



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YEŞİL SENTEZ YOLUYLA Ag
NANOPARÇACIKLARIN HAZIRLANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE MEME HÜCRE
HATLARI ÜZERİNDE SİTOTOKSİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Ümran ATA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
Anabilim Dalı

Aralık-2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Ümran ATA

Tarih: 12.12.2022

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YEŞİL SENTEZ YOLUYLA Ag NANOPARÇACIKLARIN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE MEME HÜCRE HATTI ÜZERİNDE SİTOTOKSİK ETKİNİN İNCELENMESİ

Ümran ATA

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN

2022, 76 Sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN

Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Fatma ZİLİFDAR FOTO

Nanoparçacıklar, farklı içerik, boyut ve şekillerde kendilerine has kimyasal reaktivite ve antimikrobiyal, antienflamatuar, antiviral, antioksidan, yara iyileştirici ve antikanser gibi farklı fizikokimyasal özellik ve biyolojik aktivite gösteren malzemelerdir. Gümüş nanoparçacıkların yüksek antimikrobiyal etkinlik göstermesi, çok spektrumlu bir antibiyotik olması, yüksek derişimlerde bile toksisitesinin düşük olması gibi özellikler gümüşü birçok çalışma alanında kullanılabilir kılmaktadır. Nanoparçacık sentez yöntemlerinden, yeşil sentez kolay ve düşük maliyetli olması bununla birlikte düşük toksisite göstermesi nedeniyle çevre dostu bir yaklaşım olarak sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Kullanılan bitki özütleri doğada hâlihazırda bulunan, vücut savunma mekanizmasını yüksek oranda tehdit etmeyen, biyolojik orijinli ve çok fonksiyonlu nano platformlar hazırlamak için kullanılan materyaller olarak, özellikle biyoteknoloji ve tıp alanında çok ilgi görmektedir. Bu sebeplerden dolayı gümüş nanoparçacık sentezinde *Cotinus coggygia* Scop. (Duman Ağacı) bitkisinin su içindeki ekstraktı kullanılmıştır. Nanoparçacıkların sentezinde reaksiyon parametreleri optimize edilerek, çok küçük, homojen boyut dağılımlı ve sulu çözeltisinde kararlı nanoparçacıklar sentezlenebilmiştir, karakterizasyonları için UV/Görünür Bölge Spektrofotometresi, Elektron Mikroskobu (STEM), Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDX), Infrared Spektrofotometresi (FTIR), X Işını Kırınımı Difraktometresi (XRD) ve Zeta Potansiyeli cihazları kullanılmıştır. Sentezlenen gümüş nanoparçacıkların in vitro çalışmaları için üç meme hücresi hattı (MCF-7, MDA-MB-231 ve CRL 4010) kullanılarak, nanoparçacıkların sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir ve en yüksek sitotoksik etki MCF-7 hücrelerinde görülmüştür. Nanoparçacıkların hücreler üzerinde yarattığı apoptotik etkileri Hücre Akış Sitometresi kullanılarak değerlendirilmiştir. Apoptotik ölümün ise nanoparçacıklarla 48 saat muamele edilen MCF-7 kanser hücrelerinde, %93,48'e ulaştığı görülmüştür. Ag nanoparçacıklarının kanser hücrelerine karşı seçici toksisite ve apoptotik etki göstermesi in vivo kanser tedavisi için umut vaat edici bir sonuçtur ve bununla birlikte Ag nanoparçacıklarının antioksidan ve antibakteriyel etkinliğinin varlığının da gösterilmesi ile sentezlenen Ag nanoparçacıklarının potansiyel bir antikanser, antioksidan ve antibakteriyel ajanı olarak kullanım alanı bulacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ag Nanoparçacıklar, Antibakteriyel, Antikanser, Antioksidan, *Cotinus coggygia* Scop., Yeşil Sentez

ABSTRACT

MS THESIS

PREPARATION OF Ag NANOPARTICLES BY GREEN SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND INVESTIGATION OF CYTOTOXIC EFFECTS ON BREAST CELL LINES

Ümran ATA

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

Advisor: Assist Prof. Dr. Tuğba Nur ASLAN

2022, 76 Pages

Jury

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN

Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Fatma ZİLİFDAR FOTO

Nanoparticles are the materials carrying different physicochemical properties and biological activities such as unique chemical reactivity together with different content, size and shapes, and antimicrobial, antiinflammation, antiviral, antioxidant, wound healing, and anticancer activities. Properties of silver (Ag) nanoparticles such as high antimicrobial activity, being a multi-spectrum antibiotic, and low toxicity even at high concentrations make Ag usable in many fields of study. Green synthesis among the nanoparticle synthesis methods, is the frequently used method as an environmentally friendly approach due to its low toxicity together with its ease and low-cost properties. Plant extracts used for this purpose which are already present in nature and do not threaten the body defense mechanism at high extent, are of great interest especially in the field of biotechnology and medicine as materials used for the preparation of multifunctional nanoplatfroms with biological origin. Thus, the water extract of the *Cotinus coggygia* Scop. (Smoke Tree) plant was used in the synthesis of Ag nanoparticles. Nanoparticles with ultra-small sizes and homogenous size distributions and high stability in water could be synthesized by optimizing the reaction parameters in the synthesis. For their characterization, UV/Vis Spectrophotometer, Electron Microscope (STEM), Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX), X-ray Diffraction Spectroscopy and Zeta Potential instruments were used. Three kind of breast cell lines (MCF-7, MDA-MB-231 and CRL 4010) were used for *in vitro* studies of nanoparticles synthesized, the cytotoxic effects of nanoparticles on both cell types were determined by MTT test and the most cytotoxic effect of nanoparticles were observed on MCF-7 cells. The apoptotic effects of nanoparticles on cells were evaluated using Cell Flow Cytometry. It was observed that apoptosis reached %93,48 for MCF-7 cells after treating cells with nanoparticles for 48 hours. The selective toxicity and apoptotic effect of Ag nanoparticles against cancer cells is a promising result for *in vivo* cancer treatment, and it is thought that Ag nanoparticles synthesized will find use as a potential anticancer, antioxidant and antibacterial agent with the demonstration of the antioxidant and antibacterial activity of Ag nanoparticles.

Keywords: Ag Nanoparticles, Antibacterial, Anticancer, Antioxidant, *Cotinus coggygia* Scop., Green Synthesis

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca yoluma ışık tutan, bilgi, birikim ve tüm tecrübesini benimle paylaşan, desteğini esirgemedi ilgi ve hoşgörü ile davranan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezime katkılarından dolayı sayın Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU'na ve sayın Öğr. Gör. Fuat ASLAN'a, tez projemi destekleyerek gerekli maddi olanağı sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Çalışmalarımın baştan sona her aşamasında benimle birlikte çalışan, iyi ve kötü tüm anlarıma ortak olan sevgili arkadaşım Uzm. Moleküler Biyolog Kübra SEYHAN'a, laboratuvar arkadaşlarım Tuğba KILIÇ, Hasan SİVRİKAYA, Mohammed Lengichow KADİR ve Kübra Ece COŞKUNER'e, desteklerini her zaman hissettiğim kıymetli arkadaşlarım Raziye KOÇKESEN ve Havva Nur KIRATLI'ya teşekkür ederim.

Son olarak hayatım boyunca, her yerde desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen, yanımda olan sevgili ailem; düştüğümde kaldıran, neşe ve motivasyon kaynağım canım ablam Uzm. Fzt. Rabia Nur ATA'ya, canım annem Sevim ATA'ya ve canım babam Niyazi ATA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Ümran ATA
KONYA-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER VE TABLO DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xiii
1. Genel Bilgiler	1
1.1. Nanoteknoloji.....	1
1.2. Nanoteknolojinin Tarihi.....	1
1.3. Nanoteknolojinin Kullanım Alanları	2
1.4. Nanoparçacık Sentez Yöntemleri	4
1.4.1. Fiziksel Yöntemler.....	4
1.4.2. Kimyasal Yöntemler	5
1.4.3. Yeşil Sentez Yöntemi (Biyosentez).....	5
1.5. Nanoparçacık Sentezini Etkileyen Önemli Parametreler.....	9
1.6. <i>Cotinus coggygia</i> Scop. (Tetra) Bitkisi	10
1.7. Ag Nanoparçacıkları	11
1.8. Ag Nanoparçacıkların Biyolojik Fonksiyonları.....	12
1.8.1. Antikanser Etkileri	12
1.8.2. Antimikrobiyal Etkileri.....	12
1.8.3. Antifungal Etkileri	13
1.8.4. Antiviral Etkileri	13
1.9. Kanser	13
1.10. Meme Kanseri.....	15
1.11. Hücre Canlılığı Testi.....	16
1.12. Apoptoz.....	17
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal ve Kimyasallar.....	20
3.2. <i>Cotinus coggygia</i> Scop. Ekstraktının Hazırlanması	21
3.3. Ag Nanoparçacıklarının Sentezi	22
3.4. Ag Nanoparçacık Sentezinin Optimizasyonu	23
3.4.1. AgNO ₃ Derişiminin Etkisi	23
3.4.2. Bitki Ekstraktı Miktarının Etkisi.....	24

3.4.3. pH Etkisi	24
3.4.4. Reaksiyon Süresinin Etkisi	24
3.4.5. Reaksiyon Sıcaklığının Etkisi	24
3.5. Ag Nanoparçacıkların Karakterizasyonu	25
3.6. Hücre Hatları ve Büyütme Koşulları	26
3.7. Sitotoksikite Testi (MTT Testi).....	26
3.8. Aneksin-V/PI Boyaması (Akış Sitometri Analizi)	27
3.9. Antioksidan Aktivitesi Tayini.....	27
3.10. Antibakteriyel Aktivite Deneyleri	28
3.10.1. Besiyeri Hazırlanması.....	28
3.10.2. Bakteri Çoğaltma	29
3.10.3. Disk Difüzyon Yöntemi.....	29
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	30
4.1. Nanoparçacık Sentezinde Reaksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu.....	30
4.1.1. Ekstrakt Etkinliğinin İncelenmesi.....	30
4.1.2. Ag Nanoparçacıkların Sentezine AgNO ₃ Derişiminin Etkisi	31
4.1.3. Ag Nanoparçacıkların Sentezine Ekstrakt Miktarının Etkisi.....	32
4.1.4. Ag Nanoparçacıkların Sentezine Reaksiyon pH' sının Etkisi	34
4.1.5. Ag Nanoparçacıkların Sentezinde Reaksiyon Süresinin Etkisi	35
4.1.6. Ag Nanoparçacıkların Sentezinde Reaksiyon Sıcaklığının Etkisi.....	36
4.2. Karakterizasyon Sonuçları.....	37
4.2.1. STEM ve EDS Analizi.....	37
4.2.2. FT-IR Analizi.....	41
4.2.3. X-Işını Difraktometresi (XRD) Analizi	44
4.2.4. Zeta Potansiyeli Analizi.....	45
4.3. Sitotoksikite Testi (MTT Testi).....	46
4.4. Aneksin-V Apoptoz Analizi (Akış Sitometresi Analizi)	51
4.5. Antioksidan Aktivite.....	56
4.6. Antibakteriyel Aktivite	57
5. İstatistiksel Analiz.....	60
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	61
6.1 Sonuçlar ve Öneriler	61
6. KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Nm : Nanometre

Μl : Mikrolitre

Μl : Mililitre

Mm : Milimolar

Mg : Miligram

G : Gram

Z : Zeta Potansiyeli

Ppm : Milyonda bir

K : Kelvin

°C : Santigrat

Rpm : Dakikada Devir Sayısı

Ph : Potansiyel Hidrojen Değeri

Dk : Dakika

OD : Optik Dansite

Kısaltmalar

Ag	: Gümüş
MCF-7	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
MDA-MB-231	: İnsan Meme Metastatik Adenokarsinomu
CRL-4010	: Non-Metastaz Meme Hücre Hattı
PBS	: Fosfat Buffer Saline Solusyonu
MTT	: 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid
PI	: Propidium Iodide
MHA	: Mueller Hinton Agar
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil
FITC	: Floresan İzotiyosianür
FBS	: Fetal Bovine Serum
IC	: İnhibisyon Yüzdesi
IC ₅₀	: Yarı-Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonu
ATCC	: Amerikan Hücre Kültürü Koleksiyonu
ICP-MS	: İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi
TEM	: Geçirimli Electron Mikroskopisi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometresi
XRD	: X-Işını Kırınımı
EDX	: Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi

ŞEKİLLER VE TABLO DİZİNİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Kadın ve erkekte dünya geneli 2020 tahmini yeni vaka sayısı.	15
Şekil 2. Kadın ve erkekte dünya geneli 2020 tahmini ölüm sayısı.....	15
Şekil 3. Meme kanseri hücresi.....	16
Şekil 4. MTT kimyasal yapısı.....	17
Şekil 5. Ag nanoparçacıklarının sentezinin şematik gösterimi.....	23
Şekil 6. Ag nanoparçacıkların oluşumunda bitki ekstraktının etkisi 1. Saat (mavi) ve 24. saat (turuncu) spektrumları	30
Şekil 7. 3 mM, 6mM, 9mM AgNO ₃ kullanılarak sentezlenen Ag nanoparçacıkların UV/Görünür Bölge absorpsiyon spektrumları.....	31
Şekil 8. Farklı miktarlarda bitki ekstraktı kullanılarak sentezlenen Ag nanoparçacıkların UV/Görünür Bölge absorpsiyon spektrumları.....	32
Şekil 9. Ag nanoparçacıkların ve bitki ekstraktının farklı pH optimizasyonu için UV / Görünür bölge analizi	34
Şekil 10. Ag nanoparçacıklarının sentez sırasında belirli aralıklarda alınan örneklerinin UV / Görünür bölge spektrumları.....	35
Şekil 11. Ag nanoparçacık sentezinde sıcaklık optimizasyonu için UV / Görünür bölge analizi.....	36
Şekil 12. a. pH: 5' de, b. pH: 7' de, c. pH: 9' da sentezlenen Ag nanoparçacıklarının STEM görüntüleri skala: 40, 40, 30 nm.....	38
Şekil 13.a. 25 °C' de, b. 85 °C' de, sentezlenen Ag nanoparçacıklarının STEM görüntüleri skala: 40 nm.	39
Şekil 14. a. 85 °C' de, sentezlenen Ag nanoparçacıklarının STEM görüntüsü skala: 100 nm. b. STEM görüntüsünden elde edilen boyut dağılım grafiği.	40
Şekil 15. Ag nanoparçacığına ait EDS analizi.....	41
Şekil 16. Cotinus Coggyria Scop. ekstraktı (mavi) ve Ag nanoparçacıklarına (kırmızı) ait FTIR spektrumları.....	42
Şekil 17. Ag nanoparçacığın XRD deseni.	44
Şekil 18. Ag nanoparçacığın Rietveld deseni	44
Şekil 19. Ag nanoparçacık sait zeta potansiyeli grafiği.....	45
Şekil 20. 5 farklı derişimdeki (3.125 ppm, 6.25 ppm, 12.5 ppm, 25 ppm ve 50 ppm) Ag nanoparçacık ile 24 saat ve 48 saat inkübe edilmiş CRL-4010 hücrelerine ait toksisite grafiği.....	47
Şekil 21. 5 farklı derişimdeki (3.125 ppm, 6.25 ppm, 12.5 ppm, 25 ppm ve 50 ppm) Ag nanoparçacık ile 24 saat ve 48 saat inkübe edilmiş MDA-MB-231 hücrelerine ait toksisite grafiği	47
Şekil 22. 5 farklı derişimdeki (3.125 ppm, 6.25 ppm, 12.5 ppm, 25 ppm ve 50 ppm) Ag nanoparçacık ile 24 saat ve 48 saat inkübe edilmiş MCF-7 hücrelerine ait toksisite grafiği	47
Şekil 23. A) Kontrol (Nanoparçacık uygulanmamış) CRL-4010 hücre hattı B) Nanoparçacık uygulanmış (50 ppm) CRL-4010 hücre hattı	

.....	48
Şekil 24. A) Kontrol (Nanoparçacık uygulanmamış) MDA-MB-231 hücre hattı B) Nanoparçacık uygulanmış (50 ppm) MDA-MB-231 hücre hattı	
.....	48
Şekil 25. A) Kontrol (Nanoparçacık uygulanmamış) MCF-7 hücre hattı B) Nanoparçacık uygulanmış (50 ppm) MCF-7 hücre hattı	
.....	48
Şekil 26. 50 ppm Ag nanoparçacıkları ile 24 saat muamele edilmiş CRL-4010, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları ve kontrol grubu için akış sitometrisi ölçümü analizi sonuçları.....	50
Şekil 27. 50 ppm Ag nanoparçacıkları ile 48 saat muamele edilmiş CRL-4010, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları ve kontrol grubu için akış sitometrisi ölçümü analizi sonuçları.....	51
Şekil 28. 50 ppm olan Ag nanoparçacık ile muamele edilmiş CRL-4010 hücre hattına ait 24. saat ve 48. saat % apoptoz grafiği.....	52
Şekil 29. 50 ppm olan Ag nanoparçacık ile muamele edilmiş MCF-7 hücre hattına ait 24. saat ve 48. saat % apoptoz grafiği	
.....	52
Şekil 30. Derişimi 50 ppm olan Ag nanoparçacık ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücre hattına ait 24. saat ve 48. saat % apoptoz grafiği	
.....	53
Şekil 31. 41. 300 ppm, 200 ppm, 150 ppm, 100 ppm ve 50 ppm Ag nanoparçacıklarının ve kontrol olarak kullanılan askorbik asitin % inhibisyon değerleri (n=3).	
.....	56
Şekil 32. A) E.Coli B) S.Aureus bakterilerinde kontrol su, antibiyotik ve 643 ppm, 321 ppm ve 160 ppm derişimdeki Ag nanoparçacıkların oluşturduğu zonlar (K(kontrol): Saf Su, A(antibiyotik): Ampisilin)	
.....	58

TABLÖLAR

Tablo 1. Literatürden bitki özütleriyle yapılan nanoparçacık sentezleri	8
Tablo 2. Deneyde Kullanılan Kimyasallar.....	20
Tablo 3. Deneyde Kullanılan Cihazlar.....	21
Tablo 4. Ag nanoparçacıkların ve <i>Cotinus Coggygia</i> Scop. ekstraktının FTIR spektrumlarından elde edilen bantların dalgasayıları (cm ⁻¹).....	43
Tablo 5. <i>S. Aureus</i> ' da oluşan zon çapları.....	58
Tablo 6. <i>E. Coli</i> ' de oluşan zon çapları.....	58

1. Genel Bilgiler

1.1. Nanoteknoloji

Nano kelimesi Yunanca'da 'cüce' anlamına gelmektedir ve metrenin milyarda biri kadar olan bir ölçüdür ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) (AltSansun, 2020). Nanoteknoloji ve nanobilim 1 ile 100 nanometre arasında değişen boyutlarda elde edilen malzemelerin sentezi ve tasarımı ile ilgilenen önemli bir araştırma alanıdır (Ebrahimzadeh, 2020). Hızla gelişen ve gelişmekte olan nanoteknoloji, bir maddeye atom seviyesinde veya moleküler seviyede değişiklikler kazandırarak, maddeye yeni özellikler kazandırmayı amaçlamıştır (Beykaya, 2015). Nanoteknolojinin amaçları arasında daha küçük, daha hafif, daha dayanıklı ve daha hızlı yapılar geliştirmek ve daha az malzeme ile enerji kullanımını sağlayarak alışıldan daha farklı üstün malzemeler elde etmek, nano boyuttaki yapıların fiziksel özelliklerinin anlaşılmasını sağlamak, nanometre ölçekli boyutların analizini gerçekleştirmek olarak karşımıza çıkmaktadır. Temelde fizik, kimya, biyoloji, malzeme bilimi, mühendislik gibi çalışma alanlarını birleştiren nanoteknoloji; biyomedikal, nano tıp, farmasötik gibi uygulama alanlarında kullanılmak üzere nano ölçekte malzemelerin geliştirilmesini sağlamaktadır (Parveen, 2016). Aynı zamanda gıda, yem, kozmetik gibi büyük alanlarda da nanoteknolojik yaklaşımlar uygulanmaktadır (Rana & Kalaichelvan, 2011).

1.2. Nanoteknolojinin Tarihi

1925'de Nobel Kimya Ödülü alan Richard Zsigmondy altın kolloidler gibi partiküllerin büyüklüğünü ölçmek amacıyla mikroskop kullanarak ölçen ve 'nanometre' kavramını kullanılmasını da öneren ilk bilim insanı olmuştur (Hulla, 2015). "İleri düzey duyarlılıkla mevcut teknolojilerin küçültülmesine dayalı bir teknoloji" olarak adlandırılan nanoteknoloji terimini ilk kez 1974 yılında Tokyo Science Üniversitesi'nden Prof. Norio Taniguchi kullanmıştır (Ramsden, 2005). Çalışmalarını Feynman'ın görüşleriyle destekleyen bir fizikçi bilim insanı Eric Drexler, atom ve moleküller ile çalışmalar yaparak, nano ölçekte moleküler mekanizmalardan bahsetmiştir. Feynman'ın savunduğu fikri ve çalışmaları nanobilimin şekillenmesinde ve gelişmesinde önemli rol oynamıştır (Hulla, 2015). Böylece 21. Yüzyılın başlarında nanoteknoloji ve nanobilim alanlarına gösterilen ilgi oldukça artmıştır (Hulla, 2015). Taramalı Tünelleme Mikroskobu (TTM) 1981 yılında nano ölçekli yapılan görüntülenmesinde kullanılmıştır. Sonraki yıllarda ise

Atomik Kuvvet Mikroskopunun icat edilmesi ile birlikte nanoteknolojinin gelişmesi hız kazanmıştır (Çiftçi, 2019). 1990'ların ilk yıllarında nano üretiminin babası olarak bilinen Richard Smalley ile birlikte bir grup araştırmacı geliştirdikleri nano ölçekli, ısı ve elektrik geçirgenlik özellikleri bulunan fulleren molekülleriyle 1996 yılında Nobel Kimya Ödülü kazanmışlardır (Çiftçi, 2019). Nanoteknolojiye yeni bir boyut kazandıran Sumio Iijima isimli bir araştırmacı 1991 yılında karbon nanotüpleri bulmuştur. Son yıllarda nano boyutta üretilen yapılar ve yürütülen çalışmalar büyük önem kazanarak farkındalık ortaya koymaktadır. 1991 yılında Amerika Birleşik Devletleri ile Avrupa Birliği 2001 yılında nanoteknoloji alanındaki çalışmalara öncelik vermişlerdir. Bu teknoloji yarışında önlerde olabilmek adına Japonya, Çin, İsrail, Tayvan gibi ülkeler de benzer çalışmalarını hızlandırmışlardır. Çinko Oksit nanomalzemelerin 2001 yılında yapılması ve sonralarda 2002 yılında süper örgü nanotellerin yapılması ve ilk dört tekerlekli nano araba modelinin oluşturulması bu alandaki önemli gelişmelerden olmuştur (Ersöz, 2018). Tel Aviv Üniversitesi'nde nanobiyoteknolojinin gelişmesi ile ilgili 2008 yılında bir rapor hazırlanmıştır. Hazırlanan bu rapora göre hücre içi analizlerin yapılması, yapay sistemlerin kendi kendini onarabilmesi, insan organlarının iç yapılanmasının tanımlanması, vücut içi nano makineler son yıllarında yapılması beklenen gelişmelerden olduğu bildirilmiştir. (Tüylek, 2019).

1.3. Nanoteknolojinin Kullanım Alanları

Nano boyutta üretilen malzemelerin yüzey/hacim oranlarının yüksek olması nanoteknoloji alanını diğer alanlardan ayıran bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu oranın yüksek olması üretilen malzemenin yüzeyinde bulunan atomların artması anlamına gelmekte ve böylelikle malzeme üzerinde istenilen değişiklikler yapılabilmektedir. Bu anlamda, nanoteknolojinin kullanım alanı oldukça genişlemektedir. Tıp, kimya, fizik, biyoloji, bilgisayar, farmasötik gibi alanlarda bu teknolojinin kullanımı yaygınlaşmaktadır (Hulla, 2015). Nanoteknolojinin günlük yaşantımızda kullanımına birçok örnek gösterilebilmektedir. Nanoteknolojik ürünlere örnek olarak günümüzde kullanılan antibakteriyel sıvı sabunlar, koku ve leke tutmayan aynı zamanda antibakteriyel de olan tekstil ürünleri, kozmetik ürünler gibi malzemeler karşımıza çıkmaktadır (Miller, 2008; Beykaya ve Çağlar, 2015). Nanoteknoloji uygulamaları özellikle tıp ve diş hekimliği gibi alanlarda eskiden beri kullanılmakta ve günümüzde de kullanımı ön plana çıkmaktadır. Örneğin diş hekimliği uygulamalarında

nano hibrit rezinler, nano adezinler ya da nano doldurucular nanomalzeme olarak kullanılmaktadır (Gupta,2013). Nanoteknolojinin bir diğer kullanım alanı da tarımsal uygulamalardır. Özellikle bitki hastalıklarının tespitinde ve bu hastalıkların önlenmesinde ve bu hastalıklara sebep olan toksik tarım ilaçlarının tespitinde, bunun yanında etkili gübre üretimi ve pestisit üretiminde kullanımı mevcuttur (Joseph ve Morrison, 2006; Nuruzzaman ve ark., 2016). Nanoteknolojinin çok fazla kullanılan alanlarından biri olan tıp alanında da hastalıkların teşhisine ve tedavisine yönelik yaklaşımlar bulunmaktadır. Nano tıp özellikle son yıllarda ilaç ya da aşı gibi terapötiklerin vücuda daha kolay taşınabilmesini sağlamaktadır (Turgut ve ark.,2010). Kanseri tedavisinde ilaçların kanserli hücrelerle birlikte sağlıklı hücreleri de etkilemesi büyük sorun teşkil etmektedir. Bu anlamda nanoteknoloji sayesinde geliştirilen özel taşıyıcılar bu tarz handikapların önüne geçerek yalnızca kanserli hücrelere etki eden bir tedavi sunmaktadır (Sajja.2009). Bu anlamda nanoteknolojinin teşhis ve tedavi alanlarında yaygın bir şekilde kullanımı söz konusu olmuştur. Nanoteknolojinin kullanılmasıyla birlikte kanser tedavisinde, AIDS tedavisinde, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde, oküler hastalıkların tanı ve tedavisinde, solunum yolu hastalıkları tedavisinde hızlı ilerlemeler ve gelişmeler kaydedilmiştir (Rudolph ve ark., 2004). Aynı zamanda foto termal tümör ablasyonunda ve ilaç moleküllerinin hücre içine seçici transportunda ve yine nükleer uygulamalarda nanoteknolojiden faydalanılmaktadır (O'Neal ve ark., 2004). Nanoteknoloji sayesinde, çok küçük boyutlarda nano-robotlar üretilmektedir. Üretilen bu nano-robotlar teşhis ve tedavi amaçlı, hasarlı dokulara oksijen sağlanması, dolaşım sistemindeki toksik maddelerin metabolizması, çeşitli hastalıkların izlenmesi ve teşhisi, serebral kapiller obstrüksiyonlarında nano tüpler ile bu obstrüksiyonların giderilmesi gibi birçok alanda kullanılabilmektedir (Turgut, 2011). Nanoteknolojik ürünler insan vücudunun her bölgesinde (diş veya kapiller damar içerisine vb.) konumlandırılabilir. Bu teknolojinin bir ürünü olan çipler ve özel donanımlar sayesinde canlı organizmalar kontrol edilebilmektedir (Dağlıoğlu ve Yavuz, 2020). Günümüze kullanılan sistemik dolaşıma doğrudan geçen ve vücutta homojen bir şekilde dağılan ilaçların karaciğer, beyin, böbrek gibi organlar üzerinde yan etkiler oluşturduğu bilinmekle birlikte bu tür uygulamaların dezavantajları göz önünde bulundurulduğunda farklı ve etkili bir yaklaşım olan nanoparçacıklarla ilacın hedeflendirilmesi karşımıza çıkmaktadır. Bu yöntem sayesinde ilaç doğrudan hastalıklı bölgeye veya hastalıklı dokuya iletilecek ya da nano tabancalar gibi uygulama ile doğrudan hücrelere verebilecektir (Nie ve ark., 2007). Nanoteknoloji ile yapılan tedavilerde nano kapsüller çoğunlukla kullanılmaktadır. Bu

kapsüllere ilaç etken madde yüklenmekte ve bir enjektör yardımı ile hedef bölgeye verilmektedir. Bir sonraki aşamada ise bu nano kapsüller patlatılmakta ve sadece gerekli bölgelere etken madde etki etmektedir (Farokhzad ve Langer, 2006).

1.4. Nanoparçacık Sentez Yöntemleri

Nanoteknolojideki gelişmelerle birlikte, farklı özelliklerde geniş bir ürün aralığında nanomalzeme üretimi yapılabilmektedir. İstenilen türde ve istenilen boyutta nanoparçacıkların sentezlenmesi mümkündür (sandviç şeklinde, boşluk içeren, çubuk veya küresel şeklinde, metal, polimer, seramik yapılı vb.) (Liveri, 2006). Nanoparçacıkların sentezlenmesinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak üç farklı yaklaşım mevcuttur.

1.4.1. Fiziksel Yöntemler

Fiziksel yöntemler arasında elektroliz, buharlaşma-yoğunlaşma, lazer ablasyonu, püskürtme biriktirme, difüzyon, piroliz, yüksek enerjili bilyeli öğütme ve plazma arkı gibi metotlar bulunmaktadır. Atmosferik basınçta bir tüp fırın kullanılarak buharlaştırma-yoğunlaştırma metodu kullanılmaktadır. Bu metotta kullanılan tüp fırının büyük bir alan kaplaması, çok fazla enerji harcaması ve çok zaman alıcı olması dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır. Lazer ablasyon metodu ise farklı çözücüler içerisinde kolloidal nanoparçacıklar sentezlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bazı inert gazların altında veya vakum altında bu lazer ablasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu metodun önemli bir avantajı kullanılan solüsyonlarda kimyasal reaktiflerin bulunmamasıdır. Yüksek enerjili bilyeli öğütme metodunda yüksek darbeleri çarpışmalar kullanılmasıyla herhangi bir kimyasal değişiklik olmadan malzemeleri nano kristal yapılara indirgeme esas olmaktadır. Yüksek sıcaklıkta ve oksijensiz ortamda organik maddelerin termal kırılmaya uğradığı termo kimyasal süreç piroliz olarak adlandırılmakla birlikte sprey piroliz alanında nanoparçacıkların sentezi için önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Fiziksel yöntemler olarak bilinen yöntemlerin çok fazla enerji kullanımı ve maliyetli olmaları genel dezavantajları olarak karşımıza çıkmaktadır (Khusnuriyalova ve ark., 2021).

1.4.2. Kimyasal Yöntemler

Mikro emülsiyon, elektrokimyasal ayrışma, termal ayrışma, kimyasal indirgeme metotları kimyasal yöntemler arasında yer almaktadır (Altınpınar, 2020). Metal nanoparçacıkların sentezinde kullanılan kimyasal indirgeme metodu organik ve inorganik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşmekte olup, ekipman kolaylığından ötürü nanoparçacık sentezinde sıklıkla tercih edilmektedir. Bu metotta kullanılan kimyasal indirgeyiciler arasında potasyum bitartarat ($\text{KC}_4\text{H}_5\text{O}_6$), trisodyum sitrat dihidrat, askorbat, sodyum bor hidrür (NaBH_4) gibi kimyasallar bulunmaktadır (Kim ve ark., 2007; Tan ve ark., 2003). Kullanılan bu kimyasal indirgeyiciler metal iyonlarının indirgenmesini sağlayarak metalik nanoparçacıkların oluşumunu gerçekleştirmektedir. Kimyasal yöntemler arasında yer alan mikro emülsiyon metodu parçacıkların homojenlik, geometri, yüzey alan, morfoloji ve boyut gibi özellikleri kontrolünü sağlayan aynı zamanda çok yönlü ve tekrarlanabilir bir teknik olarak karşımıza çıkmaktadır (Ganguli ve ark., 2008; Martínez-Rodríguez ve ark., 2014). Bir elektrolit içerisindeki katot ve anot arasında elektrik akımı geçirme işlemi sırasında elektrot yüzeyinde nanoparçacık oluşması yöntemi elektrokimyasal sentez yöntemi olarak adlandırılmaktadır (Ma ve ark., 2004). Bahsedilen tüm bu kimyasal yöntemlerin kullanım alanlarına göre birçok avantajları bulunmaktadır. Fakat bu avantajlara rağmen yüksek miktarlarda çözücüler, yüzey aktif maddeler ve daha birçok kimyasalların kullanılması sentezlenen nanoparçacıkların biyoaktif uygulama alanlarını sınırlandırmaktadır. Bu yüzden araştırmacılar, toksik olmayan, daha biyouyumlu ve daha çevre dostu bir yaklaşım arayışına girerek farklı yöntemler geliştirmeye çalışmışlardır (Dauthal ve Mukhopadhyay, 2016).

1.4.3. Yeşil Sentez Yöntemi (Biyosentez)

Nanoparçacıkların sentezinde kullanılmakta olan yeşil sentez diğer bir adıyla biyosentez, mikroorganizmalar, bitkilerden elde edilen ekstraktlar, mayalar, mantarlar ve algler gibi canlı organizmalar aracılığıyla nanoparçacık üretimini sağlayan bir sentez yöntemidir (Yıldız, 2010). Bu sentez yönteminde farklı biyolojik materyallerin kullanılması ve sentez başarısından dolayı hızla gelişmekte olan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Nanoparçacıkların yeşil sentez yöntemi ile elde edilmesiyle farklı boyutta, farklı şekillerde, farklı içeriklerde ve çeşitli fizikokimyasal özelliklere sahip nanoparçacıkların sentezi gerçekleştirilmektedir. Bitkilerin içerisinde bulunan fenolik bileşikler, proteinler, mikroorganizmalarda bulunan enzimler, aminler, alkaloidler gibi

moleküller sayesinde tek bir adımda indirgeme işlemi gerçekleşerek istenilen nanoparçacıklar sentezlenmektedir (Parveen ve ark., 2016). Reaksiyonun başladığını gösteren unsur karışımında oluşan renk değişimidir. Bu indirgeme sırasında parçacıklar bir araya toplanarak nanoparçacık büyümesini gerçekleştirirler ve sonuç olarak çeşitli şekillerde ve büyüklüklerle termodinamik olarak nanoparçacıklar kararlı bir şekilde oluşmaktadır (Fawcett ve ark., 2017).

Mikroorganizmalarla nanoparçacık sentezinin toksik kimyasallar içermemesi ve zor koşullar olmadan sentezin gerçekleşmesi büyük bir avantaj sağlamaktadır. Yeşil sentez yöntemiyle nanoparçacık üretimi sırasında biyolojik indirgemeler de proteinler, biyomembranlar ya da karbonhidrat gibi yapılar görev almaktadır. Örneğin sülfat redüktaz, mikroorganizmalarda bulunan redüktazlar olarak örnek verilebilmektedir ve bu biyolojik indirgemedede rol oynamakla birlikte aynı zamanda surfaktan (yüzey kaplayıcı) olarak da göre görmektedir (Han ve ark., 2007).

1.4.3.1. Yeşil Sentezde Bakterilerin Kullanımı

Bakteriler, yeşil sentezde rol alan diğer biyolojik materyallerle kıyaslandığında, kolay manipüle edilebilmelerinden dolayı oldukça geniş bir çalışma ve araştırma alanına sahiptir. Kolay kültür şartlarında ve oda sıcaklığında çeşitli özellikler ve morfolojilere sahip nanoparçacıkların sentezini bakteriler kullanarak gerçekleştirmek mümkündür (Thakkar ve ark., 2010). Fakat bu avantaja rağmen bakterileri kültürlerinin ekonomik olmaması ve indirgeyiciliğinin yavaş olması dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (Lee, 2020).

1.4.3.2. Yeşil Sentezde Alglerin Kullanımı

Algler nanoparçacık sentezinde kullanılan çevre dostu uygulamalar arasında yer almaktadır. Zor çevre şartlarına dayanıklı olan algler, bünyelerinde fenolik bileşikler ve organik maddeler bulundurmaktadır. Bu yüzden indirgeyici bir ajan olarak nanoparçacık sentezinde kullanılmaktadır. Algler ile nanoparçacık sentezi alg özü ile kullanılacak metal çözeltisinin karıştırılıp inkübe edilmesiyle gerçekleşmektedir (Sharma ve ark., 2016). Literatüre bakıldığında mikro alglerin özellikle Ag nanoparçacıkların sentezinde son zamanlarda yaygın bir şekilde kullanılmadığı görülmektedir (Bao ve ark., 2018; Kusumaningrum ve ark., 2018; Terra ve ark., 2019).

1.4.3.3. Yeşil Sentezde Mantarların Kullanımı

Yeşil sentezde kullanılan bir başka kaynak olan mantarlar da nanoparçacık üretiminin intraselüler ya da ekstraselüler yollar ile olabileceği bildirilmiştir. Bu yolla karşılaştırıldığında ise ekstraselüler yol ile nanoparçacık oluşumunun daha hızlı olduğu görülmüş ve bu yol ile büyük boyutlu nanoparçacıkların sentezlenebileceği bildirilmiştir (Yadav ve ark., 2015). Mantarlar aracılığıyla nanoparçacıkların üretimindeki avantaja bakıldığında, mantar üretimin kolay olması ve bu üretim prosesi boyunca ekstraselüler enzimlerin hücre dışına salınması dolayısıyla nanoparçacık sentezinin gerçekleşmesi karşımıza çıkmaktadır (Khan ve ark., 2018).

1.4.3.4. Yeşil Sentezde Bitkilerin Kullanımı

Nanoparçacıkların yeşil sentez yoluyla üretiminde kullanılan biyolojik kaynaklardan olan bitkiler ve bu bitkilerin ürünleri daha güvenilir ve çevre dostu bir yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır (Karthik ve ark., 2022). Ayrıca, bitki aracılı biyosentez hızlı sentez, uygun maliyet ve daha kararlı nanoparçacıkların üretilmesi şeklinde birçok avantaja sahip olmaktadır. Ayrıca büyük ölçekli sentez için uygun olması, boyut ve şekil bakımında kontrol edilebilir olması da avantaj olarak karşımıza çıkmaktadır (Kathiresan ve ark., 2009). Bitki aracılı üretilen nanoparçacıkların biyolojik olarak uyumlu olmaları ve çözücü olarak ise su kullanılmasından dolayı sentezi gerçekleştirilen nanoparçacıkların toksik bir etki oluşturmaması özellikle biyomedikal anlamda kullanımını (Mohanpuria ve ark., 2008) Bitkilerde nanoparçacık elde edebilmek için bitkinin çeşitli kısımları sentez için kullanılabilir. Gövde, yaprak, çiçek, sap, kök, tohum, kabuk gibi kısımlar nanoparçacık sentezinde kullanılan bölgelerdir (Beattie ve Haverkamp, 2011). Bhati Kushwaha ve Malik yaptıkları çalışmada, *Verbesina encelioides* bitkisinin yapraklarını ve gövdelerini kullanarak ekstraktlar hazırlamışlar ve nanoparçacık sentezini gerçekleştirmişlerdir (Bhati ve ark., 2013). Başka bir çalışmada ise Paulkumar ve ark., Piper Nigrum bitkisinin yine yaprak ve gövde kısımlarını kullanarak ekstraktlar hazırlamışlar ve bu ekstraktlardan Ag nanoparçacık sentezini gerçekleştirmişlerdir. Sentez esnasında, iki ekstrakt içinde reaksiyonun 10 dakikada başladığını fakat yaprak ekstraktı için 2 saatte ve gövde ekstraktı içinde 4 saatte reaksiyonun sonlandığı bu çalışmada gözlenmiştir (Paulkumar ve ark., 2014). Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler; flavonlar, proteinler, aldehytler, alkaloidler ya da saponin gibi biyomoleküller, sentezi gerçekleştirilecek metallerin indirgenmesinden sorumlu

olmaktadır (Nath ve Banerjee, 2013). Umadevi ve ark. yapmış olduğu çalışmada *Solanum lycopersicums* denilen domates bitkisinin meyve özünü kullanarak Ag nanoparçacıkları başarıyla sentezlemişlerdir. Kullanılan bu bitki özütündeki indirgeyici ajanın sitrik asit olduğunu ve yine bitkide bulunan malik asidin ise Ag nanoparçacıklarda sürfaktan olarak görev aldığını bildirmişlerdir (Umadavi ve ark., 2013). Altın nanoparçacıkların yeşil sentezinin gerçekleştirildiği bir çalışmada ise biyolojik kaynak olarak gül yapraklarının kullanıldığını ve sentez esnasındaki indirgemediği gül yaprağında bol miktarda bulunan şeker ve proteinin sorumlu olduğu bulunmuştur (Noruzi ve ark., 2011). Geleneksel yöntem olarak bilinen kimyasal ve fiziksel yöntemler, sentezi gerçekleştirilecek metal iyonlarının indirgenmesinde rol oynayan indirgeyici ajanlar, oluşacak nanoparçacıklarda istenmeyen toksisiteler oluşturabilmektedir. Aynı zamanda bu yöntemler maliyet olarak pahalı olup sentez yolu çok da basit olmayan yöntemler olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yüzden bu yöntemlere alternatif olabilecek, yeşil sentez, diğer adıyla biyosentez, daha tercih edilebilir bir yöntem haline gelmektedir (Mohanpuria ve ark., 2008).

Tablo 1. Literatürden bitki özütleriyle yapılan nanoparçacık sentezleri (Kumar vd., 2013)

Kullanılan Bitki	Nanoparçacık	Kaynaklar
Geranium Leaf	Au	Shankar, 2003
Azadirachta indica (neem)	Ag/Au bimetallic	Shankar, 2004
Eucalytus hybrid	Ag	Dubey, 2009
Garcinia mangostana	Ag	Veerasamy, 2010
Diopyros kaki	Pt	Song, 2010
Acalypha indica	Ag	Krishnaraj, 2010
Eclipta prostrate	Ag	Rajakumar and Abdul Rahuman, 2011
Citrus sinensis peel	Ag	Kaviya, 2011
Jatropha curcas L. Latex	Pb	Joglekar, 2011
Memecylon edule	Ag, Au	Elavazhagan and Arunachalam, 2011
Allium sativum (garlic clove)	Ag	Ahamed, 2011

1.5. Nanoparçacık Sentezini Etkileyen Önemli Parametreler

Nanoparçacıkların sentezinde boyut, şekil, kristal yapısı ve stabilitesini etkileyen, değişikliklere uğramasına neden olan bazı parametreler bulunmaktadır. Homojen morfoloji ve boyuta sahip nanoparçacıkların üretilmesi ve kararlı sistemler kurulması önem taşımaktadır. Nanoparçacıkların morfolojisi ve fizikokimyasal yapısını etkileyen bu unsurlar arasında pH, reaksiyon sıcaklığı, derişim ve inkübasyon süreleri bulunmaktadır (Gnanasangeetha ve Suresh, 2020).

Nanoparçacık sentezini etkileyen faktörlerden biri de pH' dır. Sentezi gerçekleştirilecek metale göre pH değerleri farklılık göstermektedir. Gurunathan ve ark. yaptığı bir çalışmada *Escherichia coli* aracılığıyla Ag nanoparçacıkların sentezi için optimum pH değerinin pH: 10 olduğunu göstermişlerdir (Gurunathan ve ark., 2009). Bu durum bitkilerde incelendiğinde, pH değişimi bitkilerde bulunan fitokimyasalları etkilemekte ve nanoparçacık sentezinin farklı pH' larda gerçekleşmesine sebep olmaktadır. Bu duruma örnek olarak, Avena Sativa bitkisinde elde edilen ekstrakt kullanılarak altın nanoparçacık sentezi için pH optimizasyonları yapılmıştır. Bu optimizasyonlar sonucunda pH: 3 ve pH: 4 değerlerinde oluşan altın nanoparçacıkların çok sayıda ve küçük boyutta oluştuğu fakat pH: 2 değerinde oluşan altın nanoparçacıkların agregasyona uğradıkları gözlemlenmiştir (Singh ve ark., 2016)

Nanoparçacıkların sentezinde şekil ve boyut kontrolünü sağlayan unsurlardan birinin reaksiyon süresidir. Rajendran ve ark., reaksiyon süresinin etkisinin bitki ekstraktı aracılığıyla üretilen nanoparçacıklar üzerindeki morfolojik yapısındaki değişiklikleri incelemek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmiştir (Rajendran ve Sen, 2016). Aynı zamanda ışık maruziyeti ve muhafaza etme koşulları gibi etkenlerin de reaksiyon süresini etkilediği ve uzun süreli reaksiyon sürelerinin nanoparçacıkların küçülmesiyle birlikte aglomerasyona da sebebiyet verdiği yapılan çalışmalarca ortaya koyulmuştur (Saif ve ark., 2016).

Metalik nanoparçacıkların oluşumunu etkileyen en önemli unsurlardan biri reaktan derişimidir. Yapılan bir çalışmada altın nanoparçacıkların sentezinde kullanılan *Penicillium Brevicompactum* süpernatantı derişimi ve kullanılan altın tuzu derişiminin elde edilen nanoparçacıkların şekil ve boyut bakımında önemli derecede etkilediği

bildirilmiştir (Mishra ve ark., 2011). Başka çalışmada ise düşük metal derişiminde küresel altın nanoparçacıkların oluştuğu gösterilmiştir (Pimprikar ve ark., 2009).

Nanoparçacık sentezi ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında özellikle mikroorganizmalar için yüksek sıcaklıklar tercih edilmektedir. Mikroorganizmaların büyümesi için yüksek sıcaklık ortamları bulunması gerekmektedir. Çünkü nanoparçacık sentezinden sorumlu enzimler yüksek sıcaklıklarda daha aktif hale gelmektedir (Vijayaraghavan ve ark., 2017).

1.6. *Cotinus coggygia* Scop. (Tetra) Bitkisi

Asya Himalaya, Güney Avrupa bölgelerinde yetişmekte olan *Cotinus coggygia*; anacardiaceae ailesine mensuptur. Güneş seven, çalı görünümlü çok yıllık bir ağaçtır. Farklı toprak tiplerine ve farklı pH değerlerine uyum sağlayabilmektedirler ve bu yüzden geniş bir yayılma alanına sahiptir. İlkbaharda yeşil olan yaprakları yaz sonunda kırmızı renge dönüşmektedir. Bu bitki türü ülkemizde ‘Duman Ağacı’ olarak bilinmekte ve Gaziantep-Kahramanmaraş, Akdeniz Bölgesi ve Trakya Bölgesinde yetişmektedir. *Cotinus coggygia* bitkisinin antikanser, antimikrobiyal, antioksidan, antigenotoksik, hepatoprotektif etkilerinin olduğu ve özellikle yara iyileştirici etkisinin çok iyi olduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2022). Yapılan fitokimyasal araştırmalar sonucunda bitkinin antioksidan kapasitesinin içeriğinde bulunan dihidroflavanollar, auronlardan kaynaklandığı ortaya koyulmuştur (Pdriad, 2011).

Gospodinova ve ark. *Cotinus coggygia* Scop. Bitkisi ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, bu bitkinin yağragından elde edilen özütün insan melanom olmayan ve melanom cilt kanseri hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkileri araştırılmıştır. In vitro olarak yapılan bu araştırma sonucunda bu bitkiden elde edilen özütün bu kanser hücreleri üzerinde önemli ölçüde proliferasyonu etkilediği bildirilmiştir (Gospodinova, 2021). Literatüre bakıldığında yapılan başka bir çalışmada, *C. coggygia* yaprakları kullanılarak etil asetat ekstraktı hazırlanmış ve meme, servikal, akciğer, hepatoselüler, kolorektal ve prostat kanseri hücreleri üzerinde in vitro antiproliferatif etki incelenmiştir (Gospodinova, 2021). Wang, G. ve arkadaşları, *Cotinus coggygia* bitkisini kullanarak hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda glioblastoma kanseri üzerinde bitkide bulunan flavonoidlerin etkisini araştırmışlar ve bu araştırma sonucunda, bu bitki ekstraktının malign glioblastoma hücrelerinde apoptozu büyük ölçüde indüklediği ve tümör büyümesini azaltmasıyla

birlikte *in vivo* ortotopik fare glioblastoma modellerinde göçü inhibe ettiğini ortaya koyulmuştur. (Wang, 2015). Iliev, I. ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada *Cotinus coggygia* etil asetat ekstraktının MCF-10A ve BJ hücre hatları üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda bitki ekstraktının çok küçük miktarlarında dahi FAP inhibisyonu sebebiyle BJ hücrelerinin canlılığında bir azalma olduğu bildirilmiştir (Iliev, 2020). Matić, S. ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada *Cotinus coggygia* bitkisinin sap kısmı kullanılarak metanollü bir ekstrakt hazırlamışlar ve bakterilerde ve bazı mantar türleri üzerindeki etkiler araştırılmıştır. Bu çalışma ile birlikte *Cotinus coggygia* metanol özütünden elde edilen ekstraktın çalışmada kullanılan tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır (Stanić, 2011). *Cotinus coggygia* bitki özütünün güçlü bir antioksidan ve yara iyileştirici etkisinin araştırıldığı ve kanıtlandığı bir doktora tez çalışmasında bu bitki yaprağı kullanılmış ve metanollü bir özütü hazırlanmıştır (Bayğu, 2018).

1.7. Ag Nanoparçacıkları

Ag eski zamanlardan beri yanık ve yara tedavilerinde aynı zamanda çeşitli bakteriyel enfeksiyonların iyileştirilmesi için tedavilerde kullanılmıştır. Hastalığa sebep olan 650 farklı mikroorganizma türünü öldürme potansiyeline sahip olup güvenli bir antimikrobiyal ajan olarak karşımıza çıkmaktadır (Hamideh Hammamchi, 2019). 19. yüzyılda ise Ag' nin bu antibakteriyel özelliği klinik olarak ortaya konulmuştur. Antibiyotiklerin ortaya çıkışıyla birlikte Ag bileşiklerinin kullanımında azalmalar olmuştur. Ag nanoparçacıklar nano jel, nano losyon, Ag içerikli kıyafetlerde ve Ag kaplamalı medikal cihazlarda kullanımı mevcuttur. Bunun sebebi antibiyotiklere direnç gösteren patojenik bakterilere karşı kullanımının mümkün olması olarak karşımıza çıkmaktadır. Antibiyotiklere direnç gösteren bakterilerin ortaya çıkmasıyla birlikte araştırmacılar alternatif olabilecek yeni antibakteriyel madde arayışına girmişlerdir. Nano boyuttaki yapılar ise eşsiz fiziksel ve kimyasal özellikleriyle birlikte geniş yüzey alanlarına sahip olmalarından dolayı yeni nesil antimikrobiyal maddeler olarak ortaya çıkmışlardır (Khalilzadeh ve ark., 2016).

İnert halde bulunan metalik Ag yaradaki sıvı ile veya derideki nem ile etkileşime girerek iyonik hale geçebilmektedir. İyonlaşmış halde bulunan Ag ise oldukça reaktiftir. Bu yapıdaki Ag dokuda bulunan proteinlerle kompleks oluşturarak bakterinin hücre duvarında hasar vermektedir ve aynı zamanda bakteri DNA ya da RNA'sına

bağlanabilmektedir. Bu şekilde ise denatürasyon ile bakteri replikasyonunu inhibe etme özelliğine sahip olmaktadır (Keskin, 2011). Zeolit ise Ag^+ için güçlü bir afinite gösteren kristal bir malzemedir. Bu iyonu yaklaşık %40' a kadar elektrostatik olarak bağlayabilmektedir (Kawahara, 2000). Böylece gümüş zeolit yüksek bir antibakteriyel element olarak karşımıza çıkmaktadır.

1.8. Ag Nanoparçacıkların Biyolojik Fonksiyonları

1.8.1. Antikanser Etkileri

Ag nanoparçacıklar antikanser etkisini hücre döngüsünü indüklemekle birlikte apoptozu da durdurarak gerçekleştirmektedir. Ag nanoparçacıklar kanserli hücrelerin çekirdeklerine girerek DNA kırılması ile hücre ölümüne sebep olmaktadır (Sofi ve ark., 2018). Lin ve ark., ptdlns3K yolunun aktivasyonu sayesinde Ag nanoparçacıkların kanser hücrelerinin otofajisini indüklemekle birlikte bir antikanser ajan olarak hareket ettiğini bildirmiştir (Lin ve ark., 2014). Aynı zamanda kanser hücrelerinin daha fazla Ag nanoparçacık alımına ve dolayısıyla daha fazla sitotoksik etkili gümüş iyonları üretimine sebebiyet veren bir EPR etkisine (gelişmiş bir geçirgenlik ve tutma etkisi) sahip olduğu da bildirilmiştir (Torchilin, 2011)

1.8.2. Antimikrobiyal Etkileri

Ag nanoparçacıklarının, gümüş iyonu vererek solunum enzimlerini inhibe etmesiyle antibakteriyel aktivite gösterdiği düşünülmektedir (Pal ve ark., 2007) Ag nanoparçacıkları birçok ilaca karşı ve aynı zamanda gram pozitif ve gram negatif gibi bakterilere karşı oldukça iyi antibakteriyel özellik sergilemektedirler (Sharma ve ark., 2009). Ag nanoparçacıklarının antimikrobiyal etki basamakları, bakteriyel hücre içerisine Ag nanoparçacıklarının difüzyonu ve alımı, ribozomların de-stabilizasyonu, enzim etkileşimi, elektron transfer zincirinin kesintiye uğraması, reaktif oksijen türleri (ROS), DNA hasarı ve hücre ölümü aşamalarından oluşmaktadır. Jones ve Hoek' e göre, en yaygın etki yöntemi, ATP moleküllerini inhibe eden ve Ag nanoparçacıklar tarafından reaktif oksijen türlerinin oluşumu ve DNA replikasyonunu önleyen ya da Ag^+ iyonları ile hücre zarında doğrudan hasara neden olan serbest Ag^+ iyonu alımı olabilmektedir (Jones,2010). Ag nanoparçacıklarının formlarının, artan geçirgenliğe ve hücre ölümüne neden olarak gram negatif organizmaların hücre duvarına yerleştiği kabul edilmektedir. Genel anlamda, Ag nanoparçacıklar denatürasyona neden olmaktadır. Hücre yıkımı ile

sonuçlanan hücre duvarını okside etmektedir. Aynı zamanda Ag nanoparçacıklar organizmaların sinyal iletimini kesintiye uğratan ve çoğaltmayı önleyen peptitlerin fosfotrosin profilini de değiştirmektedir (Hammamchi, 2019).

1.8.3. Antifungal Etkileri

Antifungal özelliğe sahip olan Ag nanoparçacıklar çeşitli mantar türlerine karşı oldukça iyi antifungal etki göstermiştir. Ag nanoparçacıklarının *Candida albicans*'a karşı etkisi, hücre çoğalmasını baskılamak şeklindedir. Bu baskılama hücre zarı bütünlüğünün yıkımına sebep olabilmektedir. Ag nanoparçacıklarının bundan dolayı ağız ile ilgili mantar enfeksiyonlarını önleme ajanlarından biri olabileceği rapor edilmiştir (Torres,2012).

1.8.4. Antiviral Etkileri

Ag nanoparçacıkların antiviral etki mekanizması halen bilinmemekle birlikte, Ag nanoparçacıkları; virüslerin kopyalanmalarını ve aynı zamanda bağlayıcılıklarını baskılayarak, virüslerin dış proteinlerine bağlanabilecekleri ortaya koyulmuştur (Hammamchi, 2019).

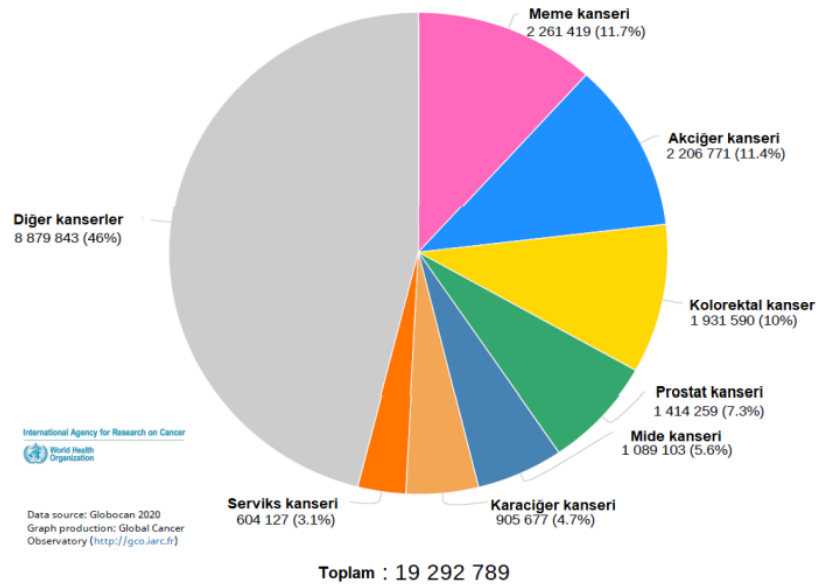
1.9. Kanser

M.Ö 3000 yıllarında Mısır'da okutulan bir cerrahi kitap olan Edwin Smith Papirüsü adlı kitapta kanser tanımı kullanılmıştır fakat kanser terimi kullanılmadan farklı şekilde isimlendirilmiştir. Kanser terimini ise ilk defa Tıbbın Babası olarak bilinen Yunan Doktor Hipokrat (MÖ 460-377) kullanmıştır (American Cancer Society, 2000). Bir organizmada bulunan hücrelerin kontrolsüz çoğalabilme yeteneğine ve hücre birikmesinin mutasyonlu olarak gerçekleşmesi kanser olarak tanımlanmaktadır. Hanahan ve Weinberg ise kanser hücrelerini anti büyüme sinyallerine duyarsızlık, sınırsız replikatif potansiyel, metastaz ve doku istilas, apoptozdan kaçınma, kendi kendine yeterlilik ve sürekli anjiyogenez olarak ayırt edici özellik başlığı adı altında altı grupta tanımlamıştır (Hanahan, 2000). Genetik olarak gerçekleşen mutasyonlarla birlikte çevresel şartlarında kanser oluşumunda etkisi görülmektedir. Bu etkiler altında meydana gelen kanserleşme tek bir organı etkilemekle kalmaz aynı zamanda damarlanma adı verilen anjiyogenez yolu ile başka organlarda da yayılım gösterebilmektedir (WHO, 2018). Bu kontrolsüz çoğalmaya sebep olan diğer faktörler arasında ise DNA hasarı, UV, genetik mutasyonlar,

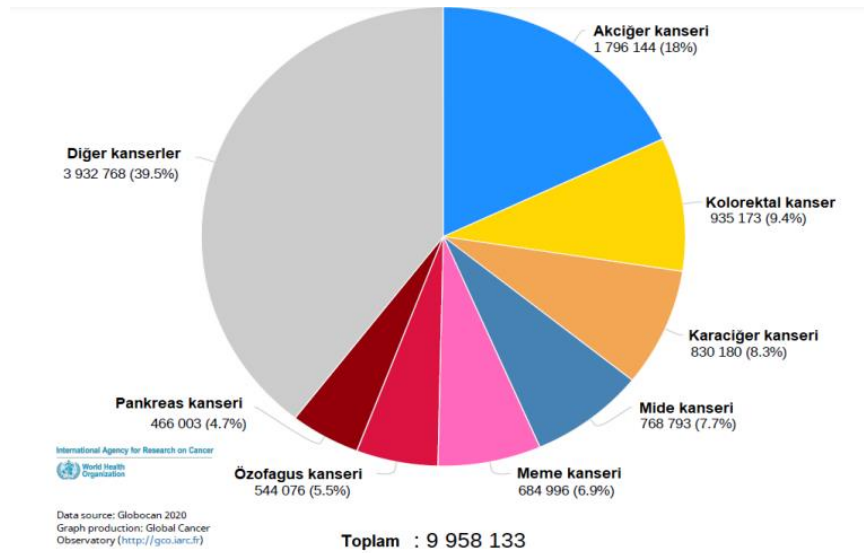
kanserojen maddelerle birlikte çeşitli kimyasallar ve radyasyon gibi etkenler bulunmaktadır (Ferlay, 2019). Kontrolsüz çoğalma sonucu oluşan kanser hücrelerinin çoğalıp birikmesiyle de kitleler oluşabilmekte ve oluşan bu kitlelere tümör adı verilmektedir. Tümörler benign tümör yani iyi huylu tümör ve malign tümör yani kötü huylu tümör olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. İyi huylu tümörler sadece oluştukları dokuda gelişebilen, diğer doku veya organlara yayılım göstermeyen tümörlerdir. Kötü huylu tümörler ise bulundukları ortamda gelişebilen ve aynı zamanda farklı dokularda da gelişip yayılabilen tümörlerdir. Kanser hücrelerinin oluşturduğu bu tümörler normal hücrelerinde yapı ve fonksiyonunu bozarak kanserleşmeyi artırmaktadır (Ferlay, 2019). Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi uygulamalar yolu ile kanser tedavisi gerçekleştirilmektedir. Bu tedaviler kanser tipine göre yani metastaza uğramış agresif bir tip ya da metastaz yapmayan tipe göre uygulanmaktadır (Ferlay, 2019). Kanserinin temel özellikleri aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir:

- Kanser hücreleri büyüme faktörü üretebilmektedir.
- Hücre büyümesini engelleyen faktörlerden kaçınmaktadır.
- Bağışıklık sistemi hücrelerinden kaçmaktadır.
- Sınırsız bölünebilme potansiyeline sahiptir.
- Tümör destekleyici iltihaplanmayı arttırmaktadır.
- İnvazyon ve metastaz yapabilmektedir.
- Yeni kan damarları oluşumunu desteklemektedir.
- Kanser hücrelerinde mutasyon meydana gelmektedir.
- Apoptozdan kaçabilmektedir.
- Enerji metabolizmalarını yeniden düzenleyebilmektedir (Hanahan, 2011).

Günümüzde de en sık karşılaşılan ve en yaygın olan ölümcül hastalıklardan birisi olarak karşımıza kanser çıkmaktadır (Lapa ve ark.). WHO verilerine göre 2020 yılında tahminen dünya çapında 19 milyon yeni kanser vakası görülürken 9 milyon kanser ölümünün gerçekleştiği bildirilmiştir (WHO, 2020). Gelişmiş ülkelerin daha az gelişmiş ülkelere göre kanser hastalığının görülme sıklığına bakıldığında daha fazla olduğu görülmektedir. 2025 yılına kadar bu kanser vakalarının çok kısa bir zaman içerisinde 20 milyondan daha fazlasına ulaşması beklenmektedir (Bray, 2015).



Şekil 1. Kadın ve erkekte dünya geneli 2020 tahmini yeni vaka sayısı

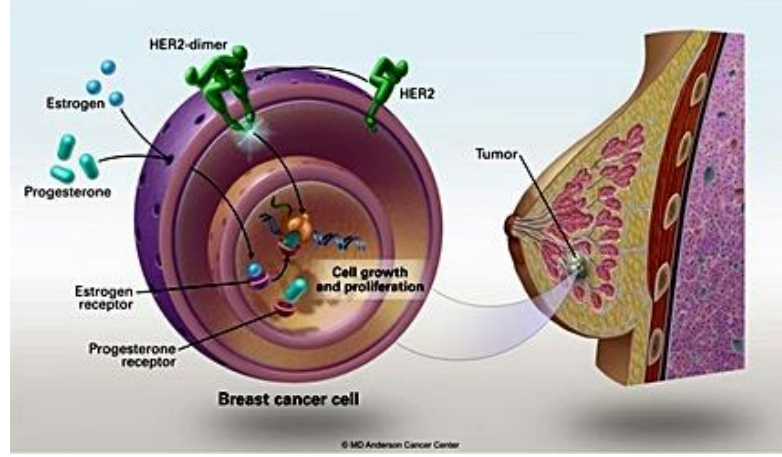


Şekil 2. Kadın ve erkekte dünya geneli 2020 tahmini ölüm sayısı

1.10. Meme Kanseri

Meme kanseri meme bezlerinde ortaya çıkmaktadır ve çeşitli malignitelerin bir sonucudur (Velloso, 2017). Dünyada en sık tanı konulan kanser türü olan meme kanserinin %95'ten fazlası adenokarsinomlardır (Makki, 2015). Özellikle kadınlarda en sık rastlanılan bu durum dünyanın çoğu bölgesinde görülmektedir. Türkiye'de ise bu durum her 4 kadından 1'ine meme kanseri teşhisi konulmaktadır. 2020 yılında tahmini olarak 24 bin kadına meme kanseri tanısı konulmakla birlikte 7 bin ölümün gerçekleştiği

bildirilmiştir (WHO, 2020). Meme kanseri ile ilgili risk faktörleri araştırıldığında yaş faktörünün en önemli risk faktörü olarak karşımıza çıktığı görülmektedir (Ullah, 2019). Yaş faktörünü takip eden; genetik mutasyonlar, hamilelik ve emzirme, ailede meme kanseri öyküsü, radyoterapi, obezite, alkol alımı, sigara kullanımı, fiziksel aktivite, vitamin eksiklikleri, kimyasallara maruz kalma gibi değiştirilebilir ve değiştirilemez risk faktörleri yer almaktadır (Aftab, 2019).

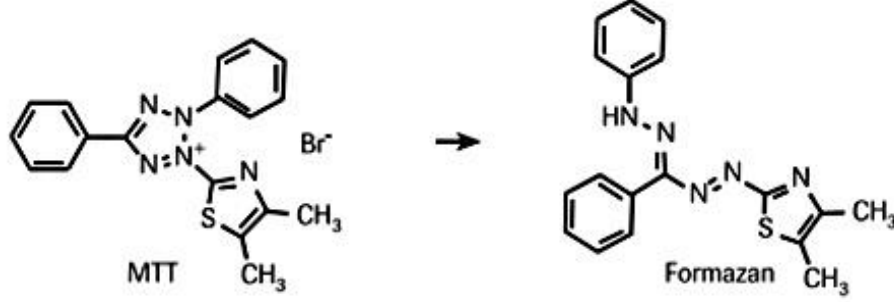


Şekil 3. Meme kanseri hücresi

1.11. Hücre Canlılığı Testi

Günümüzde çoğunlukla 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) kimyasalı kullanılarak hücredeki sitotoksosite ve hücre canlılığı belirlenmektedir. 1983 yılında Mosmann tarafından geliştirilmiştir (Tokur ve Aksoy, 2017). Hücre canlılığı testleri arasında altın standart olarak bilinmektedir. MTT testi hücre canlılığı analizi için yalnızca in vitro olarak kullanılmamaktadır. Aynı zamanda doku kültürlerinde de kullanılmakla beraber deri irritasyon, deri korozyon gibi hücre canlılığı analizlerinde de kullanılmaktadır. Hücre canlılığı analizlerinde kullanılan MTT' nin sarı renkli çözeltisi, proliferasyona uğramış hücrelerdeki artan mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesi sayesinde mor renkli formazan bileşiğine dönüşmektedir. Formazanın 415 nm'deki spektrofotometrik analizi ile hücre canlılığı ölçülmektedir. Yani oluşan formazan absorbansından hücre canlılığını hesaplanmaktadır. Herhangi bir uygulama yapılmamış hücrelerin canlılığı %100 kabul edilmekte ve bu hücrelere göre uygulama yapılmamış hücrelerin canlılığı % olarak hesaplanmaktadır (Erkekoğlu, 2020). MTT yöntemi ile hücre canlılığını test etmenin avantajları arasında güvenilir ve hızlı bir yöntem

oluşu bulunmaktadır. Bununla birlikte tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olması bu testi tercih edilebilir kılmaktadır. Aynı zamanda hem sitotoksite hem de proliferasyonun tespit edilmesi içinde kullanılabilirliği avantajları arasında yer almaktadır.



Şekil 4. MTT ve formazan' nın kimyasal yapısı

1.12. Apoptoz

Kerr, Wyllie ve Currie yayınladıkları bir makalede ilk defa apoptozu morfolojik bakımdan değişik hücre ölümünü tanımlamak amacıyla kullanmıştır (Kerr ve ark., 1972). Normal dokularda ve homeostazda önemli bir faktör olan genetik olarak ya da biyokimyasal yollarla hücre intiharı içeren programlanmış hücre ölümüne apoptoz adı verilmektedir (Hassan ve ark., 2020). Apoptoz sadece dış stresten dolayı oluşan bir ölüm ya da hücre hasarından dolayı gerçekleşen bir ölüm değildir. Aynı zamanda normal gelişim esnasında da oluşarak programlı ölümün önemli bir mekanizması olarak da tanımlanmaktadır (Jan, 2015). Apoptoz hücre yaşamı ile hücre ölümü arasındaki dengeyi koruyabilmek amacıyla hasar görmüş istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasında etkin rol oynamaktadır (Hassan ve ark., 2020). Sistein-aspartik proteaz olarak adlandırılan bir dizi kaspazın aktivasyonu ile apoptozun başlaması gerçekleşmektedir. Apoptoz sırasında yaklaşık 24 saatlik bir sürede hücre zarı bütünlüğünü kaybetmeden korunur fakat bu esnada efektör kaspazlar organellerle birlikte hücre içi yapıları da bozmaktadır. Daha sonrasında ise bu yapılar küçük hücre dışı veziküllerde salınmaya başlar ve kalan hücre kalıntılarının küçülmesine sebep olarak fagositoz yolu ile herhangi bir inflamasyon olmaksızın apoptotik hücreler ortadan kaldırılmaktadır (Sachet ve ark., 2017).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Literatüre bakıldığında, *Olaescandens* bitki yaprağı kullanılarak Ag nanoparçacıkların sentezinin gerçekleştirildiği bir çalışmada Mukherjee ve ark.; bu nanoparçacıkların biyouyumluluk, ilaç taşınımı ve görüntüleme hızlandırıcı aktivitelerini değerlendirerek, kimyasal yollarla elde edilen nanoparçacıklara göre daha iyi etkili olduğunu bildirmişlerdir (Mukherjee, 2014). 2011 yılında yapılan bir çalışmada sentezi gerçekleşen Ag nanoparçacıkların plasmodiyal patojenlere karşı aktif olduğu bulunmuş aynı zamanda filariasis ve sıtma vektörlerine karşı da larvasidal olduğu bildirilmiştir (Rajakumar ve Rahuman, 2011). Marimuthu ve ark. yaptıkları bir çalışmada *Mimosa Pudica* Gaertn (Mimosaceae) bitkisinin yapraklarının sulu ekstresini kullanarak Ag nanoparçacıkları başarıyla sentezlemişlerdir. Bu çalışmayla birlikte *Anopheles Subpictus* Grassi, filariasis vektör *Culexatus* larvalarına karşı Ag nanoparçacıkların antiparaziter etkinliği değerlendirilmiştir (Marimuthu vd., 2011). Shameli ve ark., Ag nanoparçacıkların yeşil sentezini *Curcuma Longa* yumru tozu kullanarak (Shameli vd., 2012), Veerasamy ve ark., ise *Garcinia Mangostana* bitkisinin yaprak ekstraktını kullanarak Ag nanoparçacıkların sentezini gerçekleştirmiştir. Veerasamy ve ark.'nın sentezlediği nanoparçacıkların boyutunun 35 nm olduğu bildirilmiştir (Veerasamy vd., 2011).

Yapılan bir çalışmada yeşil sentez yöntemi kullanarak Ag nanoparçacıkları elde etmiştir. Bu çalışmada *Solanum mammosum* L. meyvesinde elde edilen bir ekstrakt kullanılmıştır. Elde edilen nanoparçacıkların larvasidal etkileri incelenmiştir ve sonuçlara göre insanda hastalığa sebep olan böcek vektörlerine karşı yüksek bir toksisite sergilediği görülmüştür (Pilaquinga, 2019). Başka bir çalışmada ise yeşil sentez yöntemi ile üretilen Ag nanoparçacıkların *Culex pipiens* ve *Musca domestica*'ya karşı biyoinsektisidal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Fouda, 2020) Krishnan ve ark. yaptığı bir çalışmada *Piper Nigrum* bitki ekstraktı kullanarak Ag nanoparçacıklarının yeşil sentez yöntemi ile üretimini gerçekleştirmiştir. Üretilen Ag nanoparçacıklarının boyutu 20 nm olmakla birlikte bu nanoparçacıkların MCF-7 ve Hep-2 hücrelerine karşı elde edilen sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar ise biyosentezlenmiş bu Ag nanoparçacıkların önemli bir sitotoksik etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (Krishnan, 2016).

Bir tez çalışmasında ise *Cotinus Coggygia* Scop. ve *Pistacia Vera* L. bitki özütleri kullanılarak Ag nanoparçacıklarının sentezi gerçekleştirilmiştir Elde edilen Ag

nanoparçacıkların antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiş ve çalışma sonucunda *Cotinus Coggygia* Scop. bitkisinin *Pistacia Vera* L. bitkisine göre daha yüksek antimikrobiyal etkinlik gösterdiği bulunmuştur (Lanceolata, 2020). Başka bir çalışmada ise biberiye özütü kullanarak Ag nanoparçacıkların biyosentezinin gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu Ag nanoparçacıkların MCF-7 meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etkisi incelenmiştir. Yapılan bu inceleme sonucunda biberiye bitkisi kullanarak biyosentez yoluyla üretilen Ag nanoparçacıkların bu hücreler üzerinde oldukça iyi bir sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur (Aydın Acar & Pehlivanoglu, 2019). Çevre dostu bir yaklaşım olan yeşil sentez yöntemi ile Ag nanoparçacıkların sentezi gerçekleştirilerek kanat benek testi yardımıyla genotoksik etkisi araştırılmıştır (AltSansun, 2020). Çetintaş ve ark. yaptığı bir çalışmada *Eucalyptus Camaldulensis* bitki yaprakları kullanılarak elde edilen yaprak ekstraktından Ag nanoparçacıkların sentezini gerçekleştirmiştir. Yeşil sentez yöntemiyle elde edilen bu Ag nanoparçacıkların antimikrobiyal ve antikanser aktiviteleri incelenmiştir. Çalışma sonucunda 3.7-29.6 nm boyut aralığında, homojen, küresel yapıda nanoparçacıkların olduğu gözlenmiştir (Çetintaş, 2020). Literatüre bakıldığında Ag nanoparçacıklar ile ilgili yapılan başka bir çalışmada ise *Cucumis prophetarum* bitkisinin yaprakları kullanılmıştır. Bu bitki yapraklarından sulu bir ekstrakt elde edilerek Ag nanoparçacıkların sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bu Ag nanoparçacıkların bazı kanser hücrelerine karşı anti-proliferatif aktivitesi ve antibakteriyel etkinlikleri incelenmiştir (HemLata, 2020). “Antibakteriyel Nanolif Yapılarının Çözeltiden Üfleme Sistemi ile Üretimi ve Karakterizasyonu” adlı çalışmalarında Gökçe ve ark., *Cotinus coggygia* Scop. bitkisini kullanarak antimikrobiyal etkinliği olan bileşiklerden oluşan bir metanollü özüt hazırlamışlardır. Hazırlanan bu metanollü özütten farklı uygulama alanlarında kullanılmak üzere antibakteriyel TPU nanolifler üretilmiştir (Gökçe, 2018). Ag nanoparçacıkların güçlü bir antibakteriyel özellik sergiledikleri ve aynı zamanda memelilerde herhangi bir toksik etki göstermediği 2016 yılında yapılan bir çalışmada tespit edilmiştir (Orlovi ve ark., 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal ve Kimyasallar

Tablo 2. Deneyde Kullanılan Kimyasallar

Kimyasallar	Firma - Cas No:	Özellik
Ag Nitrat	Sigma Aldrich Cas No: 7761-88-8	AgNO ₃ MA: 169.87 g/mol
Sodium Hydroxide	İsolab Cas No:1310-73-2	NaOH MA: 40.00g/mol
Hydrochloric Acid	İsolab Cas No: 932.103.2501	
Ethanol	İsolab Cas No: 64-17-5	C ₂ H ₆ O MA: 46.07g/mol
Tris-hydrochlorid	Roth Cas No: 1185-53-1	C ₄ H ₁₁ NO ₃ .HCL MA: 157.60 g/mol
Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)	Sigma, D5652	D5652-10X1L
Fetal sıgır serumu, FBS	Pan Biotech Cas No: P30-3303	1X, 100 mL
Tripsin/EDTA	Sarorius Cas No: 03-053-1B	1X, 100 mL
Triphan Mavisi	B1 Biyolojik Endüstriler Cas No: 03-102-1B	1X, 100 mL
3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid, MTT	Sigma, M5655	%97.5
Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medium- High glucose, DMEM	Sigma, D6429	%10 FBS, %1 PS
Gentamisin sülfat	Biyolojik Endüstriler	50 mg/mL
Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Tuzlu Su, PBS	Sigma, D5652 Lonza	10X, 1L
DMSO sülfoksit (DMSO)	Applichem-Honeywell Cas No: 67-68-5	C ₂ H ₆ OS MA: 78.13 g/mol
Epidermal Büyüme Faktörü, EGF	Peptrotech, New Jersey, ABD	
Hidrokortizon ve insülin	Sigma Aldrich, Cas No: 50-23-7	C ₂₁ H ₃₀ O ₅ MA: 362.46 g/mol
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	Sigma Aldrich, Cas No:1898-66-4	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆ MA: 394,32 g/mol

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI	Biolegend Cat: 640914, Lot: B329954	Saklama Koşulu: 2 °C - 8 °C
60-15 mm doku kültürü diski	Sarstedt	

Tablo 3. Deneyde Kullanılan Cihazlar

Hassas Terazı	Radwag AS 220.R2
Ph Metre	Mettler Toledo FiveEasy
Isıtcılı Manyetik Karıştırıcı	Stirring Mantle IKA C-MAG HS7
Ultrasonik Banyo	Elmesonic S
Santrifüj	Nüve NF 800R
Vorteks	Multi-Vortex V-32
Mikrodalga fırın	Thermo Scientific, Multiscan Go
UV/Görünür Bölgespektrofotometre	Agilent Technologies Cary 60
ICP-MS	Agilent Technologies 7900
XRD	PANalytical EMPYREAN
FESEM	ZEISS Gemini SEM 500
STEM	ZEISS Gemini SEM 500
ZETA POTANSİYELİ ÖLÇÜMÜ	Micromeritics-Nanoplus 3
VSM	Cryogenic Limited PPMS
TGA	Seteram-Labsys Evo
FT-IR	Thermo Scientific-Nicolet İS20
İnvört Mikroskop	Carl Zeiss 415510-1101-000
ELISA Okuyucu	Thermo Scientific, Multiskan Sky High
Etüv	Esco-CCL-170B-8

3.2. *Cotinus coggygia* Scop. Ekstraktının Hazırlanması

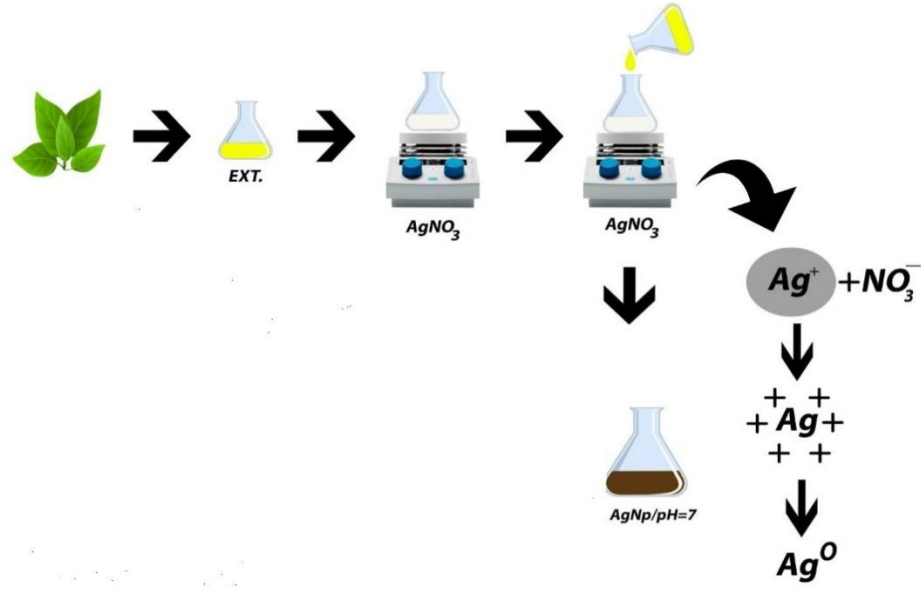
Cotinus coggygia Scop. (Duman Ağacı, Tetra) bitkisinin yaprakları steril koşullarda yıkanıp kurutulmuştur. Daha sonra küçük parçalar haline getirilmiştir. Küçük parçalar haline getirilen kurutulmuş bitki yapraklarından 1 gram alınarak tartılmıştır. Çözücü olarak su kullanılmıştır. 15 mL distile su içerisinde ısıtıcı üzerinde 10 dakika

kaynatılmıştır ve ardından 1 saat demlenmeye bırakılmıştır. Demlenme işleminden sonra Whatman kâğıdı (no:1) ile vakumlu filtrasyon sisteminde süzme işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstrakt Ag nanoparçacık sentezinde kullanılmak üzere +4 °C’ de ve bir kısmı da etüvde kurutularak karakterizasyon işlemleri için saklanmıştır.

3.3. Ag Nanoparçacıklarının Sentezi

Ag nanoparçacıklarının sentezinde Ag^+ kaynağı olarak; gümüş nitrat ($AgNO_3$) kullanılmıştır. İndirgeyici ve sürfaktan olarak *Cotinus coggia* Scop. bitkisinden elde edilen ekstrakt kullanılmıştır. 9 mL, 6 mM $AgNO_3$ çözeltisi üzerine 1 mL bitki özütü damla damla eklenerek karıştırılmaya bırakılmıştır. Karıştırılmaya 15 dakika devam edildikten sonra, 0,1 M NaOH ile karışımın pH’ sı 7 olacak şekilde ayarlanmıştır. Ardından reaksiyon 60 dakika karıştırılmaya bırakılmıştır. Reaksiyon sonunda aglomere olan nanoparçacıkları uzaklaştırmak için, süspansiyon 10 dakika boyunca 9000 rpm de santrifüjlenmiştir ve ayrılan süpernatant sonraki deneylerde kullanılmak üzere +4 °C’ de saklanmıştır.

Nanoparçacık oluşumunun ilk göstergesi renk değişimidir, renksiz $AgNO_3$ çözeltisine ekstrakt eklenmesiyle, karışımın rengi açık kahverengiye dönmüştür. Bu andan itibaren nanoparçacık oluşumu başlamış olup, ardından pH ayarı ile koyu kahverengi Ag nanoparçacıkların oluşumunun tamamlandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4). Nanoparçacık oluşumu UV/Görünür Bölge Spektroskopisi kullanılarak (Agilent Technologies Cary 60) ilgili yüzey plazmon rezonans (YPR) bandının takip edilmesi ile izlenmiştir. Nanoparçacık oluşumuna, sentezde kullanılan bitki özütünün ve metal tuzunun derişimi, sıcaklık, pH ve tepkime süresi gibi parametrelerin etkisi incelenerek, nanoparçacık sentezi için optimum reaksiyon koşulları belirlenmiştir (Dwivedi ve Gopal, 2010).



Şekil 5. Ag nanoparçacıklarının sentezinin şematik gösterimi

3.4. Ag Nanoparçacık Sentezinin Optimizasyonu

Ag nanoparçacıklarının sentezinde bulunduğu çözücüdeki nanoparçacık stabilitesi ve nanoparçacıkların boyut ve boyut dağılımının kontrolü için, derişim, pH, sıcaklık ve reaksiyon süresi parametreleri değiştirilerek sentezler yapılmıştır. Optimum parametreler oluşturulduktan sonra sentezlenen nanoparçacıklar kullanılarak, nanoparçacıkların karakterizasyonuna ve biyolojik aktivite deneylerine devam edilmiştir.

3.4.1. $AgNO_3$ Derişiminin Etkisi

Ag nanoparçacık oluşumuna, $AgNO_3$ derişiminin etkisinin incelenmesi amacıyla, nanoparçacık sentezi üç farklı derişimde (3 mM, 6 mM ve 9 mM) $AgNO_3$ çözeltisi kullanılarak yapılmıştır. Oda sıcaklığında, 9 mL, farklı derişimlerdeki $AgNO_3$ çözeltisi üzerine 1 mL ekstrakt damla damla ilave edilmiştir ($AgNO_3$ /ekstrakt: 9, (mL:mL)) ve 15 dakika karıştırılmaya bırakılmıştır. Çözelti pH' ı, 0,1 M NaOH ile pH: 7 olacak şekilde ayarlanmıştır ve 120 dakika karıştırılmaya bırakılmıştır. Reaksiyon bittikten sonra elde edilen sıvı süspansiyonlar 9000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Tüm basamaklar, her üç sentez için tekrarlanmıştır. Oluşan nanoparçacıkların YPR pikleri UV/Görünür Bölge Spektrofotometresi ile izlenmiştir.

3.4.2. Bitki Ekstraktı Miktarının Etkisi

Bitki ekstraktı derişiminin nanoparçacık oluşumuna etkisini incelemek amacıyla, 6 mM AgNO_3 çözeltisinin kullanılan hacmi sabit tutularak (9 mL), AgNO_3 /ekstrakt hacimlerinin oranı 27, 9, 3 ve 1,5 (mL:mL) olarak değiştirilmiş ve diğer parametreler (pH:7, oda sıcaklığı, reaksiyon süresi: 120 dk.) sabit tutularak nanoparçacık sentezleri aynı prosedür uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bittikten sonra elde edilen sıvı süspansiyonlar 9000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan nanoparçacıkların YPR pikleri UV/Görünür Bölge Spektrofotometresi ile izlenmiştir.

3.4.3. pH Etkisi

Ag nanoparçacıkların oluşumunda etkili olan pH değerinin etkisini incelemek için, pH 4-9 aralığında nanoparçacık sentezleri yapılmıştır. Sentezler, 6 mM AgNO_3 çözeltisine AgNO_3 /ekstrakt: 9 (mL:mL) oranında ekstrakt eklenerek, oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyonların pH değerleri; 4, 5, 7, 9, 10 olarak ayarlandıktan sonra çözeltiler 120 dakika boyunca karıştırılmaya bırakılmıştır. Reaksiyon bittikten sonra elde edilen sıvı süspansiyonlar 9000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan nanoparçacıkların YPR pikleri UV/Görünür Bölge Spektrofotometresi ile izlenmiştir. Bununla birlikte, bitki ekstraktlarının pH değerleri pH: 5, 7 ve 9 olarak ayarlanarak UV/Görünür Bölge Spektrofotometresi ile 300-800 nm arasında ekstraktların spektrumları kaydedilmiştir.

3.4.4. Reaksiyon Süresinin Etkisi

Reaksiyon süresinin nanoparçacık oluşumuna etkisini incelemek için yapılan sentez optimum derişimler ve pH değeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 9 mL 6 mM AgNO_3 çözeltisi üzerine 1 mL bitki ekstrakt damla damla eklenerek, 15 dakika karıştırılmasının ardından, ortam pH' ı pH:7 olarak ayarlanmıştır ve reaksiyon 2 saat boyunca karıştırılmaya bırakılmıştır. Tek seferde yapılan nanoparçacık sentezinde belirli aralıklarla alınan örneklerin UV/Görünür Bölge Spektrofotometresi ile absorpsiyon spektrumları kaydedilerek, oluşan nanoparçacıkların YPR pikleri izlenmiştir.

3.4.5. Reaksiyon Sıcaklığının Etkisi

Nanoparçacık boyut dağılımına reaksiyon sıcaklığının etkisini incelemek için, Ag nanoparçacıkların sentezleri oda sıcaklığında, 55°C ve 85°C sıcaklıklarda tekrarlanmıştır

ve bu deneylerde önceki optimizasyon deneylerinde belirlenen optimum şartlar kullanılmıştır. Buna göre, üç ayrı ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde deney düzenekleri kurulmuştur. Her bir deneyde 9 mL 6 mM AgNO_3 çözeltisi kullanılmıştır ve bu çözeltilerin sıcaklıkları belirlenen sıcaklıklara getirildikten sonra, üzerlerine 1 mL bitki ekstraktı damla damla ilave edilmiştir. 15 dakika karışmasının ardından ortam pH'ı 7 olarak ayarlanmıştır. Ardından reaksiyon 60 dakika karışmaya bırakılmıştır. Sıcaklık değerleri reaksiyon sırasında termometre yardımıyla kontrol edilmiştir. Reaksiyon bittikten sonra elde edilen sıvı süspansiyonlar 9000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından UV/Görünür Bölge Spektrofotometresi ile absorpsiyon spektrumları kaydedilerek, oluşan nanoparçacıkların YPR pikleri izlenmiştir.

3.5. Ag Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

Belirlenen reaksiyon parametreleri kullanılarak sentezlenen Ag nanoparçacıklarının deiyonize su ile uygun seyreltmeleri yapılarak ve bazı yöntemlerde katı örnek gereksinimi için liyofilizasyon yöntemi ile kurutularak karakterizasyon yöntemlerinde kullanılmıştır.

Ag nanoparçacıkların, şekil ve boyut analizi için, nanoparçacık süspansiyonundan alınan 10-20 μL örneğin bakır grid üzerine damlatılıp kurutulmasıyla STEM cihazı ile görüntüleri alınmıştır. Aynı şekilde karbon bant üzerine damlatılıp kurutulan örneğin, 4,30 nm kalınlığında iridyum kaplaması yapılarak Taramalı Elektron Mikroskopisi (FESEM) cihazı ile Enerji Dağılım X-Işını (EDX) analizi yapılmıştır. Kurutulan Ag nanoparçacıklarının kristal yapılarının aydınlatılması ve faz saflığının gösterilmesi için X-ışını Difraktometresi (XRD) analizi, $2\theta = 5-90$ derece aralığında yapılmıştır. Aynı cihazın database' i kullanılarak Rietveld analizi yapılmıştır. Ag nanoparçacıkların yüzey yükünün belirlenmesi amacıyla zeta potansiyeli ölçüm cihazı kullanılmıştır. Bu ölçüm MALVERN Nano ZS90 cihazında, 20-90 °C sıcaklık ve 1,2-1,65 kırılma indisi aralıklarında gerçekleştirilmiştir. Sentezde kullanılan ekstraktın ve sentezlenen nanoparçacıkların yapısını aydınlatmak için Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrometresi (FT-IR) ile yapı analizleri yapılarak, ekstrakttan kaynaklanan fonksiyonel gruplar belirlenmiştir.

Sentezlenen nanoparçacıkların Ag içeriğinin kantitatif analizi için İndüktif Eşleşmiş Plazma Spektrometresi (ICP-MS) kullanılmıştır. Ölçümler için, nanoparçacık

süspansiyonu önce derişik HCI ile parçalanmıştır ve daha sonra uygun seyreltmeleri yapılarak analiz edilmiştir.

3.6. Hücre Hatları ve Büyütme Koşulları

Sitotoksosite deneylerinde MDA-MB-231, MCF-7 ve CRL-4010 meme hücre hatları ATCC'den (Amerikan Hücre Kültürü Koleksiyonu) temin edilmiştir. Hücre hatları %10 FBS (Fetal bovine serum) ve %1 Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin B içeren DMEM ortamı içinde 37 °C' de, %95 nem ve %5 CO₂ koşullarında hepa filtreli inkübatörde çoğaltılma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.7. Sitotoksosite Testi (MTT Testi)

MDA-MB-231, MCF-7 ve CRL-4010 hücreleri 1X DPBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler %0,25 Tripsin/EDTA ile kaldırıldı. Kalkan hücrelerin dağılması için DMEM besiyeri ile muamele edildi. Daha sonra hücreler falkon tüplere alındı. Üzerine 4 mL besiyeri ilave edildi. Ardından bu homojen hücre süspansiyonlarından ayrı ayrı 20 µl ependorf tüplere alındı ve üzerine 20 µl hazır tripan mavisi (Tripan Blue) boyası eklendi. Pipetaj yapıldı ve Thoma lamı ile hücreler sayıldı. Hücrelerin 5x10⁵ hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekimi gerçekleştirildi. Bu hücreler 100 µl/kuyucuk içerisinde gece boyunca kültüre edildi. Bu sürecin ardından kuyucuklara tutunan hücrelere Ag nanoparçacıkların uygulanması işlemi gerçekleştirildi. MDA-MB-231, MCF-7 ve CRL-4010 hücreleri 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm ve 3,125 ppm derişimlerinde 4 tekrarlı olacak biçimde Ag nanoparçacıklar ile muamele edildi ve 24 saat ve 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik ve 48 saatlik uygulamalar ayrı ayrı gerçekleştirildi. Süre sonrasında hücrelere MTT uygulaması gerçekleştirildi. Hücreler üzerine 10 µl/kuyucuk MTT solüsyonu (5 mg/mL) ilave edildi ve 3 saat inkübasyona bırakıldı. 3 saatlik inkübasyonun ardından hücrelerdeki besiyeri uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa MTT tuzunu çözmek amacıyla 100 µl DMSO (dimetil sülfoksit) eklendi. Ardından oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika boyunca inkübe edildi. Sonrasında canlı hücreler tarafından indirgenmiş MTT tuzunun yoğunluğuna bağılı olarak oluşan renk değışimi 540 nm ve 690 nm dalga boyunda ELISA okuyucu cihazında optik yoğunluk (OD) değıerleri ölçüldü ve sonuçlar kaydedildi. Bu işlemler her hücre hattı için gerçekleştirildi.

Hücre Canlılığı: Örnek (OD) / Kontrol (OD) X 100

Formülü ile hücre canlılığı hesaplanmıştır.

3.8. Aneksin-V/PI Boyaması (Akış Sitometri Analizi)

Ag nanoparçacıkların, MDA-MB-23, MCF-7 ve CRL-4010 hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini değerlendirmek amacıyla Aneksin V-FITC/propidium iodide (PI) boyası kullanarak Aneksin V-FITC apoptoz kiti (Biolegend USA) talimatlarına göre yapıldı.

Hücreler nanoparçacığın 50 ppm derişimindeki çözeltisi ile 24 saat ve 48 saat boyunca muamele edildi. Bu sürelerin sonunda kuyucuklar DPBS ile yıkandı. Tripsin eklenerek hücreler kaldırıldı. Kaldırılan hücrelerin üzerine tripsin etkisinin sönmesi için DMEM besiyeri eklendi. Hücreler falkon tüplere alındı ve 5 dakika 1800 rpm hızda santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısım atıldı ve pelet kısmı boyama tamponu (staining buffer) ile çözüldü. Hücreler ependorf tüplere alındı ve bu yıkama işlemi 2 kez yapıldı. İkinci yıkamadan sonra 100 µl Aneksin V bağlama tamponu (binding buffer) her tüpe aktarıldı. Ardından 2,5 µl Aneksin V boyası ve 5 µl propidium iodide solüsyonu bu tüplere eklendi. Tüpler karanlık ortamda muhafaza edildi. Boyanan örnekler akış sitometri (Flow Cytometry, BD C6) cihazı ile analiz edildi. Analizden hemen önce ise 400 µl bağlanma tamponu (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,5 içinde 140 mM NaCl ve 2,5 mM CaCl₂) boyanan hücreler üzerine eklendi ve apoptotik ölçüm gerçekleştirildi. Ölçümü gerçekleştirilen örneklerin yüzdeleri hesaplanarak apoptoz grafiği oluşturuldu. Kit farklı popülasyonların ayırt edilmesini sağlamaktadır. Bunlar; canlı hücrenin bozulmamış mitokondriyal zarı, bozulmuş mitokondri zarı, erken ve geç apoptotik hücreler ve ölü hücrelerdir. Her bir durum yüzdeleri hesaplanarak histogram olarak verilmiştir.

3.9. Antioksidan Aktivitesi Tayini

Nanoparçacıkların antioksidan aktivitesinin tayin edilmesi için 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH) reaktifi ile radikal süpürme yöntemi uygulanmıştır. 0.1 mM DPPH etanol içinde çözülerek hazırlanmıştır. Ag nanoparçacıkların 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm ve 300 ppm olmak üzere beş farklı derişimi hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak ise doğal bir antioksidan olan askorbik asit kullanılmıştır. Askorbik asidin 50 ppm, 100

ppm, 150 ppm, 200 ppm ve 300 ppm olmak üzere beş derişimi hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu plakalara nanoparçacık süspansiyonundan 50 µl alınıp üzere 0.1 mM DPPH çözeltisinden 150 µl eklenmiştir. Bu işlem tüm derişimler için gerçekleştirilmiştir. Aynı şekilde negatif kontrol olarak kuyucuklara 50 µl etanol ve 150 µl DPPH çözeltisi koyularak hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak seçtiğimiz askorbik asidin tüm derişimleri için de aynı adımlar gerçekleştirilmiştir. 50 µl askorbik asit çözeltisi üzerine 150 µl DPPH çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan tüm bu karışımlar oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Daha sonra bu karışımların absorbens değerleri ELISA tabaka okuyucu cihazında 517 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Bu ölçümler 3 kez tekrarlanarak yapılmıştır ve elde edilen sonuçların ortalamaları alınarak grafik oluşturulmuştur.

Çözeltilerinin antioksidan aktiviteleri DPPH absorpsiyonunun % inhibisyonu olarak verilmiştir. Bu değer aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Antioksidan aktivitesi (\% İnhibisyon)} = 100 \times (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}$$

A_{kontrol} : Negatif kontrol olarak hazırlanan çözeltisinin absorbens değeridir.

$A_{\text{örnek}}$: Nanoparçacık çözeltilerinin absorbens değerleridir.

Pozitif kontrolün antioksidan aktivitesi hesaplanırken;

A_{kontrol} : Negatif kontrol çözeltisinin absorbens değeridir.

$A_{\text{örnek}}$: Askorbik asit çözeltilerinin absorbens değerleridir.

3.10. Antibakteriyel Aktivite Deneyleri

Nanoparçacıkların antibakteriyel aktivite deneyleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında disk difüzyon yöntemi kullanarak antibakteriyel aktivite, gram negatif bakteri olan *E. coli* ve gram pozitif bakteri olan *S. aureus* bakteri türleri üzerinde test edilmiştir.

3.10.1. Besiyeri Hazırlanması

Sıvı ve katı besiyeri olmak üzere iki besiyeri hazırlanmıştır. Sıvı besiyeri hazırlamak için LB-Broth besiyerinden 2,5 gram tartıldı ve bir erlen içerisinde 100 mL'

ye saf su ile tamamlanmıştır. Ardından biraz çalkalandı ve sterilizasyon için 121 °C, 1 atm basınçta, 15 dakika otoklav yapılmıştır. Katı besiyeri için ise Muller Hinton Agar (MHA) besiyerinden 7,6 gram tartıldı ve bir erlen içerisinde 200 mL' ye saf su ile tamamlanmıştır. Sterilizasyon için 121°C, 1 atm basınçta, 15 dakika otoklav yapılmıştır. Hazırlanan katı besiyeri petri kaplarına ortalama 15-20 mL olacak şekilde dökülmüştür. Petrilere dökülen besiyerinin donması için bir süre beklenmiştir.

3.10.2. Bakteri Çoğaltma

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ve *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterilerini kültüre etmek için stok kültürlerinden ayrı ayrı 20 µL alınarak üzerlerine 1 mL LB-Broth sıvı besiyeri eklenmiştir. Ardından 37 °C' de 24 saat çalkalamalı inkübatörde 150 rpm hızda bırakılarak çoğalmaları sağlanmıştır.

3.10.3. Disk Difüzyon Yöntemi

Disk difüzyon yöntemi içinde Ag nanoparçacıkların üç farklı dozu olarak; 643 ppm, 321 ppm, 160 ppm derişimler hazırlanmıştır. Katı besiyeri bulunan petrilere 100 µl olacak şekilde *E. coli* ve *S. Aureus* bakterileri yayma yöntemi ile ekimi gerçekleştirilmiştir. Sonrasında pozitif kontrol olarak su, antibiyotik olarak ampisilin (50 mg/mL) kullanılarak diskler 50 µl tüm örnekler yüklenmiştir ve bu diskler petrilerin üzerine yerleştirilmiştir. Negatif kontrol olarak boş besiyeri kullanılmıştır. Ardından petriler 24 saat 37 °C'de etüve inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda oluşan zonlar gözlemlenmiştir ve kaydedilmiştir.

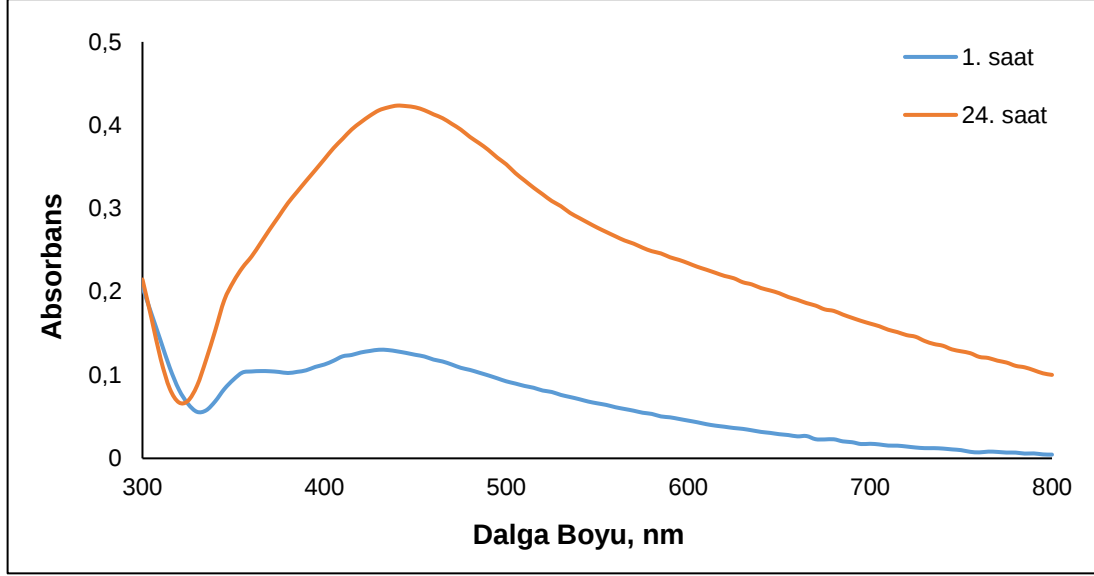
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Nanoparçacık Sentezinde Reaksiyon Parametrelerinin Optimizasyonu

Cotinus coggygia Scop. ekstraktı kullanılarak sentezlenen Ag nanoparçacıklarının oluşumu UV/Görünür Bölge Spektrofotometresi ile alınan absorpsiyon spektrumlarının takibi ile doğrulanmıştır. Ancak, bununla birlikte fizyolojik pH’ da kararlılığı yüksek, küçük boyutta ve homojen boyut dağılımlı, saf kristal yapısında nanoparçacıklar sentezleyebilmek için reaksiyon parametrelerin optimizasyonu büyük önem taşımaktadır (Javed, 2020). Ayrıca, optimizasyon çalışmalarından önce, gümüş nanoparçacık oluşumuna ekstraktın etkinliği araştırılmıştır.

4.1.1. Ekstrakt Etkinliğinin İncelenmesi

Nanoparçacıkların sentezi belirtilen reaksiyon koşullarında ($[AgNO_3]$: 6 mM, $AgNO_3$ /ekstrakt: 9 (mL:mL), oda sıcaklığı), sadece pH optimizasyonu yapılmadan, ekstraktın doğal pH’ında yapılmıştır ve nanoparçacık oluşumunu takip etmek için senteze 24 saat boyunca devam edilmiştir. Sentez esnasında ilk saatlerde ekstraktın renginden farklı olarak herhangi bir renk değişimi gözlenmemiştir, 24 saat sonunda ise renk değişiminin açık sarıdan koyu griye dönüştüğü gözlemlenmiştir. Sentez devam ederken 1. saatte ve 24. saatte örneğin UV/Görünür Bölge absorpsiyon spektrumları alınmıştır (Şekil 6).

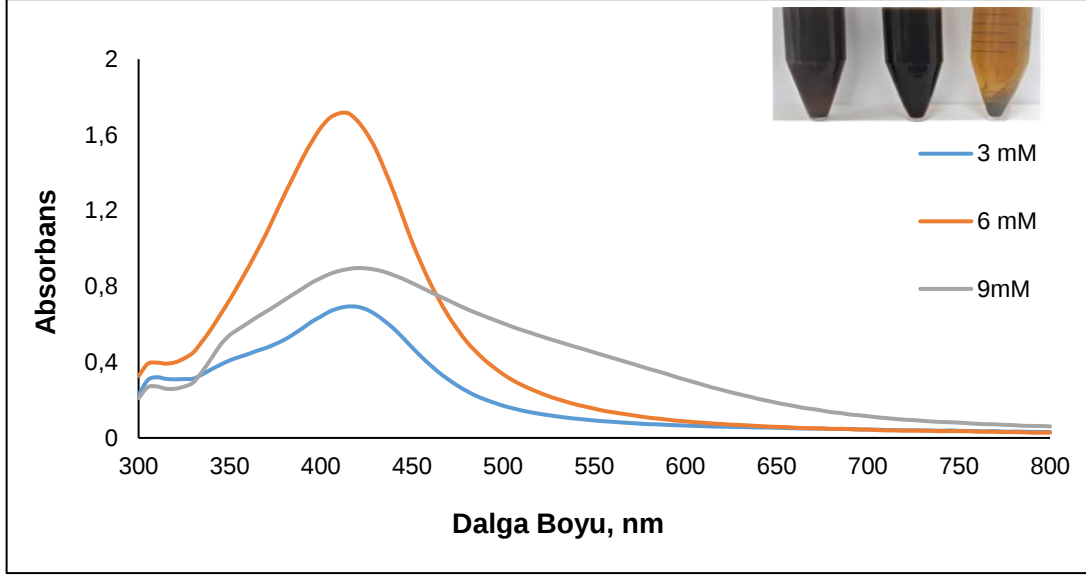


Şekil 6. Ag nanoparçacıkların oluşumunda bitki ekstraktının etkisi 1. Saat (mavi) ve 24. saat (turuncu) spektrumları

24 saat sonunda 436 nm' de örneğe ilişkin yayvan bir absorbans bandı görülmüştür. Bu sonuç ile ekstraktın zamana bağlı olarak nanoparçacık oluşumunda etkili olduğu ancak aglomerasyonun çok olduğu ve homojen boyut dağılımında kararlı nanoparçacık oluşumunu desteklemediği düşünülmüştür.

4.1.2. Ag Nanoparçacıkların Sentezine AgNO₃ Derişiminin Etkisi

Ag nanoparçacık oluşumuna AgNO₃ derişiminin etkisinin incelenmesi amacıyla, üç farklı derişimde (3 mM, 6mM, 9mM) AgNO₃ kullanılarak ve diğer tüm reaksiyon parametreleri sabit tutularak (AgNO₃/ekstrakt: 9 (mL:mL), pH:7, oda sıcaklığı, 2 saat reaksiyon süresi), nanoparçacık sentezleri yapılmıştır. Verilen koşullarda, 3 mM ve 9 mM AgNO₃ ile sentezlenen nanoparçacık süspansiyonlarının santrifüj (9000 rpm, 10 dak.) edilmesiyle, aglomerasyonundan kaynaklı daha fazla çökme görülmüştür. 6 mM AgNO₃ çözeltisi ile sentezlenen nanoparçacıklarda ise çökmenin ve aglomerasyonun daha az olduğu görülmüştür. Yapılan sentezlerden elde edilen nanoparçacık örneklerinin UV/Görünür Bölge absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir ve YPR pikleri izlenmiştir (Şekil 7).



Şekil 7. 3 mM, 6mM, 9mM AgNO₃ kullanılarak sentezlenen Ag nanoparçacıkların UV/Görünür Bölge absorpsiyon spektrumları

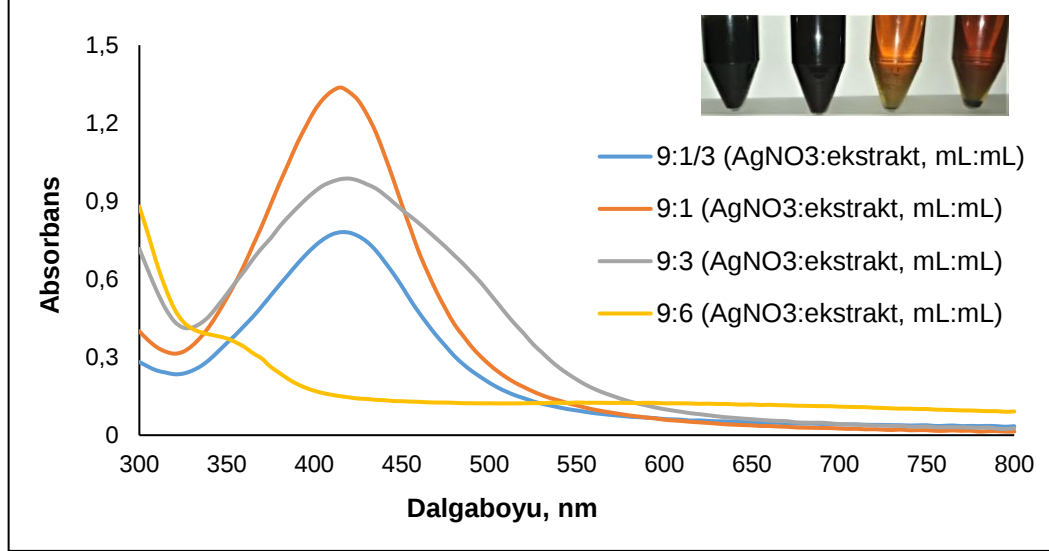
Elde edilen spektrumlara göre, 3 mM, 6 mM ve 9 mM AgNO₃ çözeltisinden sentezlenen nanoparçacıklar sırasıyla 415 nm, 415 nm ve 420 nm dalga boylarında YPR piki vermiştir (Şekil 7). Mie'nin bir teorisine göre küçük boyutlu nanoparçacıklar daha düşük dalga boyundaki ışığı absorplarken büyük boyutlu nanoparçacıklar daha yüksek bir dalga boyunda ışığı absorplamaktadır (Bakar ve ark., 2013). Dalga boyundaki 5 nm'lik kayma parçacık büyümesine dayandırılmaktadır.

415 nm'deki en şiddetli pik, 6mM AgNO₃ ile sentezlenen nanoparçacıklara ait olup, bu sonuç ile bu derişimde ve koşullarda yapılan sentezin nanoparçacık oluşumundaki verimliliğinin daha yüksek olduğunu göstermektedir. Aglomerasyonun daha az olması da sonucu desteklemektedir.

4.1.3. Ag Nanoparçacıkların Sentezine Ekstrakt Miktarının Etkisi

Ag nanoparçacık sentezinde kullanılan ekstrakt derişiminin etkisinin incelenmesi için tüm reaksiyon parametreleri sabit tutulup ekstrakt miktarı değiştirilerek (1/3 mL, 1 mL, 3 mL ve 6 mL) sentezler gerçekleştirilmiştir (9 mL [AgNO₃]: 6 mM, pH:7, oda sıcaklığı, 2 saat reaksiyon süresi). Sentez sonrasında nanoparçacık süspansiyonları santrifüjlenerek aglomerasyonlarından ayrılmıştır. Örneklerden, 1/3 mL ve 1 mL bitki ekstraktı kullanılarak elde edilen nanoparçacıklarda santrifüjden sonra çöken kısımlarının olmadığı görülmüştür. Fakat 3 mL ve 6 mL ekstrakt kullanılarak elde edilen nanoparçacıkların santrifüj edildikten sonra çöken miktarlarının olduğu gözlemlenmiştir.

Farklı Ag/ekstrakt oranlarında yapılan sentezlerden elde edilen Ag nanoparçacıkların UV/Görünür Bölge absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir ve YPR pikleri izlenmiştir (Şekil 8).



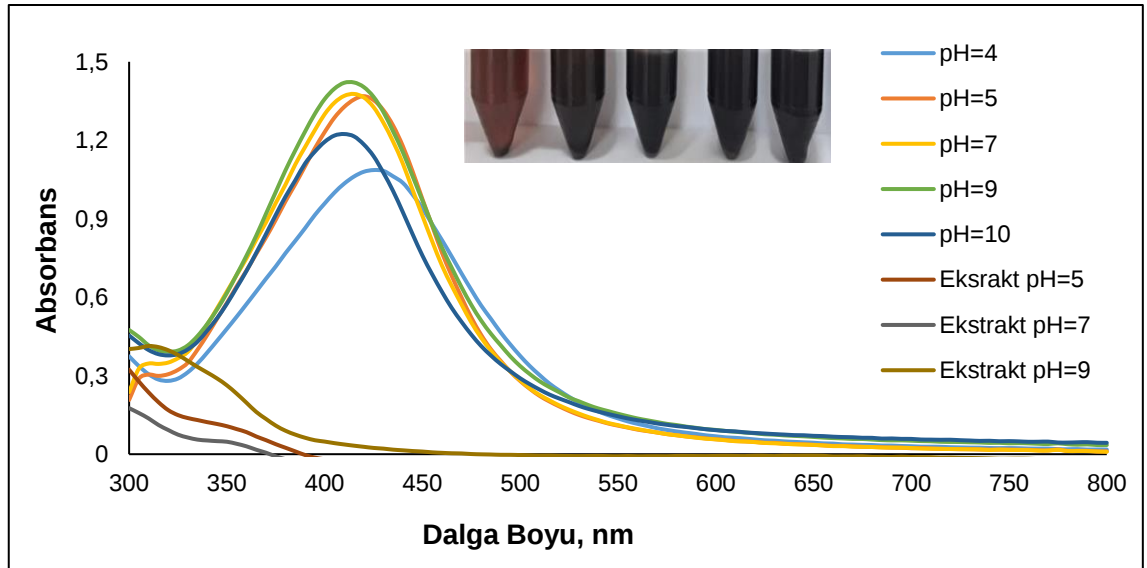
Şekil 8. Farklı miktarlarda bitki ekstraktı kullanılarak sentezlenen Ag nanoparçacıkların UV/Görünür Bölge absorpsiyon spektrumları

1/3 mL, 1 mL, 3 mL ve 6 mL ekstrakt ile sentezlenen nanoparçacıkların max. absorbans değerleri ve YPR pikleri sırasıyla; 0,780 - 415 nm, 1,336 - 415 nm, 0,986 - 420 nm, 0,879 - 300 nm şeklindedir. Bu sonuçlara göre, 6 mL ekstrakt kullanımında, süspansiyon çöken aglomerasyonlardan ayrıldıktan sonra, süpernatantta nanoparçacığın kalmadığı, ilgili YPR pikinin kaybolmasından anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, ekstrakt miktarı arttıkça (3 mL, 6 mL) nanoparçacıkların YPR pikleri 5 nm kırmızıya kayma görülmüştür, ekstrakt artışı ile aglomerasyonun arttığı görülmüştür. Bu sonuç santrifüj sonrası gözlem ile de uyumludur. Ekstrakt derişiminin artması ile, nanoparçacıkların çekirdeklenme merkezlerinin artması ve nanoparçacık oluşumunun artması beklenirken, çökmenin fazla olması ve YPR pik şiddetindeki düşüşün, aglomerasyonun fazla ekstrakt içeriğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Majid, 2018). Düşük ekstrakt derişiminin kullanılmasıyla (1/3 mL, 1 mL) elde edilen nanoparçacıkların YPR piklerinin absorpsiyon değerleri dikkate alındığında (1 mL: 0,78, 3 mL: 1,336), 3 mL ekstrakt kullanıldığında daha büyük verim ile nanoparçacık elde edildiği görülmektedir. Ekstrakt miktarının azalması ile nanoparçacık çekirdeklenme merkezlerinin azaldığı, bunun da nanoparçacık çekirdeklenmesine göre nanoparçacık büyüme mekanizmasının baskın olduğu ve nanoparçacık oluşum verimini (sayısını) düşürdüğü düşünülmektedir (Majid,

2018). Optimum ekstrakt derişimine, 9 mL AgNO₃ (6 mM) çözeltisine, 1 mL ekstrakt eklendiğinde ulaşılmıştır (Şekil 5).

4.1.4. Ag Nanoparçacıkların Sentezine Reaksiyon pH'ının Etkisi

Nanoparçacık oluşumuna pH etkisini incelemek için, nanoparçacıklar pH: 4, 5, 7, 9, 10' de diğer parametreler sabit tutularak sentezlenmiştir ([AgNO₃]: 6 mM, AgNO₃/ekstrakt: 9, oda sıcaklığı, 2 saat reaksiyon süresi). Farklı pH' larde sentezlenen nanoparçacık süspansiyonları santrifüj (9000 rpm, 10 dk.) edildikten sonra, süpernatanttan alınan örnekler UV/Görünür Bölge spektrofotometresinde analiz edilmiştir ve absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir (Şekil 7). Bununla birlikte, kullanılan ekstraktın pH' ısı, reaksiyon pH' larına (5, 7, 9) ayarlanarak, ekstraktın da absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir. Ekstraktlara ait maksimum absorbans piklerinin 300 nm dalga boyunda oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 7).



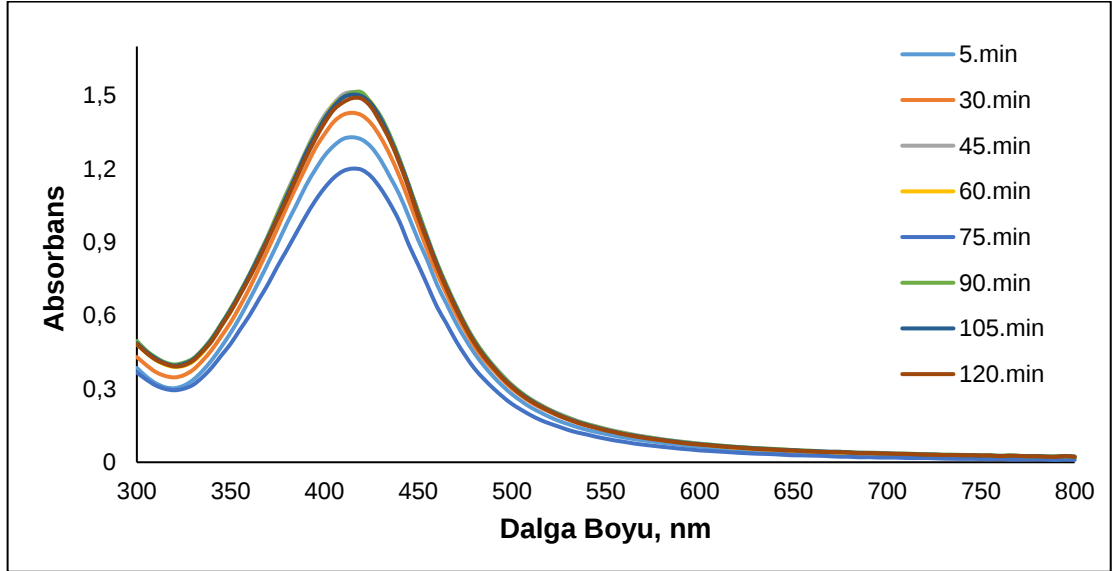
Şekil 9. Ag nanoparçacıkların ve bitki ekstraktının farklı pH optimizasyonu için UV / Görünür bölge analizi

Sonuçlara göre, pH değeri arttıkça absorbansta artış gözlemlenirken dalga boyunda ise 425 nm'den 410 nm'ye kayma (maviye kayma) gözlemlenmiştir (Şekil 9). pH:7 ve üzeri ortamda, Ag⁺ iyonlarının metalik gümüşe indirgenmesi ve çekirdek oluşumunun daha hızlı olduğu sonucuna varılmıştır (Edison ve ark., 2012). Reaksiyon pH'sı: 5, 7 ve 9' olan sentezlerden elde edilen nanoparçacıkların YPR piklerine ait (pH:5) 420 nm, (pH:7) 415 nm, (pH:9) 415 nm) absorbanslarının daha yüksek olması nedeniyle, nanoparçacık oluşum veriminin daha fazla olduğu düşünülerek, bu pH değerlerinde oluşan Ag

nanoparçacıkların STEM görüntüleri elde edilmiştir (karakterizasyon sonuçlarında STEM görüntüleri verilmiştir). Her üç pH’ da yapılan sentezlenen nanoparçacıkların küçük boyutlu ve homojen dağılımda olmaları nedeniyle, *in vivo* deneylerine, fizyolojik pH değerini dikkate alarak; pH: 7’ de sentezlenen Ag nanoparçacıkları ile devam edilmiştir.

4.1.5. Ag Nanoparçacıkların Sentezinde Reaksiyon Süresinin Etkisi

Nanoparçacık sentezi belirlenen koşullarda ([AgNO₃]: 6 mM, AgNO₃/ekstrakt: 9, oda sıcaklığı, pH: 7) tekrarlanarak, optimum sentez süresini belirlemek için, reaksiyon 2 saat boyunca karıştırılmaya bırakılmıştır ve belirli aralıklarla (15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 dk.) örnekler alınarak nanoparçacıkların YPR pikleri izlenmiştir (Şekil 10).

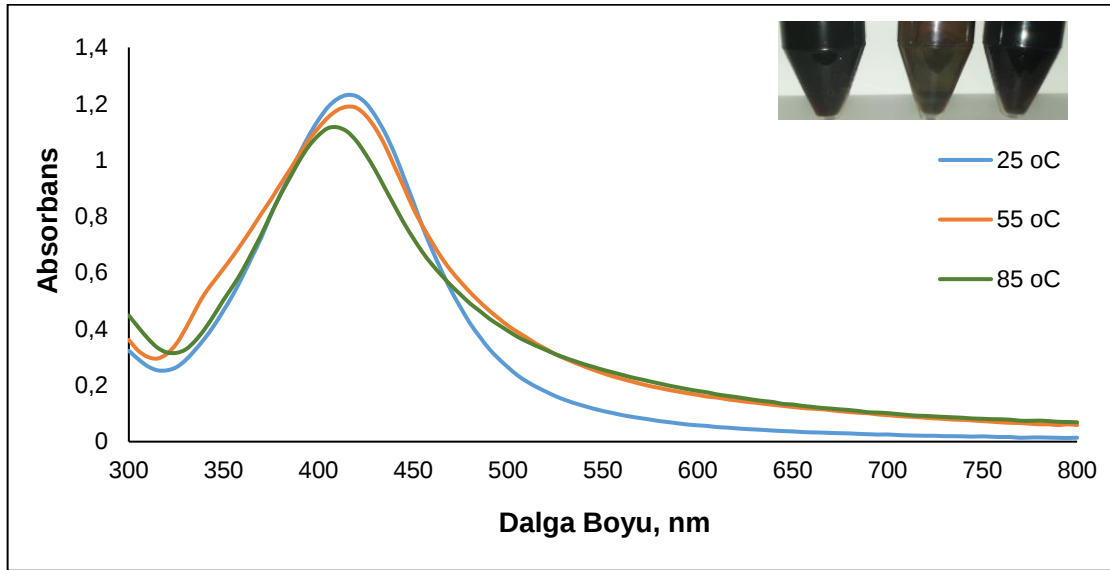


Şekil 10. Ag nanoparçacıklarının sentez sırasında belirli aralıklarda alınan örneklerinin UV / Görünür Bölge absorpsiyon spektrumları

Sonuçlara göre, nanoparçacık oluşumunun 60. dakikaya kadar sürdüğü, ilgili YPR pikinin şiddetinin artmasından anlaşılmaktadır. Reaksiyon süresinin artmasıyla parçacık büyümesinin meydana geldiği ve dolayısıyla nanoparçacık çekirdek oluşumunun 60 dakikada tamamlandığı düşünülmektedir. Daha uzun süren reaksiyonlarda, aglomere olan parçacıkların arttığı, santrifüjlenen örneklerin çökeleklerinin artmasından da doğrulanmaktadır. Optimum reaksiyon süresi 60 dk. olarak belirlenmiştir.

4.1.6. Ag Nanoparçacıkların Sentezinde Reaksiyon Sıcaklığının Etkisi

Nanoparçacıkların çekirdeklenme hızına, nanoparçacık büyümesine, boyut ve boyut dağılımında reaksiyon sıcaklığın etkisinin olduğu bilinmektedir (Yang ve ark., 2017). Belirlenen reaksiyon parametreleri ile Ag nanoparçacıkların sentezi oda sıcaklığı, 55 °C ve 85 °C sıcaklıklarda tekrarlanmıştır. Nanoparçacık örneklerinin UV/Görünür Bölge absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. Ag nanoparçacık sentezinde sıcaklık optimizasyonu için UV / Görünür Bölge analizi

Oda sıcaklığında sentezlenen nanoparçacıklarda herhangi bir çökme meydana gelmediği, ancak reaksiyon sıcaklığının artmasıyla aglomerasyonun arttığı ve çökmelerin olduğu gözlemlenmiştir. Nanoparçacıklara ait YPR pik şiddetlerinin azalması da nanoparçacık oluşum veriminin biraz azaldığını göstermektedir, ancak reaksiyon sıcaklığı 85 °C' e çıkarıldığında YPR pikinin 415 nm' den 410 nm' e kaydığı görülmüştür. Bu da yüksek sıcaklıkta yapılan sentezde, ekstrakt içeriklerinin aglomerasyonundan kaynaklı nanoparçacık çökmelerinin de olmasına rağmen nanoparçacık çekirdek oluşum hızını arttırması nedeniyle daha küçük ve homojen nanoparçacıkların oluştuğu sonucuna ulaştırmıştır (Liu ve ark., 2020) Oda sıcaklığında ve 85 °C'de sentezlenen nanoparçacıkların STEM görüntüleri alınmıştır ve sonuçlarla tutarlı olduğu görülmüştür. STEM görüntüleri nanoparçacık karakterizasyonu bölümünde verilmiştir.

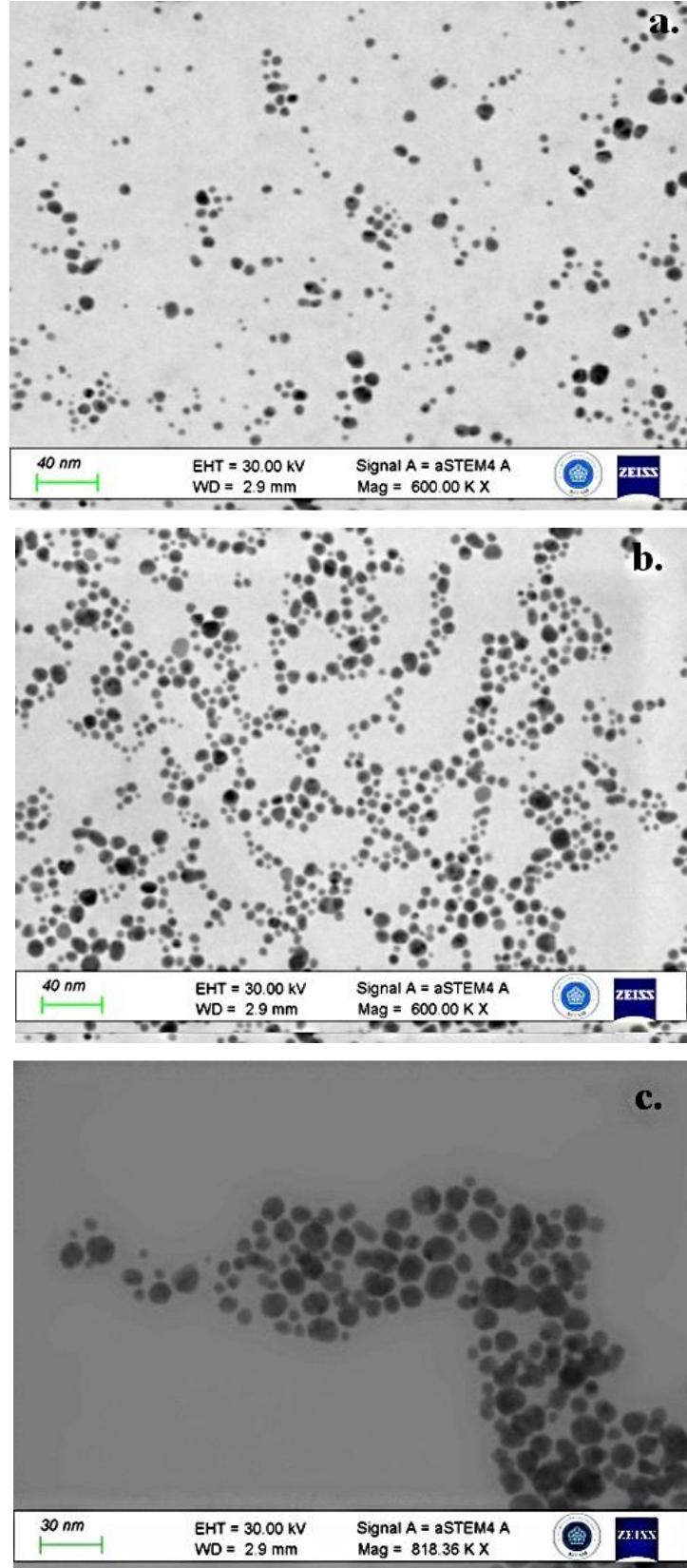
Sonuç olarak, sentezin 9 mL, 6 mM AgNO₃ çözeltisine 1 mL ekstrakt eklenmesiyle, pH: 7' de ve 85 °C' de ve 60 dk. sürede yapılmasıyla, kararlı nanoparçacık

oluşumu ve homojen parçacık büyümesinin sağlandığı optimum koşullara ulaşıldığı belirlenmiştir. Karakterizasyon ve in vitro çalışmalarda kullanılan nanoparçacıklar bu koşullar altında sentezlenmiştir.

4.2. Karakterizasyon Sonuçları

4.2.1. STEM ve EDS Analizi

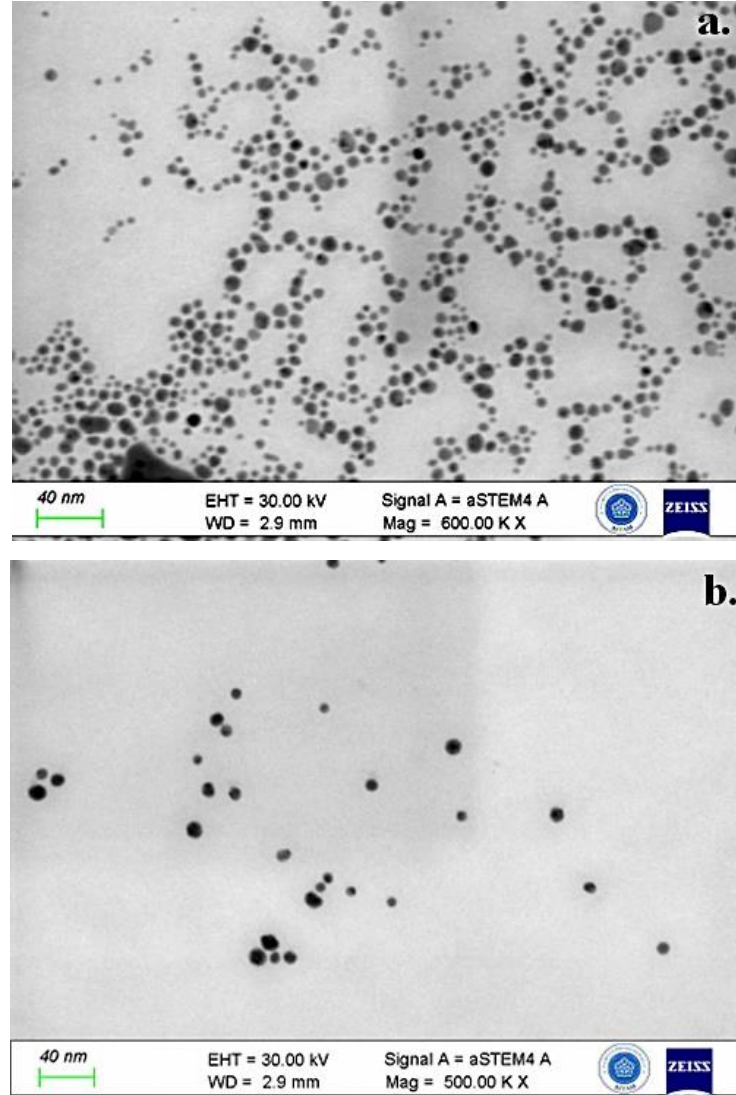
Biyolojik uygulamalarda kullanılmak üzere nanoparçacıkların hazırlanmasında, sentez ortamı ve kaplama ajanının uygunluğunun yanında nanoparçacığın boyut ve boyut dağılımının optimum olması, fizyolojik pH ortamında kararlılığının yüksek olması ve aglomere olup çökmemesi çok önemlidir. Bu amaçla, Ag nanoparçacıklarının sentez koşulları değiştirilerek, kararlı ve küçük boyutlu nanoparçacıklar sentezlenmeye çalışılmıştır. Üç farklı pH ortamında sentezlenen Ag nanoparçacıklarının morfolojisini ve boyutunu analiz etmek, üç örneğe ait elektron mikroskobu görüntüleri STEM cihazı ile alınmıştır (Şekil 11).



Şekil 12. a. pH: 5' de, b. pH: 7' de, c. pH: 9' da sentezlenen Ag nanoparçacıklarının STEM görüntüleri skala sırasıyla; 40, 40, 30 nm.

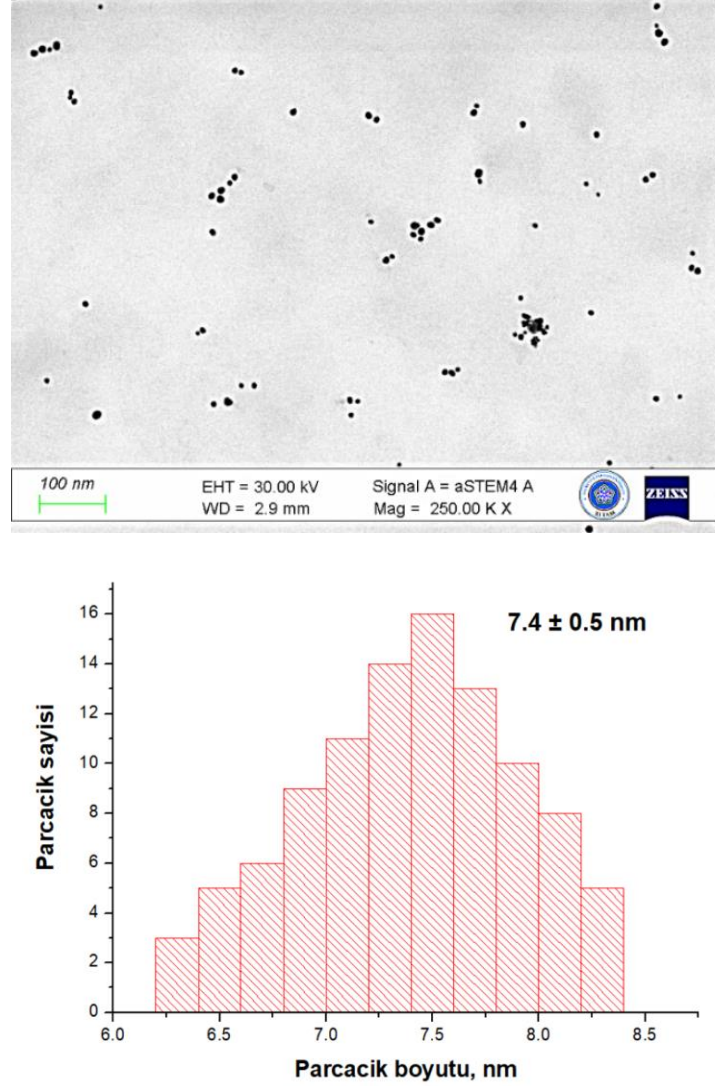
STEM görüntüleri, Ag nanoparçacıklarının oluşumunun monodisperse ve küresel şekilde gerçekleştiğini göstermiştir (Şekil 12). Her üç örneğe ait büyük aglomerasyonların olmamasına rağmen, STEM görüntülerinden pH: 5’ de sentezlenen nanoparçacıkların boyut dağılımlarının diğerlerine göre daha geniş olduğu, nanoparçacık büyümesinin bu şartlarda homojen olmadığı gözlemlenmiştir. pH: 9’da sentezlenen nanoparçacıklarda daha büyük parçacıkların olduğu görülmüştür. Sentezlere pH: 7’ de devam edilerek, nanoparçacık oluşumuna sıcaklığın etkisi değerlendirilmiştir.

Nanoparçacık boyutuna etki eden en önemli reaksiyon parametresi olan reaksiyon sıcaklığının nanoparçacık oluşumuna etkisini anlamak için, pH: 7’ de, 25 °C ve 85 °C’ de sentezlenen örneklerin STEM görüntüleri alınmıştır.



Şekil 13. a. 25 °C’ de, b. 85 °C’ de, sentezlenen Ag nanoparçacıklarının STEM görüntüleri skala: 40 nm.

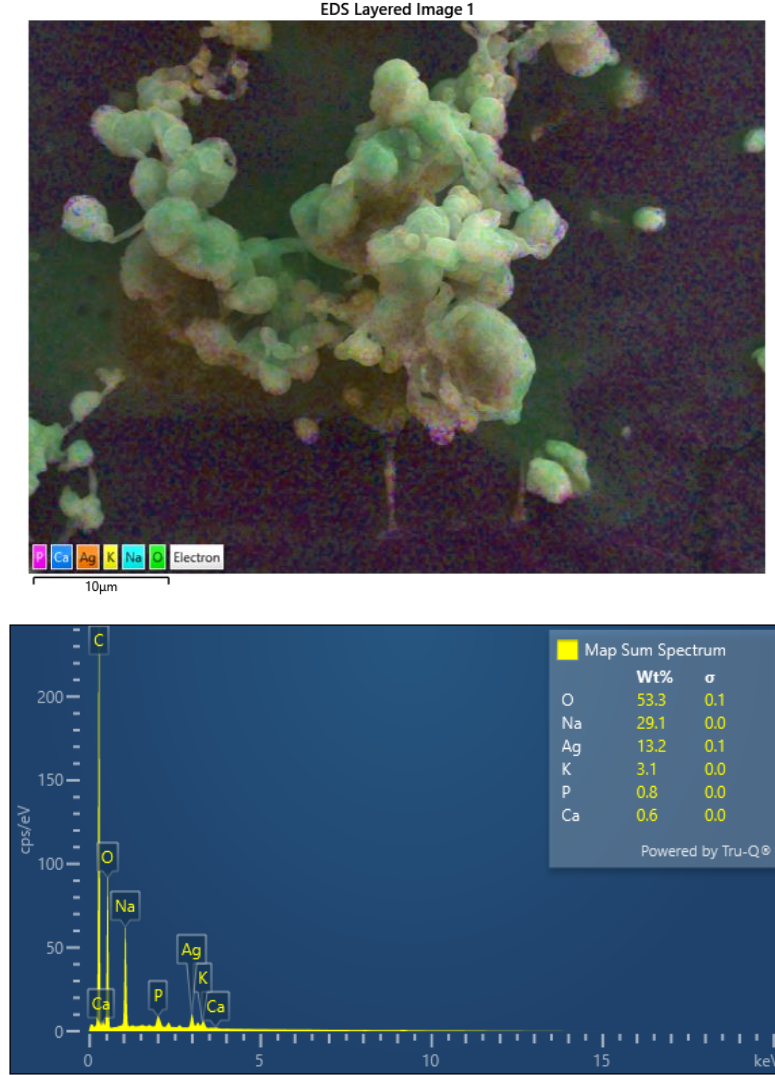
Yüksek sıcaklıkta sentezlenen nanoparçacıkların oda sıcaklığında sentezlenene göre boyut dağılımının daha homojen olduğu gözlemlenmiştir. 85 °C’ de sentezlenen nanoparçacıklara farklı bölgelerden geneli temsil etmesi açısından farklı büyütme bir STEM görüntüsü daha verilmiştir (Şekil 14). pH: 7 ve 85 °C’ de sentezlenen nanoparçacıkların STEM görüntülerinden, boyut dağılımı grafiği elde edilmiştir. Grafik 100 parçacığın boyutlarının Image J programında ölçülmesiyle çizilmiştir.



Şekil 14. a. 85 °C’ de, sentezlenen Ag nanoparçacıklarının STEM görüntüsü skala: 100 nm. b. STEM görüntüsünden elde edilen boyut dağılım grafiği.

Elektron mikroskop görüntülerinden yola çıkılarak sentezlere 85 °C’ de devam edilmiştir. Tüm karakterizasyonlar ve in vitro çalışmaları, pH:7 ortamında 85 °C’ de ve belirlenen diğer optimum koşullarda sentezlenen nanoparçacıklara aittir.

Nanoparçacıkların metal içeriklerinin gösterilmesi için Taramalı Elektron Mikroskopisi (FESEM) cihazı ile EDS analizi yapılmış ve örneğin bileşimi gösterilmiştir (Şekil 15).

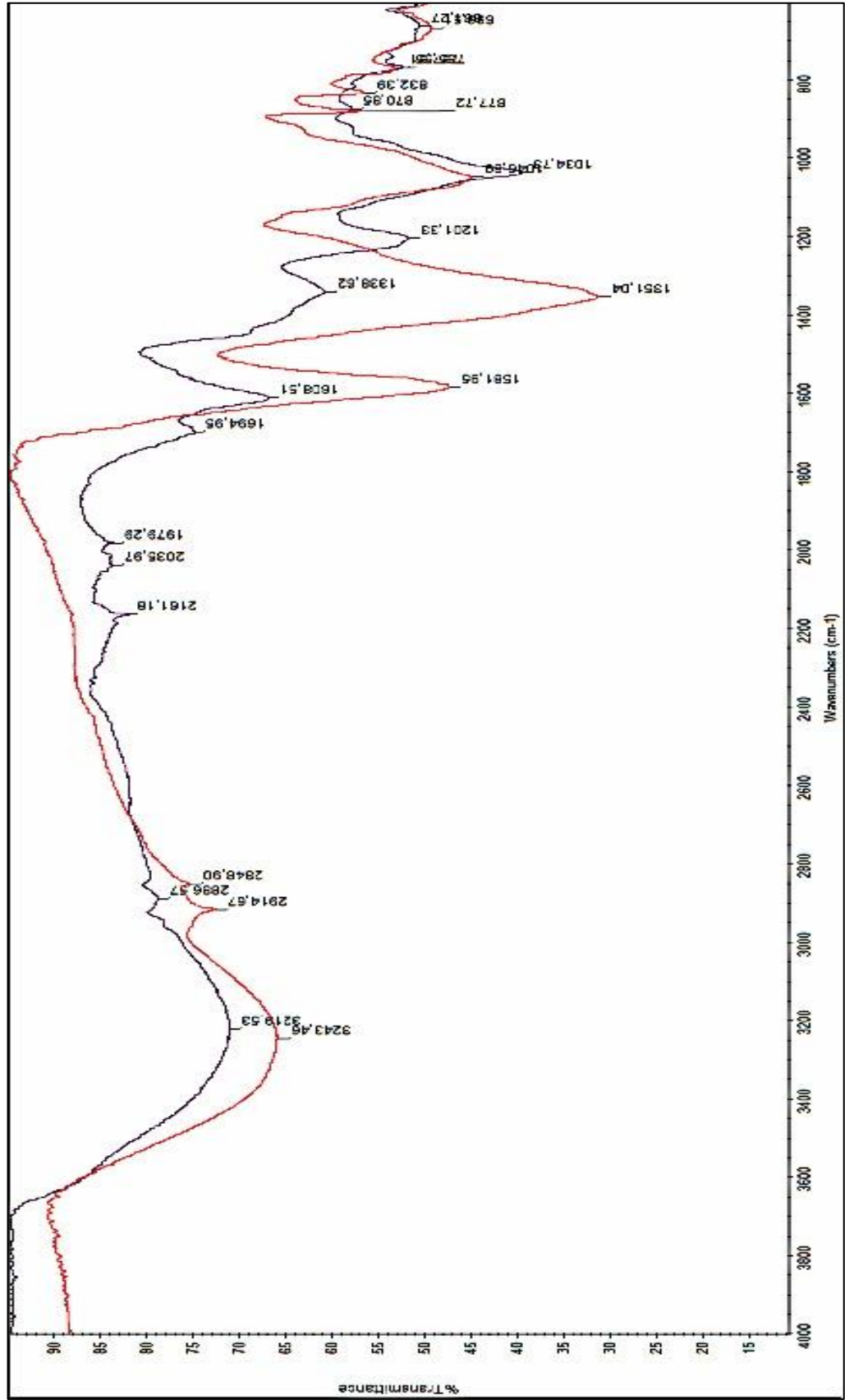


Şekil 15. Ag nanoparçacık örneğinin EDS analizi

EDS spektrumundan, nanoparçacık örneğinin Ag, O, Na, K, P ve Ca içeriği görülmektedir. Ag dışındaki içerikler bitki ekstraktından kaynaklanmaktadır.

4.2.2. FT-IR Analizi

FT-IR spektroskopisi kullanılarak hem nanoparçacıkların hem de bitki ekstraktının içeriğinde bulunan fonksiyonel grupları ve ikincil metabolitleri belirlemek amacıyla kurutulmuş örneklerin 400-4000 cm^{-1} spektral aralıkta spektrumları alınmıştır ve spektrumlar üst üste çakıştırılarak verilmiştir (Şekil 15). Elde edilen analiz sonuçları tablo halinde özetlenerek gösterilmiştir (Tablo 5).



Şekil 16. *Cotinus coggygria* Scop. ekstraktı (mavi) ve Ag nanoparçacıklarına (kırmızı) ait FTIR spektrumları

Tablo 5. Ag nanoparçacıkların ve *Cotinus coggygia* Scop. ekstraktının FTIR spektrumlarından elde edilen bantların dalgasayıları (cm^{-1})

Ag Nanoparçacıkları (cm^{-1})	<i>Cotinus coggygia</i> Scop. Ekstraktı (cm^{-1})
3243,46	3219,53
2914,67	2886,57
1581,95	1608,51
1351,04	1338,62
1046,89	1201,33
877,72	1034,73
832,39	870,85
767,61	765,55
666,61	661,27

Bitki ekstraktına ve nanoparçacığa ait spektrumlar karşılaştırıldığında (Şekil 15), bantlara ait güçlü tepe noktalarının dalga sayılarının biraz kaydığı, ancak aynı fonksiyonel grupların her iki örnekte de bulunduğu görülmüştür. Bu sonuç nanoparçacıkların *Cotinus coggygia* Scop. bitki ekstraktı ile sentezlendiğini doğrulanmaktadır.

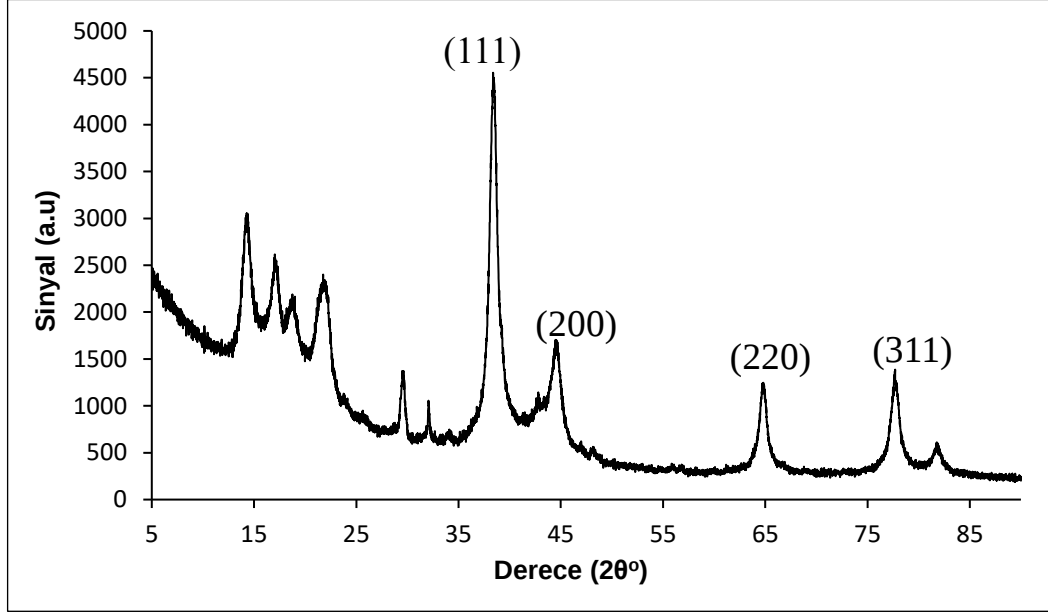
Literatüre bakıldığında *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinin çeşitli bölgelerinin biyoaktif sekonder metabolitler, flavonoidler (fitesin, fustin, kuersetin, apigenin, mirisetin taksifolin), auronlar (sülfüretin, disülfüredin, sülfürin), kalkonlar (butein, izoliquiritigenin), antosiyanin ve diğer fenolik içerik bakımından zengin olduğu bildirilmiştir (Deniz ve ark., 2020). Spektrumda dalga sayılarındaki kaymalar, bu geniş spektrumlu ekstrakt bileşenlerinin Ag nanoparçacık oluşumunda rol almasından (indirgeme ve oksitleme) ve nanoparçacık yüzeyine bağlanmasından kaynaklanmaktadır.

Cotinus coggygia Scop. Ekstraktının FTIR spektrumundaki, 3243 cm^{-1} ' deki şiddetli bant polifenolik gruplardaki O-H gerilme titreşimine karşılık gelmektedir (Li, 2020). Bu bantın 3243 cm^{-1} 'den 3219 cm^{-1} ' e kayması ekstraktta bulunan fenolik bileşiklerin nanoparçacık sentezindeki katkısını göstermektedir (Hemlata, 2020).

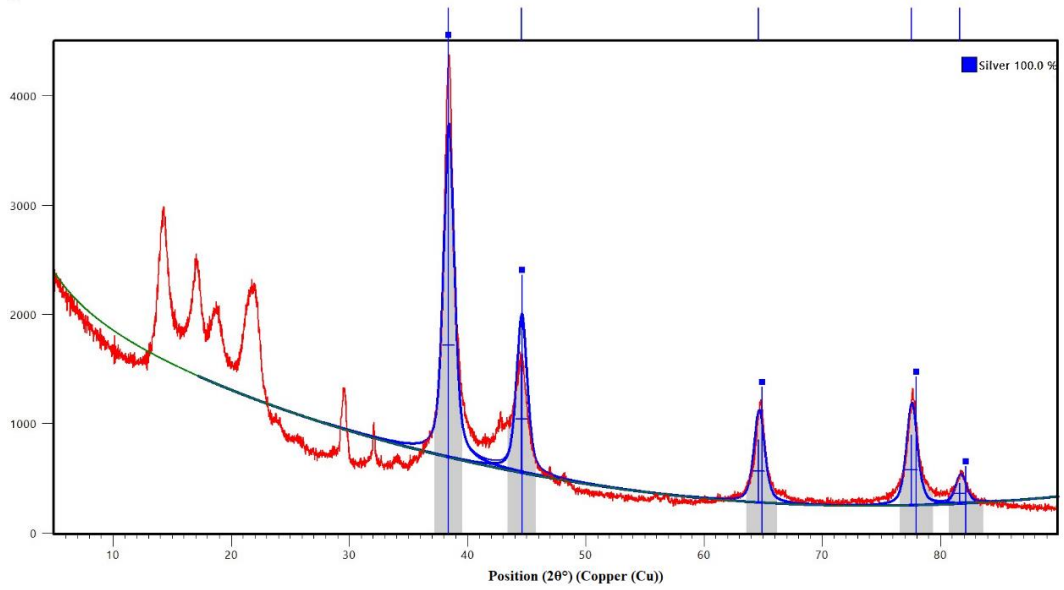
2914 ve 2848 cm^{-1} de C-H bağlarının gerilme titreşiminden kaynaklanan piklere karşılık gelmektedir (Zhang, 2020). 1351 cm^{-1} ' deki bant ise bantlar C-H ve C-O gerilme titreşimlerine aittir (Sirdeshpande, 2018). 1046 cm^{-1} de tanımlanan bant ester, alkol, karboksilik asit, eterdeki amid C-O bağı ile birlikte amin bağlarının varlığını göstermektedir (Yusefi, 2020). 1550 - 650 cm^{-1} arasındaki bantlar C=O fonksiyonel grubuna atfedilmektedir. Bu verilere bakıldığında tanımlanan tüm bantların ekstraktta bulunan zengin polifenol içeriğinin varlığını kanıtlar nitelik taşıdığı görülmektedir.

4.2.3. X-Işını Difraktometresi (XRD) Analizi

Cotinus coggygia Scop. ekstraktı kullanılarak sentezlenmiş Ag nanoparçacıkların kristal yapılarını ve kristal saflığını ortaya koymak amacıyla XRD analizi yapılmıştır ve XRD spektrumu elde edilmiştir (Şekil 16). XRD sonuçlarına göre ayrıca Rietveld analizi de yapılmıştır ve % Ag bileşimi de verilmiştir (Şekil 17, 18).



Şekil 17. Ag nanoparçacığın XRD deseni.



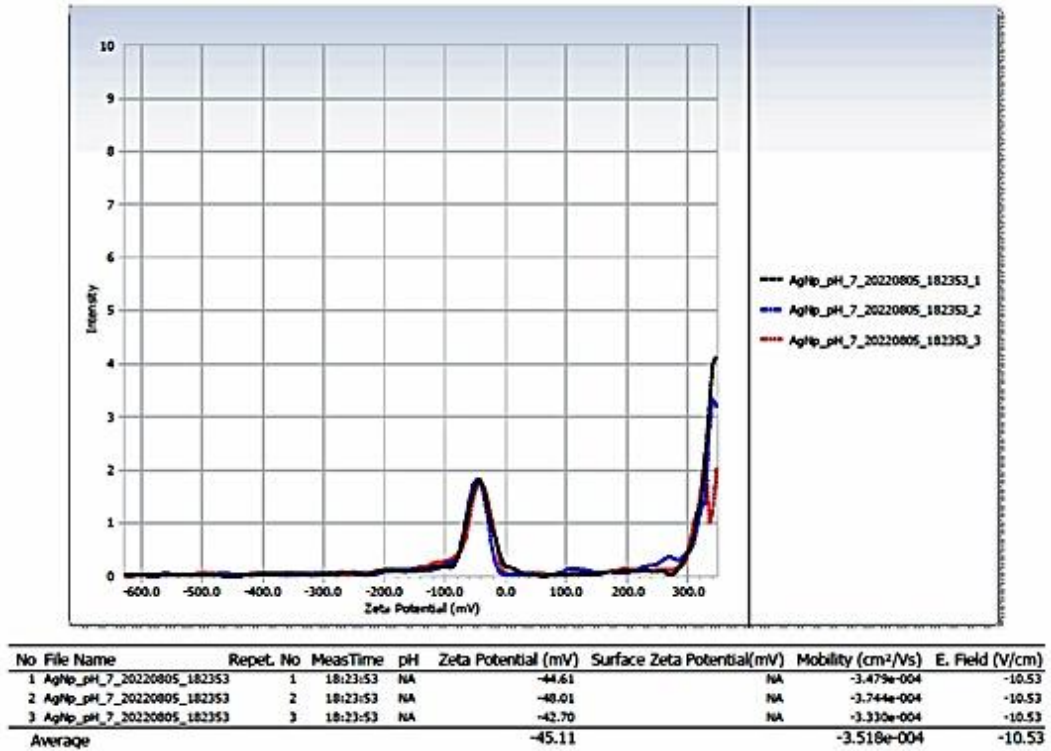
Şekil 18. Ag nanoparçacığın Rietveld analizi

Elde edilen bu spektrumdaki keskin pikler Ag nanoparçacıklarının kübik ve kristal yapıda olduğunu yansıtmaktadır (Hemlata, 2020). Ag nanoparçacıkların XRD deseni dört şiddetli tepe noktası vermiştir. Bu tepe noktaları $2\theta = 38^\circ$, 45° , 64° ve 77° olmakla beraber sırasıyla; (111), (200), (220) ve (311) düzlemlerine karşılık gelmektedir (Pandit ve ark., 2017). $2\theta = 30^\circ$, 32° , 34° açı değerlerindeki piklerin ekstraktan kaynaklandığı düşünülmektedir (Khan ve ark., 2020).

Rietveld analizine göre, sentezlenen nanoparçacıklar %100 metalik gümüş fazından oluşmaktadır. XRD sonuçları, yeşil sentez yöntemi ile Ag nanoparçacıkların üretildiği diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Abreu, 2020). Böylece XRD analizi sonuçları ile, yeşil sentez yöntemi kullanarak kristal Ag nanoparçacıklarının başarılı bir şekilde sentezlendiği kanıtlanmıştır.

4.2.4. Zeta Potansiyeli Analizi

Kolloidal nanoparçacıkların yüzey yükü ve kararlılığı zeta potansiyeli ölçümü ile belirlenmektedir (Nagasaki ve ark. 2003). Ag nanoparçacıklarının sulu çözeltisindeki yüzey yük karakterizasyonu zeta potansiyel ölçüm cihazı ile 3 tekrarlı ölçümler şeklinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 19).

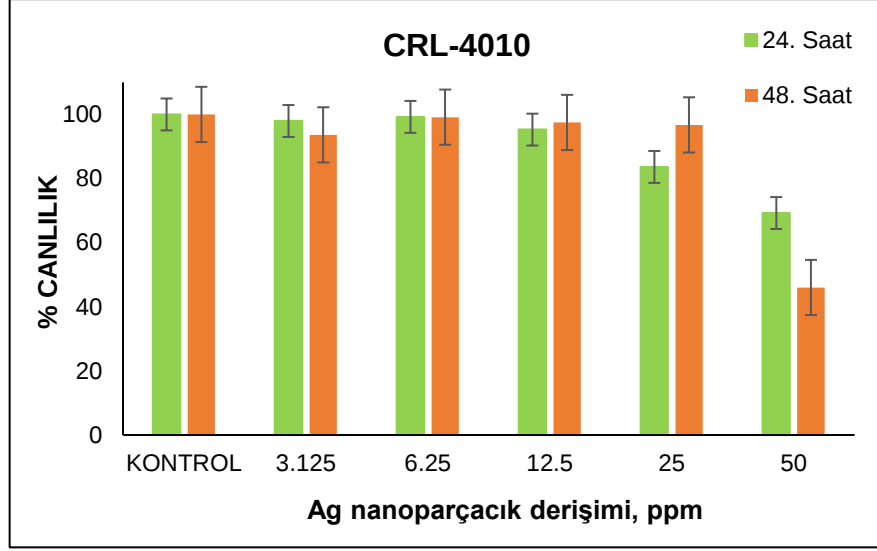


Şekil 19. Ag nanoparçacıklarına ait zeta potansiyeli grafiği.

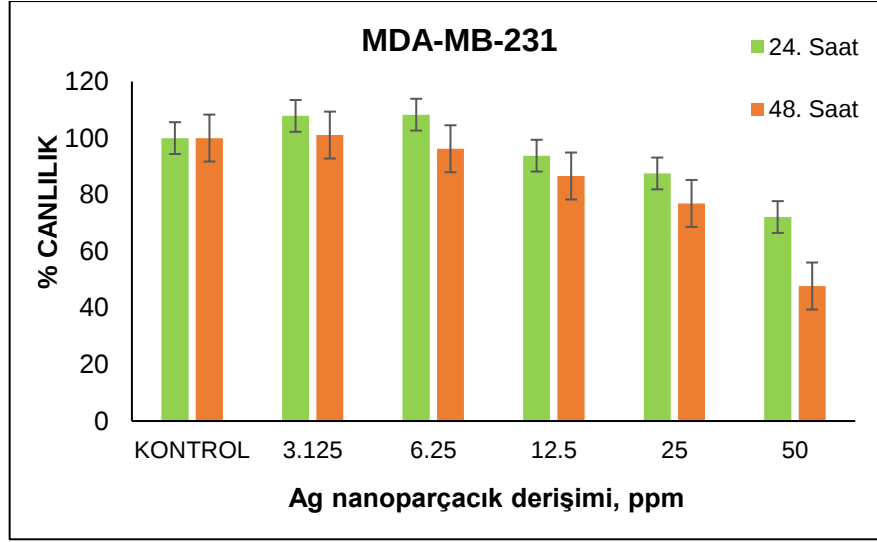
Ag nanoparçacıkların deiyonize su içindeki süspansiyonunun zeta potansiyeli -45.11 mV olarak bulunmuştur. Ag nanoparçacıklar arası aglomerasyonun azalmasının nedenlerinden birinin Ag nanoparçacıkların yüzeyindeki yük büyüklüğünün yüksek oluşundan kaynaklandığı ve yüksek yükün nanoparçacıklar arasında oluşan güçlü bir itici güce sahip olmasından kaynaklandığı bilinmektedir (Ebrahimzadeh, 2020). Parçacık aglomerasyonunu ve kümelenmesini önlemek için aynı zamanda nanoparçacıklar arası kararlılığı sağlamak için yüksek pozitif ya da negatif zeta potansiyeli sonuçlarının elde edilmesi gerekmektedir (Nagasaki ve ark., 2003). Literatüre bakıldığında yüksek negatif zeta potansiyeline sahip kolloidlerin elektriksel kararlılıklarının daha iyi olduğu görülmektedir. Buna karşılık düşük negatif zeta potansiyeline sahip kolloidlerin kümeleşme eğiliminde olduğu söylenmektedir (Jadhav, 2018). Belirlenen optimum koşullarda sentezlenen Ag nanoparçacıklarının aglomerasyonunun olmaması ve aylarca nanoparçacık süspansiyonunun kararlı kalması, bu bilgiler ışığında değerlendirdiğimizde Ag nanoparçacığının -45.11 mV zeta potansiyeli değeri ile kararlılığın yüksek olduğunu doğrulamaktadır.

4.3. Sitotoksikite Testi (MTT Testi)

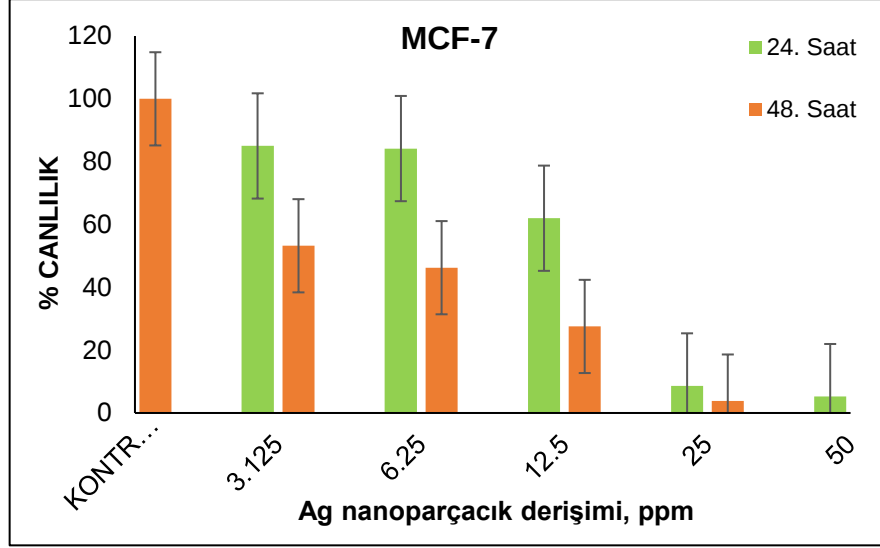
CRL-4010 meme epitelyal ve MCF-7 ile MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları 5 farklı dozda (3.125 ppm, 6.25 ppm, 12.5 ppm, 25 ppm ve 50 ppm) Ag nanoparçacıkları ile 24 saat ve 48 saat muamele edilmiştir. Doz ve zamana bağlı olarak Ag nanoparçacıklarının hücre canlılığına etkileri MTT testi kullanılarak belirlenmiştir. Belirlenen dozların yanında nanoparçacık ile muamele edilmemiş hücreler de kontrol olarak çalışılmıştır Mitokondride NADPH bağımlı hücresel oksidoredüktaz enzimi bulunmaktadır. Bu enzim MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) boyasını çözünmez formazana indirgeme özelliği göstermektedir ve formazan oluşumu hücresel metabolizma hızına bağlıdır (Kumar ve ark., 2018). Dolayısıyla nanoparçacıklar ile muamele edilmiş hücrelerin, nanoparçacık ile muamele edilmemiş hücrelere göre düşük metabolizma hızına sahip olmaları beklenmektedir. Sonuçlar, % canlılık' a karşı derişim grafikleri şeklinde verilmiştir (Şekil 20-22).



Şekil 20. 5 farklı derişimdeki (3.125 ppm, 6.25 ppm, 12.5 ppm, 25 ppm ve 50 ppm) Ag nanoparçacık ile 24 saat ve 48 saat muamele edilmiş CRL-4010 hücrelerine ait hücre canlılık grafiğı (n=3).



Şekil 21. 5 farklı derişimdeki (3.125 ppm, 6.25 ppm, 12.5 ppm, 25 ppm ve 50 ppm) Ag nanoparçacık ile 24 saat ve 48 saat muamele edilmiş MDA-MB-231 hücrelerine hücre canlılık grafiğı (n=3).

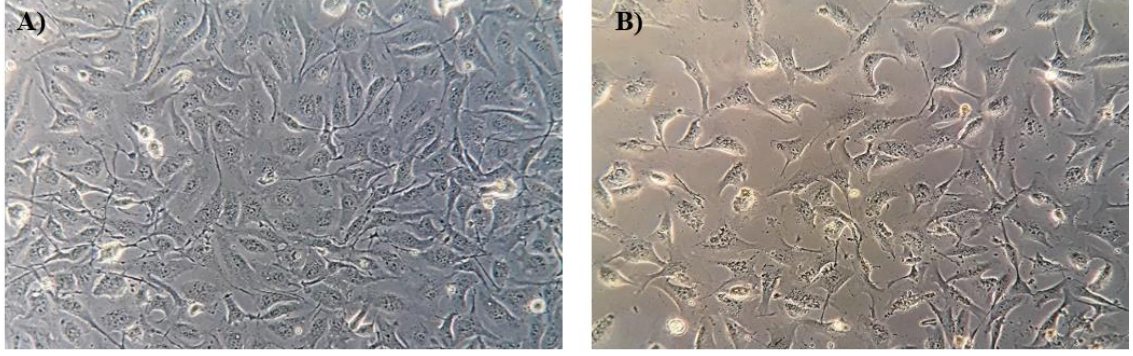


Şekil 22. 5 farklı derişimdeki (3.125 ppm, 6.25 ppm, 12.5 ppm, 25 ppm ve 50 ppm) Ag nanoparçacık ile 24 saat ve 48 saat muamele edilmiş MCF-7 hücrelerine ait hücre canlılık grafiğı (n=3).

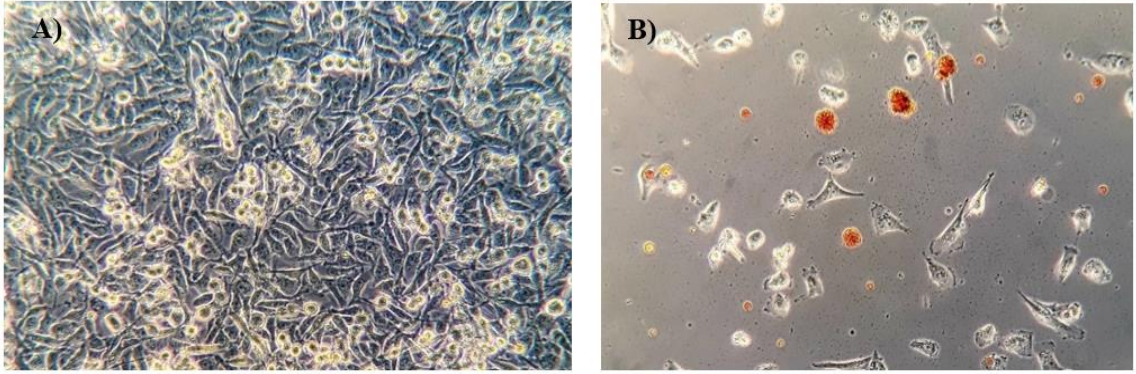
Veriler ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir ve biyolojik olarak bağımsız üç deneyden elde edilmiştir. Kontrol hücrelerine göre muamele görmüş hücrelerin sonuçlarının istatistiksel anlamlılığı student t-testi ile belirlenmiştir ($p < 0.05$).

MTT testi sonuçları Ag nanoparçacıkların artan derişimiyle ve maruziyet süresiyle birlikte hücre canlılığının üç hücre tipinde de azaldığını göstermektedir (Şekil 20-22). CRL-4010 sağlıklı hücrelerinin maksimum Ag derişiminde (50 ppm) nanoparçacık maruziyeti karşısında hücre canlılığının 24. saatte %69,2' e düştüğü, 48. saatte %46' ya düştüğü görülmüştür. MDA-MB-231 kanser hücrelerinin maksimum. Ag derişiminde (50 ppm) nanoparçacık maruziyetinde hücre canlılığının %72,1' e, 48. saatte ise %47,7' e düştüğü görülmüştür. Zamana bağlı olarak ve artan derişimle birlikte MCF-7 kanser hücrelerinde ise hücre canlılığında en düşük derişimlerde bile ciddi bir azalmanın olduğu görülmüştür (Şekil 16.). MCF-7 kanser hücrelerinin aynı derişimdeki (50 ppm) Ag maruziyetinde, hücre canlılığı 24. saatte %5,2' e düşmüştür. 48. saatte bu değer %3,5 şeklindedir. MCF-7 hücreleri için IC_{50} değeri 24 saat için ~15 ppm, 48 saat için ~4 ppm olarak bulunmuştur. MCF-7 hücrelerinin Ag nanoparçacıklarının daha düşük dozlarında bile diğer hücre tiplerine göre daha çok etkilenmesi nanoparçacıkların seçici sitotoksik etki göstermesi bakımından anlamlıdır. Bununla birlikte MDA-MB-231 kanser hücrelerinin Ag nanoparçacıklara MCF-7 kanser hücrelerine kıyasla direnç gösterdiği ortadadır (Şekil 20-22). MDA-MB-231 hücre hattının IC_{50} değeri (~ 50 ppm) olan ve bu

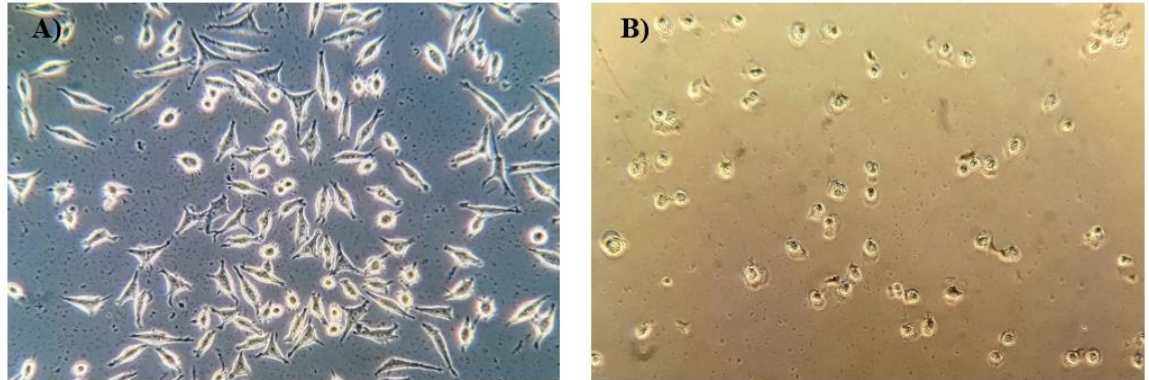
hücre hattında nanoparçacıkların etkin dozu olan ~ 50 ppm Ag nanoparçacık kullanılarak apoptosis deneylerine tüm hücre hatlarında devam edilmiştir. Hücre görüntüleri kontrol hücre (nanoparçacık uygulanmamış) ve nanoparçacık uygulanmış hücre olarak gösterilmiştir (Şekil 23-25).



Şekil 23 A) Kontrol (Nanoparçacık uygulanmamış) CRL-4010 hücre hattı **B)** Nanoparçacık uygulanmış (50 ppm) CRL-4010 hücre hattı



Şekil 24. A) Kontrol (Nanoparçacık uygulanmamış) MDA-MB-231 hücre hattı **B)** Nanoparçacık uygulanmış (50 ppm) MDA-MB-231 hücre hattı



Şekil 25. A) Kontrol (Nanoparçacık uygulanmamış) MCF-7 hücre hattı **B)** Nanoparçacık uygulanmış (50 ppm) MCF-7 hücre hattı

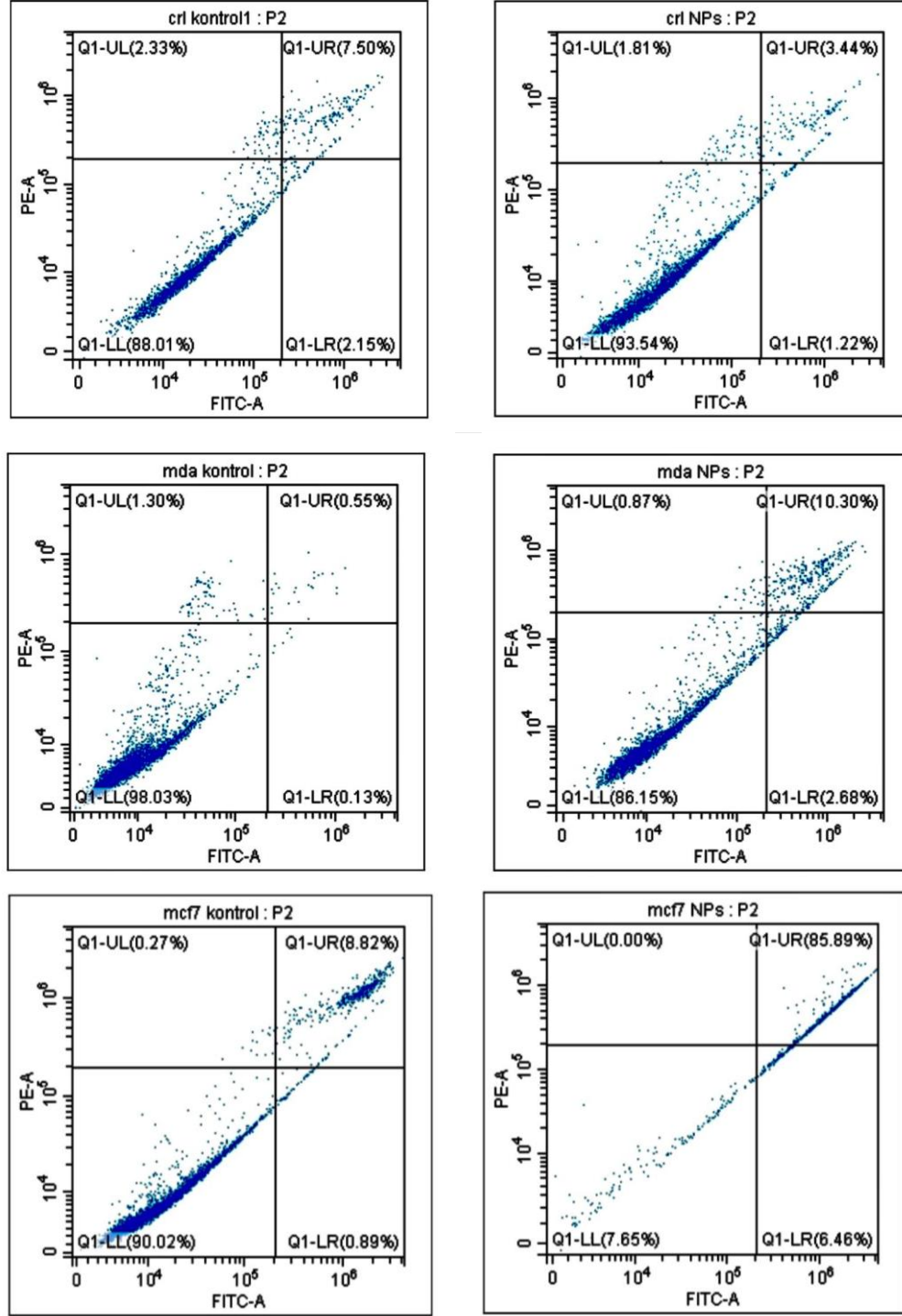
Yeni bir ajan olarak ilginin arttığı fitokimyasallar vasıtasıyla üretilen Ag nanoparçacıkların ilaç dağıtım sistemi olarak kullanıldığı bilinmektedir. Çetintaş ve ark. yaptığı çalışmada biyosentezi gerçekleştirilmiş Ag nanoparçacıkların MDA-MB-231, A549 ve HT29 insan kanseri hücre hatları üzerinde antikanser aktivitelerini araştırarak raporlamışlardır. Kanser hücreleri Ag nanoparçacıklarla 24 saat muamele edildikten sonra sitotoksik etki MTT testi kullanılarak analiz edilmiştir ve bu çalışmada üretilen Ag nanoparçacıkların MDA-MB-231 hücre hattında diğerlerine göre en yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilerek çalışmada kullanılan hem *Eucalyptus camaldulensis* bitki ekstraktının hem de bu bitki ekstraktı kullanarak sentezlenen Ag nanoparçacığının duyarlılığının MDA-MB-231 kanser hücre hattında daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Çetintaş ve ark., 2020). Çeşitli makalelerde Ag nanoparçacıkların MCF-7 kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri bildirilmiştir. Kabir ve diğerleri Ag/AgCl nanoparçacıklarını yeşil sentez yöntemi ile üreterek MCF-7 kanser hücre hattında meydana gelen sitotoksik etkileri incelemiştir. Bu sitotoksik etki MTS testi kullanılarak analiz edilerek IC₅₀ değerleri 28 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ag/AgCl nanoparçacıkları MCF-7 kanser hücre hattı üzerindeki etkinin diğer çalışmalardaki Ag nanoparçacıklarına göre daha uzun süreli olduğu bildirilmiştir (Kabir ve ark., 2020). Hemlata ve ark. yaptıkları bir çalışmada Ag nanoparçacıkların biyosentezini *Cucumis prophetarum* bitki ekstraktı ile gerçekleştirerek A549, MDA-MB-231, HepG2 ve MCF-7 kanser hücre hatları üzerindeki antiproliferatif aktivite değerlendirilmiştir. Hücreler farklı derişimlerde nanoparçacık ile 24 saat muamele edildikten sonra hücre canlılığı analizi için MTT testi kullanılmıştır ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 105,8, 81,1, 94,2 ve 65,6 µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre elde edilen nanoparçacığının diğer hücrelere kıyasla MCF-7 kanser hücre hattı üzerinde sitotoksik etkinin daha yüksek olduğu görülmüştür (Hemlata ve ark., 2020).

Literatürdeki bazı verilere bakılarak, Ag nanoparçacıklarının daha düşük dozunun MDA-MB-231 ve MCF-7 hücreleri üzerinde etkin olduğu görülmektedir.

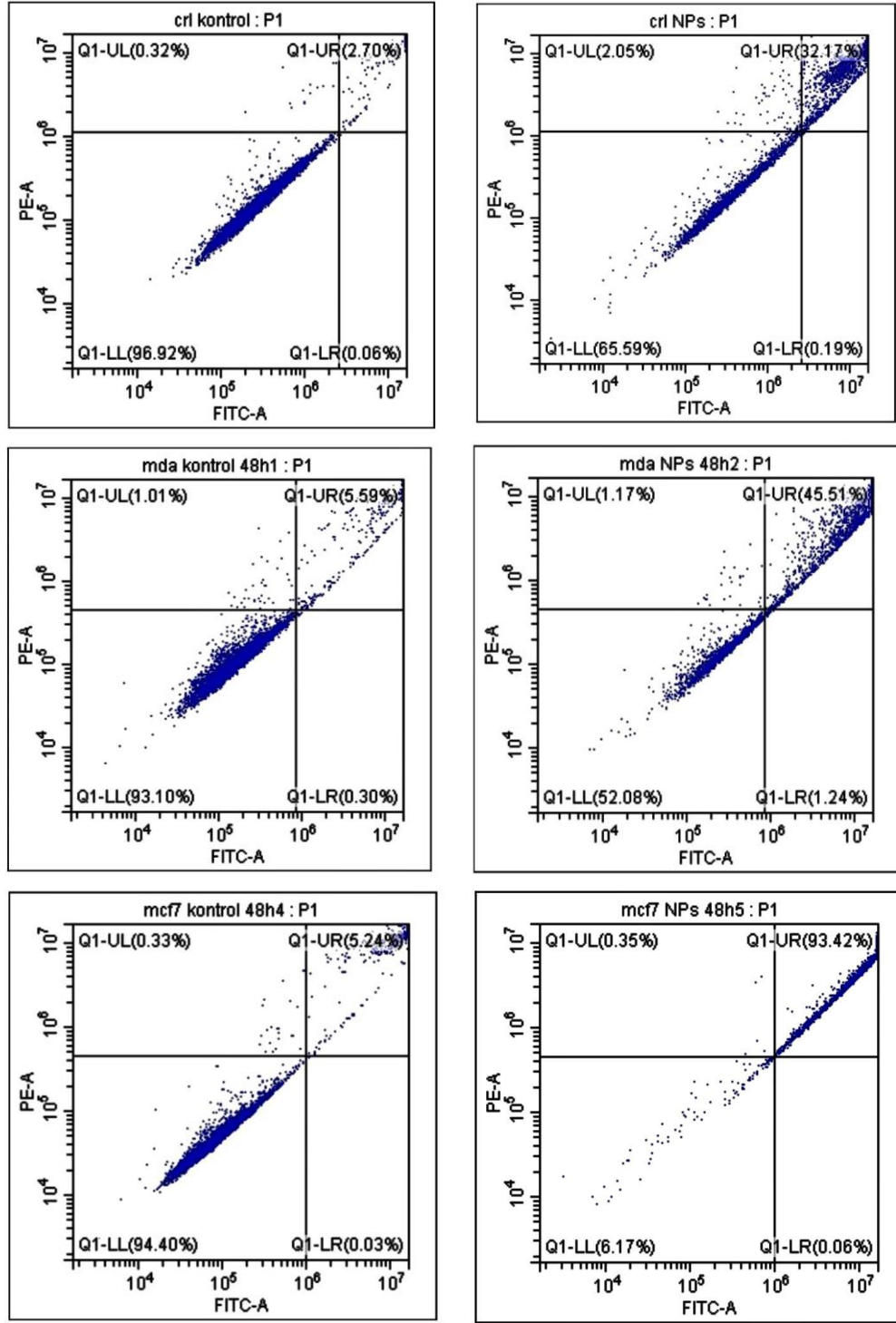
4.4. Aneksin-V Apoptoz Analizi (Akış Sitometresi Analizi)

Hücre ölümünün apoptotik yol ile gerçekleşip gerçekleşmediğini anlayabilmek için Ag nanoparçacıklar ile muamele edilmiş sağlıklı hücre ve kanserli hücreler üzerinde Anneksin-V ve PI kimyasalları kullanılarak çift boyama yapılmıştır. CRL-4010, MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri, 50 ppm Ag nanoparçacıkları ile 24 saat ve 48 saat muamele edilmiştir. Elde edilen sonuçlar histogramlar şeklinde verilmiştir (Şekil 26,27).

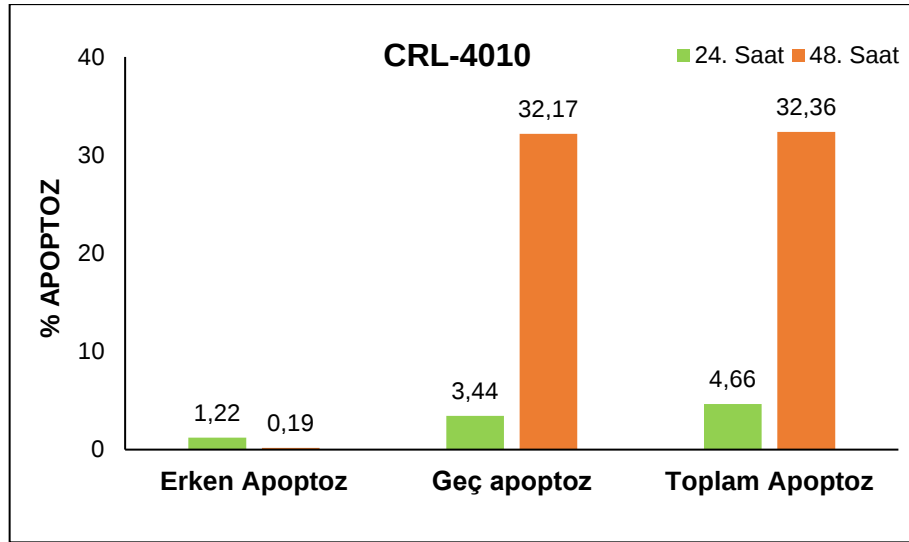
Histogramdaki bölgelerden; Q1-UL ve Q1-LL ölü (nekrotik) ve canlı hücre popülasyonunu gösterirken, Q1-UR ve Q1-LR geç ve erken apoptotik hücre popülasyonunu göstermektedir. Histogramlardaki verilerden yararlanarak, Ag nanoparçacıklar ile muamele edilen sağlıklı ve kanserli hücrelerde ve kontrol gruplarında görülen erken ve geç apoptoz yüzdeleri dikkate alınarak ve toplam apoptoz yüzdeleri hesaplanarak Ag nanoparçacık derişimine karşı apoptotik hücre popülasyonlarının grafiği elde edilmiştir (Şekil 28-30).



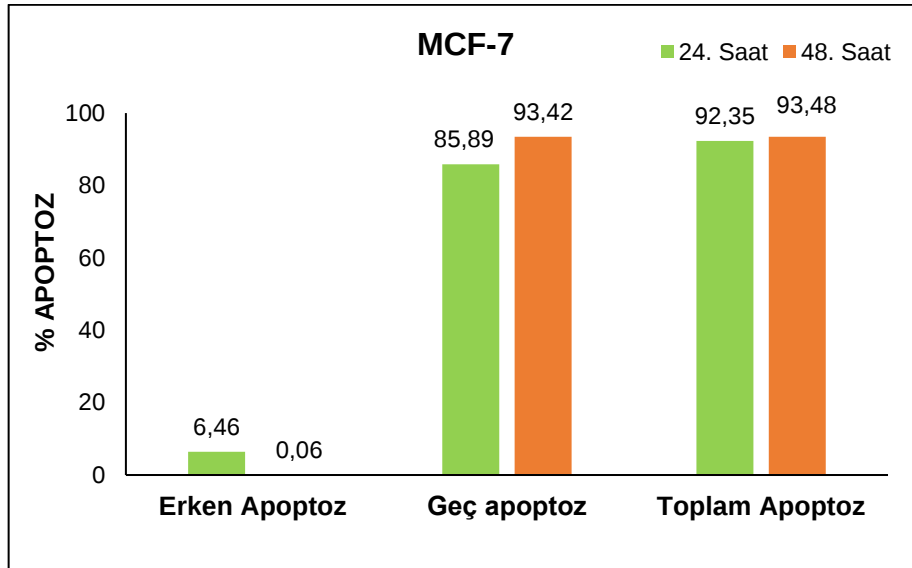
Şekil 26. 50 ppm Ag nanoparçacıkları ile 24 saat boyunca muamele edilmiş CRL-4010, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları ve kontrol grubu için akış sitometrisi analiz sonuçları



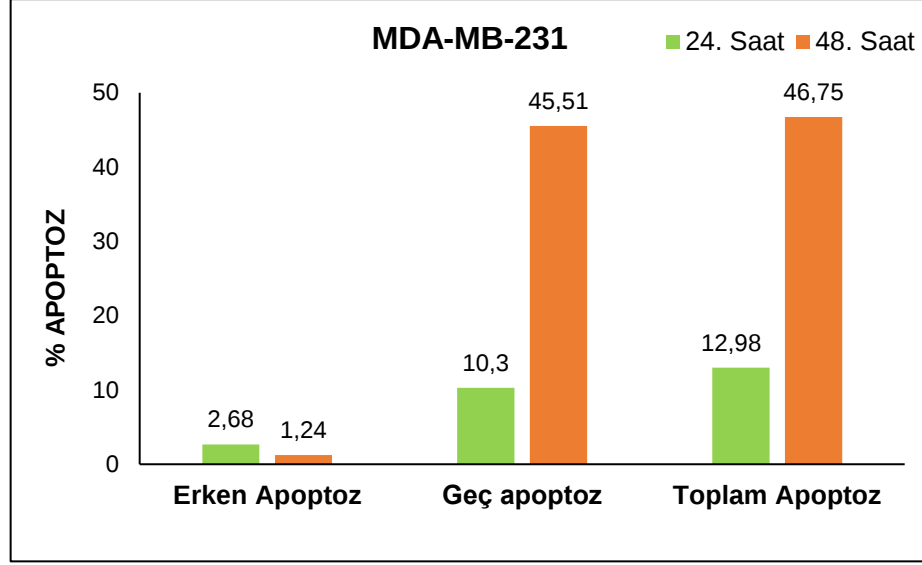
Şekil 27. 50 ppm Ag nanoparçacıkları ile 48 saat boyunca muamele edilmiş CRL-4010, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatları ve kontrol grubu için akış sitometrisi analiz sonuçları



Şekil 28. 50 ppm olan Ag nanoparçacık ile muamele edilmiş CRL-4010 hücrelerine ait 24. saat ve 48. saat % apoptoz grafiği



Şekil 29. 50 ppm olan Ag nanoparçacık ile muamele edilmiş MCF-7 hücrelerine ait 24. saat ve 48. saat % apoptoz grafiği



Şekil 30. Derişimi 50 ppm olan Ag nanoparçacık ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücrelerine ait 24. saat ve 48. saat % apoptoz grafiğı

Ag nanoparçacıklar ile muamele edilen MCF-7 hücre hattında inkübasyonun 24. saatte, MDA-MB-231 hücre hattına kıyasla apoptotik hücre popülasyonunun fazla olduğu ve zaman bağılı olarak her iki hücre hattı için bu oranın 48. saatte arttığı görülmüştür. Bununla beraber sağlıklı hücre olan CRL-4010 hücre hattında diğer hücre hatlarına kıyasla 48 saate kadar apoptotik hücre popülasyonunun daha az olduğu saptanmıştır. Toplam apoptoz yüzdeleri, 24. ve 48. saatte CRL-4010 hücreleri için sırasıyla %4,66 - %32,36, MDA-MB-231 hücreleri için sırasıyla %12,98 - %46,75, MCF-7 hücreleri için sırasıyla %92,35 - %93,48 şeklindedir. Ag nanoparçacıklarının kanser hücrelerine karşı seçici apoptoz göstermesi ve aynı zamanda MCF-7 hücreleri için hücrelerin tamamına yakını (%93,48) apoptoza götürmesi in vivo kanser tedavisi için umut vaad edici bir sonuçtur.

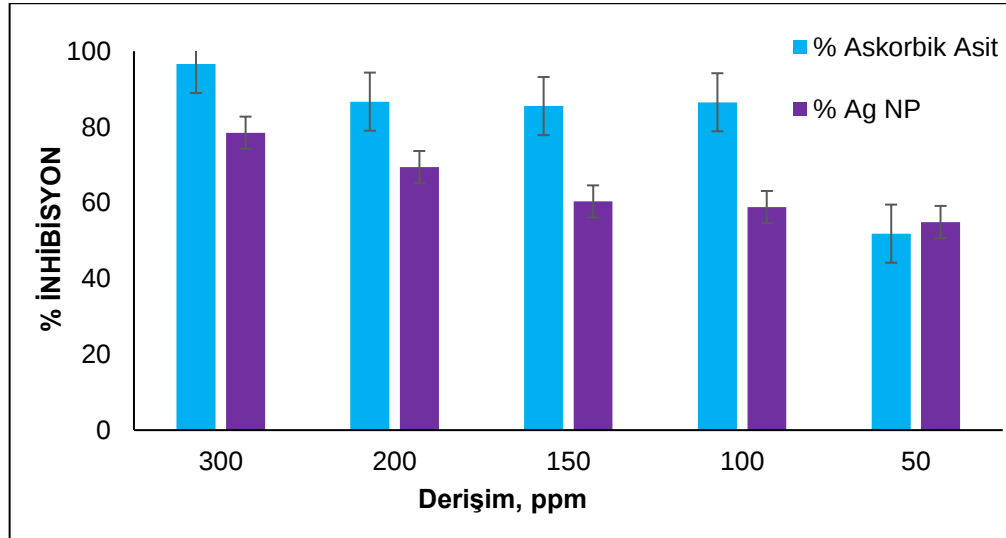
Literatüre bakıldığında bu bitki ekstraktı kullanılarak Ag ve Au (altın) nanoparçacıkların sentezi gerçekleştirilerek sadece antibakteriyel ve antioksidan aktiviteler değerlendirilmiştir (Çiftçi, 2019) Bununla birlikte, tek başına *Cotinus coggygia* Scop. bitki ekstraktının meme, servikal, akciğer, kolorektal ve prostat kanseri gibi kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri doğrulanmaktadır (Gospodinova, 2017).

Sonuç olarak, MTT ve Apoptoz deneylerinden elde edilen veriler ışığında sentezlenen Ag nanoparçacıkları kanser hücreleri üzerinde anlamlı bir sitotoksik etki gösterirken, sağlıklı hücre hatları üzerinde kanserli hücrelere kıyasla daha düşük

sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Üç hücre tipindeki apoptotik ölüm oranları da ilgili hücrelerin hücre canlılık yüzdeleri ile benzer sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlar literatür ile de uyum sağlamaktadır. Ag nanoparçacıkların özellikle MCF-7 hücrelerine karşı etkin antikanser özelliği gösterdiği belirtilerek, bu sonucun nanoparçacıkların hücrelere endositoz yoluyla kolaylıkla girebilmelerinden ve P-glikoprotein tarafından dış akışa maruz kalmamalarından kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Hemlata ve ark., 2020).

4.5. Antioksidan Aktivite

Cotinus coggygia Scop. bitki ekstraktı ile sentezlenen Ag nanoparçacığının DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi tayin edilmiştir. Pozitif kontrol olarak sentetik antioksidan olan askorbik asit (C Vitamini) kullanılmıştır ve elde edilen sonuçlar Ag nanoparçacıklarının sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir ve biyolojik olarak bağımsız üç deneyden elde edilmiştir. Ag nanoparçacıkların ve pozitif kontrol olan askorbik asit derişimleri 300, 200, 150, 100 ve 50 ppm olarak belirlenip, elde edilen antioksidan aktivitesi sonuçları derişim-yüzde (%) inhibisyon grafiği olarak sunulmuştur (Şekil 31).



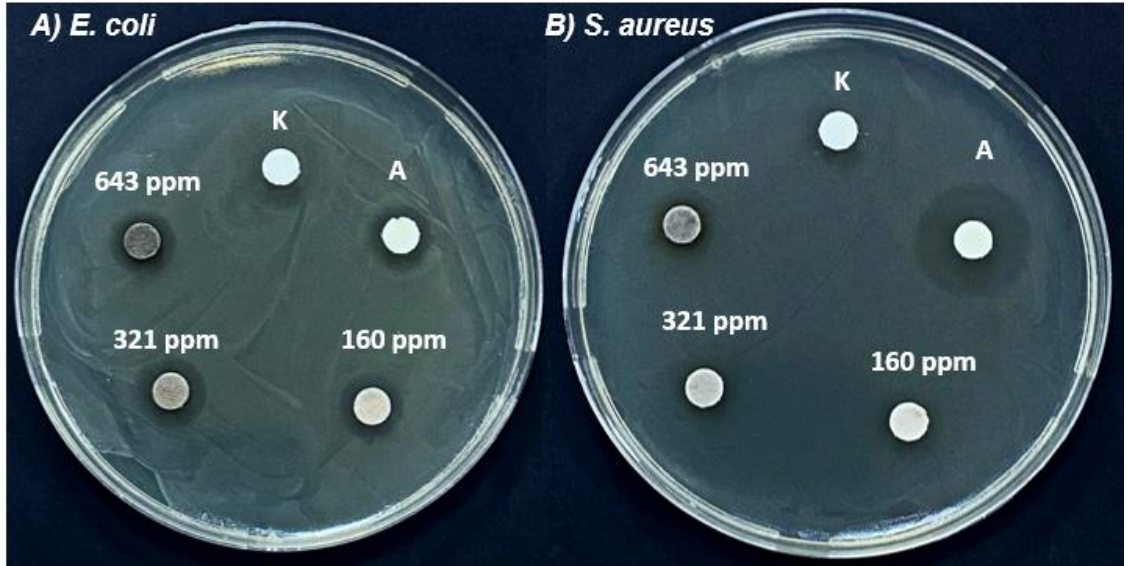
Şekil 31. 41. 300 ppm, 200 ppm, 150 ppm, 100 ppm ve 50 ppm Ag nanoparçacıklarının ve pozitif kontrol olarak kullanılan askorbik asitin antioksidan etkisi (n=3).

Ag nanoparçacıkların 300, 200, 150, 100 ve 50 ppm derişimlerindeki % inhibisyon değerleri sırasıyla %78,50, %69,42, %60,35, 55,87 ve %54,93 olarak hesaplanmıştır. Askorbik asit % inhibisyon değerleri ise sırasıyla; %96,63, %86,70, %85,52, %86,53 ve %51,85 olarak hesaplanmıştır. Derişimin artmasıyla birlikte

inhibisyon değerlerinde de artış olduğu görülmektedir. Sonuçlara bakıldığında pozitif kontrol olarak seçilerek sentetik antioksidan olan askorbik asitin, Ag nanoparçacıklardan daha yüksek antioksidan özellik gösterse de Ag nanoparçacıkların inhibisyon değerlerinin pozitif kontrol olan askorbik asit inhibisyon değerlerine yakınlığı nanoparçacığın antioksidan etkinliğinin varlığını doğrulamaktadır. Fakat 50 ppm derişimdeki sonuçlar kıyaslandığında Ag nanoparçacıkların inhibisyon değerinin askorbik asitinki ile birbirine yakın olduğu görülmektedir. Bu da daha küçük derişimlerde bile sentezlenmiş Ag nanoparçacıklarının pozitif kontrol olan askorbik asitinki kadar antioksidan özellikte olduğunu göstermiştir.

4.6. Antibakteriyel Aktivite

Yeşil sentez yöntemi ile sentezlenen Ag nanoparçacıkların antibakteriyel aktivite tayini temsili gram negatif bakteri olan *E. coli* ve temsili gram pozitif bakteri olan *S. aureus* bakteri türleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bakteriler; üç farklı derişimdeki Ag nanoparçacıkları, antibiyotik ve kontrol su ile muamele edilmiştir ve 24 saat inkübasyon sonrası oluşan zon çapları ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 32).



Şekil 32. A) *E.coli* B) *S.aureus* bakterilerinde kontrol su, antibiyotik ve 643 ppm, 321 ppm ve 160 ppm derişimdeki Ag nanoparçacıkların oluşturduğu zonlar (K(kontrol): Saf Su, A(antibiyotik): Ampisilin)

Nanoparçacıkların bakteri ortamında 24 saat sonundaki inkübasyonundan elde edilen sonuçlar tablo 7 ve 8’de verilmiştir.

Tablo 7. *S. aureus*'da oluşan zon çapları

<i>S. aureus</i>	Oluşan Zon Çapı (mm)
Antibiyotik (Ampisilin)	31 mm
160 ppm Ag Np	8 mm
321 ppm Ag Np	9 mm
643 ppm Ag Np	10 mm

Tablo 8. *E.coli*'de oluşan zon çapları

<i>E.coli</i>	Oluşan Zon Çapı (mm)
Antibiyotik (Ampisilin)	12 mm
160 ppm Ag Np	11 mm
321 ppm Ag Np	13 mm
643 ppm Ag Np	13 mm

Aynı deneyde karşılaştırma amacıyla kullanılan antibiyotiğin *S. aureus*ta büyük zon oluşturarak daha etkili olduğu görülürken *E. coli* bakteri türünde antibiyotik daha az etki gösterdiği görülmüştür. Bu da *E. coli* bakteri türünün kullanılan antibiyotiğe karşı daha dirençli olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte üç farklı dozda uygulanan Ag nanoparçacıklar *E. coli* üzerinde yüksek etkinlik gösterirken *S. aureus* bakteri türünde *E. coli*' ye göre daha az etkili olduğu görülmüştür fakat elde edilen değerlerin Ag nanoparçacıklarının antibakteriyel özelliğini destekler nitelikte olduğu doğrulanmaktadır.

Kaplan ve ark. yaptıkları bir çalışmada yeşil sentez yolu ile ürettikleri Ag nanoparçacıkların antibakteriyel aktivitesini yaygın patojenler olan *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* ve *Klebsiella pneumonia* bakteriler üzerinde değerlendirdi. Yeşil sentez yöntemi ile üretilen Ag nanoparçacıkların antibakteriyel ajan olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir (Kaplan, 2021).

Başka bir çalışmada ise Ren ve ark. yeşil sentez yöntemi ile Ag nanoparçacık sentezi gerçekleştirip *E. coli* ve *S. aureus* bakteri türleri üzerindeki antibakteriyel aktivite tayin etmiştir. Antibakteriyel aktivite için çalışmada disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır ve sonuçlara bakıldığında *E. Coli* bakteri türüne karşı Ag nanoparçacıkların $8,34 \times 10^{-7}$, $3,61 \times 10^{-6}$, $5,79 \times 10^{-5}$ ve $4,63 \times 10^{-4}$ mol/L derişimlerde sırasıyla 7,3, 11, 12 ve 13,65 mm çapında zon oluşturduğu görülmüştür. *S. aureus* bakteri türüne karşı ise yine aynı derişimlerde sırasıyla 7,3, 8,9, 12,2 ve 13,72 mm çapında inhibisyon zonu oluşturduğu görülmüştür (Ren, 2019). Yapılan tez çalışmasında ise farklı dozların uygulanmasıyla

birlikte hemen hemen bu çalışmadan elde edilen sonuçlara yakın değerlerin olduğu görülmektedir. Bu da yeşil sentez yöntemi ile ürettiğimiz Ag nanoparçacıkların antibakteriyel özelliğinin varlığını doğrulamaktadır. Literatüre bakıldığında Ag çok iyi bir antibakteriyel ajan olduğu görülmektedir. Fakat kolloidal Ag parçacıklarının bakterisidal bir etki mekanizmasının olup olmadığı çok iyi bilinmemektedir. Yapılan çalışmalar Ag nanoparçacıkların antibakteriyel aktivitesinin dört etki mekanizma ile gerçekleşebileceğini vurgulamaktadır. Bu mekanizmaların protein üretiminin ve metabolik yolun inhibisyonu, hücre duvarı sentezine ve nükleik asit üretimine müdahale olarak söylenebilmektedir (Tenover, 2006).

Antibakteriyel aktivitenin araştırıldığı bir çalışmada, kullanılan bitki ekstraktların kloroform, etanol ve hidro alkol gibi farklı çözücüler kullanarak hazırlandığı ve bu alkol türevleri arasından en yüksek inhibisyon bölgesini etanol ile hazırlanan bitki ekstraktlarının sağladığı bulunmuştur (Abera, 2011). Ekstraktların etanol ve metanol çözücüsü kullanarak hazırlandığı başka bir çalışmada ise gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkinin olduğu fakat sulu ekstraktın herhangi bir antibakteriyel etki göstermediği görülmüştür (Kassaw, 2018). Organik çözücüler bitki ekstraktı ile etkileşime girerek antibakteriyel özellik taşıyan maddeleri çözüp ekstrakta dahil edebilmektedir. Su çözücüsünün ise bu maddeleri çözerek ekstrakta alabilmesini çok sağlayamadığı görülmüştür. Literatürdeki bu bilgiler ışığında antibakteriyel aktivitenin çözücüye bağlı olabileceğini söylemek mümkündür. Yapılan bu tez çalışmasında sulu bitki ekstraktı kullanılarak Ag nanoparçacıklar üretilmiştir. Bu Ag nanoparçacıklarla antibakteriyel aktivite tayini disk difüz yöntemi ile *E. coli* ve *S. aureus* bakteri türlerine karşı gerçekleştirilmiştir. Amacımız tamamen doğal herhangi bir kimyasal madde kullanmadan elde ettiğimiz Ag nanoparçacıkların antibakteriyel özelliklerini değerlendirmektir. Elde edilen sonuçlar literatür ile kıyaslandığında çok yüksek antibakteriyel etki göstermese de elde edilen nanoparçacıkların antibakteriyel özelliğinin olduğu doğrulanmıştır. Yani sulu ekstrakttan elde ettiğimiz Ag nanoparçacıkların antibakteriyel etki gösterdiği söylenebilmektedir. Antibakteriyel etkinin çözücüye bağlı olması bilgisinden yola çıkarak çalışmada kullandığımız *Cotinus coggygia* Scop. bitkisinin farklı organik çözücülerdeki ekstraktı kullanılarak üretilen Ag nanoparçacıkların antibakteriyel etkinliğinin daha yüksek olabileceği düşünülmektedir.

5. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılığı değerlendirmek için, Graphpad Prism VI istatistik yazılımı (GraphPad Inc. CA, ABD) kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. p değeri 0,05'ten küçük ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1 Sonuçlar ve Öneriler

Son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında çeşitli nanoparçacıkların, özellikle sağlık, tıp ve medikal alanlarda kullanılmak üzere sentezi gerçekleşen nanopartiküller için doğal bir yöntem olan yeşil sentez yönteminin uygunluğu gösterilmiştir. Nanoparçacık sentezi için kullanılan yeşil sentez yöntemi kimyasal alternatifleri ile kıyaslandığında daha çevre dostu, daha güvenli ve daha ekonomik bir yaklaşım sunduğu karşımıza çıkmaktadır. Biyosentezi gerçekleşen nanoparçacıkların toksik etki göstermemelerinden dolayı nano tıp alanında kullanılabilirlik potansiyeli olduğu yapılan çalışmalarla birlikte gösterilmiştir. Bu anlamda özellikle Ag nanoparçacıkların tıpta çeşitli amaçlarla kullanımı oldukça mevcuttur. Teknolojik anlamda yeşil sentez yöntemi ile elde edilen Ag nanoparçacıklar biyomedikal alanda potansiyel uygulamalara sahiptir. Maliyeti düşük ve basit olan bu yeşil sentez yöntemi farmasötik uygulamalar için önemli derecede ticari üretimler gibi avantaja sahiptir. Tümörlü hücrelerin belirlenmesinde, kanser tedavilerinde kullanılabileceği önerilmiştir. Bu tez çalışmasında yeşil sentez yolu Ag nanoparçacıkların sentezini başarıyla gerçekleştirdi ve Ag nanoparçacıklarının antikanser, antioksidan ve antibakteriyel özellikleri araştırıldı.

Nanoparçacıkların antikanser etkinliğinin belirlenmesi için CRL-4010, MDA-MB-231 ve MCF-7 meme hücreleri modellemesi gerçekleştirildi. Bu hücre hatları üzerinde hücre canlılığı testi olan MTT testi kullanıldı. Aynı zamanda hücrelerin apoptotik ölümlerinin sayısal verilerini elde etmek amacıyla da Anneksin V/ FTCI boyama işlemi ile apoptoz deneyleri gerçekleştirildi. MTT sonuçları değerlendirildiğinde yeşil sentez yolu ile elde edilen nanoparçacıkların CRL-4010 sağlık hücreleri az etkilerken MCF-7 kanser hücresi üzerinde oldukça sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür. Bununla birlikte MDA-MB-231 kanser hücreleri üzerinde de hücre canlılığında anlamlı bir azalmanın olduğu görülmüştür. Apoptoz deneyleri sonuçları ile de MCF-7 kanser hücresi üzerinde %93,46 apoptotik ölümün gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu anlamda sentezlediğimiz Ag nanoparçacıkların kanser hücreleri üzerindeki antikanser özelliği gösterilerek literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Aynı zamanda, bu çalışmanın özgünlüğü bu bitkiden elden edilen ekstrakt ile Ag nanoparçacık sentezini gerçekleştirip ilk defa antikanser özelliğini literatüre kazandırmaktır.

Yeşil sentez yöntemi ile sentezlenen Ag nanoparçacıkların aynı zamanda antioksidan aktiviteleri üzerine yapılan çalışmaların sonuçlarına bakıldığında sentetik antioksidan olarak askorbik asitin göstermiş olduğu yüzde inhibisyon değerlerine yaklaştığı ve Ag nanoparçacıkların antioksidan etkinliğinin varlığı da doğrulanmıştır.

Yapılan bu tez çalışmasında elde edilen Ag nanoparçacıkların antibakteriyel özellikleri disk difüzyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. Deneylerde kullanılan *E. coli* ve *S. aureus* bakteri türleri arasında Ag nanoparçacıkların *E. Coli* bakteri türünde daha etkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışmayla birlikte elde ettiğimiz Ag nanoparçacıkların antibakteriyel özelliğinin varlığı da gösterilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında; çevre dostu bir yaklaşım olan yeşil sentez (green synthesis) ile Ag nanoparçacıkların sentezini gerçekleştirerek biyolojik bir platform oluşturulması amaçlanmıştır. Literatüre bakıldığında *Cotinus coggygia* Scop. bitki ekstraktı kullanılarak nanoparçacıkların sentezinin gerçekleştirildiği az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde bu nanoparçacıklarla antikanser aktivite çalışmalarının yapılmadığı literatürde bir boşluk oluşturmaktadır. Bu boşluğu doldurmak adına yapılan çalışmamızın özgünlüğü; *Cotinus coggygia* Scop. bitki ekstraktıyla sentezlenen Ag nanoparçacıklarının antikanser etkisinin varlığı gösterilmiş olmasıdır. Bu tez kapsamında elde edilen Ag nanoparçacıkların başka kanser hücreleri üzerindeki antikanser etkinliğinin araştırılması önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Acar, Ç. A., & Pehlivanoğlu, S. Ag Nanopartiküllerin Biberiye Özütü ile Biyosentezi ve MCF-7 Meme Kanseri Hücrelerinde Sitotoksik Etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 10(2), 172-176.
- American Cancer Society, “American Cancer Society | Information and Resources about for Cancer: Breast, Colon, Lung, Prostate, Skin,” Phytochemicals. 2000.
- Asmat-Campos, D., Abreu, A. C., Romero-Cano, M. S., Urquiaga-Zavaleta, J., Contreras-Cáceres, R., Delfín-Narciso, D., ... & Fernández, I. (2020). Unraveling the Active Biomolecules Responsible for the Sustainable Synthesis of Nanoscale Silver Particles through Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 17816-17827.
- Abera, A., Lemessa, F., & Muleta, D. (2011). The antifungal activity of some medicinal plants against coffee berry disease caused by *Colletotrichum kahawae*. *International Journal of Agricultural Research*, 6(3), 268-279
- Aftab, A., Shahzad, S., Hussain, H. M. J., Khan, R., Irum, S., & Tabassum, S. (2019). CDKN2A/P16INK4A variants association with breast cancer and their in-silico analysis. *Breast Cancer*, 26 (1), 11-28.
- Altınpınar, A. (2020). Mikroemülsiyon Tekniği ile Üretilmiş Hidroksiapatit Nanoparçacıkların Ti6Al4V Altlıklar Üzerine Elektroforetik Biriktirme Yöntemi ile Kaplanması ve Vakum Ortamında Sinterlenmeleri. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 10(2), 158-167.
- Bayğu, G. (2020). Cimin üzümü yaprağı kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle elde edilen Ag nanopartikülünün genotoksik etkisinin kanat benek testi ile belirlenmesi (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Bakar, A. (2013). Formation Of Copper Nanoclusters In The Presence Of Poly (Allyl Amine)-Poly (Acrylic Acid) Complexes.
- Beattie IR, Haverkamp RG. 2011. Silver and gold nanoparticles in plants: sites for the reduction to metal. *Metallomics*, 3(6): 628-632.
- Beykaya, M., & Çağlar, A. (2016). An Investigation on Synthesis of Silver-Nanoparticles (AgNP) and their Antimicrobial effectiveness by using Herbal Extracts. *Afyon Kocatepe Univ. J. Sci. Eng*, 16(3), 631-641.

- Bogunia-Kubik, K., & Sugisaka, M. (2002). From molecular biology to nanotechnology and nanomedicine. *Biosystems*, 65(2-3), 123-138
- Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., & Whyman, R. (1994). Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (7), 801-802.
- Bao Z, Lan CQJC, Biointerfaces SB. 2018. Mechanism of lightdependent biosynthesis of silver nanoparticles mediated by cell extract of *Neochloris oleoabundans*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 170: 251-257
- Bhardwaj, A. K., Shukla, A., Maurya, S., Singh, S. C., Uttam, K. N., Sundaram, S., ... & Gopal, R. (2018). Direct sunlight enabled photo-biochemical synthesis of silver nanoparticles and their Bactericidal Efficacy: Photon energy as key for size and distribution control. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 188, 42-49.
- Bhati-Kushwaha, H., & Malik, C. P. (2013). Biopotential of *Verbesina encelioides* (stem and leaf powders) in silver nanoparticle fabrication. *Turkish Journal of Biology*, 37(6), 645-654.
- Bray, F., Ferlay, J., Laversanne, M., Brewster, D. H., Gombe Mbalawa, C., Kohler, B., & Forman, D. (2015). Cancer Incidence in Five Continents: inclusion criteria highlights from Volume X and the global status of cancer registration. *International journal of cancer*, 137(9), 2060-2071.
- Çiftçi F., (2019) *Cotinus Coggygria Scop. Ve Pistacia Vera L. Bitkileri Kullanarak Ag Nanopartiküllerin Yeşil Sentezi, Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Özelliklerinin İncelenmesi* (Master's Thesis, Fen BilimLeri Enstitüsü).
- Çetintaş, Y., Nadeem, S., ÇETİN, E. S., ERDOĞAN, E. E., & ÖZLER, M. A. (2020). Green synthesis, antimicrobial and anticancer activities of AgNPs prepared from the leaf extract of *Eucalyptus camaldulensis*. *Mugla Journal of Science and Technology*, 6(1), 146-155.
- Çiftçi, H., Çalışkan, Ç. E., Öztürk, K., & Yazıcı, B. Yeşil YöntemLe Sentezlenen Biyoaktif Nanopartiküller. *Black Sea Journal of Engineering and Science*, 4(1), 29- 42..
- Dauthal, P., & Mukhopadhyay, M. (2016). Noble metal nanoparticles: plant-mediated synthesis, mechanistic aspects of synthesis, and

applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55(36), 9557-9577.

Dağlıoğlu, Y., & Yavuz, M. C. (2020). Dişhekimliğinde nanoteknoloji ve uygulamaları. *Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi*, 41(2), 149-160.

Deniz, F. S. S., Salmas, R. E., Emerce, E., Cankaya, I. I. T., Yusufoglu, H. S., & Orhan, I. E. (2020). Evaluation of collagenase, elastase and tyrosinase inhibitory activities of *Cotinus coggygria* Scop. through in vitro and in silico approaches. *South African Journal of Botany*, 132, 277-288.

Ebrahimzadeh, M. A., Naghizadeh, A., Amiri, O., Shirzadi-Ahodashi, M., & Mortazavi-Derazkola, S. (2020). Green and facile synthesis of Ag nanoparticles using *Crataegus pentagyna* fruit extract (CP-AgNPs) for organic pollution dyes degradation and antibacterial application. *Bioorganic chemistry*, 94, 103425.

Edison, T. J. I., & Sethuraman, M. G. (2012). Instant green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* fruit extract and evaluation of their catalytic activity on reduction of methylene blue. *Process Biochemistry*, 47(9), 1351-1357.

Erkekoğlu, P., & BAYDAR, T. (2020). Güncel İn Vitro Sitotoksiste Testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41 (1), 45-63

Farokhzad, O. C., & Langer, R. (2006). Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Advanced drug delivery reviews*, 58(14), 1456-1459.

Fawcett D, Verduin JJ, Shah M, Sharma SB, Poinern GEJ. 2017. A review of current research into the biogenic synthesis of metal and metal oxide nanoparticles via marine algae and seagrasses. *J Nanosci*, 2017(4): 1-15

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., & Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International journal of cancer*, 144(8), 1941-1953.

Fouda, A., Hassan, S. E. D., Abdo, A. M., & El-Gamal, M. S. (2020). Antimicrobial, antioxidant and larvicidal activities of spherical silver nanoparticles

synthesized by endophytic *Streptomyces* spp. *Biological Trace Element Research*, 195(2), 707-724.

- Gupta, S., Rakesh, K., Gupta, O. P., Khanna, S., Purwar, A., & Verma, Y. (2013). Role of nanotechnology and nanoparticles in dentistry: a review. *Int. J. Res. Dev*, 1, 95-102
- Ganguli, A. K., Ahmad, T., Vaidya, S., & Ahmed, J. (2008). Microemulsion route to the synthesis of nanoparticles. *Pure and Applied Chemistry*, 80(11), 2451-2477.
- Gurunathan, S., Kalishwaralal, K., Vaidyanathan, R., Venkataraman, D., Pandian, S. R. K., Muniyandi, J., ... & Eom, S. H. (2009). Biosynthesis, purification and characterization of silver nanoparticles using *Escherichia coli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 74(1), 328-335.
- Gnanasangeetha, D., ve Suresh, M., 2020, A review on green synthesis of metal and metal oxide nanoparticles, *Nature Environment and Pollution Technology*, 19(5), 1789–1800.
- Gökçe, E. C., Akgül, Y., Kılıç, A., Ercan, A. Ç. M. A. (2018). Antibakteriyel Nanolif Yapılarının Çözültiden Üfleme Sistemi ile Üretimi ve Karakterizasyonu. *Tekstil ve Mühendis*, 25(110), 78-85.
- Gospodinova, Z., Bózsity, N., Nikolova, M., Krasteva, M., & Zupkó, I. (2017). Antiproliferative properties against human breast, cervical and ovarian cancer cell lines, and antioxidant capacity of leaf aqueous ethanolic extract from *Cotinus coggygria* Scop. *Acta Medica Bulgarica*, 44(2), 20-25.
- Hulla, J. E., Sahu, S. C., & Hayes, A. W. (2015). Nanotechnology: History and future. *Human & experimental toxicology*, 34(12), 1318-1321.
- Hassan, M., Watari, H., AbuAlmaaty, A., Ohba, Y., & Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed research international*, 2014.
- Han G, Ghosh P, Rotello VM. 2007. Multi-functional gold nanoparticles for drug delivery. *Adv Exp Med Biol*, 620: 48-56.

- Hammamchi, H. (2019). Biyolojik Yollar ile Sentezlenen Organik/İnorganik Nanopartiküllerin Biyoaktivitelerinin Belirlenmesi ve Tedavi Amaçlı Kullanımları.
- Hemlata, Meena, P. R., Singh, A. P., & Tejavath, K. K. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles using cucumis prophetarum aqueous leaf extract and their antibacterial and antiproliferative activity against cancer cell lines. *ACS omega*, 5(10), 5520-5528.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144 (5), 646-674.
- H. Otsuka, Y. Nagasaki, and K. Kataoka, "PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 55, no. 3, pp. 403-419, 2003.
- İsmail, A. F., Ahmed, M. M., & Salem, A. A. (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles using mushroom extracts: induction of apoptosis in HepG2 and MCF-7 cells via caspases stimulation and regulation of BAX and Bcl-2 gene expressions. *J Pharm Biomed Sci*, 5 (1), 1-9.
- Jan, R., Chaudhry, G. S., 2015, Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics, *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*, 7(3), 113–117.
- Joseph, T., & Morrison, M. (2006). Nanotechnology in agriculture and food. *Nanoforum report*, 2, 2-3.
- Jadhav, K., Deore, S., Dhamecha, D., Hr, R., Jagwani, S., Jalalpure, S., & Bohara, R (2018). Phytosynthesis of silver nanoparticles: characterization, biocompatibility studies, and anticancer activity. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(3), 892-899.
- Javed, B., & Nadhman, A. (2020). Optimization, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles against plant bacterial pathogens phyto-synthesized by *Mentha longifolia*. *Materials Research Express*, 7 (8), 085406.
- Jeeva, K., Thiyagarajan, M., Elangovan, V., Geetha, N., & Venkatachalam, P. (2014). *Caesalpinia coriaria* leaf extracts mediated biosynthesis of metallic silver nanoparticles and their antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Industrial Crops and Products*, 52, 714-720.

- Kah, M., Beulke, S., Tiede, K., & Hofmann, T. (2013). Nanopesticides: state of knowledge, environmental fate, and exposure modeling. *Critical Reviews in Environmental and Technology*.
- Karthik, K. V., Raghu, A. V., Reddy, K. R., Ravishankar, R., Sangeeta, M., Shetti, N. P., & Reddy, C. V. (2022). Green synthesis of Cu-doped ZnO nanoparticles and its application for the photocatalytic degradation of hazardous organic pollutants. *Chemosphere*, 287, 132081.
- Kathiresan K, Manivannan S, Nabeel MA, Dhivya B. 2009. Studies on silver nanoparticles synthesised by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 71(1): 133-137.
- Kawahara, K., Tsuruda, K., Morishita, M., & Uchida, M. J. D. M. (2000). Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacteria under anaerobic conditions. *Dental materials*, 16 (6), 452-455
- Keskin, A.S. (2011). *Nano boyutta gümüş sentezi ve tetra pirollerle etkileşimlerinin incelenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
- Khan, A. U., Khan, M., Malik, N., Cho, M. H., & Khan, M. M. (2019). Recent progress of algae and blue-green algae-assisted synthesis of gold nanoparticles for various applications. *Bioprocess and biosystems engineering* 42(1), 1-15.
- Khan, M. R., Hoque, S. M., Hossain, K. F. B., Siddique, M. A. B., Uddin, M. K., & Rahman, M. M. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Ipomoea aquatica* leaf extract and its cytotoxicity and antibacterial activity assay. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 13 (4), 303-315.
- Krishnan, V., Bupesh, G., Manikandan, E., Thanigai, A. K., Magesh, S., Kalyanaraman, R., & Maaza, M. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Piper nigrum* concoction and its anticancer activity against MCF-7 and Hep-2 cell lines. *J Antimicro*, 2(3), 2472-1212
- Khusnuriyalova, A. F., Caporali, M., Hey-Hawkins, E., Sinyashin, O. G., & Yakhvarov, D. G. (2021). Preparation of cobalt nanoparticles. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2021(30), 3023-3047.
- Khalilzadeh, M.A., and Borzoo, M. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using onion extract and their application for the preparation of a modified

electrode for determination of ascorbic acid. *J Food and Drug Anal.* 24(4), 796-803.

Kusumaningrum, H. P., Zainuri, M., Marhaendrajaya, I., & Subagio, A. (2018, May).

Nanosilver microalgae biosynthesis: cell appearance based on SEM and EDX methods. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 1025, No. 1, p. 012084). IOP Publishing.

K., Annadurai, G. (2014). Piper nigrum leaf and stem assisted green synthesis of silver nanoparticles and evaluation of its antibacterial activity against agricultural plant pathogens. *The Scientific World Journal*, 2014.

Kaplan, Ö., Gökşen, N. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles from Teucroside and investigation of its antibacterial activity. *Cumhuriyet Science Journal*, 42(1), 60-67.

Kassaw, E., Yohannes, T., & Bizualem, E. (2018). In-vitro antibacterial activity of *Plantago lanceolata* against some selected standard pathogenic bacterial. *The International Journal of Biotechnology*, 7 /1), 44-50.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257.

Khan, M. R., Hoque, S. M., Hossain, K. F. B., Siddique, M. A. B., Uddin, M. K., & Rahman, M. M. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Ipomoea aquatica* leaf extract and its cytotoxicity and antibacterial activity assay. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 13(4), 303-315.

Khan SS, Narayanan K, Raheem A, Premkumar K, Vasanthakumar G. 2018. Gold and silver NPs biomimetically synthesized using date palm pollen extract-induce apoptosis and regulate p53 and Bcl-2 expression in human breast adenocarcinoma cells. *Biol Trace Elem Res*, 186(1): 122-134

Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomed NBM*, 3(1): 95-101.

- Kumar P, Nagarajan A, Uchil, 2018, PD: Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Cold Spring Harb Protoc,
- Liveri, V. T. (2006). *Controlled synthesis of nanoparticles in microheterogeneous systems*. Springer Science & Business Media.
- Liu, H., Zhang, H., Wang, J., & Wei, J. (2020). Effect of temperature on the size of biosynthesized silver nanoparticle: deep insight into microscopic kinetics analysis. *Arabian Journal of Chemistry*, 13 (1), 1011-1019.
- Li, L., Wang, M., Yang, H., Li, Y., Huang, X., Guo, J., & Liu, Z. (2022). Fisetin Inhibits Trypsin Activity and Suppresses the Growth of Colorectal Cancer in Vitro and in Vivo. *Natural Product Communications*, 17(8), 1934578X221115511.
- Lin, J., Huang, Z., Wu, H., Zhou, W., Jin, P., Wei, P., ... & Wen, L. (2014). Inhibition of autophagy enhances the anticancer activity of silver nanoparticles. *Autophagy*, 10(11), 2006-2020.
- Lee, K. X., Shameli, K., Yew, Y. P., Teow, S. Y., Jahangirian, H., Rafiee-Moghaddam, R., & Webster, T. J. (2020). Recent developments in the facile bio- synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) and their biomedical applications *International journal of nanomedicine*, 15, 275.
- Lanceolata, P., Doku, B., Ekstrakt, B., & Ara, E. (2020). T.c. Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Proje Başlığı.
- Lapa, M. R., Kırbaş, O. K., Bozkurt, B., Taşlı, P. N., Avcı, M. K., Şahin, F. *FVaccinium myrtillus* (Yaban Mersin'i) kaynaklı EksozomLarın İnsan Akciğer Karsinomu (A549 hücre hattı) Üzerine Sitotoksik Etkilerinin MTT testi ile Araştırılması.
- Miller, G. & Senjen, R. (2008). Out of the laboratory and on to our plates nanotechnology in food and agriculture. Friends Of The Earth Australia Europe & USA.p.68.
- Martínez-Rodríguez, R. A., Vidal-Iglesias, F. J., Solla-Gullón, J., Cabrera, C. R., & Feliu J. M. (2014). Synthesis of Pt nanoparticles in water-in-oil microemulsion: effect of HCl on their surface structure. *Journal of the American Chemical Society*, 136(4), 1280-1283.

- Ma, H., Yin, B., Wang, S., Jiao, Y., Pan, W., Huang, S., ... & Meng, F. (2004). Synthesis of silver and gold nanoparticles by a novel electrochemical method. *ChemPhysChem*, 5 (1), 68-75.
- Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology advances*, 31 (2), 346-356.
- Mishra, A., Tripathy, S. K., Wahab, R., Jeong, S. H., Hwang, I., Yang, Y. B., ... & Yun, S. I. (2011). Microbial synthesis of gold nanoparticles using the fungus *Penicillium brevicompactum* and their cytotoxic effects against mouse mayo blast cancer C 2 C 12 cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 92 (3), 617-630.
- Mohanpuria P, Rana N, Yadav S. 2008. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *J Nanopart Res*, 10(3): 507-517.
- Mukherjee, S., Chowdhury, D., Kotcherlakota, R., & Patra, S. (2014). Potential theranostics application of bio-synthesized silver nanoparticles (4-in-1 system). *Theranostics*, 4 (3), 316.
- Marimuthu, S., Rahuman, A. A., Rajakumar, G., Santhoshkumar, T., Kirthi, A. V., Jayaseelan, C., Kamaraj, C. (2011). Evaluation of green synthesized silver nanoparticles against parasites. *Parasitology research*, 108 86), 1541-1549.
- Makki J. Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance.2015;8:CPath.S31563. doi: 10.4137/CPath.S31563. PubMed PMID: 26740749.
- Nath D, Banerjee P. 2013. Green nanotechnology – a new hope for medical biology. *Environ Toxicol Pharmacol*, 36(3): 997- 1014.
- Nuruzzaman, M. D., Rahman, M. M., Liu, Y., & Naidu, R. (2016). Nanoencapsulation, nano-guard for pesticides: a new window for safe application. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64 (7), 1447-1483.
- Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. (2010). Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in colloid and interface science*, 156 (1-2), 1-13.
- Noruzi, M., Zare, D., Khoshnevisan, K., & Davoodi, D. (2011). Rapid green synthesis of gold nanoparticles using *Rosa hybrida* petal extract at room

- temperature. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79 (5), 1461-1465.
- Nie, S., Xing, Y., Kim, G. J., & Simons, J. W. (2007). Nanotechnology applications in cancer. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 9, 257-288.
- Niloy, M. S., Hossain, M. M., Takikawa, M., Shakil, M. S., Polash, S. A., Mahmud, K. M., ... & Ranjan Sarker, S. (2020). Synthesis of biogenic silver nanoparticles using *Caesalpinia digyna* and investigation of their antimicrobial activity and in vivo biocompatibility. *ACS Applied Bio Materials*, 3 (11), 7722-7733.
- Nasiriboroumand, M., Montazer, M., & Barani, H. (2018). Preparation and characterization of biocompatible silver nanoparticles using pomegranate peel extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 179, 98-104.
- O'Neal, D. P., Hirsch, L. R., Halas, N. J., Payne, J. D., & West, J. L. (2004). Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer letters*, 209(2), 171-176.
- Parveen K, Banse V, Ledwani L. 2016. Green synthesis of nanoparticles: Their Advantages and Disadvantages. 2nd International Conference on Emerging Technologies: Micro to Nano, India
- Paulkumar, K., Gnanajobitha, G., Vanaja, M., Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Pandian, Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in biotechnology* 34(7), 588-599.
- Pal S, Tak YK, Song JM. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 73(6): 1712-1720.
- Pimprikar, P. S., Joshi, S. S., Kumar, A. R., Zinjarde, S. S., & Kulkarni, S. K. (2009). Influence of biomass and gold salt concentration on nanoparticle synthesis by the tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74 (1), 309-316
- Pandit, R., Rai, M., & Santos, C. A. (2017). Enhanced antimicrobial activity of the food-protecting nisin peptide by bioconjugation with silver nanoparticles. *Environmental Chemistry Letters*, 15(3), 443-452.

- Pilaquinga, F., Morejón, B., Ganchala, D., Morey, J., Piña, N., Debut, A., & Neira, M. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles using *Solanum mammosum* L.(Solanaceae) fruit extract and their larvicidal activity against *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). *PLoS One*, 14(10), e0224109
- Rana, S., & Kalaichelvan, P. T. (2011). Antibacterial activities of metal nanoparticles. *Antibacterial Activities of Metal Nanoparticles*11(02), 21-23.
- Ramsden, J.J. (2005). What Is Nanotechnology? Department Of Advanced Materials, Cranfield University, Bedfordshire, UK. *Nanotechnology Perceptions* 1. 3-17.
- Rodriguez-Sanchez, L., Blanco, M. C., & López-Quintela, M. A. (2000). Electrochemical synthesis of silver nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(41), 9683-9688.
- Rajakumar, G., & Rahuman, A. A. (2011). Larvicidal activity of synthesized silver nanoparticles using *Eclipta prostrata* leaf extract against filariasis and malaria vectors. *Acta tropica*, 118 (3), 196-203.
- Rajendran K, Sen S. 2016. Optimization of process parameters for the rapid biosynthesis of hematite nanoparticles. *J Photochem Photobiol B Biol*, 159: 82-87
- Ren, Y. Y., Yang, H., Wang, T., & Wang, C. (2019). Bio-synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activity. *Materials Chemistry and Physics*, 235, 121746.
- Rudolph, C., Schillinger, U., Ortiz, A., Tabatt, K., Plank, C., Müller, R. H., & Rosenecker, J. (2004). Application of novel solid lipid nanoparticle (SLN)-gene vector formulations based on a dimeric HIV-1 TAT-peptide in vitro and in vivo. *Pharmaceutical research*, 21(9), 1662-1669.
- Sachet, M., Liang, Y. Y., & Oehler, R. (2017). The immune response to secondary necrotic cells. *Apoptosis*, 22(10), 1189-1204.
- Sajja, H. K., East, M. P., Mao, H., Wang, Y. A., Nie, S., & Yang, L. (2009). Development of multifunctional nanoparticles for targeted drug delivery and noninvasive imaging of therapeutic effect. *Current drug discovery technologies* 6(1), 43-51.

- Saif S, Tahir A, Chen Y. 2016. Green synthesis of iron nanoparticles and their environmental applications and implications. *Nanomaterials*, 6 (11): 209.
- Sneed, B. T., Young, A. P., & Tsung, C. K. (2015). Building up strain in colloidal metal nanoparticle catalysts. *Nanoscale* 7(29), 12248-12265.
- Sharma, A., Sharma, S., Sharma, K., Chetri, S. P., Vashishtha, A., Singh, P., ... & Agrawal, V. (2016). Algae as crucial organisms in advancing nanotechnology: a systematic review. *Journal of applied phycology*, 28(3), 1759-1774.
- Shameli, K., Ahmad, M. B., Zamanian, A., Sangpour, P., Shabanzadeh, P., Abdollahi, Y., & Zargar, M. (2012). Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Curcuma longa* tuber powder. *International journal of nanomedicine*, 7, 5603.
- Sati, S. C., Kour, G., Bartwal, A. S., & Sati, M. D. (2020). Biosynthesis of metal nanoparticles from leaves of *Ficus palmata* and evaluation of their anti-inflammatory and anti-diabetic activities. *Biochemistry*, 59 (33), 3019-3025.
- Sathyavathi, R., Krishna, M., & Rao, D. N. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Moringa oleifera* leaf extract and its application to optical limiting. *Journal of nanoscience and nanotechnology* 11(3), 2031-2035.
- Sharma, O. P. Analytical Methods DPPH antioxidant assay revisited (2009). *Food Chem*, 113.
- Sirdeshpande, K. D., Sridhar, A., Cholkar, K. M., Selvaraj, R., 2018, Structural characterization mesoporous magnetite nanoparticles synthesized using the leaf extract of *Calliandra haematocephala* and their photocatalytic degradation of malachite green dye, *Applied Nanoscience*, 8, 675–683.
- Sofi, M. A., Sunitha, S., Sofi, M. A., Pasha, S. K., & Choi, D. (2021). An overview of antimicrobial and anticancer potential of silver nanoparticles. *Journal of King Saud University-Science*, 101791
- Tan Y, Dai Y, Li Y, Zhua D. 2003. Preparation of gold platinum, palladium and silver nanoparticles by the reduction of their salts with a weak reductant-potassium bitartrate. *J Mater Chem*, 13: 1069-1075.
- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*, 6 (2), 257-262.

- Terra, A. L. M., Kosinski, R. D. C., Moreira, J. B., Costa, J. A. V., & Morais, M. G. D. (2019). Microalgae biosynthesis of silver nanoparticles for application in the control of agricultural pathogens. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54 (8), 709-716.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, 119 (6), S3-S10.
- Torchilin, V. (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced drug delivery reviews*, 63(3), 131-135.
- Tokur, O., & AKSOY, A. (2017). In vitro sitotoksisite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118
- Turgut, O., Keskin, L., Avşar, A.F., (2010) Nanoteknoloji Nedir?. Derleme. *Türk Tıp Dergisi*.
- Ullah 2019- Fahad Ullah, M. (2019). Breast cancer: current perspectives on the disease status. *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance*, 51-64.
- Ersöz, M., Işıtan, A., & Balaban, M. (2018). Nanoteknoloji 1: nanoteknolojinin temelleri.
- Tüylek, Z. (2019). Nanotıp alanında kullanılan sistemler. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 28(2), 119-129.
- Veerasamy, R., Xin, T. Z., Gunasagaran, S., Xiang, T. F. W., Yang, E. F. C., Jeyakumar, N., & Dhanaraj, S. A. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Journal of saudi chemical society*, 15 (2), 113-120.
- Velloso, F. J., Bianco, A. F., Farias, J. O., Torres, N. E., Ferruzo, P. Y., Anschau, V., & Correa, R. G.(2017). The crossroads of breast cancer progression: insights into the modulation of major signaling pathways *OncoTargets and therapy* 10, 5491.
- Vijayaraghavan, K., and Ashokkumar, T.(2017). Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5, 4866–4883.

Yadav A, Kon K, Kratosova G, Duran N, Ingle AP, Rai M. 2015. Fungi as an efficient mycosystem for the synthesis of metal nanoparticles: progress and key aspects of research. *Biotechnol Lett*, 37(11): 2099-2120.

Yıldız, N. (2011). Ag nanopartiküllerinin liken özütü ile biyosentezi.

Yusefi, M., Shameli, K., Ali, R. R., Pang, S-W., Teow, S. Y., 2020, Evaluating anticancer activity of plant-mediated synthesized iron oxide nanoparticles using punica granatum fruit peel extract, *Journal of Molecular Structure*, 1204, 127539.

Yang, B., Chou, J., Dong, X., Qu, C., Yu, Q., Lee, K. J., & Harvey, N. (2017). Size controlled green synthesis of highly stable and uniform small to ultrasmall gold nanoparticles by controlling reaction steps and pH. *The Journal of Physical Chemistry C*, 121(16), 8961-8967.

World Health Organization. (2018). Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. *International agency for research on cancer. Geneva: World Health Organization.*

Who 2020-WHO. International Agency for Research on Cancer. (2020).