hücrelerince tanınarak doğru yere göç edebilmiş, proliferere olabilmış ve hayatta kalabilmişlerdir (Nagano ve ark., 2002).

Testiküler doku parçacıklarının transplantasyonu

Testis transplantasyonunun klinik uygulaması, genetik olarak değerli bir pre-pubertal erkek hayvanın üreme potansiyelini korumak için çok önem arz etmektedir (Pukazhenti ve ark., 2005). Testis dokusu ksenotransplantasyon tekniği ile yabancı türlerde ektopikal bölgelere greftlenen (nakledilen) testis eksplantlarında sperm üretimi gerçekleştirilmiştir. Testis doku parçacıklarının immün yetmezliği olan çıplak konakçı farelere (nude mice) allogreftlenmesi (aynı türler arası nakil) veya ksenogreftlenmesi (farklı türler arası nakil), çiftlik hayvanı üretiminde ve prepubertal erkek onkoloji hastalarında germ hattının korunması için yeni bir araçtır. Honaramooz ve ark. (2003), germ hücre naklinin bağışıklığı yeterli alıcı keçilerde donör kaynaklı spermatogenez ve fertilité ile sonuçlanıp sonuçlanmayacağını araştırmak için, testis hücrelerini (insan alfa-1 antitripsin ekspresyon yapısındaki) transgenik donör keçilerden prepubertal vahşi tip alıcı keçilerin testislerine nakletmişlerdir. Puberta sonrasında, beş alıcıdan ikisinin ejakülatlarında donör kaynaklı transgeni taşıyan sperm tespit edildiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca bir alıcının çiftleştirilmesi sonucu, biri donörden türetilen 15 transgenik yavru elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu veriler, kemirgen olmayan türlerde germ hücre naklinden sonra donör hücre kaynaklı sperm üretimi ve genetiğin (donör haplotipinin) bir sonraki nesle aktarılmasına ilişkin ilk rapor olma özelliğine sahiptir.

Honaramooz ve ark. (2002) yaptıkları bir başka çalışmada, neonatal fare, domuz ve tekelerden alınan testis fragmanlarının, immün yetmezliği olan çıplak konakçı farelerin sırt derisinin altına nakledilmesiyle bu küçük testis parçalarının, orijinal lokal yerleri dışında büyüdüğünü ve farklılaştığını rapor etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada yeni doğan fare, domuz veya keçilerden alınan testis dokusunun fare konakçılara greftlenmesiyle morfolojik olarak tam spermatogenez gösterdiği ve sperm hücresi elde edildiğini bildirmişlerdir. Alıcı fareler yüksek seviyelerde folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) sağlamak için kısırlaştırılmış ve konakçı farelerin endokrin sisteminin, farklı hayvan türlerinden ksenotransplante edilmiş testis dokularının gelişimini desteklediği, testis parçacıklarının boyutunda bir artış olduğu ve sperm hücresinin elde edildiği bildirilmiştir.

Testis dokusu ksenograft uygulamasının, konağın endokrin sisteminin donör testis greft gelişimini desteklediği ve pubertayı hızlandırdığı araştırmalar sonucunda açıkça bildirilmiştir (Honaramooz ve ark., 2002). Normal testis dokularında seminifer tübül sıvısı (STF) rete testiste yeniden emilirken greftlerde rete dokusunun olmaması STF'nin emilimini bozar ve tübüllerde birikerek tübüler şişkinliğe neden olur. Transplantasyon döneminde, özellikle türler arası uygulamada, ksenograftların seminifer tübüllerinde rete testislerinin olmamasından kaynaklanan bir lümen dilatasyonu şekillenir (Honaramooz ve ark., 2007).

Testiküler doku parçacıklarının kriyoprezervasyonu

Fare testisinin dondurulması, genetik kaynakların korunması ve suşun kurtarılması amacıyla yardımcı üreme teknolojisinde önemli bir araçtır. Bu teknik, hücre bütünlüğünün ve testislerin endokrin fonksiyonlarının korunmasını sağlayabilir. Prepubertal erkeklerin testislerinde SSC'lerin varlığı, fertilitenin daha sonraki yaşamlarında korunması ve restorasyonu için klinik olarak uygun seçenekler sunar. Erkek germ hücresi ve testis dokusunun nakline dayanan yeni yaklaşımlar, kemoterapi öncesinde sağlıklı testis dokusunun dondurulmasıyla testis kanseri hastalarında fertilitenin restorasyonu sonrasında sınırlı sayıda sperm hücresi üretmek için düşünülebilir. Bu konudaki çalışmaların çoğu, infertilitenin ileride intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) tedavisinde kullanılmak üzere testis dokusunun işlenmesi veya greftlenerek sperm üretiminin geri kazanılması için önerilmiştir (Al-Hasani ve ark., 1999; Shinohara ve ark., 2002; Yıldız ve ark., 2013).

Prepubertal testis dokusunun kriyoprezervasyonu

Bu yöntemde araştırmacılar DMSO-etilen glikol-sükroz ve DMSO-sükroz kombinasyonlarının kullanımını tercih etmektedirler. Prepubertal testisin seminifer tubuluslarında SSC'lerin bazal kısma yerleşmesini Sertoli hücreleri sağlamaktadır. SSC'ler bazal membrana tamamen yerleştikten sonra bazal ve adluminal kompartman arasında kan-testis bariyeri oluşumu için sıkı bağlantılar şekillenir (Kervancıoğlu, 2018). Otomatik kontrollü hızlı dondurma, gamet ve somatik doku bankasında en yaygın kullanılan tekniktir. İnfertil erkeklerden alınan testis dokusu, hücre süspansiyonları veya doku parçaları halinde (Hovatta ve ark., 1996) kriyoprotektan ajan (CPA) olarak gliserol kullanılarak dondurulur. Brook ve ark. (2001), %4 fetal sığır serumu içeren Leibovitz ortamında farklı CPA'lar kullanarak yavaş programlanmış soğutma ile insan testis dokusunu başarıyla dondurmuşlardır.

Yıldız ve ark. (2013), farklı CPA'ların kriyoprezerve ve allotransplante yenidoğan fare testis dokusunda spermatogenez ve steroidogenez üzerindeki etkilerini test etmek amacıyla

yaptıkları çalışmada; yenidoğan fare testislerinin dondurulması ve çözülmesi için en etkili CPA'nın DMSO olduğunu, yavaş dondurma ile vitrifikasyon tekniklerinin de bu amaçla kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Ovaryum doku parçacıklarının transplantasyonu

Ovaryum doğal olarak neovaskülarizasyon sürecini destekleyen bol miktarda anjiyojenik faktör içermesi nedeniyle transplantasyon için oldukça uygun bir yerdir. Ovaryum doku transplantasyonunun temel amacı, özellikle kanser tedavisi (kemo/radyoterapi) gören genç ve yetişkin kadınlarda ovaryum endokrin fonksiyonunun ve fertilitenin yeniden sağlanmasıdır (Donnez ve ark., 2013). Özellikle çocuklar veya genç hastalarda fertilitiyi korumak için; çok sayıda primordial ve primer folikülün depolanmasına izin veren ovaryum dokusunun dondurularak saklanması en iyi seçenektir. Primordial foliküller, hormonal tedaviye ihtiyaç duymadan dışı üreme yaşamının herhangi bir aşamasında dondurularak saklanabilir (Donfack ve ark., 2017).

Ovaryum naklinin uygunluğu, doku kalınlığının doğru hazırlanmasını ve en uygun nakil bölgesinin bulunmasını gerektirmektedir. Ovaryumun doğal plastisitesi, yeniden damarlanabileceği ve normal fizyolojisini hızla restore edebileceği farklı bölgelere greftlemeyi kolaylaştırır. Ovaryum dokusu ortotopik olarak pelvis boşluğuna veya heterotopik olarak deri altı bölgelere, rektus kası ve subperitoneal dokunun (Donfack ve ark., 2017) yanı sıra böbrek kapsülüne veya yağ yatağına nakledilebilir. Böbrek kapsülüne transplantasyon, greft sağkalımını artıracak mükemmel kan temini nedeniyle daha çok tercih edilmiştir (Youm ve ark., 2015).

Ortotopik transplantasyonun ana avantajı, yardımcı üreme tekniklerine gerek duyulmaksızın doğal gebelik oluşabilmesidir. Dezavantajı ise, ovaryum boyutu nedeniyle sınırlı sayıda fragman nakledilebilmektedir. Ayrıca ciddi pelvik yapışmalara neden olabilen invaziv bir işlemdir (Demeestere ve ark., 2009).

Fareler üzerinde yürütülen bir çalışma, kriyoprezervasyon ile ovaryumun bir bütün olarak ortotopik nakli sonrasında ilk doğumu tanımlamıştır (Parrot, 1960). İnsanlarda, ovaryum dokusu kriyoprezervasyonu ve greftleme kullanılarak elde edilen ilk doğum Donnez ve ark. (2004) tarafından rapor edilmiş ve insan üreme tıbbında bir dönüm noktası olmuştur. Günümüze kadar dondurularak saklanan ovaryum dokusunun naklinden sonra 70 adet sağlıklı bebeğin doğumu (Silber, 2016) rapor edilmiştir.

Gosden ve ark. (1994) koyunlarda, yavaş dondurma ile dondurularak saklanan ovaryum dokusunun ortotopik ootransplantasyonundan sonra siklik aktivitenin, hamileliğin ve canlı

doğumun meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Santos ve ark. (2009), iki taraflı ovarektomize keçilerde küçük ovaryum parçalarının ortotopik ototransplantasyonu ve kriyoprezervasyonundan sonra hormon uygulamaksızın endokrin fonksiyonun geri kazanıldığını ve tam foliküler gelişim gösterdiğini bildirmişlerdir.

Heterotopik nakil işleminin avantajları; invaziv prosedürlerden kaçınma, greftin kolay erişilebilirliği, kortikal dilimler için artan kapasite, şiddetli pelvik yapışıklıklar ortotopik transplantasyonu engellese bile greftleme için uygunluk sağlar (Kim, 2012). Ayrıca genel anestezi kullanımı gerekli değildir ve nakledilen parçaların çıkarılması kolaydır (Filatov ve ark., 2016). Heterotopik transplantasyondan sonra doğal gebelik beklenemez ve bu yüzden gebelik için IVF gereklidir.

İnsan ovaryum dokusunun bağışıklığı yetersiz çıplak farelere (nude mice) ksenograflanması, ovaryum fonksiyonunu ve folikül gelişimini *in vivo* değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır (Van Eyck ve ark., 2009). Çıplak farelerde timus olmadığından olgun T lenfositleri üretmezler ve bu yüzden immün yanıtın birçok tipine karşı tepki oluşturamazlar. Böylece çıplak fareler allogreftleri hatta ksenogreftleri bile reddetmezler (Fransolet ve ark., 2015). Hayvan deneylerinde donmuş-çözdürülmüş ovaryum dokusunun transplantasyonu sonucunda antral folikül gelişiminin ve canlı doğumun meydana geldiği bildirilmiştir (Schubert ve ark., 2008; Donfack ve ark., 2017).

Dath ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, insan ovaryum dokusunun çıplak farelere ksenotransplantasyonunu intraperitoneal (IP), deri altı (SC), ovarian bursa (OB) boşluğu ve kas içi (IM) olmak üzere dört farklı bölgeye greftleyerek karşılaştırmışlar. Greftlemeden bir hafta sonra, dört bölgede de büyüyen foliküllerin görüldüğünü ve birkaç sekonder folikülün tespit edildiğini bildirmişlerdir. IP, SC, IM ve OB greftlemeden sonra foliküler aktivasyon gözlemlenmesine rağmen, hareketsiz primordial folikül havuzunun, greftleme bölgesinden bağımsız olarak, greftlemeden 3 hafta sonra tükenmediği bildirilmiştir. Böylece, dört aşılama bölgesinin tümünün, donmuş çözülmüş insan ovaryum dokusunun nakilden kısa süre sonra erken foliküler büyümeyi eşit olarak desteklediği ifade edilmiştir.

Sonuç

Birçok hastalık mekanizmasının açıklanamadığı günümüzde; doğru tedavi yöntemlerinin uygulanabilmesi için bu hastalık mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik çok sayıda çalışma yürütülürken; diğer yandan kök hücrelerin bu hastalıklarda nasıl ve hangi yollarla etki edeceği üzerine de bir takım çalışmalar yürütülmektedir. Böylece kök hücrenin elde edilmesi, nakli ve tedavi amacıyla kullanımı günümüzde en güncel konulardan biri olma

yolunda ilerlemektedir. Yapılan çalışmalar kök hücrelerin kullanımının oldukça önemli olduğunu göstermektedir. Yakın bir gelecekte, hastalıkların tedavisinde kök hücre, doku ve organ naklinin çok önemli bir uygulama alanına sahip olması beklenmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Araştırmacıların Katkı Oranı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Kaynaklar

Akar M, Genç MD, Kaya C, Çevik M., 2019. Spermatogonial kök hücre ve transplantasyonu/International Black Sea Coastline Countries Symposium-2.

Al-Hasani S, Demirel LC, Schopper B, Bals-Pratsch M, Nikolettos N, Kupker W, Ugur M, Sturm R, Diedrich K., 1999. Pregnancies achieved after frozen–thawed pronuclear oocytes obtained by intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa extracted from frozen–thawed testicular tissues from non-obstructive azoospermic men. Hum Reprod, 14(8): 2031–2035.

Andrades JA, Claros S, Palomo PJ, Puertas JML, Navas PZ, Guerado E, Monleon M, Araque MC, Becerra J., 2011. Skeletal regeneration by mesenchymal stem cells: What else?. Regenerative Medicine and Tissue Engineering-Cells and Biomaterials, 5, 107-144.

Aponte PM., 2015. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. World J Stem Cells, 7(4): 669-680.

Ateş U., 2016. Kök hücreyi tanıyalım. İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi, 1(1): 19-28.

Brinster RL, Zimmermann JW., 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc Natl Acad Sci, 91(24): 11298–11302.

Brinster RL, Nagano M., 1998. Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture. Seminars in Cell & Developmental Biology, 9(4): 401-409.

Brook PF, Radford JA, Shalet SM, Joyce AD, Gosden RG., 2001. Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. Fertil Steril, 75(2): 269–274.

Cannazik O, Polat B., 2014. Kök hücre ve veteriner hekimlikte uygulama alanları. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 9(3): 198-205.

Chen C, Ouyang W, Grigura V, Zhou Q, Carnes K, Lim H, Zhao GQ, Arber S, Kurpios N, Murphy TL, Cheng AM, Hassell JA, Chandrashekar V, Hofmann MC, Hess RA, Murphy KM., 2005. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature*, 436(7053): 1030-1034.

Chen SR, Liu YX., 2015. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction*, 149, 159–167.

Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL., 1996. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature*, 381(6581): 418–421.

Çerçi E, Erdost H., 2019. Kök hücre. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 14(2): 221-228.

Çevik M., 2020. Reprodüktif biyoteknoloji değerlendirme. Erişim: [avys.omu.edu.tr › storage › app › public › mfindik](http://avys.omu.edu.tr/storage/app/public/mfindik). Erişim tarihi: 20.04.2021

Dadoune JP., 2007. New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochem Cytobiol*, 45(3): 141–147.

Dalgın D, Meral Y., 2017. Stem cell therapy as a regenerative approach in veterinary medicine. *Van Veterinary Journal*, 28(2): 117-121.

Dath C, Van Eyck AS, Dolmans MM, Romeu L, Delle Vigne L, Donnez J, Van Langendonck A., 2010. Xenotransplantation of human ovarian tissue to nude mice: comparison between four grafting sites. *Human Reproduction*, 25(7): 1734-1743.

Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y., 2009. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod*, 15, 649–665.

Deak E, Seifried E, Henschler R., 2010. Homing pathways of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their role in clinical applications. *International Reviews of Immunology*, 29(5): 514–529.

Dobrinski I, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL., 1999. Computer assisted image analysis to assess colonization of recipient seminiferous tubules by spermatogonial stem cells from transgenic donor mice. *Mol Reprod Dev*, 53, 142-148.

Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL., 2000. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Mol Reprod Dev*, 57(3): 270–279.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4): 315-317.

Donfack NJ, Alves KA, Araújo VR, Córdova A, Figueiredo JR, Smitz J, Rodrigues APR., 2017. Expectations and limitations of ovarian tissue transplantation. *Zigot*, 25(4): 391-403.

Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Madrid BM, Langendonck AV., 2004. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, 364(9443): 1405–1410.

Donnez J, Dolmans MM, Pellicer A, Diazgarcia C, Serrano MS, Schmidt KT, Ernst E, Luyckx V, Andersen CY., 2013. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil Steril*, 99(6): 1503–1513.

Düzağaç F, Güven Ü, Açıkgöz E, Öktem G., 2013. Spermatogonial kök hücrelerde kendini yenileme ve farklılaşma sürecinde etkili moleküller. *Derleme*, 15(55): 256-260.

Dym M., 1994. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc Natl Acad Sci*, 91(24): 11287–11289.

Elçin YM., 2009. Embriyonik kök hücreler, kök hücre biyolojisi ve klinik uygulamalar. *TÜBA Raporları* 20, 23-28.

Erol H, Arıcan M., 2008. Atlarda tendinitisin kök hücre ile sağaltımı I: Kök hücre nedir? Veteriner hekimliğinde kullanım alanları nedir? *Veteriner Cerrahi Dergisi*, 14, 26-31.

Evans MJ, Kaufman MH., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156.

Filatov MA, Khramova YV, Kiseleva MV, Malinova IV, Komarova EV, Semenova M., 2016. Female fertility preservation strategies: cryopreservation and ovarian tissue in vitro culture, current state of the art and future perspectives. *Zygote*, 24, 635–653.

Fransolet M, Henry L, Labied S, Masereel MC, Blacher S, Noel A, Foidart JM, Nisolle M, Munaut C., 2015. Influence of mouse strain on ovarian tissue recovery after engraftment with angiogenic factor. *J Ova Res*, 8, 1-8.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN., 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4(5): 267-274.

Gade NE, Pratheesh MD, Nath A, Dubey PK, Amarpal G, Sharma T., 2012. Therapeutic potential of stem cells in veterinary practice. *Vet World*, 5(8): 499-507.

Gearhart JD, Addis RC., 2010. The use of animals in human stem cells research: past, present and future. *ILAR Journal*, 51(1): 1-2.

George B., 2011. Regulations and guidelines governing stem cell based products: Clinical considerations. *Perspect Clin Res*, 2(3): 94-99.

Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R., 1994. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at -196°C . *Hum Reprod*, 9(4): 597–603.

Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G., 2006. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 440(7088): 1199-1203.

Güneş AM., 2005. Kök hücre plastisitesi ve tıptaki kullanım alanları. *Güncel Pediatri*, 36- 42.

Heinrich A, DeFalco T., 2019. Essential roles of interstitial cells in testicular development and function. *Andrology*, 8(4): 903-914.

Herthel DJ., 2002. Suspensory desmitis therapies. *Proc 12th ACVS Symp*, 165-167.

Hess RA, Cooke PS, Hofmann MC, Murphy KM., 2006. Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell Cycle*, 5(11): 1164–1170.

Honaramooz A, Snedaker A, Boiani M, Scholer H, Dobrinski I, Schlatt S., 2002. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature*, 418(6899): 778–781.

Honaramooz A, Behboodi E, Megee SO, Overton SA, Homer HG, Echelard Y, Dobrinski I., 2003. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. *Biol Reprod*, 69(4): 1260–1264.

Honaramooz A, Megee SO, Rathi R, Dobrinski I., 2007. Building a testis: Formation of functional testis tissue after transplantation of isolated porcine (*Sus scrofa*) testis cells. *Biol Reprod*, 76(1): 43-47.

Hovatta O, Foudila T, Sieberg R, Johansson K, Von Smitten K, Reima D., 1996. Case report: Pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of spermatozoa from a frozen–thawed testicular biopsy specimen. *Hum Reprod*, 11(11): 2472–2473.

İnan S, Özbilgin K., 2009. Kök hücre biyolojisi. *Sağlıkta Birikim Dergisi*, 1, 11-23.

Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara T., 2003. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod*, 69(2): 612–616.

Kanatsu-Shinohara M, Takehashi M, Shinohara T., 2008. Brief history, pitfalls, and prospects of mammalian spermatogonial stem cell research. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 73, 17-23.

Karaşahin T., 2012. Embriyonik kök hücreler. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 9(1): 65-71.

Kervancıoğlu G., 2018. Kanser hastalarında fertilitenin korunmasında kullanılan kriyoprezervasyon yöntemleri. *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi*, 1(2): 17-26.

Kim JY., 2012. Control of ovarian primordial follicle activation. *Clin Exp Reprod Med*, 39(21): 10.

Koerner J, Nesic D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P, Grogan SP., 2006. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24(6): 1613-1619.

Kruse C, Danner S, Rapoport DH., 2008. Current stem cell technology: limitations and realistic expectations. *Engineering in Life Sciences*, 8(1): 13-18.

Lanza R, Gearhart J, Hogan B, Melton D, Pedersen R, Thomas ED, Thomson JA., 2005. *Essentials of stem cell biology II* nd Ed. Elsevier, Academic Press, ISBN 978-0-12-374729-7.

Lynch JA., 2011. *What are stem cells? Definitions at the intersection of science and politics*. Tuscaloosa, AL: University of Alabama Press.

Morgani SM, Canham MA, Nichols J, Sharov AA, Migueles RP, Ko MSH, Brickman J M., 2013. Totipotent embryonic stem cells arise in ground-state culture conditions. *Cell Rep*, 3(6): 1945-1957.

Nagano M, Patrizio P, Brinster RL., 2002. Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes. *Fertil Steril*, 78(6): 1225-1233.

Ogawa T, Arechaga JM, Avarbock MR, Brinster RL., 2003. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol*, 41(1): 111–122.

Ogawa T, Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL., 2000. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nat Med*. 6, 29–34.

Özen A, Gül Sancak İ., 2014. Mesenchymal stem cells (Msc) and stem cell applications in veterinary medicine. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 61(1): 79-84.

Özer A.(Ed.), 2018. *Temel Histoloji*. Bursa: Dora.

Pabuccuoğlu S., 2021. *Biyoteknoloji Ders Notu*. Erişim tarihi: 20.04.2021

Parrot DMV., 1960. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fertil*, 1(3): 230–241.

Pukazhenti B, Comizzoli P, Travis AJ, Wildt DE., 2005. Applications of emerging technologies to the study and conservation of threatened and endangered species. *Reprod Fertil Dev*, 18(2): 77-90.

Radford JA, Shalet SM, Lieberman BA., 1999. Fertility after treatment for cancer: questions remain over ways of preserving ovarian and testicular tissue. *BMJ*, 319(7215): 935–936.

Sağsöz H, Ketani MA., 2008. Kök hücreler. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1(2): 29-33.

Santos RR, Knijn HM, Vos PLAM, Oei CHY, Loon TV, Colenbrander B, Gadella BM, van den Hurk R, Roelen BAJ., 2009. Complete follicular development and recovery of

ovarian function of frozen–thawed, autotransplanted caprine ovarian cortex. *Fertil Steril*, 91(4): 1455–1458.

Schatten H., 2007. Introduction histology, cellular and molecular biology. In: *Comparative Reproductive Biology*. Ed.: Schatten H, Constantinescu GM, 64-65.

Schubert B, Canis M, Darcha C, Artonne C, Smitz J, Grizard G., 2008. Follicular growth and estradiol follow-up after subcutaneous xenografting of fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertil Steril*, 89(6): 1787–1794.

Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falciatori I, Kim J, Chavala S, Scherr DS, Zhang F, Torres R, Gale NW, Yancopoulos GD, Murphy A, Valenzuela DM, Hobbs RM, Pandolfi PP, Rafii S., 2007. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature*; 449(7160): 346-350.

Shetty G, Uthamanthil RK, Zhou W, Shao SH, Weng CC, Taylor RC, Hermann BP, Orwig KE, Meistrich ML., 2013. Hormone suppression with GnRH antagonist promotes spermatogenic recovery from transplanted spermatogonial stem cells in irradiated cynomolgus monkeys. *Andrology*, 1(6): 886–898.

Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Nakata K, Kurome M, Nagashima H, Toyokuni S, Kogishi K, Honjo T, Ogura A., 2002. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. *Hum Reprod*, 17(12): 3039–3045.

Silber S., 2016. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications. *J Assist Reprod Genet*, 33(12): 1595–1603.

Şahin İ., 1987. *Biyoteknoloji ve tarım*. Dergipark: 12(5).

Şahin F, Saydam G, Omay SB., 2005. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi*, 1(15): 48-56.

Şenel F., 2002. Kök hücreler. *Bilim ve Teknik Dergisi*, Şubat (eki), 1-15.

Takahashi K, Yamanaka S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *J Cell*, 126(4): 663- 676.

Tekeli S, Arısu Naghavi E, Gökçe B, Sır G, Yiğittürk G, Çavuşoğlu T, Uyanıkgil Y., 2016. Kök hücreler; mezenkimal kök hücreler ve güncel klinik uygulamaları. *İstanbul Bilim Üniversitesi Florence Nightingale Transplantasyon Dergisi*, 1(2): 72-83.

Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP., 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci*, 92(17): 7844-7848.

Thomson JA., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282.

Thore CB, Sudheer S, Janke D, Jagodzinska J, Jung M, Adjaye J., 2008. The origins of human embryonic stem cells: A biological conundrum. *Cells Tissues Organs*, 188(1-2): 9–22.

TÜBA. Kök Hücre Çalışma Grubu., 2009. Kök hücre biyolojisi ve klinik uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları, Sayı:20.

Ural AU., 2006. Kök hücre. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi*, 5, 3-4.

Van Eyck AS, Jordan BF, Gallez B, Heilier JF, Van Langendonck A, Donnez J., 2009. Electron paramagnetic resonance as a tool to evaluate human ovarian tissue reoxygenation after xenografting. *Fertil Steril*, 92(1): 374–381.

Yanar S, Açıkgöz Ş, Şahin E, Sarıkaya A., 2017. Spermatogonial kök hücre / Spermatogonial stem cell. *MMJ*, 4(1): 37-44.

Yıldız C, Mullen B, Jarvi K, McKerlie C, Lo K., 2013. Effect of different cryoprotectant agents on spermatogenesis efficiency in cryopreserved and grafted neonatal Mouse testicular tissue. *Cryobiology*, 67(1): 70–75.

Youm HW, Lee JR, Lee J, Jee BC, Suh CS, Kim SH., 2015. Transplantation of mouse ovarian tissue: comparison of the transplantation sites. *Theriogenology*, 83(5): 854–861.

Zheng Y, Thomas A, Schmidt CM, Dann CT., 2014. Quantitative detection of human spermatogonia for optimization of spermatogonial stem cell culture. *Human Reproduction*, 29(11): 2497-2511.

Patoloji Laboratuvarında Kullanılan Moleküler Yöntemler

Ayhan ATASEVER¹, Ali Sefa MENDİL², Ali GÜNGÖR^{3*}

¹Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kayseri

²T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı

³Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı, Osmaniye

¹<https://orcid.org/0000-0002-6327-1604>

²<https://orcid.org/0000-0003-2722-3290>

³<https://orcid.org/0009-0008-7985-0986>

*Sorumlu yazar: aligungor@osmaniye.edu.tr

Derleme

Makale Tarihiçesi:

Geliş tarihi: 08.01.2025

Kabul tarihi: 05.02.2025

Online Yayınlanma: 17.03.2025

Anahtar Kelimeler

İmmunohistokimya

İmmunofloresans

Western blot

İn situ hibridizasyon

ÖZ

Bu derleme makale, patoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan moleküler yöntemler hakkında bilgi vermek amacıyla yazılmıştır. İmmunohistokimyasal (IHC) ve immünofloresans (IF) boyama teknikleri, hücrelerde ve dokularda bulunan spesifik proteinleri ve molekülleri tespit etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. IHC, antijenlerin spesifik antikorlarla etkileşimiyle hücrelerdeki proteinlerin görsel olarak tespit edilmesini sağlar. IF boyama ise benzer şekilde floresan etiketli antikorlar kullanarak proteinlerin yerini belirler. Her iki yöntem de antijen-antikor etkileşimleri sayesinde protein ekspresyonunun belirlenmesine yardımcı olur. Western Blot (WB) yöntemi, hücre ve doku örneklerinden proteinlerin ayrılmasını ve tanımlanmasını sağlar. Bu yöntem, proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasına ve ardından hedef proteinelere karşı antikorlarla işaretlenmesine dayanır. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi, DNA'nın çoğaltılmasında kullanılan temel bir tekniktir. *In Situ* Hibridizasyon (ISH) ise hücrelerdeki nükleik asit dizilerinin tespit edilmesini sağlayan bir tekniktir. Bu yöntemlerin her biri, biyolojik örneklerin detaylı incelenmesinde önemli araçlar olarak kullanılır ve hücre analizlerinden genetik incelemelere kadar geniş bir yelpazede uygulama alanı bulur.

Molecular Methods Used in Pathology Laboratories

Reviews

Article History:

Received: 08.01.2025

Accepted: 05.02.2025

Available online: 17.03.2025

Keywords:

Immunohistochemistry

Immunofluorescence

Western blotting

In situ hybridization

ABSTRACT

This review article is written to provide information about the molecular techniques frequently used in pathology laboratories. Immunohistochemical (IHC) and immunofluorescence (IF) staining techniques are commonly used to detect specific proteins and molecules found in cells and tissues. IHC allows the visual detection of proteins in cells through the interaction of antigens with specific antibodies. Similarly, IF staining uses fluorescently labeled antibodies to determine the location of proteins. Both methods help in identifying protein expression through antigen-antibody interactions. The Western Blot (WB) technique enables the separation and identification of proteins from cell and tissue samples. This method relies on separating proteins according to their molecular weight, followed by labeling the target proteins with antibodies. Polymerase Chain Reaction (PCR) is a fundamental technique used for DNA amplification. *In Situ* Hybridization (ISH) is a technique that enables the detection of nucleic acid sequences in cells. Each of these methods serves as

Giriş

Moleküler patoloji, gen ifadesini morfolojiyle karşılaştırarak uygulamaya çalışan bir alandır ve çok sayıda hedefin doğruluğunu teyit etmek için gen ifadesi analizlerini kullanır (Sterchi ve Astbury, 2013). Patoloji alanında kullanılan immunohistokimya, *in situ* hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Western blot ve dizileme yöntemleri, moleküler değişikliklerin tespiti için yaygın olarak başvurulan tekniklerdendir (Netto ve ark., 2003; Mahmood ve Yang, 2012; Sarıoğlu, 2021). Moleküler patoloji teknikleri; Tüberküloz, HIV, hepatit B gibi birçok bulaşıcı hastalığın tanı ve tedavi rejimlerinin izlenmesinde klinik laboratuvarlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Netterwald, 2006). Bu moleküler teknikler, hastalığın fenotipini değerlendirmeksizin doku analizi ve doğrudan tanıya ulaşmamızı sağlayan güçlü yöntemlerdir. RNA veya DNA düzeyindeki anormallikleri tespit etmeye olanak tanırırlar. Yüksek hassasiyet ve özgüllük özellikleri taşıyan bu teknikler, günümüzde neoplastik hastalıklar, enfeksiyon hastalıkları ve genetik hastalıkların kimlik tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır (Ergin, 2004).

Bu derlemede, patoloji laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılan moleküler yöntemler arasında yer alan immunohistokimyasal ve immunofloresans boyama, Western Blot, PCR ve *in situ* hibridizasyon teknikleri hakkında kapsamlı bilgi sunulması amaçlanmıştır.

1. İmmunohistokimyasal ve İmmunfloresans Boyama

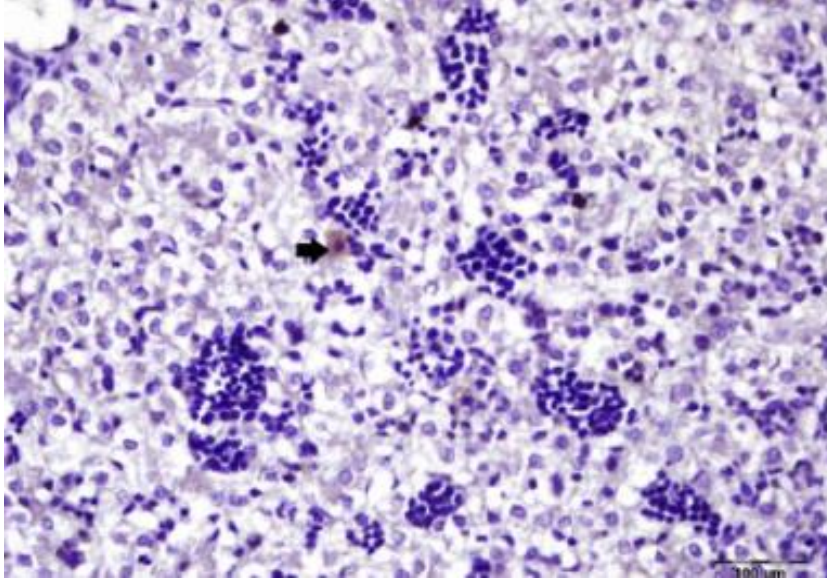
İmmunohistokimyasal (IHC) ve İmmunfloresans (IF) boyama hücrede veya dokuda bulunan bazı endojen ve eksojen maddelerin çeşitli kimyasal yollarla tepkimeye sokularak bulunduğu dokuda görünür hale getirilmesi amacıyla yapılmaktadır (Demir, 2001; Rosai, 2004). Hücre ve dokuda yer alan protein, aminoasit, karbonhidrat, lipid, enzim ve pigmentler bu boyama yöntemiyle histolojik kesitler alınarak gösterilmektedir (Mills, 1992). Bu maddeler dışında IHC ve IF boyamada hücre ve dokuda yer alan antijenik yapıların epitop bölgelerine özgü spesifik antikörlerin bağlanması sonucu hücre ve dokuda görünür hale getirilmesi esasına dayanmaktadır (Korgun, 2001; Weiss ve Görg, 2008).

Hücre ve dokulardan salınan protein ekspresyonunun şiddetini belirlemek ve dokudaki varlığını kanıtlamak için kullanılan güçlü tekniklerdir (Crowe ve Yue, 2019). IHC ve IF boyama teknikleri direkt yöntem ve indirekt yöntem şeklinde uygulanmaktadır. Direkt yöntem hücre ve dokuda bulunan proteinin spesifik primer antikör ile bağlanması sonucu gerçekleşmektedir.

İndirekt yöntemde ise dokuda ekspre edilen antijenin primer antikor ile işaretlendikten sonra sekonder antikor kullanılarak primer antikora bağlanması esasına dayanmaktadır. Direkt yöntem indirekt yöntemle göre daha az duyarlılığa sahip olduğu için indirekt yöntem daha yaygın kullanılmaktadır. Genel olarak hem IHC hem de IF yöntemde indirekt yöntemler kullanılmaktadır (Eugenio, 1998).

1.1. İmmunohistokimyasal (IHC) Boyama Prosedürü

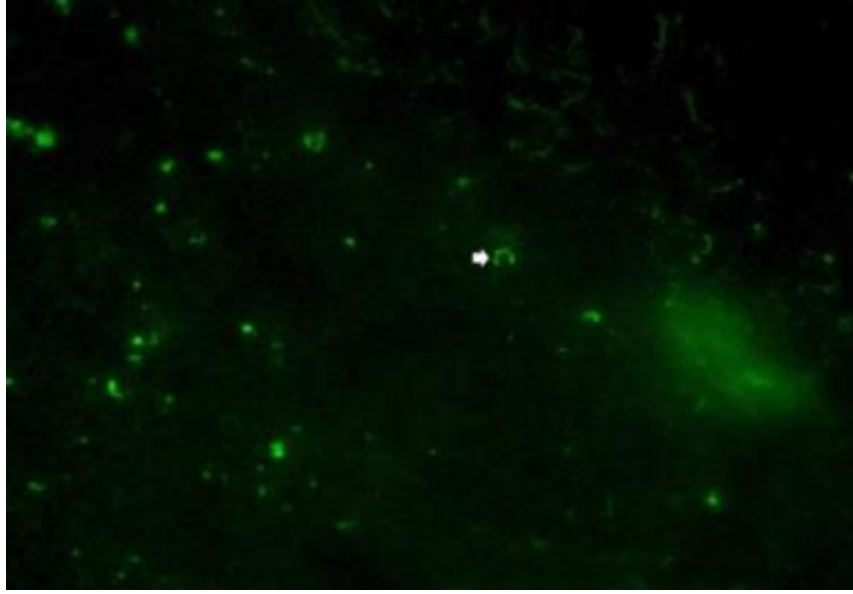
Dokulara deparafinizasyon ve dehidrasyon işlemi için ksilol-alkol serilerinden geçirilerek distile su ile yıkanır. Kesitler endojen peroksidaz aktivitesi önlemek için %3'lük Hidrojen Peroksit'de 10 dakika bekletilir. Bu prosedürde dahil olmak üzere her basamaktan sonra Fosfat buffer solüsyonunda (PBS) yıkanır. 10 mM citrate buffer solüsyonunda 10 dakika boyunca mikrodalga fırında kaynatılır. Kesitlerin üzerine bloking solüsyonunun dökülür ve 10 dakika beklenir. Primer antikor ile inkubasyona bırakılır (İnkubasyon süresi üretici firmaya göre değişmektedir). Biotinlenmiş sekonder antikor ile 30 dakika inkubasyona bırakılır. Streptavidin antikor ile tekrar 30 dakika inkubasyona bırakılır. DAB substrat+ DAB (Diaminobenzidine) Kromojen solüsyonu ile renklendirme yapılır. Daha sonrasında Hematoksilen ile zıt boyama yapılarak çeşme suyunda yıkama işlemine alınır. Son olarak kesitler alkol-ksilol serilerinden de geçirilerek, etellan damlatılıp mikroskopta altında incelenir (Anonim, 2024b).



Şekil 1. IHC boyama yöntemi ile *T. Gondii*'nin keçi karaciğerinde gösterimi(ok), (100µm), (Özkaraca ve ark., 2016).

1.2. İmmunfloresans (IF) Boyama Prosedürü

Dokulara deparafinizasyon ve dehidrasyon işlemi için ksilol-alkol serilerinden geçirilerek su ile yıkanır. Kesitler mikrodalga fırında 10 mM sodium citrate buffer (pH 6,0) ile 10 dakika kaynatılır. Distile su ile 5 dakika yıkanır. Kesitler içerisinde %3 H₂O₂'de bulunan metanol'de 15 dakika bekletilir. 5 dakika süreyle 2 kere yıkanır. Kesitler içerisinde %0,4 Triton X-100 (PBS-T) ve %1'lik normal goat serum bulunan PBS ile 10'ar dakika 2 kere yıkanır. %5 normal goat serum bulunan PBS-T ile oda ısısında 30 dk bekletilir. Primer antikor ile inkubasyona bırakılır (İnkubasyon süresi üretici firmaya göre değişmektedir). PBS ile yıkanır. %1 normal goat serum bulunan PBS-T ile 10'ar dakika süreyle 2 kere yıkanır. FITC bağlı bu sekonder antikorlar içerisinde %1 normal goat serum bulunan PBS-T ile uygun oranda dilüe edilerek oda ısısında 1,5 saat inkube edilir. Tekrar %1 normal goat serum bulunan PBS-T ile 10' ar dakika süreyle 2 kere yıkanır. DAPI damlatılarak mikroskopta incelenir (Anonim, 2024a).



Şekil 2. IF boyama yöntemi ile *T. Gondii*'nin koyun dalağında gösterimi(ok), (100µm), (Özkaraca ve ark., 2016).

2. Western Blot (WB) Yöntemi

Western Blot (WB) yöntemi hücre ve ya dokularda meydana gelen yapısal proteinleri belirlemek amacıyla uygulanan yaygın bir yöntemdir (Brianna, 2017). Dokularda yer alan karmaşık proteinlerin belirlenmesi, moleküler ağırlıklarına göre ayrılması, membrana transfer edilmesi ve istenilen primer ve sekonder antikorlarla işaretlenmesi esasına dayanmaktadır (Hubálek, 2009). Bu yöntem dokuda yer alan hedef proteinlerin varlığını, moleküler ağırlığını, karmaşık proteinlerin yapısını ve modifikasyonunu belirlemek için rutin olarak

kullanılmaktadır (Lin ve ark., 1985; Kurien ve Scofield, 2006; Bio-Rad Laboratories, 2011). Western blot yöntemi örneklerin hazırlanması, protein miktar tayini ve denatürasyonu, jel elektroforezi ile proteinlerin yürütülmesi, Proteinlerin membrana transferi ve Blokasyon, Primer ve Sekonder antikorla inkübasyon, görüntüleme ve analiz gibi aşamalardan oluşmaktadır (Sean ve ark., 2013).

2.1. Örneklerin Hazırlanması

Dokudaki proteinleri homojen hale getirebilmek için öncelikle bir doku parçalayıcısı olarak bilinen Tissue Lyser ile dokular küçük parçalara ayrılmaktadır (Angell ve ark., 2004; Wilson ve ark., 2007). Daha küçük parçalara ayrılan dokular hücre ve doku lizisi için RIPA (Radio Immun Precipitation Assay) adı verilen lizis tampon çözeltisinde proteaz inhibitörleri ile birlikte çözünerek örnekler hazırlanmaktadır (Cordwell, 2008; Weiss ve Görg, 2008).

2.2. Protein Miktar Tayini ve Denatürasyonu

Hazırlanan örneklerde protein miktarlarını belirlemek için Bradford veya BCA (Bicinchoninic Acid) yöntemleri kullanılmaktadır. BCA yöntemi spektrumu daha geniş olması ve Bradford yöntemine göre daha güvenilir sonuç vermesi sebebiyle daha çok tercih edilmektedir. BCA yönteminde örneklerdeki total protein miktarları ölçülmekte ve hesaplanmaktadır (Friedenauer ve Berlet, 1989; Walker, 1994). Protein miktarları hesaplanan örnekler protein denatürasyonunu sağlamak için içerisinde β -merkaptoetanol, gliserol, bromfenol mavisi, Tris-HCl (Trisaminomethane- Hydrochloric acid) ve SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) içeren bir yükleme tampon çözelti hazırlanır ve örneklerdeki proteinler denatüre olarak büyüklüklerine göre ayrılmaktadır (Hnasko ve Hnasko, 2015).

2.3. Jel elektroforezi ile Proteinlerin Yürütülmesi

Western Blot yönteminde jel elektroforezi için PAGE (Poly Acrylamide Gel Electrophoresis) yöntemi kullanılmaktadır. PAGE yöntemi yükleme ve yürütme jellerinden meydana gelmektedir. Kit halinde satılan bu jellerin içerisine APS (ammonium Persulfate), TEMED (Tetra Methyl Ethylene Diamine) ve Akrilamid gibi çözeltiler eklenerek polimerizasyon sağlanmaktadır. Oluşan örnekler içerisinde yürütme tampon çözeltisi (Tris+ SDS+ Distile su) bulunan Western Blot jel elektroforez tankına protein belirteciyle (β -actin, β -tubulin veya GAPDH) beraber kuyucuklara yüklenerek belirli sıcaklık, zaman ve voltajda yürütme işlemi gerçekleştirilmektedir. Yürütmedeki amaç negatif yüke sahip olan denatüre

proteinlerin uygulanan pozitif yüklü voltaj sayesinde yavaşlaması ve pozitif yöne doğru ilerlemesi esasına dayanır (Mahmood ve Yang, 2012).

2.4. Proteinlerin Membrana Transferi ve Blokasyon

Blotlama membranı için genellikle Nitroselülöz ve PVDF (Polyvinylidene fluoride) membranlar kullanılmaktadır. Nitroselülöz membranlar hassas ve yırtılmaya daha yatkın oldukları için PVDF membran daha çok tercih edilmektedir. Kullanılan PVDF membran ve filtre kağıtları membrana transfer öncesinde transfer tampon çözeltisi içerisinde (Tris+ Glisin+ Metanol+ Distile su) inkübe edilir. Transfer işlemi yarı-ıslak yöntemle gerçekleştirilmektedir. Jelde yer alan yürütülen proteinler yarı-ıslak transfer sistemi için kullanılan cihaza uygun şekilde (alt kısımda filtre kağıdı, üzerine PVDF membran, membran üzerinde proteinler yürütülen jel ve üst kısımda filtre kağıdı) koyularak belirli süre, sıcaklık ve voltajda transfer işlemi gerçekleştirilmektedir. Transfer işleminden sonra primer antikorun hedef proteine bağlanması için ve nonspesifik bağlanmayı engellemek için blokasyon işlemi uygulanmaktadır. Blokasyon için yağsız süt tozu veya BSA (Bovine Serum Albumin) tercih edilmektedir. Transfer edilen membran daha önceden hazırlanmış PBS-T (Photphate Buffered Saline- Twenn 20), yağsız süt tozu veya BSA ile oluşturulan çözeltide inkübe edilerek blokasyon işlemi gerçekleştirilmektedir (Kurien ve Scofield, 2006).

2.5. Primer ve Sekonder Antikorla İnkübasyon

Primer ve sekonder antikor üretici firmanın önerdiği konsantrasyonda ve uygun dilüsyonda hazırlanmalıdır. İstenilen proteini işaretlemek amacıyla membrana uygun dilüsyonda hazırlanan primer antikor üretici firmanın önerdiği şekilde membranda inkübe edilerek antikorun hedef proteine bağlanması gerçekleştirilmektedir. İnkübasyondan sonra membran PBS ile yıkanır ve primer antikora bağlanması için HRP (Horseradish Peroksidaz) ile konjuge sekonder antikor üretici firmanın önerdiği şekilde inkübe edilmektedir (Sandhu ve ark., 1991; Dubitsky ve ark., 2002; Alegria-Schaffer ve ark., 2009).

2.6. Western Blot Prosedürü

2.6.1. Çözelti ve Tamponların Hazırlanması

a) Lizis Tampon Çözeltisi: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM Sodyum Klorür, 1% Nonidet P-40 (NP-40) or 0,1% Triton X-100 0,5% sodium deoxycholate, 0,1% sodium dodecyl sulphate (SDS) 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM NaF, Proteaz İnhibitörü tablet (Roche)

b) Yükleme Tampon Çözeltisi; 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0,004% Bromfeneol mavisi, 0.125 M Tris-HCl, (pH 6,8 olmalı)

ç) Yürütme Tampon Çözeltisi; 25 mM Tris, 190 mM glycine 0,1% SDS

d) Transfer Tampon Çözeltisi; 25 mM Tris, 190 mM glycine, 20% methanol, (80kD ağırlığından daha büyük proteinler için ekstra olarak 0,1%.SDS ilave edilmeli)

e) Twenn-20 ve Tamponlu Tris Tampon Çözeltisi; 20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl 0,1% Tween 20

f) Bloklama Tampon Çözeltisi; 3% bovine serum albumin (BSA) in TBST

g) SDS-Jel Tampon Çözeltisi; 20 ml 10% SDS, 12,5 ml 0,5 M Tris HCl, (pH 6,8), 67, 5 ml ultra saf su, 0.8 ml 2-mercaptoethanol

2.6.2. Örneklerin Hazırlanması (Hücre Kültürü)

Hücre kültürü tabağını buza yerleştirin ve hücreleri, buzlu ortamda Tris tamponlu tuz (TBS) ile yıkayın. TBS ortamı uzaklaştırılır ve soğuk RIPA tamponu (100 mM tabak başına 1 ml) eklenir. Yapışan hücreler, soğuk bir plastik hücre kazıyıcı kullanarak tabaktan kazınır ve hücre süspansiyonu, önceden soğutulmuş bir mikrosantrifüj tüpüne yavaşça aktarılır. Tüp, 4°C'de 30 dakika boyunca sabit çalkalamaya bırakılır. 16.000 x g'de 20 dakika santrifüj edilir. Santrifüj tüpü nazikçe çıkarılır ve buz üzerine konulur. Bir protein testi yapmak için küçük bir hacimde (10–20 µl) lizat alınır. Her hücre lizati için protein konsantrasyonu belirlenir. Her numuneden 20 µg alınır ve eşit hacimde 2x Laemmli numune tamponu eklenir. Her hücre lizati, numune tamponunda 95°C'de 5 dakika kaynatılır. 16.000 x g'de 1 dakika mikrosantrifüjde santrifüj edilir.

2.7. Protein Ayırma ve Jel Elektroforezi

Moleküler ağırlık belirteçleri mini (8 x 6,7 cm) veya orta (13,3 x 8,7 cm) ölçekli SDS-PAGE jel kuyucuklarına eşit miktarda protein (20 µg) yüklenir. Jeli, 50 V'da 5 dakika çalıştırın. Çalışmayı yaklaşık 1 saat içinde bitirmek için voltajı 100-150 V'a yükseltin.

2.8. Protein Jelden Membrana Aktarılması

Jel, 10-15 dakika boyunca 1x transfer tamponunda bekletilir. Transfer kaseti monte edilir ve kasette hava kabarcığı kalmadığından emin olunmalıdır. Ayrıca, blot katot üzerinde ve jel anot üzerinde olmalıdır. Kaset, transfer tankına yerleştirilir ve tanka bir buz bloğu konulur. Soğuk odada 10 mA sabit akımda bir gece aktarılır (Alternatif olarak transfer, 30 dakika ile 2

saat arasında 100 V'da yapılabilir, ancak yöntemin farklı boyutlardaki proteinler için optimize edilmesi gerekmektedir).

2.9. Antikor İnkübasyonu

Membranı suyla kısa bir süre durulayın ve transfer kalitesini kontrol etmek için Ponceau S solüsyonuyla boyayın. Ponceau S solüsyonu, TBS-T ile üç kez yıkanarak durulanır. 1 saat boyunca oda sıcaklığında TBS-T içinde %3 BSA kullanarak blokasyon yapılır. Hedef proteine karşı primer antikor çözeltisi, 4°C'de gece boyunca inkübe edilir (Antikorum tutunma olasılığına bağlı olarak oda sıcaklığında 1-3 saat inkübasyon yapılabilir). Blot, 3-5 kez TBS-T ile 5 dakika boyunca yıkanır. HRP-konjuge sekonder antikor çözeltisiyle 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilir. Blot, 3-5 kez TBS-T ile 5 dakika boyunca yıkanır.

2.10. Görüntüleme ve Veri Analizi

Üreticinin önerilerine göre kemilüminesan substrat, membrana uygulanır. Kemilüminesan sinyalleri, CCD kamera tabanlı bir görüntüleyici tarafından görüntülenir. Hedef proteinlerin bant yoğunluğu, görüntü analiz yazılımı kullanılarak değerlendirilir ve bant yoğunlukları, moleküler ağırlıklarına göre detaylı olarak inceleme altına alınmaktadır (Anonim, 2024c).

3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu yöntemin ismi, DNA Polimeraz enzimi kullanılarak DNA'nın bir parçasını in vitro olarak çoğaltılmasından almaktadır. PCR yönteminde birkaç farklı düzenlemeyle üretilen DNA'nın çoğaltılmış milyonlarca kopyası arasından, istenilen kısma ait DNA parçasının bir ya da birkaç kopyasını elde edilmesi mümkündür (Bottore ve ark., 2003). Bu yöntemde kan, deri, saç, tükürük, virüs, bakteri gibi ajanlar olmak üzere farklı tipteki materyaller DNA kaynağı olarak kullanılmaktadır. PCR için gerekli olan yeterli miktarda DNA miktarının elde edilmesi ve elde edilen kopya DNA ürünlerinin analiz edilmesi laboratuvar yöntemleri ile sağlanır. Bu nedenle PCR hassas bir yöntemdir (Gabrilyan ve Avashia, 2013). Yöntemin uygulanmasında 'Termal Cycler' cihazı kullanılmaktadır. Termal Cycler belirli bir sıraya sahip DNA içeren örneğinin ısıtılması ve soğutulması üzerine kurulu bir sistemdir. Bu sistem; DNA'nın erime sıcaklığına gelerek, DNA replikasyon enzimleri için ısıtma ve soğutma reaksiyonlarının tekrar tekrar uygulanması, ısıya dayanıklı DNA Polimeraz enzimi, primer dizi ve dNTP (Deoxynucleoside triphosphate) karışımı kullanılmasına dayanır. İşlem sonunda, milyonlarca kopya DNA'nın çoğaltılması sağlanır. Denatürasyon, bağlanma ve uzatma işlemleriyle

istenilen DNA bölgesine bağlanabilen primer ile yeni-kopya DNA iplikler sentezlenmesine devam edilir ve DNA'dan yeni kopyalar üretilir (Sharkey ve ark., 1994; Elizabeth, 2007).

3.1. Konvansiyonel PCR

PCR'ın ilk yöntemi olan konvansiyonel PCR, 1980'lerde Kary Mullis tarafından geliştirilmiş ve 1994'te Nobel ödülü almıştır (Bruce ve ark., 1999). Yöntem hastalıkların teşhisinden, genetik değişimlere kadar tüm temel biyolojik süreçlerin ortaya konması açısından gerçek anlamda bir devrim yaratmıştır (Spolidorio ve Spolidorio, 2005). Üç aşamayı takip eder. Bunlar;

3.1.1. Denatürasyon

Sıcaklığın yükseltilmesiyle elde edilen iki DNA ipliğinin ayrılması aşamasıdır. İlk periyotta, denatürasyon sıcaklığı olarak adlandırılan 94°C'lik bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Bu sıcaklıkta, replikasyon sırasında matris görevi gören matris DNA denatüre edilir. çift sarmallı DNA, tek sarmallı DNA'ya denatüre edilir.

3.1.2. Hidridizasyon

İkinci aşama hibridizasyondur. Primer hibridizasyon sıcaklığı olarak ta adlandırılan bu aşamada, genellikle 40 ila 70°C arasındaki bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Sıcaklığın düşürülmesi, hidrojen bağlarının yeniden oluşmasına ve dolayısıyla tamamlayıcı şeritlerin hibridize olmasına izin verir. Primerler, amplifiye edilecek DNA'yı çevreleyen bölgeleri tamamlayan kısa tek sarmallı diziler, uzun sarmallı matris DNA'dan daha kolay melezenir. Hibridizasyon sıcaklığı ne kadar yüksekse hibridizasyon o kadar seçici, o kadar spesifiktir.

3.1.3. Elongasyon

Üçüncü ve son aşama olan bu kısım, uzama sıcaklığı olarak adlandırılan 72°C'lik bir sıcaklıkta gerçekleştirilir. Tamamlayıcı ipliğin sentezidir. 72°C'de Taq polimeraz, hazırlanmış tek sarmallı DNA'lara bağlanır ve reaksiyon karışımında bulunan Deoksiribonükleosit trifosfatları kullanarak replikasyonu katalize eder. Primerlerin aşağı akışındaki şablon DNA bölgeleri böylece seçici bir şekilde sentezlenir. Bir sonraki döngüde, önceki döngüde sentezlenen fragmanlar sırayla matristir ve birkaç döngüden sonra baskın türler, primerlerin melezenildiği bölgeler arasındaki DNA sekansına karşılık gelir. Analiz edilebilir miktarda DNA'yı (yaklaşık 0,1 µg) sentezlemek 20–40 döngü alır. Her döngü teorik olarak önceki döngüde bulunan DNA miktarını iki katına çıkarır (Pelt ve ark., 2008; Kadri, 2019).

3.2. Konvansiyonel PCR Protokolü

0,2 ml duvar kalınlığındaki PCR tüpleri için 96 kuyucuklu bir plaka soğuk ortama yerleştirilir (PCR reaktiflerinin soğuk ortamda PCR tüplerine eklenmesi, nükleaz aktivitesini ve nonspesifik primer bağlanmalarını önlemeye yardımcı olacaktır).

Steril su, 10X PCR buffer, dNTPs, MgCl₂, primer ve template DNA, 0,2 ml duvar kalınlığındaki PCR tüpleri içerisinde karıştırılır. PCR tüpü içerisine negatif kontrol hariç tüm reagent'ler aktarılır. Ek olarak bilinen bir DNA örneğini içeren diğer bir tüp ise pozitif kontrol olarak kullanılmalıdır. Kullanılacak olan Taq DNA polimeraz % 50 gliserol solüsyonunda muhafaza edilmektedir. Diğer PCR reaktifleri ile 20 kere pipetaj yapılarak iyice karışması sağlanır. Bu işlem yapılırken kabarcıkların oluşmamasına özen gösterilmelidir. PCR tüpü gerekli program ayarlandıktan sonra, Thermal Cycler cihazına yerleştirilerek işlem başlatılır.

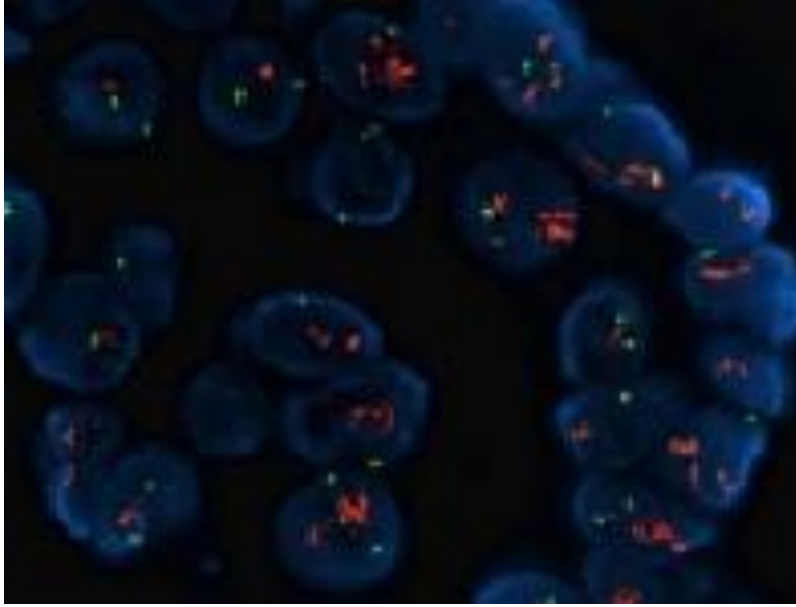
4. *İn Situ* Hibridizasyon (ISH)

İn Situ Hibridizasyon yöntemi hücre ve dokuların içinde yer alan nükleik asit dizilerini ve morfolojisini incelemeye dayanmaktadır. Hücrelerdeki kromozomal evreler, tümoral olgular, kromozom analizleri ve birçok sitogenetik çalışmalar için uzun yıllar bu teknik kullanılmıştır (Moter ve Göbel, 2000). Bu yöntem hücrelerde gen ekspresyonu yapılabilen en yaygın yöntemlerden birisidir. Kullanılan yöntemdeki amaç dışardan sentezlenen bir nükleik asit probunun hücredeki nükleik asit dizilimine mRNA sekansı ile hibridizasyon olayının gerçekleşmesine dayanmaktadır (Wilcox, 1993). Hedef DNA ve RNA sekanslarına doğrudan hibritlendiği için bu yöntem büyük bir avantaj sağlamaktadır (De Bault ve Gu, 2012). Hibritlenen nükleik asit dizilimleri kromojen *in situ* hibridizasyon (CISH) ve floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemleri ile tespit edilmektedir (Jensen, 2014).

4.1. Kromojen *İn Situ* Hibridizasyon ve Floresan *İn Situ* Hibridizasyon

Kromojen *İn Situ* Hibridizasyon yönteminin amacı dokuda yer alan gen tespit edilerek bir kromojen olan digoksinin bağlı bir prob ile hibritlenmesi ve peroksidasyon sağlanmasına dayanmaktadır. Floresan *İn Situ* Hibridizasyon yöntemi ise aynı amacı kapsamaktadır fakat bu yöntemde Floresan bağlı bir prob kullanılmaktadır ve floresan mikroskop gerekmektedir (Fischer ve ark., 2008). CISH yönteminin bir avantajı avidin-biyotin kompleksi kullanıldığı için örneklerin uzun süre saklanabilir ve rutin analizlerde ışık mikroskopunda incelenebilir olmasıdır. FISH yöntemi ise son derece hassas olması ve spesifik olması avantaj sağlamaktadır. Fakat FISH yönteminde floresan ışığına maruz kalması sonucu solması ve uzun süreli

incelenmemesi dezavantaj sağlamaktadır (Cremers ve ark., 1987; Cornelese-ten Velde ve ark., 1989; Robben ve ark., 1994; Kanda ve ark., 1998).



Şekil 3. FISH yöntemi ile meme kanseri tanısı (Kabakçı ve ark., 2016).

4.2. *In Situ* Hibridizasyon Protokolü

Parafin veya dondurulmuş kesitler hazırlanır.

4.2.1. Ön İşlemler

Dondurulmuş kesitler oda sıcaklığında ısıtılır ve 50°C de 15 dakika kurutulur. 2. Parafin kesitleri ise deparafinizasyon (15 dakika boyunca 2 kez ksilen ile muamele) ve rehidrasyon (5 dakika boyunca sırasıyla %100, %95, %90, %80, %70 etanol ve distile su) işlemi yapılır. Not: Eğer dokularda dökülme olursa 60°C de 1-2 saat ısıtılır.

4.2.2. Hibridizasyon

Dokular 20 dakika oda sıcaklığında DEPC-PBS (Diethyl Pyrocarbonate Phosphate-Buffered Saline) içinde %4 lük paraformaldehit ile sabitlenir. 2. Dokular oda sıcaklığında DEPC-PBS ile 5 dakika boyunca yıkanır. Dokular 10µg/ml Proteinaz-K ile 37°C de 8-15 dakika boyunca muamele edilir. Dokular DEPC-PBS içinde oda sıcaklığında yıkanır ve %4 lük paraformaldehit ile tekrar sabitlenir. Dokular ön hibridizasyon solüsyonu içinde 50°C de 3-4 saat hibridizasyon yapılır. Hibridizasyon solüsyonu içinde hibritlenen dokular + Prob

(Digoksinin işaretli prob: 2-4 ng/ul hibridizasyon solüsyonunda) 45°C de 12-16 saat hibritlenir (Eğer FISH yöntemi uygulanırsa Floresan işaretli prob gerekmektedir).

Not: Pre-hibridizasyon, hibridizasyon ve bloke edici solüsyon hacmi dokuyu kaplayacak şekilde olmalıdır. Dokular Immegde Pen ile daire içine alınmalıdır. Buharlaşmayı önlemek için su ile ıslatılmış kağıt havlu kullanılmalıdır.

4.2.3. Yıkama

Dokular 2x SCC ile 45°C de 10 dakika yıkanır. Dokular 1,5x SCC ile 45°C de 10 dakika yıkanır. Dokular iki kez 0,2x SCC ile 37°C de 20 dakika yıkanır. Dokular 1x bloklama solüsyonunda 1 saat inkübe edilir.

4.2.4. Digoksinin'in Antikor ile Bağlanması

Probun hassasiyetine göre dokuları 1: 100 ve ya 1: 1000 oranında seyreltilmiş PBS ile Alkalen fosfataz (AP) -konjuge anti-digoksinin antikor ile 1-4 saat boyunca ya da 4°C de gece boyunca inkübe edilir. Dokular oda sıcaklığında 3 kez 1x PBS ile 10 dakika yıkanır. Dokular oda sıcaklığında 1x Alkalen Fosfotaz tampon çözeltisinde 2 kez 5 dakika boyunca yıkanır. Dokuda yer alan hedef RNA'nın yoğunluğuna göre 1ml 1x Alkalen Fosfotaz tampon çözeltisine 6,6 µl NBT ve 3,3 µl BCIP eklenir ve oda sıcaklığında 2-20 saat arası inkübe edilir. NBT/BCIP (Bromo chloro fosfat indolyl/Nitro mavi tetrazolium)karışımı uzaklaştırılır ve dokular distile su ile yıkanır. Dokulara eğer gerekliyse Zıt boyama yapılır. Dokular kapatılarak mikroskopta incelenir (Anonim, 2024d).

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye benzer oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Kaynakça

Alegria-Schaffer A, Lodge A, Vattem K., 2009. Performing and optimizing western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods Enzymol*, 463, 573-599.

Angell CM, Wilson JY, Moore MJ, Stegeman JJ., 2004. Cytochrome P4501A1 expression in cetacean integument: Implications for detecting contaminant exposure and effects. *Marine Mammalian Sciences*, 20, 554-566.

Anonim., 2024a. İmmünohistokimyasal boyama yönteminde kullanılan protokol.http://images.novusbio.com/design/IHC_fluorescentFFPE_protocol.pdf. (Alınma Tarihi: 05.12.2024).

Anonim., 2024b. İmmünohistokimyasal boyama yönteminde protokol. <https://www.biologend.com/en-us/protocols/immunohistochemistry-protocol-for-paraffin-embedded-sections>.(Alınma Tarihi: 05.12.2024).

Anonim., 2024c. Western blot yönteminde kullanılan çalışma protokolüne ait bilgiler. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6376.pdf. (Alınma Tarihi: 05.12.2024).

Anonim., 2024d. İn situ hibridizasyon yönteminde kullanılan çalışma protokolü. <https://resources.amsbio.com/Datasheets/K2191050.pdf>. (Alınma Tarihi: 05.12.2024).

Bio-Rad Laboratories., 2011. Protein blotting guide, interactive pdf. review b, Bulletin 2895.

Bottero MT, Civera T, Nucera D, Rosati S, Sacchi P, Turi RM., 2003. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cows, goats, and sheeps milk in dairy products. *International Dairy Journal*, 13, 277-282.

Brianna Kim., 2017. Western blot techniques, molecular profiling: Methods and protocols, methods in molecular biology: Ed. Espina V. 1606.

Bruce A, Bray D, Johnson A, Lewis J, Rass M, Roberts K, Walter P., 1999. Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula. porto alegre: Artes Médicas Su.

Cordwell SJ., 2008. Sequential extraction of proteins by chemical reagents. *Methods Mol Biol*, 424, 139-146.

Cornelese-ten Velde I, Wiegant J, Tanke HJ, Ploem JS., 1989. Improved detection and quantification of the immuno peroxidase product using reflection contrast microscopy. *Histochemistry*, 92, 153-160.

Cremers AF, Jansen in de Wal N, Wiegant J, Dirks RW, Weisbeek P, van der Ploeg M, Landegent JE., 1987. Non-radioactive in situ hybridization. A comparison of several immunocytochemical detection systems using reflection-contrast and electron microscopy. *Histochemistry*, 86(6): 609–615.

Crowe AR, Yue W., 2019. Semi-quantitative determination of protein expression using immunohistochemistry staining and analysis: An integrated protocol. *Bio-Protocol*, 9(24): e3465.

De Bault LE, Gu J., 1996. In situ hybridization, in situ transcription, and in situ polymerase chain reaction. *Scanning Microscopy, Supplement 10*, 27–47.

Demir R., 2001. *Histokimya ve temel elemanlar. Histolojik Boyama Teknikleri*, Ankara, Palme, 195–225.

Dubitsky A, DeCollibus D, Ortolano GA., 2002. Sensitive fluorescent detection of protein on nylon membranes. *Journal of Biochemical Biophysical Methods*, 51, 47–56.

Elizabeth G., 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature Reviews Neuroscience*, 8, 481–488.

Eugenio S., 1998. *Methods in molecular biology. Mycoplasma protocols. Immunohistochemical staining of fixed tissues*. Humana press inc 999 riverview drive, New Jersey 07512.

Ergin M., 2004. Molecular pathology-moleküler patoloji. *Aegean Pathologist Journal*, 103-107.

Fischer I, de la Cruz C, Rivera AL, Aldape K., 2008. Utility of chromogenic in situ hybridization (cish) for detection of egfr amplification in glioblastoma: Comparison with fluorescence in situ hybridization (fish). *Diagnostic Molecular Pathology*, 17(4): 227-230.

Friedenauer S, Berlet HH., 1989. Sensitivity and variability of the bradford protein assay in the presence of detergents. *Analytical Biochemistry*, 178:263–268.

Gariyban L, Avashia N., 2013. Polymerase chain reaction. *J Investig Dermatol*, 133(3): e6.

Hnasko TS, Hnasko RM., 2015. The western blot. *Methods Mol Biol*, 1318, 87-96.

Hubálek Z., 2009. Epidemiology of lyme borreliosis. *Curr Probl Dermatol*, 37, 31-50.

Jensen E., 2014. Technical review: Insituhybridization. *The Anatomical Record*, 297, 1349-1353.

Kabakçı KA, Çapar A, Töreyn BU, Akkoç M, Borazan O, Türkmen İ, Ata LD., 2016. A multi-level thresholding based segmentation method for microscopic fluorescence in situ hybridization (fish) images, 24th Signal Processing and Communication Application Conference, Zonguldak, Turkey, 849-852.

Kadri K., 2019. Polymerase chain reaction (pcr): principle and applications, synthetic biology. *New Interdisciplinary Science*, 14, 237.

Kanda R, Suzuki M, Minamihisamatsu M, Furukawa A, Odaka T, Hayata I., 1998. Non-fluorescent chromosome painting using the peroxidase/diaminobenzidine (dab) reaction. *International Journal of Radiation Biology*, 73, 529-533.

Korgun ET., 2001. İmmünohistokimya uygulamalar ve örnek protokoller, histolojik boyama teknikleri. Editör: Demir R. Sayfalar: 285–305. Ankara, Palme.

Kurien BT, Scofield RH., 2006. Western blotting. *Methods*, 38(4): 283–293.

Lin JC, Choi EI, Pagano JS., 1985. Qualitative and quantitative analyses of Epstein-Barr virus early antigen diffuse component by western blotting enzyme-linked immunosorbent assay with a monoclonal antibody. *Journal of Virology*, 53(3): 793–799.

Mahmood T, Yang PC., 2012. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medicine and Science*, 4(9): 429-434.

Mills B., 1992. Immunohistochemistry, laboratory methods in histotechnology, armed forces institute of pathology, Ed. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Washington DC, 247–255.

Moter A, Göbel UB., 2000. Fluorescence in situ hybridization (fish) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41(2): 85–112.

Netterwald J., 2006. Molecular testing? Emerging technologies show promise for helping to prevent spread of the epidemic disease. *Advance for Medical Laboratory Professionals*, 17-18.

Özkaraca M, İrehan B, Parmaksız A, İtik Ekinci A, Çomaklı S., 2016. Koyun ve keçi abortlarında neospora caninum ve toxoplasma gondii' nin dubleks pcr, immunohistokimyasal ve immunfloresans yöntemlerle teşhisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 11(2): 200-206.

Pelt-Verkuil E, Belkum A, John PA., 2008. Brief comparison between in vivo dna replication and in vitro pcr amplification. principles and technical aspects of pcr amplification. Netherlands: Springer, 9-15.

Robben H, Van Dekken H, Poddighe PJ, Vooijs GP., 1994. Identification of aneuploid cells in cytological specimens by combined in situ hybridization and immunocytochemistry. *Cytopathology*, 5, 384-391.

Rosai J., 2004. Special techniques in surgical pathology. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*, 37-91.

Sandhu GS, Eckloff BW, Kline BC., 1991. Chemiluminescent substrates increase sensitivity of antigen detection in western blots. *Biotechniques*, 11, 14–16.

Sarioğlu S., 2021. Kanser tanı ve takibinde kullanılan moleküler yöntemler: moleküler patoloji yöntemleri ve biyoinformatik; immünohistokimyasal yöntemler, in situ hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu, yeni nesil dizileme. Aktaş S, Alakavuklar M, editörler, *Klinisyenler İçin Temel Onkoloji*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri, 45-50.

Sean CT, Thomas B, Geetha YA, Matt H., 2013. A defined methodology for reliable quantification of western blot data. *Mol Biotechnol*, 55i 217–226.

Sharkey DJ, Scalice ER, Christy KG, Atwood SM, Daiss JL., 1994. Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction. *Biotechnol*, 12, 506–509.

Spolidorio DMP, Spolidorio LC., 2005. Técnicas básicas de biologia molecular. in: estrela, c. metodologia científica ciência-ensino-pesquisa. São Paulo: Artes Médicas.

Sterchi DL, Astbury C., 2013. Molecular pathology. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 455–491.

Walker JM., 1994. The bicinchoninic acid (bca) assay for protein quantitation. *Methods Mol Biol*, 32, 5-8.

Weiss W, Görg A., 2008. Sample solubilization buffers for two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 424, 35-42.

Wilcox JN., 1993. Fundamental principles of in situ hybridization. *the journal of histochemistry and cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 41(12): 1725-1733.

Wilson JY, Wells R, Aguilar A, Borrell A, Tornero V, Reijnders P, Moore M, Stegeman JJ., 2007. Correlates of cytochrome p450 1a1 expression in bottlenosedolphin integument biopsies. *Toxicological Sciences*, 97(1): 111-119.