



T.C.

BARTIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**YEŞİL SENTEZ YÖNTEMİYLE *RUSCUS ACULEATUS* L. BİTKİSİ
KULLANILARAK GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE
ANTİBİYOFİLM, ANTİMİKROBİYAL, ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN
İNCELENMESİ**

HAZIRLAYAN

FUNDA KARAKAYA

DANIŞMAN

PROF. DR. ALİ SAVAŞ BÜLBÜL

BARTIN-2021



T.C.

**BARTIN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YEŞİL SENTEZ YÖNTEMİYLE *RUSCUS ACULEATUS* L. BİTKİSİ
KULLANILARAK GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE
ANTİBİYOFİLM, ANTİMİKROBİYAL, ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN

Funda KARAKAYA

JÜRİ ÜYELERİ

Danışman : Prof. Dr. Ali Savaş BÜLBÜL

- Kahramanmaraş Sütçü İmam
Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi. Recep TAŞ

- Bartın Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yavuz KOÇAK

- Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi

BARTIN-2021

BEYANNAME

Bartın Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Prof. Dr. Ali Savaş BÜLBÜL danışmanlığında hazırlamış olduğum “YEŞİL SENTEZ YÖNTEMİYLE *RUSCUS ACULEATUS* L. BİTKİSİ KULLANILARAK GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE ANTİBİYOFİLM, ANTİMİKROBİYAL, ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ” başlıklı yüksek lisans tezimin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

25/03/2021

Funda KARAKAYA

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tezimin tüm aşamalarında, bilgi birikimi ve tecrübesiyle beni destekleyen, yardımlarını esirgemeyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Ali Savaş BÜLBÜL'e ve ortak tez danışmanım Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL'e katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışması sürecinde düşüncelerinden yardım aldığım ve nanopartikül sentezinde bana destek olan Dr. Öğr. Üyesi Nesrin KORKMAZ'a, hem bilimsel anlamda hem de mesleki anlamda tez çalışmamın sonuçlandırılmasına kadar bilgi ve tecrübelerini eksik etmeyen ve aynı zamanda bana her zaman destek olan Öğr. Gör. İbrahim Seyfettin ÇELİK hocama, antikanser aşamasında bana deneysel çalışmalarımda yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Sabahattin CÖMERTPAY hocama, antibiyofilm veri sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde bana yardımcı olan Uzm. Biyolog Ferudun KOÇER'e ve bu tez çalışmasına maddi destek veren Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: 2020/1-7 YLS) teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca, bu günlere gelmemde en sıkıntılı zamanlarda bile esirgemedikleri maddi, manevi desteklerini ve emeklerini asla ödeyemeyeceğim değerli annem Birgül KARAKAYA, babam Akif KARAKAYA ve kardeşlerim başta olmak üzere her zaman moral ve desteklerini esirgemeyen dostlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Funda KARAKAYA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YEŞİL SENTEZ YÖNTEMİYLE *RUSCUS ACULEATUS* L. BİTKİSİ KULLANILARAK GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE ANTİBİYOFİLM, ANTİMİKROBİYAL, ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Funda KARAKAYA

**Bartın Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali Savaş BÜLBÜL
Ortak Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kemal BÜYÜKGÜZEL
Bartın-2021, sayfa: 84**

Bu tez çalışmasında *Ruscus aculeatus* L. bitkisinin yaprak özütü ile gümüş nanopartiküllerin (AgNP) yeşil sentezi gerçekleştirilerek karakterizasyonu yapılmıştır. AgNP'lerin karakterizasyonu Uv-vis Spektroskopisi, X Işını Kırınımı (XRD), Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ile belirlenmiştir. Karakterizasyon sonucunda 426 nm dalga boyunda spektrum gösteren, yaklaşık olarak 32,56 nm büyüklüğünde ve küresel boyutta nanopartiküllerin olduğu belirlenmiştir.

Ruscus aculeatus L. bitkisinin yaprak ekstraktı ve yeşil sentez AgNP'nin antimikrobiyal aktivite çalışmaları, disk difüzyon yöntemi kullanılarak 6 gram pozitif, 9 gram negatif bakteri suşu olmak üzere toplam 15 farklı bakteri suşları ile incelenmiştir. Ayrıca, antimikrobiyal aktiviteleri minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonu (MBK) yöntemleri ile incelenmiştir. Bitki ekstraktının ve AgNP'nin antibiyofilm aktivitelerinin değerlendirmesinde kristal viyole bağlanma yöntemi kullanılmıştır. Biyofilm oluşumu engelleme aktivitelerinin değerlendirilmesinde

Enterobacter aerogenes ATCC 13048, *Salmonella infantis*, *Escherichia coli* CFAI ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* DSMZ 20044 ve *Bacillus subtilis* DSMZ 1971 bakteri suşları kullanılmıştır. Bu yöntemler üç paralel şekilde çalışılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen veriler IBM SPSS Statistics 23.0 (SPSS Inc; Chicago, IL, ABD) programı kullanılarak yapılmıştır.

Antikanser aktivite çalışmalarında meme kanseri hücre hattı (MCF-7) ve insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) kullanılmıştır. Hücrelerin sayısı, canlılığı tespitinde MTT yöntemi kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Çalışma sonunda elde edilen veriler GraphPad Prism (Ver. 6.01) programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, antimikrobiyal çalışmada disk difüzyon yönteminde en iyi sonucu bitki ekstraktı verirken MİK ve MBK çalışmasında en iyi sonucu AgNP vermiştir. Antibiyofilm aktivite çalışmasında, bitki ekstraktında en yüksek aktivite sonucunu *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 ve *Basillus subtilis* verirken *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en düşük aktiviteyi göstermiştir. AgNP' de ise en yüksek aktiviteyi *Salmonella infantis* bakteri suşu gösterirken *Escherichia coli* CFAI ATCC 25922 en düşük aktiviteyi gösterdiği saptanmıştır.

Sitotoksik aktivite çalışmalarında belirlenen konsantrasyonlarda bitki-AgNP kompleksinin MCF-7 ve HUVEC hücre hattı üzerinde en düşük konsantrasyon değeri 10^{-3} µg/ml olarak saptanmıştır ve ekstraktın MCF-7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı ancak HUVEC hücre hattı üzerinde en düşük konsantrasyon 10^{-3} µg/ml olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Ruscus aculeatus* L., AgNP, antimikrobiyal aktivite, antibiyofilm aktivite, antikanser aktivite

Bilim Alanı Kodu: 20325

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

RESEARCHING ANTIMICROBIAL, ANTIBIOFILM, ANTICANCER ACTIVITIES AND SILVER NANOPARTICLES SYNTHESSES USING *RUSCUS ACULEATUS* L. PLANT IN GREEN SYNTHESIS METHOD

Funda KARAKAYA

Bartın University

Graduate School

Department of Biology

Thesis Advisor: Prof. Dr Ali Savaş BÜLBÜL

Co-Advisor: Prof. Dr Kemal BÜYÜKGÜZEL

Bartın-2021, pp: 84

In this thesis study, green synthesis and characterization of silver nanoparticles (AgNP) using the leaf extract of *Ruscus aculeatus* L. plant and their characterisation was achieved. The characterization of nanoparticles has been identified by Uv-vis spectrophotometer (UV-vis), X-Ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). As a result of the characterization, it was determined that there are nanoparticles with a spectrum at 426 nm wavelength, approximately 32.56 nm in size and in spherical size.

The antimicrobial activity studies of the leaf extract of *Ruscus aculeatus* L. plant and green synthesis AgNP were examined with a total of 15 different bacterial strains, 6 gram positive and 9 gram negative bacteria strains, using disk diffusion method. Additionally, their antimicrobial activities examined by the minimum inhibitor concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) methods. The method of connecting to the crystal cello was used in the evaluation antibiotic film activities of plant extract and AgNP's. *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Salmonella infantis*, *Escherichia coli* CFAI ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* DSMZ 20044 and

Bacillus subtilis DSMZ 1971 bacteria strains were used in the evaluation of biofilm formation inhibition activities. These methods have been studied in three parallel ways. The data obtained at the end of the study were made using IBM SPSS Statistics 23.0 (SPSS Inc; Chicago, IL, USA) program.

Breast cancer cell line (MCF-7) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were used in anticancer activity studies. The number of cells was measured spectrophotometrically using the MTT method to determine the viability. The data obtained at the end of the study were evaluated using GraphPad Prism (Ver. 6.01) program.

As a result, AgNP gave the best result in the MIC and MBC study while the plant extract were the best result in the disk diffusion method in antimicrobial study. In the antibiofilm activity study, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 was the highest activity result in plant extract, while *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 showed the lowest activity. AgNP showed the highest activity in *Salmonella infantis* bacteria strain, while *Escherichia coli* CFAI ATCC 25922 showed the lowest activity.

At the concentrations determined in cytotoxic activity studies, the lowest concentration value of the plant-AgNP complex on MCF-7 and HUVEC cell lines was determined as 10^{-3} $\mu\text{g/ml}$. It was observed that the extract had no cytotoxic effect on the MCF-7 cell line, but the lowest concentration was 10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ on the HUVEC cell line.

Keywords: *Ruscus aculeatus* L., AgNP, antimicrobial activity, antibiofilm activity, anticancer activity

Scientific Field Code: 20325

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BEYANNAME.....	iii
ÖNSÖZ.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
BÖLÜM 1 GİRİŞ	1
1.1. Bitkilerin Tıbbi Açısından Önemi	1
1.2. <i>Ruscus aculeatus</i> L. Bitkisi.....	2
1.2.1. Genel Özellikleri.....	2
1.2.2. <i>Ruscus aculeatus</i> L. 'nin Yapısında Bulunan Bileşikler ve Kullanım Alanları 3	3
1.2.3. Türün Türkiye ve Dünyadaki Yayılışı.....	4
1.3. Nanoteknoloji ve Nanopartiküller	4
1.3.1. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları.....	6
1.3.2. Nanopartiküllerin Sentezi	7
1.3.2.1. Kimyasal Sentez	8
1.3.2.2. Biyolojik Sentez	9
1.3.3. Gümüş Nanopartikülü (AgNP).....	12
1.4. Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Aktiviteleri	12
1.4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Aktiviteleri	13
1.5. Nanopartiküllerin Antibiyofilm Aktiviteleri.....	16
1.5.1. Biyofilm Yapısı ve Oluşum Basamakları.....	17
1.5.2. Gümüş Nanopartiküllerin Antibiyofilm Aktiviteleri.....	19
1.6. Nanopartiküllerin Antikanser Aktiviteleri	21
1.6.1. AgNP'lerin Antikanser Aktiviteleri.....	22
BÖLÜM 2 LİTERATÜR ÖZETİ.....	24
BÖLÜM 3 MATERYAL VE YÖNTEM	31

3.1 Materyaller.....	31
3.1.1 Bitki Materyali	31
3.1.2 Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar	31
3.1.3 Kullanılan Mikroorganizmalar	34
3.2 Yöntem.....	35
3.2.1 Bitki Örneği ve Ekstraktının Hazırlanması	35
3.2.2 Yeşil Sentez Yöntemiyle AgNP'lerin Biyolojik Sentezi	36
3.2.3 Sentezlenen AgNP'lerin Karakterizasyonu.....	37
3.3 Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	38
3.3.1 Disk Difüzyon Yöntemi	38
3.3.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)	40
3.3.3 Minimum Bakterisidal Konsantrasyon ((MBC).....	40
3.4 Antibiyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	41
3.4.2. İstatistiksel Analiz	41
3.5 Antikanser Aktivitelerinin Belirlenmesi	42
3.5.1 Hücre Kültürü.....	42
3.5.2 Bitki Ekstraktı ve AgNP ile Muamele	43
3.5.3 MTT Yöntemi	43
3.5.4 İstatistiksel Analiz.....	44
BÖLÜM 4 ARAŞTIRMA BULGULARI.....	45
4.1 Ekstrakt ile Gümüş Nanopartiküllerin Sentez ve Karakterizasyonu.....	45
4.2 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	50
4.2.1 Disk Difüzyon Sonuçları	50
4.2.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Sonuçları	56
4.2.3 Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) Sonuçları	58
4.3 Antibiyofilm Aktivite Sonuçları	61
4.4 Antikanser Aktivite Sonuçları	63
4.5 İstatistiksel Analiz Sonuçları	65
BÖLÜM 5 TARTIŞMA	68
BÖLÜM 6 SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
1.1: <i>Ruscus aculeatus</i> L'nin genel görünümü	2
1.2: <i>Ruscus aculeatus</i> L.'nin illere göre yayılışı	4
1.3: Metal nanopartikül tipleri ve biyoteknolojide ki uygulama alanları	7
1.4: Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar	8
1.5: Tekil Dağılımlı, kararlı ve yüksek verimli biyolojik nanopartiküllerin üretme parametreleri.....	11
1.6: Gümüş nanopartiküllerinin antimikrobiyal etki basamakları.....	15
1.7: Biyofilm oluşum aşamaları	19
1.8: Gümüş nanopartiküllerden (AgNPs) kaynaklı sitotoksosite için olası mekanizmaların şematik gösterimi.....	22
3.1: Bartın ili ve Balamba mevki	31
3.2: Kurutulmuş bitki örneğinin sıvı azotla öğütülmesi.....	35
3.3: A) Bitki ekstraksiyon çözeltisi B) Bitki ekstraktının filtre kâğıt ile süzme işlemi	36
3.4: Bitki ekstraktı kullanılarak AgNP sentezi. A) AgNO ₃ B) Bitki ekstraktı C) AgNO ₃ + bitki ekstraktı kompleksi D) AgNO ₃ çözeltisi ile muamele edilen bitki ekstraktının 1 saat bekledikten sonra çekilmiş görüntüsü	37
3.5: AgNP ve bitki ekstraktı çözeltileri	38
3.6: Disklere emdirilmiş; A) AgNP B) Bitki ekstraktı C) (Pozitif kontrol) Tetracycline ...	39
3.7: A) Bitki özütü içeren disklerin besiyerine ekimi B) AgNP içeren disklerin besiyerine ekimi	39
4.1: AgNP UV-vis spektrumları.....	46
4.2: AgNP XRD görüntüsü	47
4.3: AgNP SEM görüntüsü.....	48
4.4: a) Yeşil sentez AgNP b) <i>Ruscus aculeatus</i> yaprak ekstraktına ait FT-IR spektrumları	49
4.5: Test edilen gram negatif mikroorganizmalara karşı bitki ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi (+ Kontrol: Tetrasiklin (TE 10), a) <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 b) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSMZ 50071 c) <i>Salmonella typhimurium</i> d) <i>Escherichia coli</i> CFAI.....	52

4.6: Test edilen gram pozitif mikroorganizmalara karşı bitki ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi (+ Kontrol: Tetrasiklin (TE 10), a) <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 b) <i>Enterococcus durans</i> c) <i>Staphylococcus epidermidis</i> DSMZ 20044 d) <i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971).....	53
4.7: Test edilen gram negatif mikroorganizmalara karşı biyolojik sentezlenen AgNP'nin antimikrobiyal aktivitesi (+ Kontrol: Tetrasiklin (TE 10), a) <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048 b) <i>Klebsiella pneumoniae</i> c) <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13075 d) <i>Serratia marrescens</i> ATCC 13048).....	54
4.8: Test edilen gram pozitif mikroorganizmalara karşı biyolojik sentezlenen AgNP'nin antimikrobiyal aktivitesi (+ Kontrol: Tetrasiklin (TE 10), a) <i>Listeria innocua</i> b) <i>Enterococcus durans</i> c) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 d) <i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971).....	55
4.9: MİK sonuçlarının değerlendirilmesi için 96 kuyucuklu dilüsyon plağı (a: Bitki ekstraktı b: AgNP).....	56
4.10: Bitki ekstraktının MBK sonuçları (A1=A2=A3: %100 konsantrasyon, B1=B2=B3: %50 konsantrasyon, a: <i>P. aeruginosa</i> (A1,B1), <i>S. kentucky</i> (A2,B2), <i>E. faecalis</i> (A3,B3), b: <i>L. innocua</i> (A1,B1), <i>S. enteritidis</i> (A2,B2), <i>E. durans</i> (A3,B3), c: <i>S. typhimurium</i> (A1,B1), <i>S. aureus</i> (A2,B2), <i>S.epidermidis</i> (A3,B3), d: <i>B. subtilis</i> (A1,B1), <i>E. coli</i> (A2,B2), <i>S. marrescens</i> (A3,B3).	59
4.11: AgNP'nin MBK Sonuçları (A1: 1 mg/ml, B1: 0,5 mg/ml, C1: 0,25 mg/ml, D1: 0,12 mg/ml, E1: 0,06 mg/ml, F1: 0,03 mg/ml, a: <i>K. pneumoniae</i> , b: <i>P. aeruginosa</i> DSMZ 50071, c: <i>E. faecalis</i> ATCC 29212, d: <i>L. innocua</i> , e: <i>S. enteritidis</i> ATCC 13075, f: <i>E.durans</i>). ...	60
4.12: <i>Ruscus aculeatus</i> L. bitki ekstraktının ve yeşil sentezlenmiş AgNP'nin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri	63
4.13: <i>Ruscus aculeatus</i> L. bitki ekstraktının ve yeşil sentezlenmiş AgNP'nin HUVEC hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri	64
4.14: Antibiyofilm oluşumunda bitki ekstraktının farklı yüzde etki grafiği.	66
4.15: Antibiyofilm oluşumunda farklı AgNP oranlarının mikroorganizmalardaki yüzde etki grafiği.	67

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
1.1: Biyolojik kaynaklı nanopartiküller.....	10
1.2: Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ve yüzey proteinlerinin fonksiyonu.....	17
3.1: Kullanılan Sarf Malzemeler.....	32
3.2: Kullanılan Cihazlar.....	32
3.3: Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmaların Listesi.....	34
4.1: Bitki ekstraktı ve yeşil sentez AgNP'nin test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zonlarının ölçümleri (mm).....	51
4.2: Test mikroorganizmalarına karşı yeşil sentez AgNP'nin MİK sonuçları.....	57
4.3: Çalışılan yeşil sentez AgNP'nin minimum bakterisidal konsantrasyonları.....	58
4.4: Bitki ekstraktının farklı konsantrasyonlardaki biyofilm inhibisyon değerleri (%).	61
4.5: AgNP'nin farklı konsantrasyonlardaki biyofilm inhibisyon değerleri (mg/ml).....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μg	: MİKROGRAM
μl	: MİKROLİTRE
g	: GRAM
mg	: MİLİGRAM
ml	: MİLİLİTRE
mM	: MİLİMOLAR
mm	: MİLİMETRE
nm	: NANOMETRE
$^{\circ}\text{C}$: SANTIĞRAT DERECE
dk	: DAKİKA
rpm	: DAKİKADAKİ DEVİR SAYISI
%	: YÜZDE
cm^2	: SANTIĞMETRE KARE
Ag	: GÜMÜŞ
Ag^+	: GÜMÜŞ KATYONU

KISALTMALAR

ATCC	: Amerikan Türü Kültür Koleksiyonu
BAP	: Biyofilm Birleşmiş Protein Yapısı
CFAI	: Kolonizasyon Faktör Ajan I
CFU	: Koloni oluşturan birim
DSMZ	: Alman Hücre Kültürü ve Mikroorganizma Koleksiyonu
Gram (+)	: Gram Pozitif
Gram (-)	: Gram Negatif
LB	: Luria Bertoni
MBK	: Minimum bakterisidal konsantrasyon
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyon
MHA	: Mueller Hinton Agar
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
AgNO ₃	: Gümüş Nitrat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
UV-vis	: UV-Görünür Bölge Spektroskopisi
XRD	: X-Işını Kırınımı Difraktometresi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopisi
FT-IR	: Fourier Dönüşümü Kızılötesi
NP	: Nanopartikül
IC ₅₀	: İnhibitör konsantrasyon 50
MTT	: 3-(4,5-dimetilriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
AgNP	: Gümüş Nanopartikül
MCF-7	: İnsan Meme Kanseri Hücre Hattı
HUVEC	: İnsan umblikal ven endotel hücreleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
DNA	: Deoksiribonükleik asit
+ Kontrol	: Pozitif kontrol

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1. Bitkilerin Tıbbi Açıdan Önemi

Ülkemiz zengin florasından dolayı birçok tıbbi ve aromatik bitki türleri içermektedir. Eski çağlardan beri insanlar bitkileri hem besin maddesi olarak hem de sağlık sorunlarını gidermek için tedavi amaçlı kullanmışlardır. Günümüzde ise tüm dünyada ve ülkemizde bitkiler tıbbi amaçlı kullanılmaya başlanmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) araştırmalarına göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin sayısı 20.000 civarındadır (Faydaoğlu ve Süpürücüoğlu, 2011).

Bitkiler insan yaşamında gıda, baharat, boya, kozmetik, parfümeri, eczacılık, hastalıkların tedavisi ve insan yaşamını kolaylaştıran birçok alanda uzun yıllardan beri kullanılmıştır. Tıp alanında oldukça yoğun kullanılan ilaçların birçoğu da bitkilerden elde edilmektedir (Özbek, 2005). Genellikle tıbbi bitkiler grubuna dâhil bitkilerden, etken maddeler elde edilerek bitkisel ilaçlar hazırlanmaktadır. Bitkisel ürünler genellikle meme kanseri(%2), karaciğer hastalıkları (%21), HIV (%22), astım (%24) ve romatolojik bozuklukları (%26) da içeren kronik tıbbi durumları olan hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Şarışen ve Çalışkan, 2005).

Son yıllarda sentetik ilaçların kullanımı sonucu oluşan ciddi yan etkiler ve bu ilaçların meydana getirdiği ekonomik ve medikal sorunlar bitkilerle tedaviyi tekrar popüler hale getirmiştir (Özbek, 2005). Günümüzde organik ve doğal üretilen besinlere olan ilgi artışı da tıbbi ve aromatik bitkilere yönelimi arttırmıştır.

1.2. *Ruscus aculeatus* L. Bitkisi

1.2.1. Genel Özellikleri



Şekil 1.1: *Ruscus aculeatus* L'nin genel görünümü (Fotoğraf: Funda KARAKAYA, 2020).

Ruscus aculeatus L. bitkisi en çok takdir gören ve tıbbi açıdan öneme sahip olan türler arasındadır. Ruscaceae familyasına ait olan bu tür maki ormanlarında bulunur ve boyutları 20-50 cm civarındadır. Kışın yapraklarını dökmeyen, çok yıllık, eylül-nisan aylarında yeşilimsi ve açık pembemsi çiçekleri açan, yaprak biçiminde dallara sahip, sert ve dikenli çalı görünüşünde, ormanlık ve dağlık bölgelerde yetişen bitki türleridir. Kırmızı ve küre biçiminde meyvelere sahiptir. Yaprakları ise, oval şeklindedir, sivri uçlara sahiptir ve bu uçlar dikenlidir (Çelikboyun, 2015).

Ayrıca yaprağa benzeyen bu dalcıkların üst yüzeyinde küçük çiçekler açmaktadır ve daha sonra bunlar kırmızı renge sahip, tek tohumlu yapıya sahip meyveler vermektedir (Tanker vd, 2007).

Ruscus aculeatus L. bitkisi halk arasında tavşan memeciği, Yalova mercanı, dişi kuşkonmaz, sıçan dikenli, enir veya zirmek gibi isimlerle bilinmektedir (*Ruscus aculeatus* L., *Ruscus colchicus* , *Ruscus hypoglossum* L. *Ruscus hypophyllum* L. cinsin bilinen önemli temsilcilerindedir (Grieve, 1984)

1.2.2. *Ruscus aculeatus* L. 'nin Yapısında Bulunan Bileşikler ve Kullanım Alanları

Ruscus aculeatus L. (tavşan memeciği) bitkisinin aktif bileşenleri steroid saponinlerdir. Bu aktif bileşenlerin toplardamarlar üzerinde kan dolaşımını arttırmak gibi faydalı ve antienflamatuar etkileri bulunmaktadır (Vieira, 2010). Ayrıca bitkinin yaprak ve gövdesinde temel fenolikler kuersetin ve p-kumarik asit olarak tanımlanmıştır (Luís vd, 2011).

Ruscus aculeatus L.'nin kökleri uzun yıllar boyunca geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır. Kökleri steroidal saponin, uçucu yağ ve rezin içerdiğinden, kök ve rizomları doğrudan toplanarak idrar söktürücü, enfeksiyon giderici, varis hastalıkları ve hemoroid tedavisinde ve ayrıca damar tıkanıklığı, dolaşım bozuklukları gibi hastalıkları önlemek için kullanılmaktadır (Yılmaz, 2012). Bunun yanı sıra bitki üzerinde yapılan kimyasal analizler, spirost-S-ene-1 / a, 3/3-diol bazında bir dizi steroidal saponenin ve saponin; rizomlarda sterol ve triterpenler içerdiğini ortaya koymuştur (Mimaki vd, 1998).

R. aculeatus L. ekstraktlarının venöz yetmezlik, ödem, ortostatik hipotansiyon ve inflamasyon gibi dolaşım problemlerine karşı etkili olduğunu gösterilmiştir. Özellikle, *R. aculeatus*'un alkol içeren ekstraktında bulunan iki saponin bileşiği, insan promiyelositik lösemi hücre dizisi HL-60'ın büyümesini inhibe ettiği ortaya çıkmıştır (Bassil vd, 2012).

Yapılan bir araştırmaya göre, *Ruscus aculeatus* L. ve Ruscaceae familyasına ait olan *Ruscus hypoglossum* L. bitkisinin %70' lik metanol ekstratlarında birçok flavonoid glikozidleri ve fenolik asitler tanımlanmıştır. *R. aculeatus* L. ekstratında shaftosid, orientin, vitexin, vitexin-2 " -O-dglucopyranoside, vitexin-2 " -O- α -l-rhamnoside, rutin, isoquercitrin, nicotiflorin, narcissin, caffeic ve p-coumaric acid, trans-feruloyl2 " -hexaracidlactone, transferuloyl-3 " -hexaracidlactone, trans-feruloyl-methoxyhexaracid-lactone derivate, (S)-Ntrans-caffeoyloctopamine, (S)-N-trans-cumaroyloctopamine, (S)-N-transferuloyloctopamine, N-trans-caffeoyltyramine, N-trans-cumaroyltyramine ve Ntrans-feruloyltyramine tespit edilirken *R. hypoglossum* L.' nin % 70'lik metanol ekstresinde rutin, nicotiflorin, narcissine, caffeic ve p-coumaric acid bulunmuştur. *R. aculeatus* L. rizomlarına ait % 70' lik metanol ekstraktında p-coumaric acid hidroksisinnamik asit amidleri tespit edilirken hiçbir flavonoid belirlenmemiştir (Hadzifejzovic vd, 2013).

1.2.3. Türün Türkiye ve Dünyadaki Yayılışı

R. aculeatus L. türünün dünya üzerindeki doğal yayılış alanları genellikle kuzey, güney ve güney doğu Avrupa, Anadolu ve Kuzey Afrika'dır. Türkiye'de ise en çok Karadeniz, Akdeniz ve Marmara bölgelerinde yetiştirilmektedir (Çelikboyun, 2015). Başta Marmara bölgesi olmak üzere tüm sahil kıyılarında deniz seviyesinden 500-600 metre yüksekliklere kadar yayılış göstermektedir (Yılmaz, 2012).

Her mevsim yetişen bir bitki türüdür. Kış soğuklarına ve özellikle kış donlarına oldukça dayanıklıdır. Makilikler, ağaç altları, çalılık ve taşlık alanlarda yetişmektedir (Yılmaz, 2012).



Şekil 1.2: *Ruscus aculeatus* L.'nin illere göre yayılışı (Çelikboyun, 2015).

1.3. Nanoteknoloji ve Nanopartiküller

Nanoteknoloji terim olarak ilk kez 1974 yılında Norio Taniguchi tarafından, “ileri düzey duyarlılıkla mevcut teknolojilerin küçültülmesine dayalı bir teknoloji” olarak tanımlanmıştır (Ramsden, 2015). Nanoteknoloji, nano (10^{-9}) boyutlarda ki maddelerin kontrol edilmesi ve atomik seviyede değiştirilip işlevsel duruma getirilmesi olarak tanımlanabilmektedir (Yanık, 2019). Nanoteknoloji bilimi, biyoloji, kimya, biyoteknoloji, fizik, tıp ve materyal bilimi gibi alanları bünyesinde barındıran multidisipliner bir alandır. Nanoteknolojiyi diğer bilim dallarından ayıran önemli özelliklerden birisi nano boyutlarda malzemelerin yüzey/hacim oranlarının artmasıdır ve dolayısıyla malzemenin tümüne göre yüzeydeki

atomların oranının artması sağlanabilmektedir. Bu sayede malzemenin özelliklerinde büyük değişiklikler sağlanabilmektedir (Beykaya ve Çağlar, 2016).

Günümüzde nanoteknoloji, tıp alanında üst düzey görüntüleme, algılama, hedeflenen ilaç dağıtımı, yapay implantlar ve gen dağıtım sistemleri gibi çoğu çeşitli alanı keşfetmek için araç olarak kullanılmaktadır. Üretilen yeniçağ ilaçları kanser gibi hastalıkların mücadelesinde ve bakteri gibi insan patojenleriyle savaşabilen polimer, metal veya seramik nanoparçacıklardır. Nanoteknolojinin gelişimi ile birlikte biyolojik ve kimyasal savaş, mühimmat ve askeri silahlandırma uygulamaları da olası sonuçlardandır. Bu alanda üretilen nanosensörler yoluyla gelişecek gözetim yöntemleri gizlilik haklarını savunan kişiler ve kurumlar için endişe vericidir (Singh vd, 2010).

Nanoteknoloji uygulamaları ile kimyasal ya da biyolojik yöntemlerle üretilen nanopartiküllerin, antibakteriyel, antikanserojen veya antibiyofilm gibi etkilerinin araştırılma fırsatı doğmuştur. Hastalıkların tedavisinde bu etkilerin araştırılıp kullanılarak hangi tedavilerde etki gösterdiği öğrenilebilmektedir.

Nanopartiküllerin üretiminde şimdiye kadar kullanılan fiziksel ve kimyasal metotlarda istenilen boyutlarda nanoparçacık üretilmemesi, sürecin uzun sürede gerçekleşmesi, partikül karalılıklarının iyi olmaması ve bu işlemlerin pahalı olması problemlerinden dolayı daha yeni yöntemlere yönelim oluşmuştur. Yeni yöntemler araştırılırken bilim insanları doğadaki canlılardan ilham alarak canlı yapıları kullanmış ve inorganik maddelerin üretilmesi araştırılmaya başlanmıştır (Beykaya ve Çağlar, 2016). Araştırma sonucunda çevre dostu, toksik etkisi daha az ve doğadaki canlılar kullanılarak nanopartikül esasına dayanan “Yeşil Nanoteknoloji” terimi ortaya çıkmıştır. Yeşil nanoteknoloji metodu, insan sağlığına zararlı olmayan, kolay uygulanabilir ve atık ürünler problemini azaltan bir yöntemdir (Duncan, 2011). Bu yöntem sayesinde bakteriler, algler ve bitkiler kullanılarak metal nanoparçacıklar diğer yöntemlere göre daha ucuz ve kolaylıkla üretilebilmektedir.

Nanoteknolojik çalışma yöntemleri arttıkça bitkisel özütler kullanılarak üretilen nanoparçacıkların aktivitelerinin belirlenmesi ilerleyecek ve bu sayede gıda, sağlık, mühendislik ve tıp gibi çoğu alanda yeni bir çığır açacaktır (Beykaya ve Çağlar, 2016).

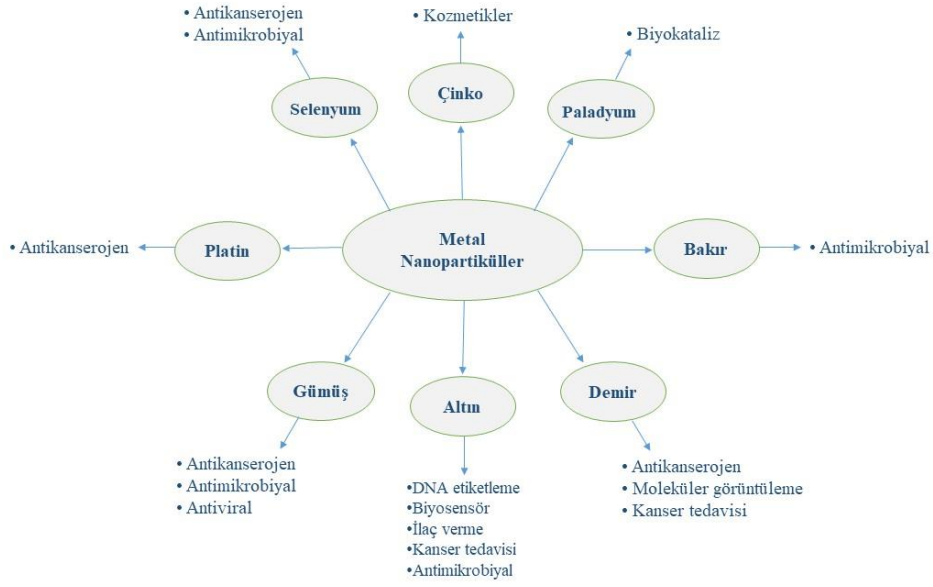
1.3.1. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

Nanoteknoloji ile üretilen nanomalzemeler ve özellikle nanopartiküller bu alanın en ön safhalarında yer alır. Nanopartiküller ve nanomalzemeler, inanılmaz derecede çok sayıda endüstri ve pazar üzerinde etki yapma potansiyeline sahip gelişen bir teknolojiyi temsil eder (Michael ve Pitkethly, 2003).

Günümüzde bazı metal nanopartiküller (NP'ler), biyomedikal alanlarda, ilaç salınımı alanında, katalizör olarak, tarım alanında, antikanser ajan olarak, antioksidan ajan olarak, antibakteriyel ve antibiyofilm ajan olarak kullanılabilir (Erci, 2018).

Gümüş nanopartiküller (AgNP), antibiyotik tedavisine dirençli patojen mikroorganizmaların neden olduğu mikroorganizmaların önlenmesi ve tedavisi için gerekli antimikrobiyal ajanlardır. Gümüş nanopartiküllerinin bakteri, virüs ve diğer ökaryotik mikroorganizmalara karşı en etkili antimikrobiyal ajan olduğu kanıtlanmıştır (Rai vd, 2012).

Metal nanopartiküller biyomedikal alanda sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar; ilaç dağıtım ve kanser tedavilerinde, tıbbi teşhis ve sensörler de, tıbbi görüntüleme uygulamalarında, atık su arıtımında, kozmetik, malzeme bilimi, nanotıp, elektronik ve gıda sektöründe kullanılmaktadır (Erci, 2018; Beykaya ve Çağlar, 2016).



Şekil 1.3: Metal nanopartikül tipleri ve biyoteknolojide ki uygulama alanları (Beykaya ve Çağlar, 2016).

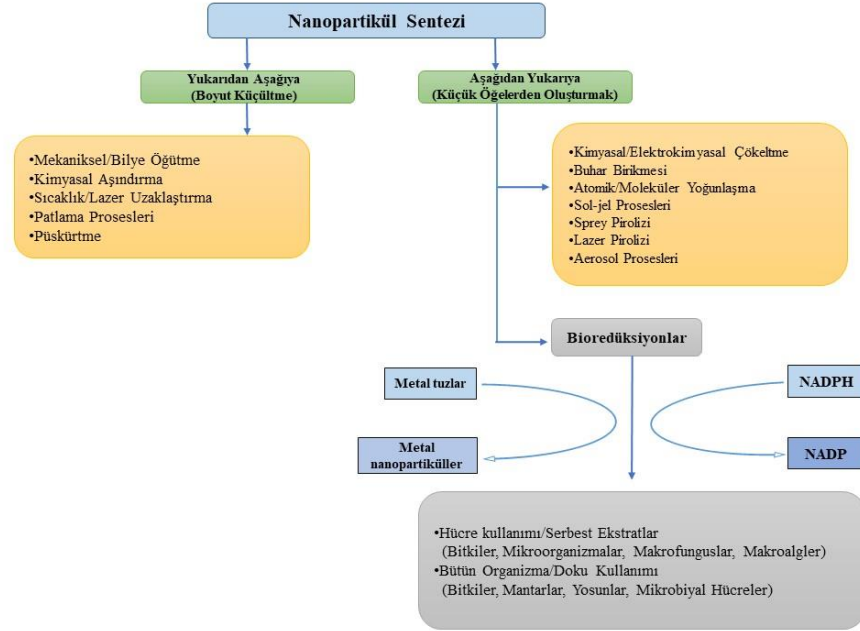
1.3.2. Nanopartiküllerin Sentezi

Geleneksel olarak nanopartiküllerin sentezi için kimyasal, fiziksel ve biyolojik metotlar kullanılmaktadır (Vithiya ve Sen, 2011). Nanopartiküllerin üretiminde kullanılan bu yöntemler yukarıdan aşağı “top down” ve aşağıdan yukarı “bottom up” olarak iki ana başlık altında toplanır (Ravichandran, 2010).

Yukarıdan aşağıya sentez yöntemine dâhil olan metotlarda hacimsel malzemeye dışarıdan mekaniksel ve/veya kimyasal işlemler ile enerji verilmesi sonucunda malzemenin nano boyuta kadar inebilecek küçük parçalara ayrılması esasına dayanmaktadır (Beykaya ve Çağlar, 2016). Yukarıdan aşağıya yaklaşım temel olarak öğütme gibi gıda maddelerinin fiziksel olarak işlenmesi yoluyla elde edilir (Ravichandran, 2010). Bu yaklaşımda en genel örnek olarak mekanik öğütme ve kimyasal aşındırma gösterilebilmektedir (Beykaya ve Çağlar, 2016).

Aşağıdan yukarıya yönteminin esası ise atomlar veya moleküller ile organik ya da inorganik yapı inşa etmeye dayanmaktadır. Nano yapıları birleştirebilmek için doğadaki canlılardan ve DNA gibi biyolojik sistemlerin kendi kendine birleşme özelliğinden yararlanılarak karbon

nanotüplerin kontrolü sağlanır (Beykaya ve Çağlar, 2016). Bu yaklaşımda en yaygın örnekler kimyasal buhar kaplama, kimyasal buhar yoğunlaştırma, sol jel ve sprej piroliz yöntemleridir (Wolfgang, 2007; Zaki, 2007).



Şekil 1.4: Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar (Mittal vd, 2013).

1.3.2.1. Kimyasal Sentez

Nanoteknolojik olarak üretilen malzemelerin arasında bulunan nanopartiküller birçok yöntemle üretildiği gibi kimyasal metotlarla da üretilebilirler. Metalik nanopartiküllerin üretilmesinde kullanılan başlıca yöntemler; kimyasal buhar yoğunlaştırma, hidrojen redüksiyonu, asal gaz yoğunlaştırma, mikro heterojen sistemlerden üretim, alev sentezi, mekanik aşındırma ve ultrasonik sprej piroliz metotları gibi farklı sistemler kullanılmaktadır (Gürmen ve Ebin, 2008). Kimyasal sentez yöntemlerinde istenilen büyüklükte nanopartiküllerin sentezlenmesi, istenilen morfolojide olması ve üretim aşamaları kısa süre aldığı için avantajlıdır. Fakat nanoparçacık sentezi ve stabilizasyonu için kullanılan kimyasallar toksik yapıya sahiptir bu da çevre açısından uygun olmayan problemlere yol açmaktadır (Beykaya ve Çağlar, 2016; Vithiya ve Sen, 2011). Ayrıca yöntemlerin yüksek maliyetli olması, enerji gereklilikleri, zehirli reaktiflerin kullanımı, anaerobik koşullar ve tehlikeli atıkların üretiminden dolayı elverişsiz olarak görülmektedir ve bu yüzden çevre

hakkında endişelere neden olmaktadır (Hammamchi, 2019). Dolayısıyla çevre dostu ve toksik yapıya sahip olmayan çevreci sentez yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

1.3.2.2.Biyolojik Sentez

Nanopartikül üretiminde kullanılan kimyasal ve fizyolojik yöntemlerin kompleks bir yapıya sahip olması, yüksek maliyetli olması ve çevre dostu olmaması bilim insanlarını biyolojik yöntemlere yönlendirmektedir. Biyolojik yöntemler basit, daha ucuz, toksik madde kullanımını gerektirmez. Ayrıca biyomedikal ve farmakolojik uygulamalara daha uygun olduğu için ticari üretime elverişlidir (Çoşkunçay, 2017). Bu yüzden biyolojik yöntemlere yönelim artmaktadır.

Biyosentez, biyolojide canlı organizmalardaki kimyasal süreçleri belirten terimdir ve enerji kullanılarak gerçekleştirilen bu süreçler basit yapıdaki maddelerden daha karmaşık ürünler elde edilmesini sağlar. Nanoteknoloji de ise bu terim bitki ekstraktı, mikroorganizmalar, mantar, maya, alg ve virüs gibi canlı organizmaları ya da kimyasal maddeleri kullanarak nanoparçacık sentezlemektir (Yıldız, 2011).

Nanopartiküllerin biyoüretiminde, bitkiler, mayalar, mantarlar, aktinomisetler ve bakteriler de dâhil olmak üzere metal nanopartikül sentezi için doğal yöntemler vardır. Tek hücreli ve çok hücreli organizmalar hücre içi ve hücre dışı inorganik nanopartiküller üretebilirler (Vithiya ve Sen, 2011). Biyolojik olarak sentezlenen nanoparçacıkların bazıları Tablo 1.1’de gösterilmiştir.

Tablo 1.1: Biyolojik kaynaklı nanopartiküller (Vithiya ve Sen, 2011).

Kaynak	Bilimsel İsmi	Lokalitesi	Ürettiği nanopartikül	Büyükük (nm)
Bitki	<i>Azadirachta indica</i>	Hücre dışı	Ag, Au	50-100
	<i>Geranium yaprak ekstraktı</i>	-	Ag	16-40
	<i>Avena sativa</i>	Hücre dışı	Au	5-85
	<i>Aloe vera</i>	Hücre dışı	Au	50-350
Fungi	<i>Fusarium oxysporum</i>	Hücre içi	Au	20-40
	<i>Verticillium sp.</i>	Hücre içi	Ag	25-12
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Hücre içi	Ag	5-25
	<i>Schizosaccharomycepombe</i>	Hücre içi	CdS	200
	<i>Fusarium oxysporum ve Verticillium sp</i>	Hücre içi	Manyetit	20-50
Maya	Yeast strain MKY3	Hücre dışı	Ag	2-5
	<i>Candida glabrata</i>	Hücre içi	CdS	200
	<i>Schizosaccharomyce pombe</i>	Hücre içi	CdS	200
Bakteri	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Hücre içi	Ag	200
	<i>Lactobacillus strains</i>	Hücre içi	Ag, Au	-
	<i>Escherichia coli</i>	Hücre içi	CdS	2-5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hücre dışı	Au	5-32

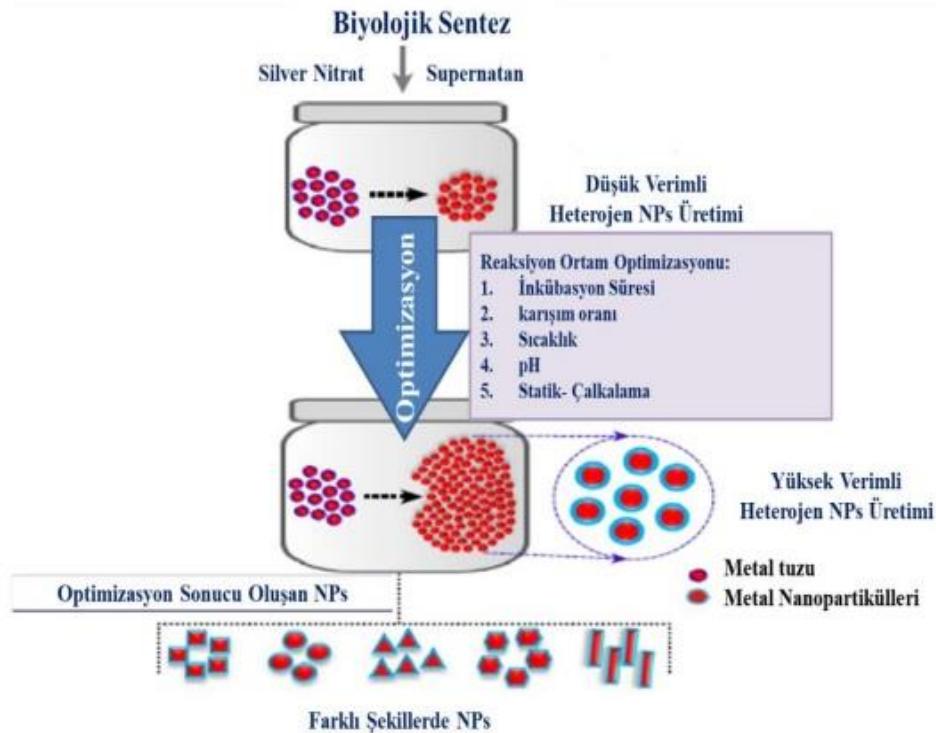
Son yıllarda biyolojik sentez yöntemlerinde bitki ekstraktları sıklıkla kullanılmaktadır. Bundan dolayı ‘‘Yeşil Sentez Yöntemi’’ adı verilen metot ortaya çıkmıştır. Bitkiler kullanılarak üretilen metal nanopartiküller bu sayede hem daha basit hem de daha ucuz maliyet içererek kısa sürede nanopartikül üretimi sağlanmaktadır. Nematollahi (2015) tarafından yapılan bir çalışmada nanopartikül üretimi için bitki ve bitkisel ürünlerin ucuz ve yenilenebilir kaynaklar olduğu, son yıllarda bitki özütlerinin kullanımının fiziksel ve kimyasal metotlara karşı alternatif olduğu ve yaygın olarak sağlık alanında kullanıldığı bildirilmiştir (Nematollahi, 2015). Bu nedenlerden dolayı bitki ekstraktlarının kullanılması ile NP sentezinin gerçekleştirilmesine olan ilgi son yıllarda artmıştır (Bar vd, 2009).

Bir tepkimenin ya da bir materyalin yeşil olabilmesi için;

1. Güvenli olması
2. Tek bir tepkime basamağından oluşması
3. Atık üretimi gerçekleştirilmemesi
4. Yenilenebilir hammaddelerin kullanımı ile elde edilmesi
5. Çevresel olarak kabul edilebilir olması
6. Ürünün basit şekilde ayrıştırılabilirliği
7. % 100 verim vermesi koşullarını sağlaması gerekmektedir.

Birçok tepkimede ise bu koşulların tamamını yerine getirmek oldukça zordur (Yıldız, 2011).

Biyolojik yollar ile sentezlenen nanoparçacıklar da birçok parametrenin (tuz konsantrasyonu, biyolojik ekstrakt ve metal tuzunun karıştırma oranı, pH değeri, sıcaklık, inkübasyon süresi ve havalandırma) benzer boyutta ve şekilde homojen NP üretmek için optimizasyonu gerekmektedir (Hammamchi, 2019). Biyolojik olarak üretilen nanopartiküllerin kararlı ve yüksek verimli üretim parametreleri Şekil 1.5'de gösterilmiştir.



Şekil 1.5: Tekil Dağılımlı, kararlı ve yüksek verimli biyolojik nanopartiküllerin üretme parametreleri (Pereira vd, 2015).

1.3.3. Gümüş Nanopartikül (AgNP)

Gümüş nanopartiküller, kimyasal kararlılıkları, iyi iletkenlik özellikleri, katalitik ve en önemlisi antibakteriyel, antiviral, antifungal gibi benzersiz özelliklerinden dolayı nanoteknoloji alanında önemli bir üründür (Klaus-Joerger, 2001; Ahmad vd, 2003). Bu yüzden bakterilere, virüslere ve diğer ökaryotik mikroorganizmalara karşı en iyi etkinliği gümüş göstermektedir (Duncan, 2011; Beykaya ve Çağlar, 2016). Antimikrobiyal özelliği ile dikkat çeken gümüş nanopartikül (AgNP) birçok avantaja sahiptir. Bu avantajlar; gümüşün çok geniş spektrumlu bir antibiyotik olması, gümüşte bakteri direncinin neredeyse hiç bulunmaması ve daha önce belirtildiği üzere düşük derişimde toksik olmamasıdır (Rai vd, 2009).

AgNP'ler hücreyle etkileşime girerek hücre duvarı bozulmalarına, elektron transport zincirinin etkilenmesine, radikallerin oluşmasına, ribozomlarla etkileşerek protein sentezini etkilemesine, enzimlerle etkileşerek enzimlerin çalışmasını etkilemesine ve DNA ile etkileşerek DNA hasarlarına neden olabilirler (Patil ve Kim, 2017).

Gümüş nanopartiküllerin elektriksel, optik, termal ve antibakteriyel özelliklerinden dolayı geniş kullanım alanına sahiptir. Örneğin su ve atık su arıtımı, biyomedikal alanında antibakteriyel malzeme üretimi, elektronik malzemelerde iletkenliğin artırılması gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Esmeray ve Özata, 2019).

1.4. Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Aktiviteleri

Bir bakteri hücresinin canlılığını devam ettirmesi hakkındaki literatürde ki çalışmalar, bakteri hücresi zarı ile nanopartikül etkileşimlerini araştırmayı da hedeflemiştir. Gram-pozitif bakteriler, hücre zarı dışındaki teikoik asitlere bağlanan, lipit peptidoglikanın 20-50 nm tekli kalın tabakasına sahip hücre duvarlarından oluşur ve Gram-negatif bakteriler, teikoik asitler ya da lipoteikoik asitlere bağlı olmayan 2-3 nm ince çok katmanlı lipid peptidoglikan ile 8 nm kalınlığında hücre duvarlarından meydana gelmektedir. Hücre duvarlarının bu yapısal bütünlüğü, NP gibi yabancı cisimlere bakterilerin toleransına veya hassasiyetine neden olur. (Erci, 2018). Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin membran yapısında farklılıkların en belirgin olanı peptidoglikan tabakasının kalınlığıdır (Kim vd., 2007).

AgNP' ler hem Gram pozitif hem de Gram negatif organizmalar ve çeşitli ilaca dirençli suşlar üzerinde geniş spektrumlu antibakteriyel etki gösterirler (Hammamchi, 2019). Kim ve arkadaşları (2007), AgNP' lerin antibakteriyel etkisinin peptidoglikan tabakası ile ilişkili olduğunu belirlemek için Au (altın) nanopartikül ve Ag nanopartikül ile yaptıkları deneysel sonuçta AuNP' lerin önemli bir antimikrobiyal etki göstermediğini fakat AgNP' lerin önemli bir antimikrobiyal etki gösterdiğini ispatlayarak bu durumun Ag'ye özgü bir durum olduğunu düşündürmektedir ve bu sayede daha kolay ve daha spesifik bir antibakteriyel ajan olarak AgNP'ler kullanılabilir.

Dirençli suşların gelişmesi nedeniyle bakterilerin bakterisitlere ve antibiyotiklere direnci son yıllarda artmıştır. Bazı antimikrobiyal ajanlar son derece tahriş edici ve toksik yapıya sahiptir bu nedenle güvenli ve uygun maliyetli biyosidal materyaller formüle etmenin yollarını bulmak için çok fazla ilgi oluşmaktadır (Sondi ve Salopek-Sondi, 2004).

Daha önceki çalışmalar nanopartiküller formunda antimikrobiyal yöntemlerin, etkili bakterisit materyaller olarak kullanılabilirliğini göstermiştir (Sondi ve Salopek-Sondi, 2004). Klabunde ve arkadaşları (2002) yüksek reaktif metal oksit nanoparçacıklarının Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı mükemmel biyosidal etki sergilediklerini gösterdiler. Böylece, nano hale getirilmiş inorganik parçacıkların hazırlanması, karakterizasyonu, yüzey modifikasyonu ve fonksiyonelleştirilmesi, yeni nesil bakterisit malzemelerin araştırılmasını artırır (Sondi ve Salopek-Sondi, 2004).

1.4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Aktiviteleri

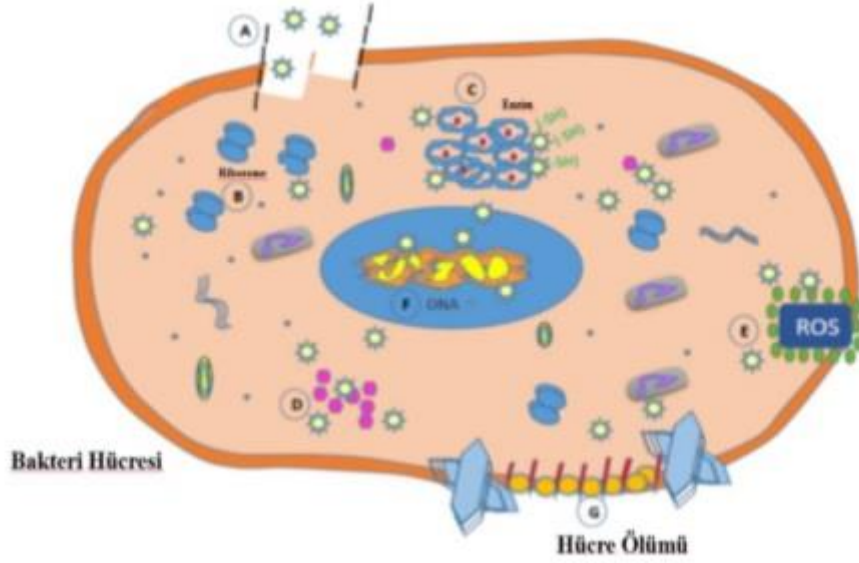
Gümüş iyonlarının mikroorganizmalar üzerindeki inhibitör etki mekanizması kısmen bilinmektedir. DNA' nın replikasyon yeteneğini kaybettiğine ve hücresel proteinlerin Ag⁺ tedavisinde inaktive olduğuna inanılmaktadır. Buna ek olarak, Ag⁺ 'nın fonksiyonel protein gruplarına bağlanarak protein denatürasyonuna yol açacağını göstermiştir. Gram-negatif bakteriler üzerindeki AgNP'lerin antimikrobiyal aktivitesinin AgNP konsantrasyonuna bağlı olduğunu ve bakterilerin hücre duvarında 'çukurların' oluşumuyla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Sondi ve Salopek-Sondi, 2004).

Ag iyonları ve tuzları, tuzların müdahale edici etkileri ve (metal formundan Ag iyonunun yeterli konsantrasyonunun sürekli salınımı) dâhil olmak üzere çeşitli nedenlerden dolayı bir

antimikrobiyal ajan olarak sınırlı kullanılabilirliğe sahiptir. Buna karşılık, bu tür sınırlamalar AgNP'lerin kullanımı ile aşılabılır. Ancak Ag'yi mikroorganizmalara karşı çeşitli alanlarda kullanmak için uygun maliyetli yöntemlerle hazırlamak ve antimikrobiyal etkinin mekanizmasını bilmek esastır ve antimikrobiyal etkisini artırmak için önemlidir (Kim vd, 2007).

AgNP' ler için çeşitli antibakteriyel etki mekanizmaları önerilmesine rağmen tam bir etki mekanizması halen anlaşılmamıştır (Şekil 1.6) (Hammamchi, 2019).





Şekil 1.6: Gümüş nanopartiküllerinin antimikrobiyal etki basamakları.

(A) Bakteriyal hücre içerisine AgNP difüzyonu ve alımı: Plazma zarında AgNP birikmesi ve çözünmesi hücre sızıntısına neden olmaktadır. (B) Ribozomların destabilizasyonu: Protein sentezini ve plazma zarı degradasyonunu inhibe ederek ribozomların doğasını değiştirir. (C) Enzim etkileşimi: AgNP' ler solunum enzimlerindeki tiyol grubu ile (-SH) bağlanır ve onları etkisizleştirir. (D) Elektron transfer zincirinin kesintiye uğraması: AgNP'ler sinyal yolunu etkileyerek elektron taşınmasını engeller. (E) Reaktif Oksijen Türleri (ROS): Mitokondriyal hasar, proteinleri okside eden ROS'u indükler. (F) DNA Hasarı. AgNP'ler, apoptoza neden olan replikasyon ve multiplikasyonunu önleyerek DNA ile bağlanır. (G) Hücre Ölümü: Hücre zarında çukur ve delik oluşumu, hücre organellerinin salımına ve hücre ölümüne neden olur.

Gümüş, hücredeki kükürt veya fosfor içeren biyomoleküllerle reaksiyona girme eğilimindedir. Bu nedenle, zardaki veya hücrelerin içindeki kükürt içeren proteinlerin ve DNA gibi fosfor içeren elementlerin AgNP bağlanması için tercih edilen yerler olması muhtemeldir (Krishnaraj vd, 2010).

Yamanaka ve ark. (2005) yaptığı çalışmada gümüş iyonunun bakterisidal etkilerinin öncelikle hücrenin içindeki sitoplazma ile etkileşmesinden kaynaklandığını belirtmiştir. Gümüş iyonunun hücre zarına zarar vermeden iyon kanallarına nüfuz ettiği

görülmektedir ve ayrıca ribozomu denatüre eder, ATP üretimi için gerekli olan enzimlerin ve proteinlerin ekspresyonunu bastırır, bu da hücreyi denatüre eder.

Kaviya ve ark. (2011) yaptığı çalışmada ise, *E. coli* ve *P. aeruginosa* (Gram-negatif) bakterilerinin *S. aureus* (Gram-pozitif) bakterisine karşı daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. 60 °C'de sentezlenen AgNP'lerin boyutu daha küçük olduğu için 25 °C'ye kıyasla antibakteriyel aktivitenin etkisi yüksek olmuştur. Bu sonuç, hücre duvarı yapısının gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler arasındaki fark nedeniyle mümkündür. Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarında peptidoglikan tabaka Gram-negatif bakterilere göre daha kalındır ve bu yüzden AgNP'lerin penetrasyonu daha zor gerçekleşir. Yüksek bakterisidal aktivite, kesinlikle Ag⁺ bakterisidal ajan için rezervuar görevi gören AgNP'lerden salınan gümüş katyonlarından kaynaklanmaktadır. Gümüş katyonlar ile etkileşim sonucunda bakterilerin membran yapısındaki büyük değişiklikler bakterilerin membran geçirgenliğinin artmasına yol açmaktadır.

1.5. Nanopartiküllerin Antibiyofilm Aktiviteleri

Biyofilmler, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelse bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilir (Gün ve Ekinci, 2009). Biyofilmler, antibiyotiklerin ve insan bağışıklık sistemine direnen karmaşık bakteri topluluklarıdır ve biyofilmlerin içinde bulunan bu bakterileri yok etmek neredeyse imkansızdır bu yüzden kalıcı enfeksiyonlar gibi sayısız problemlere sebep olurlar (Markowska vd., 2013). Hücre dışı polimerik matriks, biyofilmlerin önemli yapısal ögesidir. Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan hücre dışı matriks, biyofilm hücrelerinin tutunmasını sağlar. Matriksin en önemli fonksiyonlarından birisi UV radyasyon, farklı pH koşulları, ozmotik basınç, su kaybı, antibiyotik gibi birçok faktöre karşı bakteriyi korumaktır (Gün ve Ekinci, 2009).

Hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakteriler kateterler, mekanik kalp kapakçıkları ve protez eklemler gibi tıbbi cihazlarda biyofilm oluşturabilirler. En yaygın biyofilm oluşturan bakteriler *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *Pseudomonas aeruginosa* 'dır (Donlan, 2001). Aşağıdaki tabloda (Tablo 1.2) biyofilm

oluşturan mikroorganizmalar ve yüzey proteinlerinin fonksiyonları verilmiştir (Gün ve Ekinci, 2009).

Tablo 1.2: Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ve yüzey proteinlerinin fonksiyonu

Mikroorganizma	Yüzey Proteini	BAP'la hemoloji	Fonksiyon
<i>Staphylococcus aureus</i>	BAP	-	Başlangıç tutunması ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumu
<i>Pseudomonas putida</i>	Mus20	8e-136 %29 tanımlanmış	Başlangıç çekirdek kolonizasyonu
<i>Salmonella enteritidis</i>	BAPA	3e-114 %28 tanımlanmış	Biyofilm oluşumu Konukçu kolonizasyonu
<i>Burkholderia cepacia</i>	BAP	8e-135 %33 tanımlanmış	Son aşamada biyofilm oluşumu
<i>Enterococcus faecium</i>	Espfm	1e-125 %27 tanımlanmış	Ökaryotik hücrelerde yapışma
<i>Enterococcus faecalis</i>	Esp	2e-118 %26 tanımlanmış	Başlangıç tutunması ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumu
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LapA	8e-59 %25 tanımlanmış	Biyofilm oluşumunda dönüşümsüz tutunma aşamasında destekleme
<i>Escherichia coli</i>	YeeJ	5e-18 %21 tanımlanmış	Yapışma
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	VP1443	3e-05 %20 tanımlanmış	Biyofilm olgunlaşması

Biyofilm oluşumuyla mücadelede nanoteknolojik yaklaşımlar, biyomalzemelerin yüzeyini kaplama ile işlevselleştirmek için nanopartiküllerin kullanılmasına dayanmaktadır (Markowska vd., 2013). Antimikrobiyal aktivitesi kanıtlanmış metal nanopartiküller arasında gümüşten yapılmış olanlar özellikle etkili bakterisidal ajanlardır (Seil ve Webster, 2012). Gümüş elementinin antibakteriyel özellikleri uzun yıllardır bilinmektedir ve AgNP'lerin gümüş iyonlarından daha az toksik olduğu bildirilmektedir. AgNP'ler, tıbbi ve farmasötik nanomühendislikte terapötik ajanların verilmesi, kronik hastalık teşhisinde ve sensörlerin bir parçası olarak başarıyla kullanılmıştır (Markowska vd., 2013).

1.5.1. Biyofilm Yapısı ve Oluşum Basamakları

Biyofilm kütesinin %97'sini su oluşturmaktadır. Matriks de bulunan diğer bileşenler ise; %1-2 EPS, %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asit, lipid,

fosfolipitlerdir. Fakat bu oranlar mevcut organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir (Allison, 2003). EPS çoğunlukla polisakaritlerden oluşur, ancak EPS'de protein, lipid ve nükleik asitler gibi diğer biyomoleküller de bulunmaktadır. Glikopeptidler, lipidler ve lipopolisakkaritler gibi polimerler bir iskelet oluşturur ve biyofilmi birlikte tutar (Erci,2018).

Polisakkarit, protein, DNA ve sudan oluşan ekstraselüler matriks biyofilm hücrelerinin tutunmasını sağlar. Yüzeyle sıkıca tutunan bakteri burada çoğalarak önce mikrokolonileri oluşturur, mikrokoloniler büyüyerek ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturur. EPS üretimi, organizmanın yüzeyle dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir ve bu biyofilm oluşumunun bir göstergesidir (Gün ve Ekinci, 2009). Olgun bir biyofilmin kütlelerinin %75-90'ını EPS oluşturmaktadır (Padera, 2006).

Biyofilm oluşum basamakları aşağıdaki gibi sıralanmaktadır;

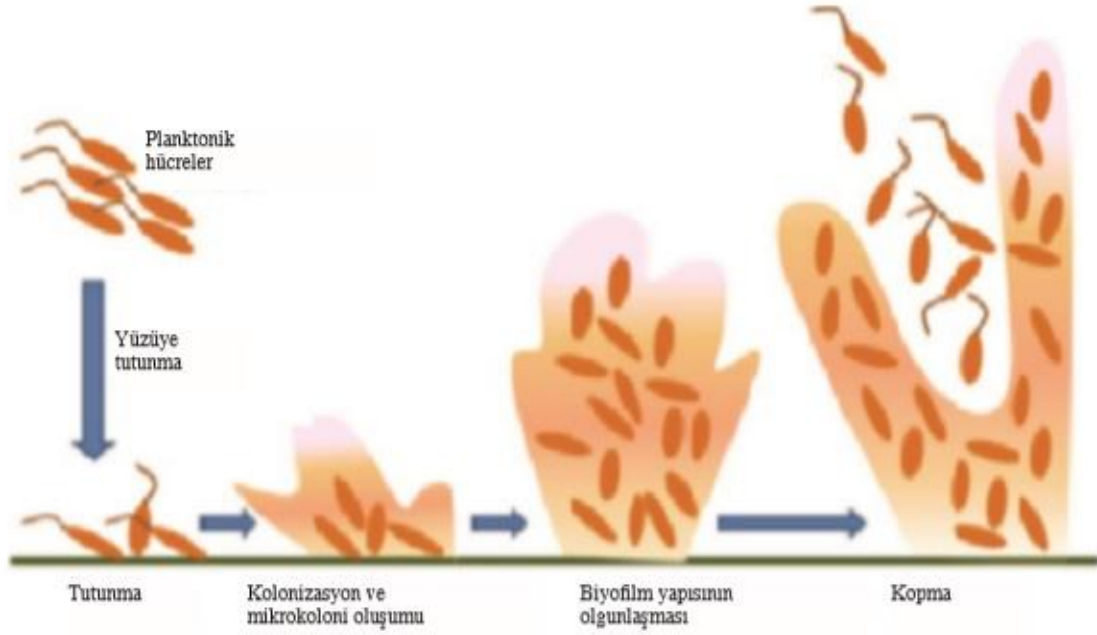
Tutunma: Bakteri hücresi yüzeyle tam olarak temas etmemektedir, ancak bakteri hücresi ile flagella, fimbria veya kapsülleriyle yüzeyle zayıf kuvvetlerle geri dönüşümlü olarak bağlanırlar. Bunlar elektrostatik güçler, hidrofobik etkileşimler ve Van der Waals kuvvetidir. Elektrostatik etkileşimler daha çok itici güçlerdir, çünkü bakteriler ve katı yüzeyle negatif yüklüdür (Hood ve Zottola, 1995; Gün ve Ekinci, 2009).

Yapışma: Bakteri hücreleri flagella veya pili gibi organelleri ile EPS oluşturarak, yüzeyle güçlü kuvvetlerle (kimyasal bağlanma, hidrofobik etkileşimler) tek bir tabaka halinde dönüşümsüz olarak tutunurlar. Ancak yüzeyle yapışmasını sağlayan matriks jel (EPS) oluşturmayan bazı bakteri türlerinin de yüzeyle bağlanabildiği belirtilmektedir (Hood ve Zottola, 1995; Gün ve Ekinci, 2009).

Koloni Oluşturma: Yüzeyle tutunmuş bakteri hücreleri bölünüp çoğalarak mikrokoloniler oluşturur. Ortamdaki planktonik bakterilerin de mikrokolonilere yapışmasıyla kolonizasyon desteklenir. Bakterinin etrafındaki popülasyon yoğunluğunu algılamasına yarayan Quorum Sensing (QS) sinyal sistemi devreye girer. Hücreler arası iletişimi sağlayan sinyal moleküllerinden oluşan bu sistem, bakteri hücresinde spesifik genlerin ekspresyonunu etkileyerek olgun biyofilm yapısının oluşumunu destekler (Temel ve Araç, 2018).

Büyüme: Bu olgunlaşma evresinde biyofilm, yapısını, fizyolojisini ve metabolizmasını manipüle ederek dış koşula adapte olur ve aynı zamanda bu büyüme gözenekler ve su kanalları oluşumu ile gerçekleşir (Balaban, 2018; Erci, 2018).

Ayrılma: Olgun biyofilmin diğer yüzeylere tutunmak üzere ayrılması ve biyofilm oluşturucu serbest mikroorganizmaların diğer yüzeylere dağılımı aşamasıdır (Balaban, 2018).



Şekil 1.7: Biyofilm oluşum aşamaları (Temel ve Araç, 2018).

1.5.2. Gümüş Nanopartiküllerin Antibiyofilm Aktiviteleri

AgNP'lerin yaygın kullanımını (örneğin dezenfektanların bir bileşeni olarak) gümüşe dirençli bakteri suşlarının daha fazla kullanılmasını teşvik eder. Biositler olarak AgNP'ler, bakteri hücreleri üzerinde veya içinde birden fazla yerde hedef eğilimindedir ve dolayısıyla geniş spektrumlu aktiviteye sahiptirler. Ayrıca, AgNP'lerin bu özelliği, mikrobiyal hücreden biyofilm oluşumu dâhil olmak üzere mevcut mikrobiyal ilaç direnci mekanizmalarının üstesinden gelinebileceği anlamına gelmektedir (Pelgrift ve Friedman, 2013).

AgNP'ler aynı zamanda konvansiyonel antibiyotiklerin antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitesini artırabilir. Örneğin; ampisilin, kanamisin, streptomisin veya vankomisin

arasında *E. coli* ve *P. aeruginosa* 'ya karşı sinerjik aktivitesini açıklayan raporlar vardır (Markowska vd., 2013).

AgNP'lerin antibiyofilm aktivitesi bir dizi çalışmada gösterilmiştir. Fabrega ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada iyi ölçülen ve karakterize edilen bakteriyel biyofilmler ile AgNP'ler arasındaki etkileşimleri tartışan ilk raporda; 24 saatlik *Pseudomonas putida* biyofilmlerinin biyokütlesinde küçük ama önemli düşüşler gözlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan AgNP'lerin ortalama çapı 65 ± 30 nanometredir (nm) ve nanopartiküllerin 1-100 nm aralığında olduğu düşünüldüğünde oldukça yüksektir.

Kalishwaralal ve ark. (2010) çalışmada ise, 100 nM konsantrasyonda AgNP'lerin (ortalama çap 50 nm) *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus epidermidis* tarafından ilk adımı engelleyerek biyofilm oluşumunu neredeyse tamamen engellediği bulunmuştur. Söz konusu çalışmalarda kullanılan nanogümüşün kimyasal ve fiziksel özelliklerindeki farklılıkların, antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliğinde gözlenen değişimin bir kısmına neden olabileceğini belirtmek önemlidir (Markowska vd., 2013).

Mohanty ve ark. (2012) nişasta kullanarak stabilize ettikleri nanopartikülleri, 1-2 μ M konsantrasyonlarda (*P. aeruginosa* ve *S. aureus*) biyofilm oluşumunu sırasıyla % 65 ve % 88 oranında azalttığını göstermişlerdir. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*, ilaca direnç gösteren ve enfeksiyonun patogenezinde katkıda bulunan biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Söz konusu organizmalar bakterileri konak savunma mekanizmalarından korur ve aynı zamanda biyofilm oluşturmak için yüzeylere yapışmaya aracılık eden eksopolisakkaritleri sentezler. Bu çalışmada, AgNP konsantrasyonundaki artışın biyofilm oluşumunu olumsuz yönde etkilediğini göstermişlerdir. Antibiyofilm aktivitesi, eksopolisakkarit sentezinin inhibisyonundan kaynaklandığını çünkü AgNP'lerin *P. aeruginosa*'da eksopolisakkarit sentezini bozduğunu bildirmişlerdir, bu sonuç bize biyofilm oluşumunun engellendiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, AgNP'ler biyofilm oluşumunu etkili bir şekilde önler ve yerleşik biyofilmlerde bakterileri öldürür, bu da AgNP'lerin biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi için kullanılabileceğini gösterir (Martinez-Gutierrez vd., 2013).

1.6. Nanopartiküllerin Antikanser Aktiviteleri

Kanser, tümör hücrelerinin evrensel özelliği olan biyokimyasal ve enzimatik parametrelerin histerik değişiklikleri ile kontrolsüz bir hücre çoğalmasdır. Hücresel büyümenin aşırı ekspresyonu, biyo-tabanlı nanopartiküllerin yeni kontrol ajanları olarak kullanılarak kanserli hücredeki sistematik hücre döngüsü mekanizmaları ile düzenlenecektir (Akhtar vd., 2013). Ayrıca bitkiler ile üretilen nanopartiküller Hep 2, HCT 116 ve HeLa hücre hatları gibi çeşitli kanser hücre hatlarına karşı büyük etkisi vardır. Son zamanlarda, yapılan birçok çalışma bitki kaynaklı nanopartiküllerin tümör hücre büyümesini kontrol etme potansiyeline sahip olduğunu ve geliştirilmiş sitotoksik etkinin sekonder metabolitler ve diğer metal olmayan bileşimlerden kaynaklandığını bildirmektedir (Raghuandan vd., 2011; Das vd., 2013).

Bitkiler aracılığı ile üretilen AgNP' ler kan dolaşımındaki hücre döngüsünü ve enzimleri düzenler (Alt vd, 2004). Ayrıca, sentezlenen AgNP'ler hücreden serbest radikal oluşumunu nispeten kontrol ederler. Serbest radikaller genellikle hücre proliferasyonunu indükler ve normal hücre fonksiyonuna zarar verir (Kuppusamy vd., 2016).

Nanomalzemeler ve hücreler arasındaki etkileşimler, hücre alım ve daha sonra hücrenin toksik tepkisi AgNP'lerin neden olduğu toksisite ile ilgili en önemli konular arasındadır. Çoğu hücre için AgNP'lerin esas olarak endositoz yoluyla alınması zamana, doza ve enerjiye bağlıdır ve ana hedef organeller endozomlar ve lizozomlardır. Nanopartiküller, lizozomların asidik ortamına maruz kaldıklarında doğrudan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini indükleyebilmektedir. Reaksiyon, hücre kültür ortamı veya sitoplazmada proteinler ile temas ettiğinde meydana gelmektedir. Ayrıca ROS oldukça reaktiftir, proteinlere ve DNA' ya oksidatif hasar verir ve mitokondriyal disfonksiyona neden olur. AgNP'ler ve Ag⁺ ayrıca lizozomlardan kaçarak hücre içi ROS artışını indükleyebilmektedir.(Wei vd., 2015).

Suman ve ark. (2013) yaptıkları çalışma da AgNP' lerin yeşil sentezinin HeLa hücre hattında diğer kimyasal bazlı sentetik ilaçlara kıyasla önemli bir sitotoksik etki sergilediğini bildirmişlerdir.

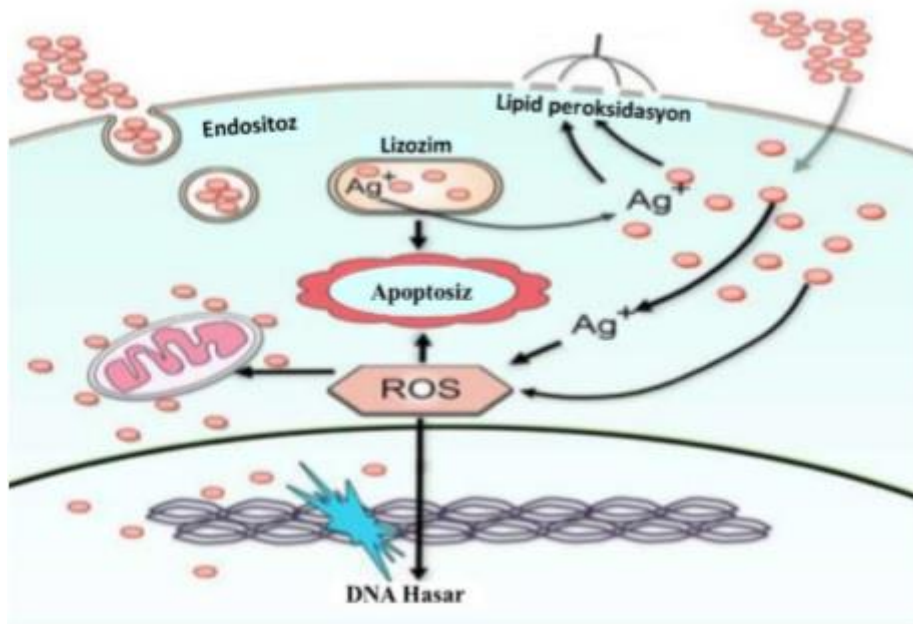
Franco molina ve ark. (2010) ise çalışmalarında kolloidal gümüşün MCF-7 meme kanseri hücre hattında apoptozun indüklenmesi yoluyla antitümör aktivitesine sahip olduğunu

gösterdi ve bu da koloidal gümüşün insan meme kanseri tedavisi için potansiyel bir alternatif ajan olabileceğini düşündürmektedir.

1.6.1. AgNP'lerin Antikanser Aktiviteleri

AgNP'ler önemli antianjiyojenik özelliklere sahip maddelerdir. Antianjiyojenik özelliklere sahip bileşikler, anormal olarak eksprese edilen sinyal proteinlerinin aktivitesini bloke etme potansiyeli göstermektedir. Oksidatif stres genellikle doğal veya sentetik toksik ajanların neden olduğu sitotoksitenin indüksiyonu için bir merkez üs olarak kabul edilmektedir. NP'lerin toksisitesi, elektronun moleküler oksijenden aktarılması veya bilinmeyen bir mekanizma yoluyla elektron taşıma zincirinin bloke edilmesi şeklinde uygulanır (Suman vd., 2013).

AgNP'lerin DNA hasarını ve kromozomal anormallikleri tetikleyen ROS oluşumuna yol açabileceği bildirilmiştir. AgNP'lere maruz kalma, ROS seviyelerini yükselterek ve lipid peroksidasyonunu artırarak sitotoksiteye neden olur; ayrıca DNA ve kromozomal hasarı indükleyerek genotoksiteye yol açmaktadır (Şekil 1.8) (Wei vd., 2015). Kısaca, AgNP'lerin antikanser mekanizmaları hücre zarlarının bozulmasını ve proteine ya da DNA'ya zarar vermek için reaktif oksijen türleri ve Ag^+ üretimini içerir (Hammamchi, 2019).



Şekil 1.8: Gümüş nanopartiküllerden (AgNPs) kaynaklı sitotoksite için olası mekanizmaların şematik gösterimi (Wei vd., 2015).

Bu çalışmadaki öncelikli amaç, *Ruscus aculeatus* L. bitkisinin yaprak kısmı kullanılarak çevre dostu biyolojik sentez yöntemlerinden olan yeşil sentez yöntemi tercih edilerek gümüş nanopartikül sentezlenmesi ve karakterizasyonunun belirlenmesidir. Elde edilen AgNP'lerin ve bitki ekstraktının 15 farklı bakteri türüne karşı antibakteriyel aktiviteleri belirlenecektir. Daha sonra antibiyofilm etkileri belirlenecek olup antikanser etkisi MCF-7 meme kanseri hücre hattı ve sağlıklı hücre HUVEC üzerinde belirlenecektir. Ayrıca *R. aculeatus* kullanılarak yeşil sentez metodu ile AgNP'lerin sentezlenmemesi ve antimikrobiyal, antibiyofilm gibi antikanser aktivitelerinin incelenmemiş olması çözümü bulunmaya çalışılan kanser hastalığı için bitkisel alternatif imkânı sağlayacaktır. Aynı zamanda biyomedikal alanda etkili bir antibiyofilm ve antimikrobiyal ajan tasarımları için umut vadetmektedir.



BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETİ

Hadžifejzović vd. (2009) yaptıkları çalışmada, *Ruscus aculeatus* L. bitkisinin bazı polar özütlerinin (MeOH, EtOAc ve BuOH bitki özütleri ve MeOH rizom özütü), *R. hypoglossum* ve *R. alexandrinus* bitkilerinin MeOH özütlerinin antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için mikrodilüsyon yöntemi kullanmışlardır. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus* ve beş mantar: *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium funiculosum* ve *Trichoderma viride* kullanmışlardır. Test edilen tüm özütler, geniş bir konsantrasyon aralığında 0.1-4 mg/ml antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Bakteriyel suşlara karşı MİK ve MBK değerleri sırasıyla 0.1-2 mg/ml ve 0.2-4 mg/ml' dir. Antifungal aktivite MİK ve MFK değerleri sırasıyla 0.25-2 mg/ml ve 0.5-3 mg/ml' dir. *R. aculeatus*'un EtOAc özütü en iyi antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir ve izole edilen dört bileşiğin test edilen mikroorganizmalara karşı çok daha iyi aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Singh vd. (2010) yaptıkları çalışmada *Argemone mexicana* yaprak ekstratı ile 5 mM AgNO₃ solüsyonu kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle gümüş nanopartikül üretmişlerdir. Üretilen AgNP karakterizasyonu Uv-vis absorpsiyon spektroskopisi, FTIR, XRD ve SEM kullanılarak tespit edilmiştir. XRD ve e SEM analizi sonucunda ortalama nanopartikül boyutunun 30 nm olarak hesaplamışlardır. Antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için disk difüzyon yöntemi, antifungal aktiviteyi belirlemek için gıda zehirlenmesi metodunu kullanmışlardır. Antimikrobiyal aktivite için *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakteri suşlarını, antifungal aktivite için *Aspergillus flavus* mantar suşunu kullanmışlardır. Sonuç olarak, nanoparçacık sentezlemek için yaprak özütlerinin kullanımı oldukça iyi tanımlanmış boyutlarda gümüş nanopartiküllerin oluşumuna yol açtığını ve yöntemin oldukça basit olması diğer sentez yöntemlere göre avantajlı olduğunu göstermişlerdir.

Baydoun ve arkadaşlarının (2012) yaptıkları çalışmada, *Ruscus aculeatus* ve *Pleurotus ostreatus* bitki ekstratlarının insan akut T hücreli lenfositik lösemi modeli olan Jurkat hücre

hattının hayatta kalması ve proliferasyonu üzerindeki etkisini MTT ve Annexin V-FITC test kiti ile tespit etmişlerdir. *R. aculeatus* ve *P. ostreatus* özütlerinin hem Jurkat hücreleri hem de insan birincil lenfositleri için toksik olduğunu ve LDH salımı ve MTT deneylerinde Jurkat hücreleri için birincil lenfositlere göre önemli ölçüde daha toksik olduğu belirlemişlerdir.

Hadžifejzović vd. (2013) yaptıkları çalışmada, *Ruscus aculeatus* L. ve *Ruscus hypoglossum* L. özütlerinin mikrodilüsyon yöntemi kullanarak antimikrobiyal aktivitelerini incelemiştir. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* mikroorganizmalarına karşı etkilerine bakılmış ve test edilen bileşiklerin tümünün MİK değerleri 0.05 - 0.2 mg/ml arasında değişen ve MBK değerleri ise 0.05 - 0.4 mg/ml arasında değiştiği belirlenmiştir. Toplam fenolik içerik (TPC), Folin - Ciocalteu (FC) reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. Antioksidan aktiviteyi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi ile belirlemişlerdir. Çalışma sonuçlarında, *Ruscus* ekstraktlarının ve izole edilmiş bileşiklerin antibakteriyel ve özellikle antifungal aktivitesinin karşılaştırılabilir olduğunu ve bazı durumlarda standart ilaçlardan daha iyi olduğunu belirlemişlerdir.

Awwad vd. (2013) yaptıkları çalışmada, *Ceratonia siliqua* yaprak ekstraktı kullanılarak, sulu gümüş nitrat çözeltisi ile gümüş nanopartiküllerin (AgNPs) yeşil sentezini yapmışlardır. AgNP'lerin karakterizasyonu UV-vis spektroskopisi, SEM, FT-IR, XRD ve atomik absorpsiyon spektroskopisi ile yapılmıştır. UV-vis spektrumları, 420 nm' de sentezlenmiş gümüş nanopartiküller için yüzey plazmon rezonansı vermiştir ve ortalama nanopartikül boyutu farklı konsantrasyonlarda 5-40 nm arasında değiştiğini göstermişlerdir. Antibakteriyel aktivite disk difüzyon ve MİK yöntemi ile belirlenmiştir ve *Escherichia coli* bakteri suşu kullanılmıştır. Sonuçlara göre, *E. coli*'nin mikrobiyal büyümesinin AgNP konsantrasyonundan bağımsız olduğunu ve *Ceratonia siliqua* yaprak ekstraktını kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin standart antibiyotikten daha güçlü aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir.

Mandal vd. (2014) yaptıkları çalışmada, *Psidium guajava* bitkisi kullanılarak yeşil sentez yöntemi ile AgNP sentezini gerçekleştirmişlerdir ve AgNP'lerin karakterizasyonu UV-vis spektroskopisi, TEM, XRD ve EDX ile yapmışlardır. UV-vis spektrumları yaklaşık olarak 487 nm' de yüzey plazmon rezonansı vermiştir ve ortalama nanopartikül boyutu TEM ile yaklaşık 60 nm ile kararlı ve küresel partiküller olduğunu belirlemişlerdir. AgNP'ler bu çalışmada kullanılan mikrobiyal suşlara karşı 2 saat içinde yaklaşık % 100 ölüme neden olan

etkili bir geniş spektrumlu antimikrobiyal davranış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, sentezlenmiş AgNP' ler, özellikle cerrahi cihazlar ve sentetik implantlarda antimikrobiyal kaplama malzemeleri olarak umut verici uygulamalara sahip olabileceğini belirtmişlerdir.

Kim vd. (2014) yaptıkları çalışmada, *Allophylus cobbe* yaprak ekstraktını kullanarak AgNP' lerin sentezi için basit, güvenilir, uygun maliyetli ve çevreci bir yöntem kullanmışlardır. AgNP'lerin karakterizasyonu belirlemek için UV-vis spektroskopisi, TEM, XRD, XPS (X-ışını fotoelektron spektroskopisi) ve DLS (Dinamik ışık saçılımı) ile belirlemişlerdir. UV-vis spektrumları yaklaşık olarak 420 nm'de yüzey plazmon rezonansı (SPR) vermiştir ve yaklaşık olarak ortalama nanopartikül boyutu 5 nm olarak belirlemişlerdir. Çalışmada, AgNP' lerin antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitesi veya AgNP'lerin bir antibiyotik ile kombinasyonları *in vitro* öldürme deneyi, disk difüzyon yöntemi, MİK ve doku kültürü plakası yöntemi (TCP) kullanılarak biyofilm aktivitesinin belirlenmesi ile test etmişlerdir. Gram negatif bakteriler (*Pseudomonas aeruginosa* ve *Shigella flexneri*) ampisilin ile; Gram pozitif bakteriler (*Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus pneumoniae*) vankomisin ile daha belirgin antibakteriyel artış gösterdiğini test etmişlerdir. Öldürücü olmayan antibiyotik konsantrasyonlarının AgNP' ler ile kombinasyonu, tek başına antibiyotikler veya AgNP'lere göre hücre ölümünü önemli ölçüde arttırmış ve ROS üretimini artırmıştır. Bu sonuçlar, antibiyotiklerin ve AgNP'lerin sinerjik veya artmış etkileri için olası bir mekanizma sağlayabileceğini göstermişlerdir.

Munusamy vd. (2015) yaptıkları çalışmada, *Solanum trilobatum* bitkisinin olgunlaşmamış meyvelerini kullanarak AgNP basit ve çevre dostu bir yöntemle sentezlemişlerdir. Sentezlenen AgNP' lerin karakterizasyonu Uv-vis spektroskopisi, SEM, EDX, XRD, FT-IR ve TEM ile belirlenmiştir. UV-vis absorpsiyon spektrumları 432 nm' de SPR göstermişlerdir. Antibakteriyel aktivite insan patojenik bakterilere karşı agar kuyu difüzyon yöntemi ile test etmişlerdir. Antikanser aktiviteyi belirlemek için MCF-7 hücre hattı ile MTT yöntemini kullanarak test etmişlerdir ve propidium iyodür boyama yaparak yoğunlaştırılmış/parçalanmış çekirdekli apoptotik hücreleri belirlemişlerdir. Bunların yanı sıra Western Blot Analizi ve Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile de testler yapmışlardır. Sonuç olarak, sentezlenmiş AgNP' lerin mükemmel antibakteriyel ve antikanser özelliği olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca insan patojenik bakterilerine ve insan göğüs kanseri hücre hattı MCF-7' ye karşı etkisi olduğunu

gözlemlemişlerdir. AgNP'lerin ilaç dağıtımı, gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanılabilceğini göstermişlerdir.

Zande vd. (2016) yaptıkları çalışmanın amacı farklı dokulardan türetilen epitel hücrelerinin benzer yanıtlar gösterip göstermediğini değerlendirmek ve AgNP'lere maruz kaldıktan sonra Caco-2 ve MCF-7 hücrelerindeki hücresel moleküler yanıtları daha derinlemesine incelemektir. Sentezlenen AgNP'lerin karakterizasyonu SEM (MIRA) ile analiz edilmiştir. Hücre canlılığı deneyleri ($n=3$), bir WST-1 canlılık deneyi kullanılarak analiz edilmiştir. ICP-MS ölçümü, Ag⁺ ve AgNP'ler arasında veya hücresel ilişkili gümüş ile içselleştirilmiş gümüş arasında ayırım yapılmasına izin vermediği için hücrelerle AgNP etkileşimlerini görselleştirmek için CM ve TEM analizi kullanılmıştır. CM her iki hücre tipinde lizozomlarla kısmi ortak lokalizasyon ile 6 saat maruz kaldıktan sonra hücrelerin içindeki çeşitli düzlemlerde Ag-60 ve Ag-110 NP'lerin varlığını açıkça göstermiştir. MCF-7 hücreleri ile karşılaştırıldığında, Caco-2 hücreleri AgNP'lere karşı daha yüksek bir hassasiyet, daha yavaş gen ekspresyon kinetiği ve NP boyutuna bağlı yanıtların yokluğunu göstermiştir. Bununla birlikte, moleküler düzeyde, iki hücre tipi arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. Transkriptomik analiz, Ag (NP) maruziyetinin (oksidatif) stres tepkilerine neden olduğunu ve muhtemelen her iki hücre hattında hücre ölümüne yol açtığını göstermiştir. AgNP'lere yanıtların, AgNP'lerden salınan gümüş iyonları tarafından indüklendiği görülmüştür. Sonuç olarak, Caco-2 ve MCF-7 hücreleri arasındaki AgNP'lere karşı mRNA yanıtlarındaki farklılıklar temelde zaman ve büyüklük ile ilgili olduğunu ve farklı temel mekanizma ile ilgili olduğunu göstermişlerdir.

Khatami vd. (2018) yaptıkları çalışmada, çim atıklarını kullanarak yeşil sentez yöntemi ile AgNP sentezlemişlerdir. Sentezlenen AgNP'lerin karakterizasyonu UV-vis spektroskopisi, XRD ve TEM ile belirlemişlerdir. Ortalama nanopartikül boyutunu yaklaşık 15 nm olarak belirlemişlerdir. Antimikrobiyal aktiviteyi belirlerken MİK ve MBK değerlerini belirlemek için broth makro-seyreltme yöntemi kullanmışlardır. Sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antifungal etkileri *Fusarium solani* ve *Rhizoctonia solani* kültürleri üzerinde agar seyreltme yöntemi kullanılarak değerlendirmişlerdir. Antikanser aktiviteyi belirlemek için MTT testi ile MCF-7 hücre hattı kullanarak belirlemişlerdir. Sonuç olarak, AgNP'lerin *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*'ye karşı MİK değeri yaklaşık 3 µg/ml olarak hesaplamışlardır ve *Fusarium solani*'ye karşı en yüksek inhibitör etkisi 20 µg/ml AgNP konsantrasyonunda % 90'a yakın olduğunu belirlemişlerdir. Kanser hücresi büyümesi

üzerinde inhibe edici bir etkiye, AgNP konsantrasyonunun 5 µg/ml'ye yükseltilmesiyle ulaştıklarını ve bu sayede kanser hücrelerinin hayatta kalması yaklaşık % 30 azaldığını göstermişlerdir. MCF-7 hücre hattının Cyclin D1 proteininin ekspresyonunun etkili AgNP konsantrasyonu ile tedaviden sonra azaldığını göstermişlerdir.

Kumar vd. (2018) yaptıkları çalışmada, *Hydnocarpus pentandra* yaprak ekstraktı kullanarak yeşil sentez yöntemiyle AgNP sentezlemişlerdir. AgNP'lerin karakterizasyonu UV-vis spektrofotometri ve SEM ile belirlemişlerdir. UV-vis spektral analiz, 438 nm'de SPR verdiğini göstermişlerdir ve SEM analizi ile yaklaşık ortalama AgNP boyutunun 141-202 nm aralığında bir boyuta sahip küresel şekilli olduğunu göstermişlerdir. AgNP'lerin antioksidan aktivitesi DPPH yöntemi kullanılarak test etmişlerdir ve doza bağlı olarak antioksidan aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Antikanser aktiviteyi belirlemek için MTT testi MCF-7 hücre hattı ile test etmişlerdir. Sonuç olarak, MCF-7 meme kanseri hücrelerinin canlılığını doza bağlı olarak verimli bir şekilde azalttığını ve mükemmel anti-kanser aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Mevcut çalışma verileri, yeşil sentezlenmiş AgNP'lerin kanser tedavisi için alternatif tıp olarak kabul edilebileceğini göstermişlerdir.

Adebayo-Tayo vd. (2019) yaptıkları çalışmada, *Oscillatoria sp.* metanol ekstresi kullanarak AgNP'lerin yeşil sentezini yapmışlardır. AgNP'lerin karakterizasyonunu UV-vis spektrofotometri, FTIR, SEM, Termogravimetri, EDX ve DLS ile belirlemişlerdir. UV-vis spektrumları yaklaşık olarak 500 nm' de SPR verdiğini ve ortalama AgNP boyutunu 10 nm olarak belirlemişlerdir. AgNP'lerin antibakteriyel aktiviteleri agar kuyucuk difüzyon yöntemi kullanılarak ve *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter sp.*, *Salmonella typhi* ve test patojeni olarak *Bacillus cereus* bakteri suşlarını kullanarak belirlemişlerdir. AgNP'lerin toksisitesini belirlemek için ise larva *nauplii* için tuzlu su karidesi letalite testi kullanmışlardır. Sonuç olarak, test patojenlerine karşı güçlü bir antibakteriyel ve antibiyofilm aktivite sergilerken kenar karidesine karşı düşük sitotoksosite sergilediğini tespit etmişlerdir. Bu sonuç, ısıya dayanıklı nano ürünlerin üretimini ve diğerleri arasında nanokateterler gibi tıbbi cihazların üretiminde bir antibakteriyel ajan olarak kullanılmasını ümit verici bir nanomateryal yapacağını belirtmişlerdir.

Behravan vd. (2019) yaptıkları çalışmada, *Berberis vulgaris* yaprağı ve kök kısımlarını kullanarak AgNP'lerin yeşil sentezini yapmışlardır. AgNP'lerin karakterizasyonunu UV-vis spektrofotometri, XRD, TEM ve DLS ile belirlemişlerdir. XRD ve TEM sonuçlarına göre,

nanopartiküllerin küresel şekillere ve 30-70 nm boyutlarına sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu nanopartiküllerin antibakteriyel etkisi, *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakteri suşları üzerinde Disk difüzyon testi ve Minimum inhibisyon konsantrasyon testi (MİK) ile çalışılmıştır. Antibakteriyel testler, bu nanopartiküllerin diğer bitki ekstraktlarından daha fazla antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, *Berberis vulgaris* bitki ekstraktı kullanılarak gümüş nanopartiküllerin biyosentezinin temiz, ucuz ve güvenli bir yöntem olduğunu ve herhangi bir toksik madde kullanılmadığını göstermişlerdir. Bu yüzden de yan etkilerinin olmadığını ve bu nanopartiküllerin yüksek bir antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir.

David vd. (2019) yaptıkları çalışmada, *Malus domestica* yaprak ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle AgNP sentezi yapmışlardır. AgNP'lerin karakterizasyonunu UV-vis spektroskopisi, XRD, TEM ve FT-IR kullanarak analiz etmişlerdir. AgNP'lerin oluşumunu gösteren ve gümüşün yüzey plazmonuna karşılık gelen 425 nm' de absorpsiyon piki gözlemlenmiştir ve AgNP'lerin yaklaşık 50-107 nm aralığında çok küresel şekilli ve çok dağınık nanopartiküller olduğunu belirtmişlerdir aynı zamanda FTIR analizi ile flavonoidler, terpenoidler, alkaloidler, saponinler, tanenler ve fenolik bileşiklerin varlığını doğruladıklarını göstermişlerdir. AgNP'lerin sitotoksik etkisi MTT testi ile çalışılmış ve antioksidan etkinliği DPPH, nitrik oksit radikali ve fosfomolibdat testleri ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, yeşil sentezlenmiş nanopartiküller, çoklu ilaca dirençli klinik izolatlarla karşı antibakteriyel aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, AgNP'ler çoklu ilaca dirençli bakteri suşuna karşı doza bağlı antioksidan aktivite ve antimikrobiyal aktivite ortaya koyduğunu ve *in vitro* çalışmalar ile *bitki*-AgNP ile muamele edilmiş MCF-7 hücre hattının doza bağlı sitotoksik etkilerini ortaya çıktığını test etmişlerdir. Bu veriler, *bitki*-AgNP'lerin potansiyel bir antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksikite aktivitesine sahip olduğunu kuvvetle göstermiş olduğunu belirtmişlerdir.

Tripathy vd. (2019) yaptıkları çalışmada, *Dicoma anomala* bitkisinin kök ekstraktını kullanılarak farklı yöntemlerle gümüş nanopartikülleri sentezlemişlerdir. AgNP'lerin karakterizasyonunu UV-vis spektroskopisi, XRD, EDX ve FT-IR kullanarak analiz etmişlerdir. AgNP'lerin antikanser aktivitesini, MCF-7 hücre hattına karşı değerlendirmişlerdir. Ayrıca AgNP-konjuge seskiterpenin antiparazitik aktivitesini belirlemişlerdir. Sonuç olarak, kök ekstraktı kullanılarak sentezlenen AgNP'ler, meme kanseri hücrelerinde oksidatif hasara neden olmuştur ve AgNP-konjuge seskiterpenin

Plasmodium falciparum NF54 suşuna karşı daha iyi antiparazitik aktivite gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Bu bulgular, AgNP'lerin ve seskiterpenin antimadde adayları olarak potansiyel ipuçları haline getirilmesi ve bu seskiterpenlerden biyolojik olarak yararlanabilmek için daha derinlemesine araştırmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Ahn ve Park (2020)'ın yaptıkları çalışmada 58 bitki örneği ile AgNP'lerin yeşil sentezini gerçekleştirmişlerdir. *Areca catechu*, *Hypotrachyna laevigata*, *Ardisia incarnata*, *Maesa calophylla*, *Maesa laxiflora* ve *Adinandra poilanei* ekstraktları ile sentezlenen 6 AgNP örneğini seçmişlerdir. Dikkate değer bir şekilde, bu 6 özüt diğer özütlerden daha yüksek 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürme aktivitesi ve indirgeme gücü sergilemiştir. Ayrıca, seçilen 6 ekstrakta toplam fenolik bileşiklerin ve indirgeyici şekerlerin içerikleri de diğer ekstraktlardakinden daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Seçilen 6 AgNP örneği, 416-438 nm aralığında güçlü yüzey plazmon rezonansı göstermiştir. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) görüntüleri ile ölçüldüğü üzere, tümü 12.5 ± 1.0 nm'den 21.3 ± 4.9 nm'ye kadar ortalama bir boyuta sahip ve küresel şekillere sahip olduğunu göstermişlerdir. A549 ve HeLa hücrelerinde sitotoksikite değerlendirmesi ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu, *Ardisia incarnata*, *Maesa calophylla* ve *Maesa laxiflora* tarafından hazırlanan AgNP örneklerinin, seçilen 6 AgNP örneği arasında nispeten yüksek sitotoksikite ve fazla ROS üretimi olduğunu göstermişlerdir. AgNP örneklerinin A549 ve HeLa hücrelerine maruz kalması, çoğunlukla nekrozdan ve geç apoptozdan kaynaklanan hücre ölümüyle sonuçlandığını göstermişlerdir. Sonuç olarak, yeşil sentezlenen AgNP'ler hücre ölümüne neden olmuştur ve bu da antikanser nanotıpın gelişimi hakkında yeni bir fikir sunabilecek antikanser umutlarını düşündürmektedir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyaller

3.1.1 Bitki Materyali

Bu çalışmada *Ruscus aculeatus* L. bitkisinin yaprakları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan bitki örneği Prof. Dr. Ali Savaş Bülbül tarafından Karadeniz'in kuzeybatı kıyısında 41° 53' kuzey enlemi ile 32° 45' doğu boylamı arasında yer alan Bartın ili ve merkezinde bulunan Balamba mevkiinden toplanarak teşhisi yapılmıştır.



Şekil 3.1: Bartın ili ve Balamba mevki (Ateşoğlu, 2008).

3.1.2 Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

Çalışmada yürütülen deneysel süreçler Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında ve Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında, 2020/1-7 YLS nolu proje desteği alınmış olup çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan Sarf Malzemeler

Materyal Adı	Markası	Kullanım Amacı
LB Broth (Miller)	Merck	Mikroorganizma suşlarının canlandırılmasında ve MİK aşamasında besiyeri olarak kullanıldı.
Mueller Hinton Agar (MHA)	Merck	Bakteri suşlarının uygun ortam koşullarında üremelerini sağlamak için kullanılan katı besiyeridir
Etanol	Merck	Çalışılacak yerlerin sterilizasyonunda, antibiyofilm çalışmasında kullanıldı.
Metanol	Merck	Antibiyofilm aşamasında fiksasyon amacıyla kullanıldı.
Kristal Viyole	Norateks	Antibiyofilm aşamasında kullanıldı.
Glasiyel Asetik Asit	Sigma	Gr (+) bakterilerin olduğu kuyucukların biyofilm oluşumunu ne kadar engellediğini ölçmede kullanıldı.
Gümüş Nitrat	Merck	AgNP sentezinde kullanıldı.
DMEM	HyClone	Hücre kültüründe besiyeri hazırlamada kullanıldı.
Tripsin EDTA	HyClone	Hücre kültüründe kullanıldı.
FBS	HyClone	Hücre kültüründe besiyeri hazırlamada kullanıldı.
PBS	HyClone	Hücre kültüründe kullanıldı.
Penicilin/Streptomisin	HyClone	Hücre kültüründe besiyeri hazırlamada kullanıldı.
Dimetil Sülfoksit	HyClone	Hücre kültüründe kullanıldı.
Cell Freezing Medium-DMSO	HyClone	Hücre kültüründe kullanıldı.
MTT	HyClone	Hücre canlılığının değerlendirilmesi için kullanıldı.
İnsülin	Sigma	Hücre kültüründe kullanıldı.

Tablo 3.2: Kullanılan Cihazlar

Materyal Adı	Markası	Kullanım Amacı
Uv-vis Spektroskopisi (Spektrofotometre)	Thermo Scientific Multiskan GO	Bakterilerin optik yoğunluk değerlerinin (OD) ölçülmesinde, mikroorganizmaların absorbans ölçümünde, antibiyofilm ile ilgili ölçümlerde ve sentezlenen AgNP'lerin absorbans ölçümünde kullanıldı.
XRD (X Işını Kırınımı)	SMARTLAB RIGAKU	Sentezlenen agNP'lerin karakterizasyonunu belirlemek, madde fazını ve kristal yapısının analizi için kullanıldı.
SEM (Taramalı Elektron Mikroskopisi)	MALA3 XMU TESCAN	Sentezlenen agNP'lerin morfolojik özelliklerini belirlemek için kullanıldı.
FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)	Perkin Elmer Spectrum markalı Infrared (IR) Spektrofotometresi	Sentezlenen agNP'lerin spektrumdaki tepe noktalarından farklı fonksiyonel gruplar hakkında bilgi edinmek için kullanıldı.
Manyetik karıştırıcı	Dragonlab MSH-Pro	Tüm besiyerlerin çözücü içerisinde iyice çözünmesini sağlamada ve diğer tüm çözeltilerin uygun sıcaklıkta çalkalama işlemlerinde kullanıldı.
Densitometer	Den-1 Biosan	Mikroorganizma bulanıklığının McFarland 0.5 standart ölçümünde kullanıldı.
Hassas terazi	Shimadzu AUW220D	Çalışmada yapılan tüm tartım işlemlerinde kullanıldı

Otoklav	Nüve SteamArt	Çalışmada kullanılan bazı malzemelerin ve besiyerlerinin sterilizasyonunda ve ayrıca kullanılan bakteri plaklarının steril edilip imha edilmesinde kullanıldı.
Vorteks	Stuart BioCote	Bakteri solüsyonları, bitki ekstraktları ve bazı kimyasalların kullanılmadan önce çalkalanmasında kullanıldı.
Laminar kabin	Biobase	Sterilizasyon gerektirecek tüm çalışmalarda (bakteri ekimi hariç) kontaminasyon riskini en aza indirmek için kullanıldı.
Etüv	Nüve EN 400	Mikroorganizmaların uygun sıcaklıkta üremelerini sağlamak için kullanıldı.
Mikroplate	Thermo Scientific	Bitki ekstraktının ve sentezlenen agNP'ün seyreltik derişimlerinin antimikrobiyal, antibiyofilm ve antikanser aktivitelerini incelemede kullanıldı.
Mikropipet	Nichoryo, Nichipet EX II	Mikroorganizma ve ekstraktların eşit miktarda aktarılmasında kullanıldı.
Enjektör	Ayset	Sıvı broth besiyerini cam tüplere eşit miktarda koymak ve bitki ekstraktının filtreden geçirilmesi işleminde kullanıldı.
Membran filtre	Minisart Sartorius CE 0.45 µm	Bitki ekstraktların herhangi bir kontaminasyona karşı sterilliğin sağlanmasında kullanıldı.
Steril svap	True Line (145x2,2 mm)	Ekim yaparken kullanıldı.
Santrifüj	MIPRO	AgNP sentezi yapılırken kullanıldı.
Ph metre	HANNA Instruments HI 2211	AgNP sentezi yapılırken çözeltinin Ph ölçümü için kullanıldı.
Ultrasonikatör	DAWE	AgNP sentezinden sonra hazırlanan çözeltinin daha iyi çözünebilmesi için kullanıldı.
Çalkalamalı İnkübatör	STIK Incubator Shaker Series PSE- T150	Mikroorganizmaların uygun sıcaklıkta üremelerini sağlamak için kullanıldı.
Destile su cihazı	Thermo Scientific Smart2Pure 6 UV	Çözelti hazırlamada ve tüm aşamalarda kullanıldı.
CO2'li İnkübatör	Heal Force HF90	Hücre kültürlerinin üretilmesi, geliştirilmesi ve muhafaza edilmesi amacıyla kullanıldı

3.1.3 Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu çalışmada bitki ekstraktının ve sentezlenen AgNP'lerin antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteleri 15 bakteri türü üzerinde test edilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların listesi

Mikroorganizma Suşlarının Adları	Suşların Gram Türleri ve Şekilleri
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	Gram negatif, Çubuk
<i>Salmonella infantis</i>	Gram negatif, Çubuk
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram negatif, Çubuk
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSMZ 50071	Gram negatif, Çubuk
<i>Salmonella kentucky</i>	Gram negatif, Çubuk
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Gram pozitif, Kokus
<i>Listeria innocua</i>	Gram pozitif, Çubuk
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13075	Gram negatif, Çubuk
<i>Enterococcus durans</i>	Gram pozitif, Kokus
<i>Salmonella typhimurium</i>	Gram negatif, Çubuk
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Gram pozitif, Kokus
<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSMZ 20044	Gram pozitif, Kokus
<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971	Gram pozitif, Çubuk
<i>Escherichia coli</i> CFAI ATCC 25922	Gram negatif, Çubuk
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13048	Gram negatif, Çubuk

ATCC: Amerikan Türü Kültür Koleksiyonu.

DSMZ: Alman Hücre Kültürü ve Mikroorganizma Koleksiyonu.

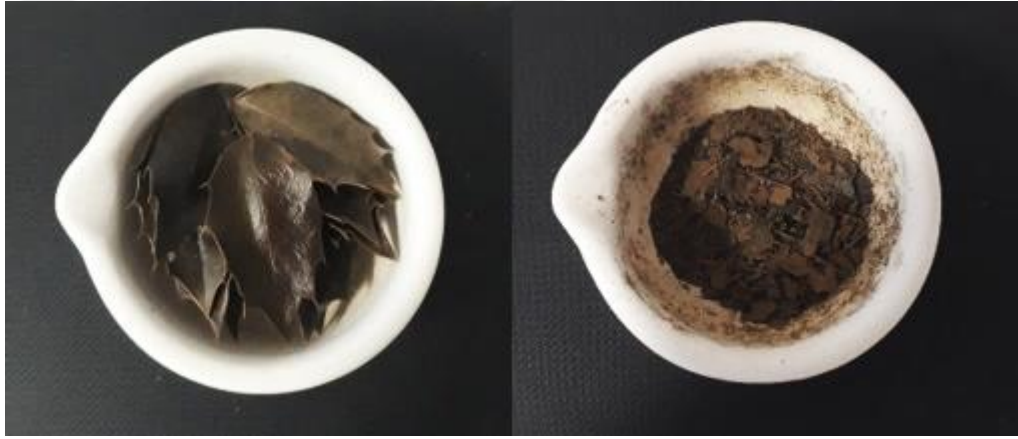
CFAI: Kolonizasyon Faktör Ajan I.

3.2 Yöntem

3.2.1 Bitki Örneği ve Ekstraktının Hazırlanması

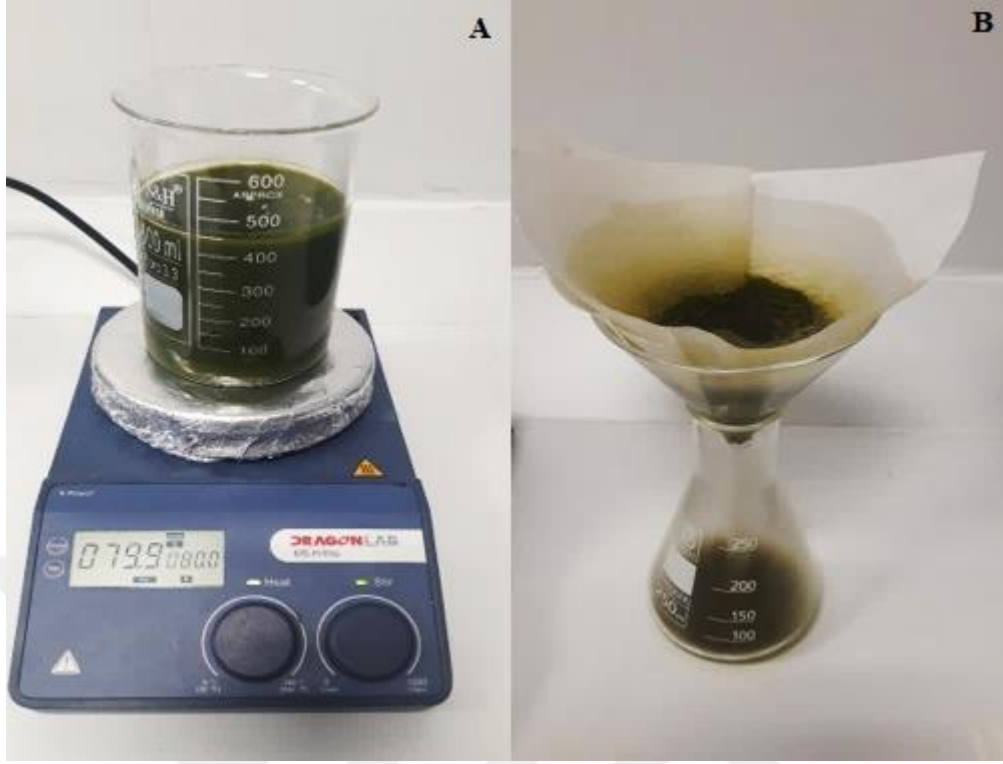
Çalışmada kullanılan bitki örneği toplanıp tür teşhisi yapıldıktan sonra kullanılacak olan bitki kısmı musluk suyunda iyice yıkanarak serin ve rutubetsiz ortamda kurutulup öğütülmeye hazır hale getirildi.

Oda sıcaklığında kurutulmuş olan bitkinin ekstraktını hazırlamak amacıyla çözücü olarak distile su kullanıldı. Bitkinin yaprak kısmı sıvı azot yardımıyla havanda ezilerek öğütüldü (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Kurutulmuş bitki örneğinin sıvı azotla öğütülmesi.

Öğütülen bitki örneğinden 10 gr tartıldı ve çözücü olarak 150 ml distile su kullanıldı. Manyetik ısıtıcı da 80 °C ayarlanarak 4 saat boyunca ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Süre sonunda filtre kağıtlar kullanılarak süzme işlemi yapıldı (Şekil 3.2). Bu işlemde sonra elde edilen ekstrakt kullanılmak üzere +4°C'ye konuldu.



Şekil 3.3: A) Bitki ekstraksiyon çözeltisi B) Bitki ekstraktının filtre kâğıt ile süzme işlemi

3.2.2 Yeşil Sentez Yöntemiyle AgNP' lerin Biyolojik Sentezi

Kurutulmuş bitki yaprakları havanda ezilerek toz haline getirildi ve 10 gr tartılarak üzerine distile su eklendi. Manyetik ısıtıcı da 4-5 saat boyunca ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu ve süre sonunda filtre kâğıtlar kullanılarak süzme işlemi yapıldı. Hazırlanan özütten 60 ml alınarak üzerine, 1 mM gümüş nitrat (AgNO_3) çözeltisi eklendi. Karışım manyetik ısıtıcı da 1 saat boyunca renk değişimi gerçekleşene kadar karıştırıldı. Renk değişimi gözlemlendikten sonra karışım 13.000 rpm' de 15 dk santrifüj edildi ve bu sayede nanopartiküller diğer organik moleküllerden arındırılmış oldu. Her seferinde süpernatantını dökerek üzerine tekrar hazırlanan çözeltiden eklendi. Son olarak dipte kalan kısım etüvde 35 °C'de kurutuldu (Korkmaz ve ark., 2019). Biyolojik sentez Şekil 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.4: Bitki ekstraktı kullanılarak AgNP sentezi. A) AgNO_3 B) Bitki ekstraktı C) AgNO_3 + bitki ekstraktı kompleksi D) AgNO_3 çözeltisi ile muamele edilen bitki ekstraktının 1 saat bekleddikten sonra çekilmiş görüntüsü

3.2.3 Sentezlenen AgNP'lerin Karakterizasyonu

Yeşil sentez yöntemi ile sentezlenen AgNP'lerin karakterizasyonlarının belirlenebilmesi için Uv-vis Spektroskopisi, XRD (X Işını Kırınımı), SEM (Taramalı Elektron Mikroskopisi) ve FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) kullanılmıştır.

Uv-vis analizinde spektroskopik ölçümlerin alınması için Thermo Scientific Multiskan GO kullanılmıştır ve 300 ila 800 nm aralığında ölçüm yapılmıştır. Yeşil sentez ile elde edilen nanoparçacıklar 1, 24, 48 saatlik çalışma numuneleri alınmış ve analiz edilmiştir. Analiz işlemi Bartın Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

X-ışını difaksiyonu (XRD) analizi madde fazı ve kristal yapısının analizi için gereklidir. Analiz işlemi Bartın Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. SEM analizinde mikro resimleri almak ve analiz etmek için alan emisyon taramalı elektron mikroskopu kullanılmıştır. Analiz işlemi Bartın Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

FT-IR analizinde AgNP'lerin biyolojik indirgenmesinden ve stabilizasyonundan sorumlu moleküllerdeki çeşitli fonksiyonel grupların varlığı, yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu ve bağlanma yerleri belirlenmiştir. Analiz işlemi

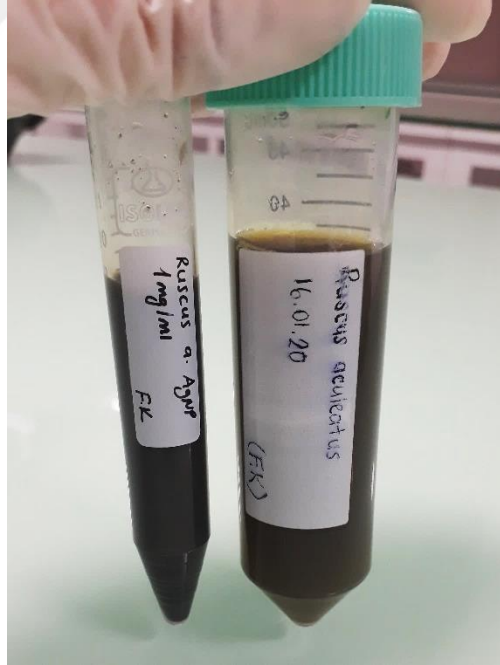
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Üniversite-Sanayi-Kamu İşbirliği Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (USKİM)'de hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır.

3.3 Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi

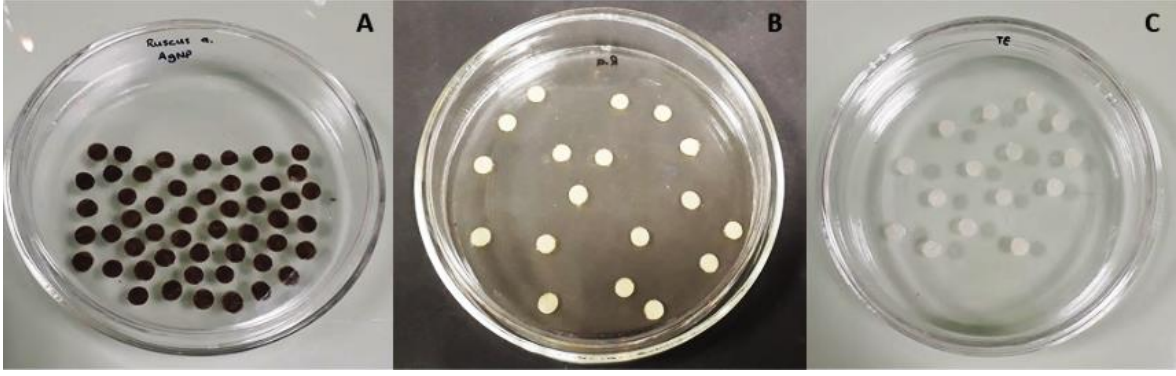
3.3.1 Disk Difüzyon Yöntemi

AgNP'nin ve yaprak ekstraktının antimikrobiyal aktivite denemeleri disk difüzyon yöntemi ile analiz edilmiştir (Hudzicki, 2009). Çalışmada 6 adet Gram pozitif ve 9 adet Gram negatif bakteri olmak üzere toplam 15 mikroorganizma kullanılmıştır.

Kurutulan AgNP'den 0.2 gr tartılarak, 10 ml distile su (dH₂O) içinde ultrasonikatörde çözdürülmüştür ve hazırlanan bitki ekstraktından 50 ml falcon tüpüne alınmıştır (Şekil 3.4). Hazırlanan çözeltiler steril boş kâğıt disklerle emdirilmiştir. Pozitif kontrol amaçlı, antibiyotik ilaçlardan hazırlanan Tetrasiklin (TE: 10 mg/ml) etkin maddesini içeren antibiyotik diskler kullanılmıştır (Şekil 3.5).

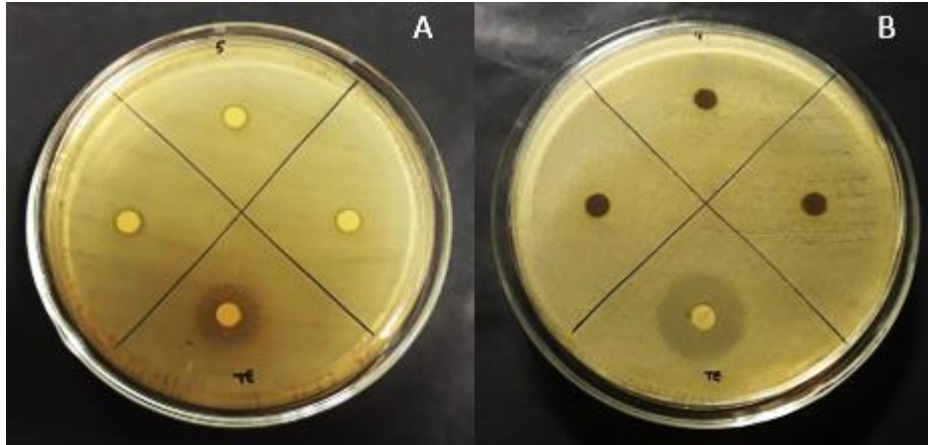


Şekil 3.5: AgNP ve bitki ekstraktı çözeltileri



Şekil 3.6: Disklere emdirilmiş; A) AgNP B) Bitki ekstraktı C) (Pozitif kontrol) Tetracycline

Stok mikroorganizmalardan alınan suşlar Luria Bertoni (LB) broth besiyeri içerisinde süspansiyon edildi ve 16-18 saat boyunca çalkalamalı inkübatör içerisinde bekletildi. Bu süre tamamlandıktan sonra mikroorganizma suşlarına 0.5 hücre/ml McFarland bulanıklık testi yapıldı ve $1,5 \times 10^6$ hücre/ml mikroorganizma içeren dilüsyon hazırlandı. Bakteri dilüsyonları için Mueller Hinton Agar (MHA) katı besiyeri hazırlandı. Daha sonra petrilerin yüzeyine tek kullanımlık steril swap yardımıyla ekimleri yapıldı. AgNP ve bitki özütü içeren diskler, petrilere uygun şekilde konuldu (Şekil 3.6). Bakteriler 37°C'de 16-18 saat inkübatöre bırakıldı ve süre sonunda diskler etrafında oluşan inhibisyon zon çapları cetvel yardımıyla ölçüldü. Çalışma, AgNP ve bitki ekstraktı için üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi ve sonuçların aritmetik ortalaması ile standart sapmaları hesaplandı.



Şekil 3.7: A) Bitki özütü içeren disklerin besiyerine ekimi B) AgNP içeren disklerin besiyerine ekimi

3.3.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

Bitki ekstraktının ve AgNP'nin minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri, steril 96 kuyucuktan oluşan mikrolaklar kullanılarak tespit edildi. Bunun için, mikroorganizmaların günlük sıvı kültürlerinden alınan solüsyonlar, McFarland 0.5 bulanıklık testi yapılarak $1,5 \times 10^6$ cell/ml olacak şekilde hazırlandı.

Mikrolakların ilk kuyucuklarına 100 µl LB Broth ve üzerine 100 µl AgNP ve bitki özütü (%100' lük) pipetlenip karıştırıldıktan sonra 100 µl alınarak bir sonraki kuyucuğa pipetleme yapıldı ve bu seyreltmelere son kuyucuğa kadar devam edilerek her kuyucuktaki konsantrasyon bir öncekinin yarısı olacak şekilde ayarlandı. Bitki özütü için bu konsantrasyon 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12.5 mg/ml, 6.25 mg/ml, 3.12 mg/ml 'dir ve AgNP için ise 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.0625 mg/ml, 0.03125 mg/ml' dir. Son olarak negatif kontrolün bulunduğu kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 10 µl mikroorganizma ilave edildi. Böylece 1-6. kuyucuklarda besiyeri, solüsyonlar ve mikroorganizma bulunurken 7. kuyucuk pozitif kontrolü, 8.kuyucuk ise negatif kontrolü içermektedir. Bu aşamalar tamamlandıktan sonra mikrolaklar 37°C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda spektrofotometre cihazında 600 nm'de ölçüm yapıldı. Çalışma, AgNP ve bitki özütü için üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.3.3 Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK)

Çalışmada kullanılan bitki özütünün ve AgNP'nin mikroorganizmalara karşı minimum inhibisyon konsantrasyonlarını (MİK) belirledikten sonra minimum bakterisidal konsantrasyonları (MBK) incelendi. MİK değerleri belirlendikten sonra mikroorganizmaların üremediği kuyucuklar tespit edilerek buralardan steril öze yardımıyla örnekler alınıp MHA katı besiyerlerine ekimleri yapıldı. Daha sonra 37°C'de 16-18 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu süre tamamlandıktan sonra, besiyerlerine inoküle edilen örneklerin, bakterilerin %99,9'nu öldüren, minimum antimikrobiyal madde konsantrasyonu MBK değeri olarak kabul edildi. Deneysel çalışmalar AgNP ve bitki özütü için üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.4 Antibiyofilm Aktivitelerinin Belirlenmesi

Biyofilmler, bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak tanımlanabilmektedir (Gün ve Ekinci, 2009). 37°C’de 48 boyunca 96 kuyucuklu mikroplate içerisinde inkübasyona bırakılan tüm bakteriler süre tamamlandıktan sonra tamamen boşaltıldı ve tüm kuyucukların içerisine dH₂O konulup 2-3 defa tekrar edilerek kuyucuklar yıkandı. Daha sonra mikroplate kuruması için oda sıcaklığında bekletildi. Kuruyan kuyucuklara 130 µl %95’lik metanol eklenerek, 15 dakika boyunca fiksasyon için bekletildi ve süre sonunda kuyucuklarda bulunan metanol boşaltılarak tekrar kurumaya bırakıldı. Daha sonra kuyucuklara %0,1’lik kristal viyole çözeltisinden 125 µl konulup 10 dakika boyunca oda koşullarında bekletildi ve bu süre de tamamlandığında mikroplate 2-3 defa dH₂O ile yıkanıp, kurumaya bırakıldı.

Kuruyan kuyucuklara tutunan bakterilerin çözünmesi amacıyla gram pozitif bakteri içeren kuyucuklara %33’lük glasiyel asetik asit çözeltisinden 200 µl, gram negatif bakteri içeren kuyucuklara %95’lik etanol çözeltisinden 200 µl konulup oda koşullarında 15 dakika bekletildi. Bu işlemlerin hepsi pozitif kontrol içinde uygulandı. Deneysel süreç tamamlandıktan sonra spektrofotometre cihazında 600 nm’de ölçüm yapıldı. Uygulanan bitki özütünün ve AgNP’nin, antibiyofilm üzerindeki etkisi pozitif kontrolden elde edilen veriler ile karşılaştırılarak biyofilm inhibisyonunun % azalma değeri hesaplandı. % Azalma: $((K-Ö)/K) \times 100$ formülüne göre hesaplanmıştır. Bu formüle göre;

K: Pozitif kontrol kuyucuğu

Ö: Test kuyucukları.

3.4.2. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler IBM SPSS Statistics 23.0 (SPSS Inc; Chicago, IL, ABD) programı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler olarak ortalama, standart sapma ve yüzde dağılımları verilmiştir. Çalışmadan elde edilen bitki ve AgNP antibiyofilm oluşumu etkinliği verileri Pearson korelasyon analizi yapılarak yorumlanmıştır. *p* değerinin ≤ 0.05 ve ≤ 0.01 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.5 Antikanser Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda insan meme kanseri hücre serisi (MCF-7) ve insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) kullanılmıştır.

3.5.1 Hücre Kültürü

-80°C’de dondurularak muhafaza edilen hücre hatlarının çözünmesi sağlandı ve akabinde MCF-7 hücre hattı için DMEM, %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin ve %1 insülin içeren ve HUVEC hücre hattı için DMEM, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren falkon tüplerine hızlı bir şekilde alındı. Falkon içerisindeki hücreler 5 dakika boyunca 1000 rpm’de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak kalan pellet üzerine her bir hücre hattı için uygun tamamlanmış besiyerleri eklenerek dikkatli bir şekilde pipetaj yapıldı. Hücrelerin yoğunluğuna bağlı olarak uygun santimetreküplük flasklara hücreler ekildi. Flask içerisine ekilen hücrelerin inkübasyonu 37 °C’de % 5 CO₂ içeren inkübatörde gerçekleştirildi. Her iki hücrenin medyumları haftada iki defa değiştirildi. Hücrelerin canlılığı %1 tripan blue kullanılarak inverted mikroskopta incelenerek belirlendi. Mikroskopta incelenen hücreler flask yüzeyini %80 oranında kapladığı esnada pasajlama işlemi yapıldı.

Pasajlama işlemi yapılırken ilk aşama da flaskı ölü hücrelerden ve tamamlanmış besiyerinden uzaklaştırmak için PBS ile yıkama yapılmış olup flask yüzeyine yapışan hücreleri tripsin-EDTA ile muamele ederek 5 dakika boyunca inkübatörde bekletildi. Mikroskop altında hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldıkları tespit edildikten sonra yaklaşık 3 ml kadar tamamlanmış besiyeri içeren steril falkon içerisine aktarılmış ve 5 dakika boyunca 1000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış olup pelletlerin üzerine tamamlanmış besiyerine eklenip yavaş bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra yeni flasklara yeni besiyeri eklenerek üzerine eklenmiştir. Flaska ekilen hücrelerin inkübasyonu aynı koşullar altında gerçekleştirilmiştir.

Deneylerde pasajlanan hücreler kullanıldıktan sonra kalan hücreler hazırlanan dondurma solüsyonu ile başka deneylerde kullanılmak üzere donduruldu.

3.5.2 Bitki Ekstraktı ve AgNP ile Muamele

Test edilecek bitki ekstraktı ve yeşil sentezlenen AgNP'nin 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-7} ve 10^{-9} µg/ml 'lık konsantrasyonları hücrelerin içinde bulunduğu kuyucuklara eklendi ve 24 saat 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücrelerdeki canlılık düzeyi MTT yöntemi kullanılarak belirlendi.

3.5.3 MTT Yöntemi

Bitki ekstraktı ve yeşil sentezlenen AgNP'nin meme kanseri (MCF-7) ve insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) yöntemi ile belirlenmiştir. Bu yöntem Mosmann tarafından tanımlanmış, Alley ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Mosmann, 1983; Alley vd., 1988). Mitokondriyal dehidrogenaz enzimi sarı renkli, suda çözünebilen bir tuz olan MTT tuzunu, suda çözünmeyen formazana indirgeyerek mor renkli kristaller ortaya çıkmaktadır. Dimetil sülfoksit (DMSO) ile muamelesi sonucu çözülen formazan kristalleri canlılığın ölçütü olarak kantitatif olarak ELISA okuyucuda kalorimetrik yöntemle hesaplanabilmektedir (Razavi, 2017).

Bu tez çalışmasında pasajlanarak elde edilen yeterli sayıda MCF-7 ve HUVEC hücrelerinin her biri ayrı ayrı işlem görmüştür ve her iki hücre hattı için de aynı adımlar izlenmiştir. Öncelikli olarak hücreler PBS ile yıkanmış ve tripsin-EDTA ile flask yüzeyinden kaldırılmış ve daha sonra falkon içerisine alınarak santrifüj edilip pellet şeklinde elde edilmiştir. Pellet az miktarda besiyeri ile çözülerek 1:1 oranında hücre süspansiyonu ve tripan mavisi alınarak thoma lamına aktarılmıştır ve mikroskop altında hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı yapıldıktan sonra hesaplanan miktarda hücre besiyerine eklenmiştir ve pipetaj yapılarak homojen dağılması sağlanmıştır. Daha sonra 96 kuyucuklu mikropiplakların herbir kuyucuğuna 10^5 hücre/ml olacak şekilde eklenmiştir ve 24 saat boyunca 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası toksik etkileri incelenecek olan bitki ekstraktı ve yeşil sentezlenen AgNP'nin 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} ve 10^{-9} µg/ml 'lık konsantrasyonları süspanse edilerek kuyucuklara eklenmiştir. 24 saat boyunca tekrar inkübasyona bırakılmıştır ve sonrasında meydana gelen değişiklikler mikroskopta incelenerek kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Bu aşamadan sonra her kuyucuğa MTT solüsyonundan 10 µl eklenmiştir ve 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda

mikroplaklar ELISA ile 490 nm'de okutularak sonuçlar hesaplanmıştır. Deney 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.4 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz GraphPad Prism yazılımı sürüm 8 (GraphPad Yazılımı, La Jolla, CA) programı kullanılarak gerçekleştirildi. IC₅₀ değerleri GraphPad Prism kullanılarak hesaplanmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda Tukey testi kullanıldı. Nicel veriler ortalama \pm standart sapma (\pm SS) olarak ifade edildi ve 0.05'ten küçük *p* değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



BÖLÜM 4

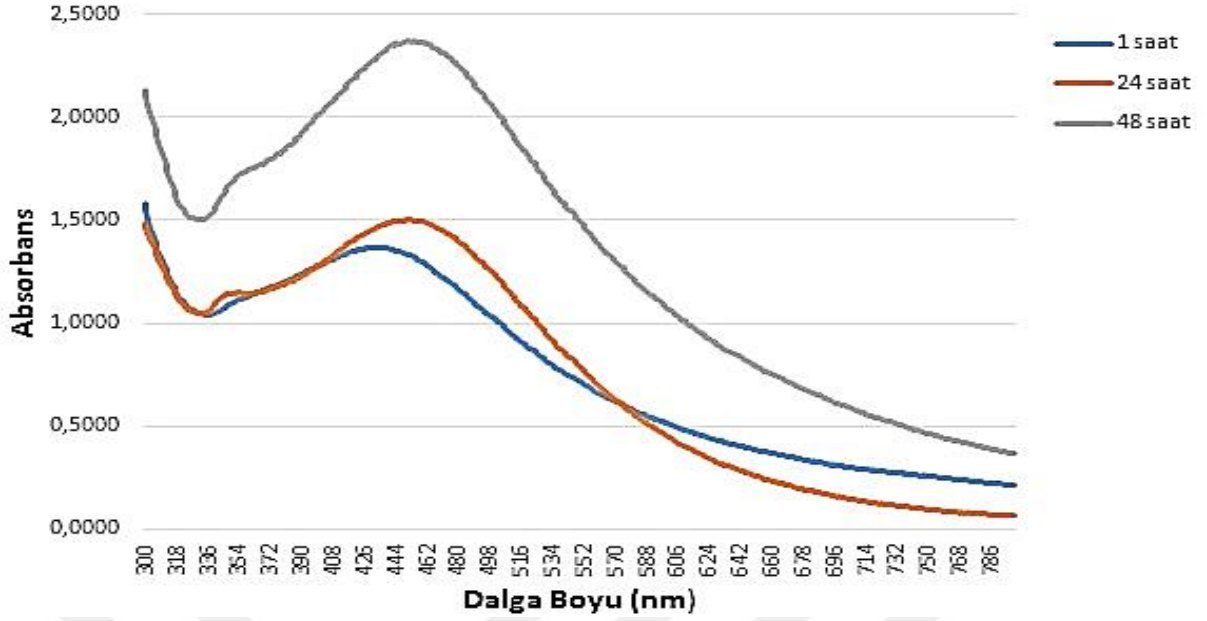
ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Ekstrakt ile Gümüş Nanopartiküllerin Sentez ve Karakterizasyonu

UV-vis spektrofotometre kullanımı metalde var olan lokalize yüzey plazmon rezonansını uyararak, bir elektrik alan oluşturup belirli bir dalga boyunda rezonans meydana getirir ki o dalga boyunda güçlü ışın saçılmasına neden olmaktadır. Bu sayede spektrofotometrik ölçümlerin değerlendirilmesi; farklı dalga boylarında renksel ya da kolorimetrik olarak kullanılan skala değerlendirmesi yapılır.

Reaksiyon başlangıcından itibaren 1 saat, 24 saat ve 48 saat zaman aralıklarından sonra kaydedilen UV-vis spektrumları Şekil 4.1’de gösterilmiştir. Bitki yaprak ekstraktı ile gümüş nitrat çözeltisi karıştırılır karıştırılmaz, saf Ag^+ iyonlarının Ag^0 ’a indirgenmesi, belirli zaman aralıklarıyla UV-vis spektrumu ile ölçülerek izlendi. Reaksiyon ortamında oluşan AgNP’lerin absorpsiyon spektrumları, AgNP’lerin yüzey plazmon rezonansı (SPR) nedeniyle 426 ile 462 nm aralığında emme maksimumuna sahiptir (Bonerjee vd., 2014).

AgNP’nin Uv-vis ölçümü ile 1 saat sonra ölçülen gümüş plazmon rezonansının 426 nm’de, 24 saat sonra 444 nm’de ve 48 saat sonra ise 444 nm’de gerçekleştiğini ve tepkime süreleri arttıkça tepe dalga boyunda sürekli olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: AgNP UV-vis spektrumları

XRD (X Işını Kırınımı), yeşil sentez yöntemiyle sentezlenen AgNP'nin büyüklüğü, faz tanımlanması ve kristal yapısını analiz etmek için kullanıldı. Hazırlanan AgNP'lerin XRD spektrumu, yüzey merkezli küpün karakteristik Bragg kırınım planları (111), (200), (220) ve (311) olan $2\theta = 38.35, 46.46, 64.75$ ve 77.62° 'de dört kırınım bandı gösterdi (Bagherzade vd., 2017). Bu sonuca göre yüzey merkezli kübik yapıda metalik gümüşün olduğu belirlendi. AgNP'lerin ortalama nanopartikül boyutu, Debye-Scherrer formülüne göre $32,56$ nm olarak hesaplandı.

$$d(\text{Å}) = k\lambda / \beta \cos\theta$$

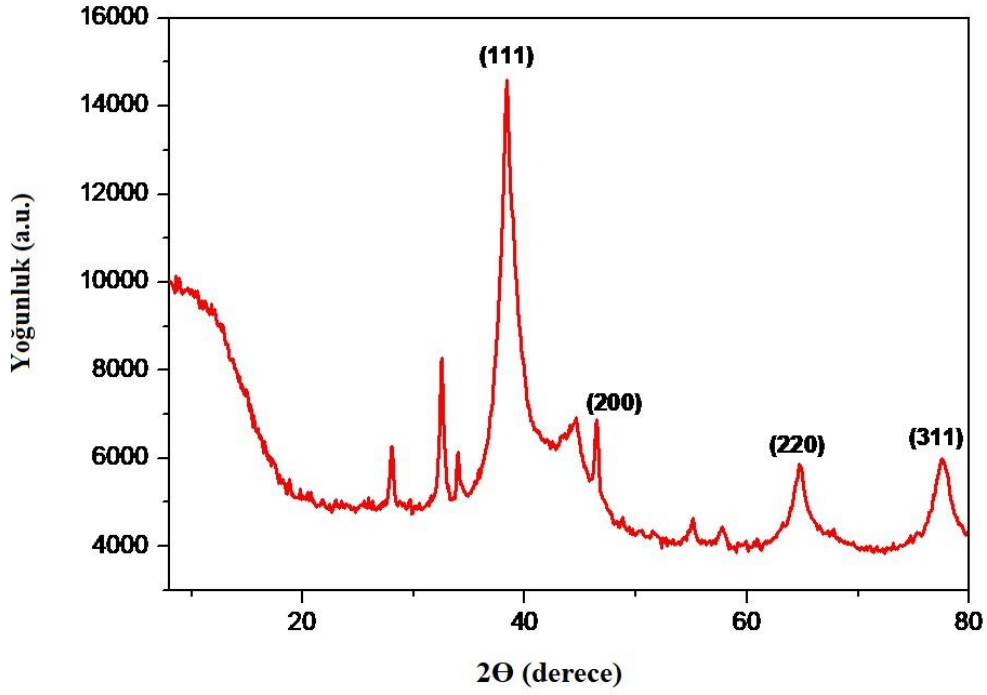
d= NP'lerin ortalama boyutu,

k= katsayı (0,9),

λ = X-ışını dalga boyu ($1,54056\text{Å}$),

β = ilgili kırılma pikinin tam genişliğinin yarı maksimum noktası (rad),

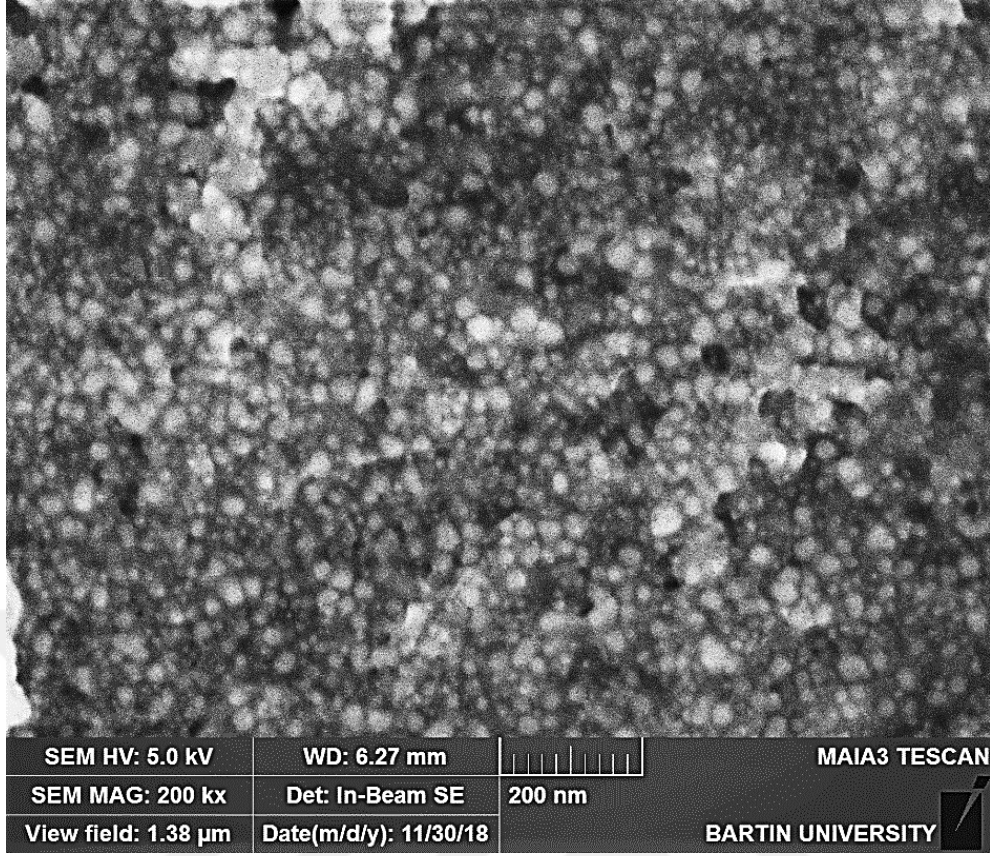
θ = pikin maksimum yükseklikteki açısını (rad) ifade etmektedir.



Şekil 4.2: AgNP XRD görüntüsü

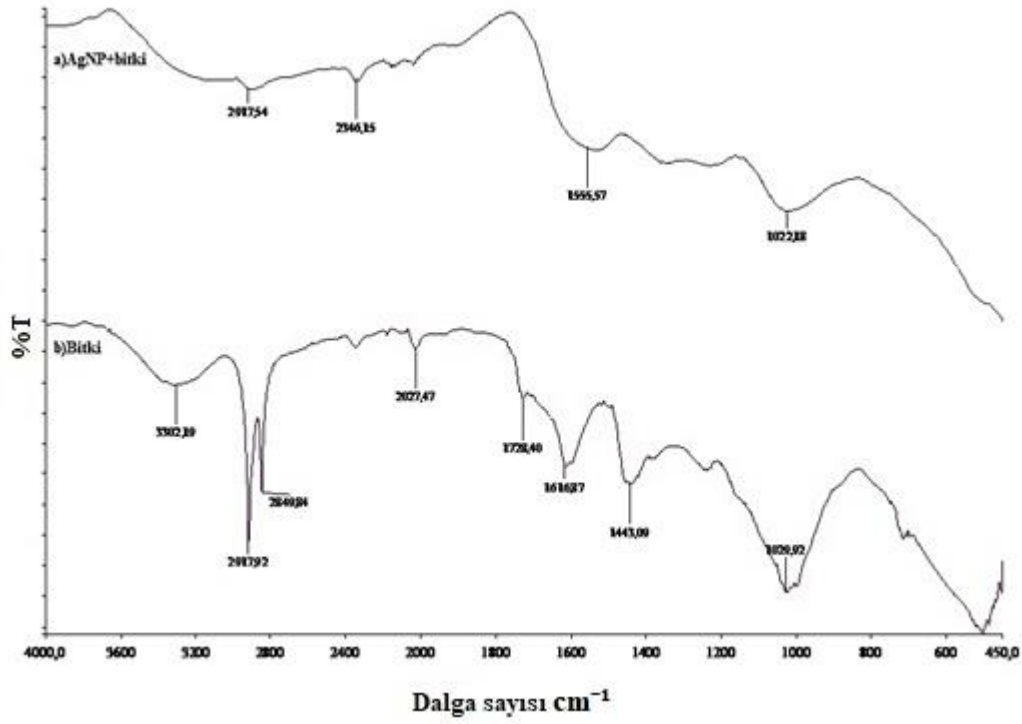
SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) ile yeşil sentez yöntemiyle elde edilen AgNP'lerin yüzey morfolojileri ve boyutları analiz edildi. Yapılan görüntüleme sonucunda biyolojik AgNP'nin küresel boyutta ve yaklaşık olarak 32,56 nm büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir. AgNP'nin SEM görüntüsü Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

AgNP'nin SEM içerisinde 200 nm görüntü kalitesinde alınan Şekil 4.3'de bitki ekstraktı ile hazırlanmış nanopartikül oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 4.3: AgNP SEM görüntüsü

Çalışmada elde edilen bitki ekstraktının ve yeşil sentezlenmiş AgNP'nin FTIR spektrumlarına göre önemli ve beklenen farklılıkların olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.4). Bitkinin FTIR spektrum sonuçlarına göre, yaklaşık 3302 cm^{-1} dalga sayısındaki pik hidroksil gruplarından gelen O-H titreşimine karşılık gelmektedir (Silva vd., 2014) ve polifenolik bileşenlerde yüksek seviyelerde bulunan fenilden kaynaklanan C-C gerilmesi titreşimine karşılık gelen 1616 cm^{-1} dalga sayısında benzer pikler olduğu gözlemlenmiştir (Lu vd., 2011). Yaklaşık olarak 1443 cm^{-1} dalga sayısına karşılık gelen pik karbonhidratlar, glikojen ve oligosaakkaritlerden gelen oluşan -C-O bağı titreşimine karşılık gelmektedir (Dıblan vd., 2018).



Şekil 4.4: a) Yeşil sentez AgNP b) *Ruscus aculeatus* yaprak ekstraktına ait FT-IR spektrumları

Her iki spektrumun karşılaştırılmasıyla, 2917 cm^{-1} dalga sayısına karşılık gelen piklerin doymuş alkan (-C-H) gerilmesinden kaynaklandığı belirlenmiştir (Jahan, 2019). Yaklaşık 1022 cm^{-1} ve 1029 cm^{-1} dalga sayısında gözlemlenen piklerin glukozun maksimum bant absorpsiyonu olduğu gözlemlenmiştir. (Mellado-Mojica vd., 2016; Se vd., 2018).

Her iki spekturumdaki küçük kayma ile benzer piklerin varlığı, sentezlenen AgNP'lerin bitki ekstratından kaynaklanan doğal bileşikler içerdiğini ortaya koymaktadır (Heydari ve Rashidipour, 2015).

4.2 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

4.2.1 Disk Difüzyon Sonuçları

Bu çalışmada, *Ruscus aculeatus* L. bitkisi kullanılarak elde edilen özüt ve AgNP'nin antimikrobiyal aktiviteleri; disk difüzyon, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK), minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) yöntemleriyle altı tane gram pozitif bakteri (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus durans*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* DSMZ 20044, *Bacillus subtilis* DSMZ 1971) ve dokuz tane gram negatif bakteri (*Salmonella enteritidis* ATCC 13075, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*, *Salmonella kentucky*, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* DSMZ 50071, *Escherichia coli* CFAI ATCC 25922, *Serratia marcescens* ATCC 13048) olmak üzere toplam 15 mikroorganizma suşlarına karşı değerlendirildi. Ayrıca pozitif kontrol olarak Tetrasiklin (TE: 10 mg/ml) antibiyotik diskleri kullanıldı. Tetrasiklin antibiyotiğinin test mikroorganizmalarına karşı 8-22 mm aralığında inhibisyon zonu gösterdiği tespit edildi. *R. aculeatus* L. ekstraktı ve yeşil sentez yöntemiyle sentezlenen AgNP'lerin ve pozitif kontrol olarak kullanılan tetrasiklin antibiyotiğinin test mikroorganizmalarının tümüne karşı etki gösterdiği gözlemlenmiştir (Tablo 4.1). Sonuçlar hesaplanırken disk çapları dâhil edilmiştir.

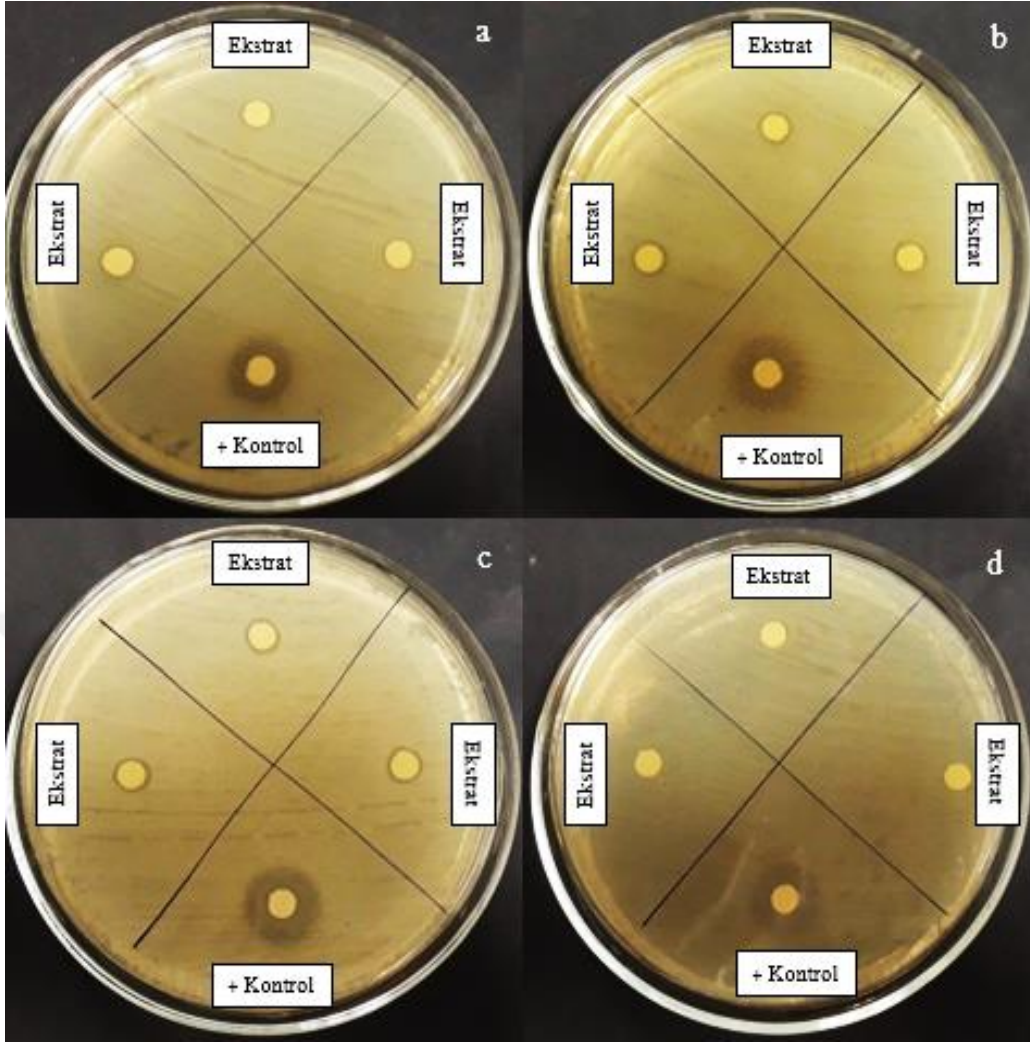
Tablo 4.1: Bitki ekstraktı ve yeşil sentez AgNP' nin test mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zonlarının ölçümleri (mm)

Mikroorganizmalar	Ekstrakt	AgNP	TE 10
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	7±0,00	-	14
<i>Salmonella infantis</i>	8,3±1,52	-	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7±0,00	-	19,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSMZ 50071	8±0,00	-	17,5
<i>Salmonella kentucky</i>	7,6±0,57	7,6±1,15	17,5
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	7±0,00	-	16,5
<i>Listeria innocua</i>	7,3±0,57	-	15,5
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13075	9,6±0,57	7±0,00	17,5
<i>Enterococcus durans</i>	8,6±0,57	7±0,00	19
<i>Salmonella typhimurium</i>	7,3±0,57	7±0,00	18,5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	14,5
<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSMZ 20044	7±0,00	-	11
<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971	7,3±0,57	-	14
<i>Escherichia coli</i> CFAI ATCC 25922	-	-	16
<i>Saratia marrescens</i> ATCC 13048	6,6±0,57	-	9

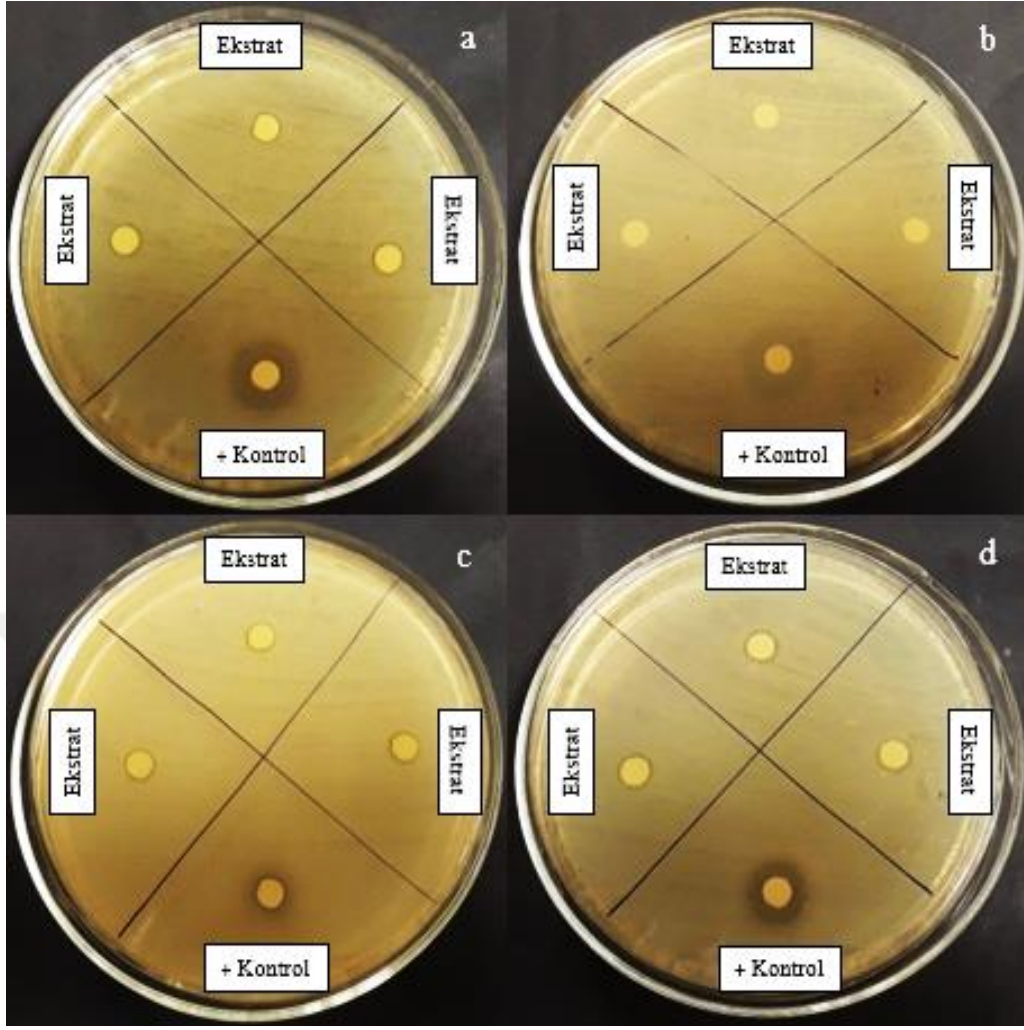
(-): İnhibisyon zonu yoktur. (TE 10): Tetrasiklin (10 mg/ml).

Tablo 4.1'de, bitki ekstraktının ve biyolojik olarak sentezlenen AgNP'nin disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri gösterilmiştir. Buna göre, *R. aculeatus* L. ekstraktı *E. aerogenes* ATCC 13048, *S. infantis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* DSMZ 50071, *S. kentucky*, *E. faecalis* ATCC 29212, *L. innocua*, *S. enteritidis* ATCC 13075, *E. durans*, *S. typhimurium*, *S. marrescens* ATCC 13048, *S. epidermidis* DSMZ 20044, *B. subtilis* DSMZ 1971 mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zonu gösterirken, *S. aureus* ATCC 25923 ve *E. coli* CFAI ATCC 25922 mikroorganizmalarına karşı herhangi bir inhibisyon zonu göstermemiştir (Şekil 4.5-Şekil 4.6).

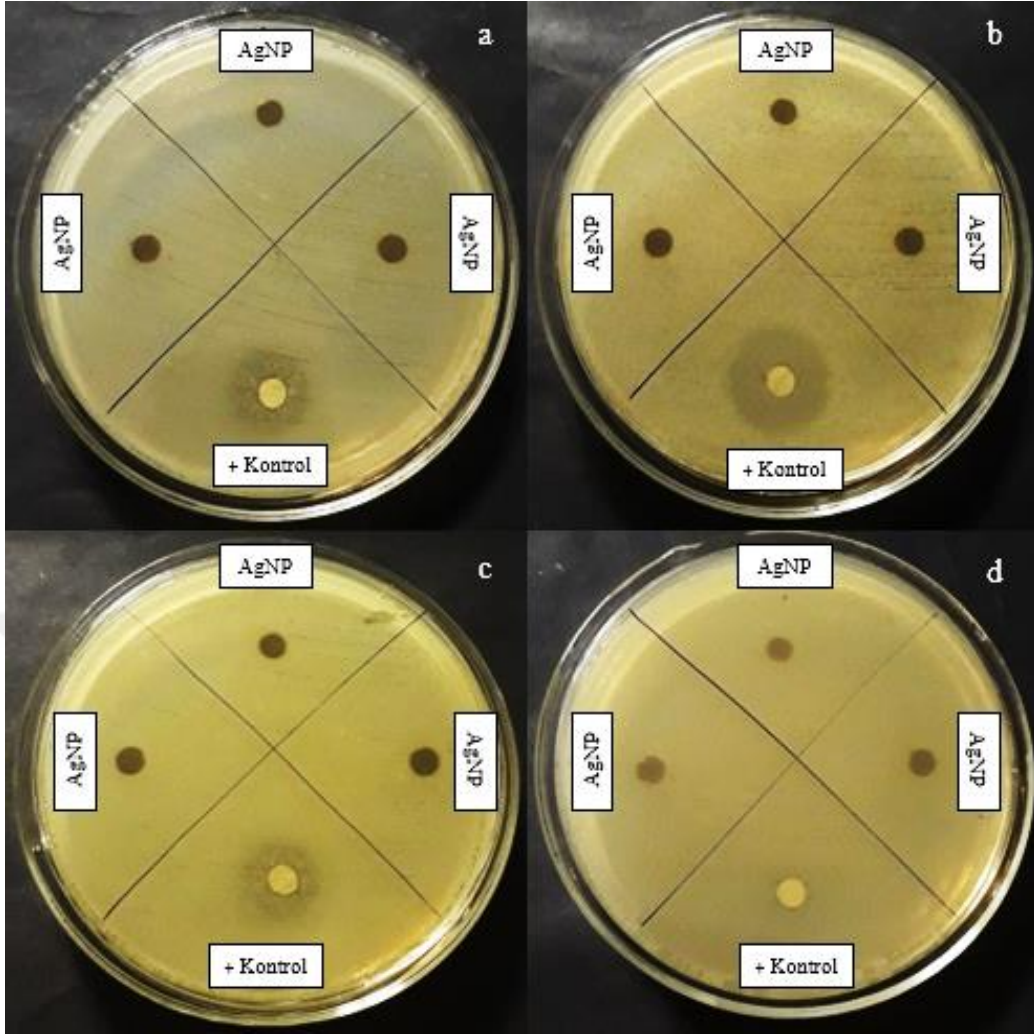
Biyolojik olarak sentezlenen AgNP'nin, *S. kebtucky*, *S. enteritidis* ATCC 13075, *E. durans*, *S. typhimurium* mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zonu gösterirken, *E. aerogenes* ATCC 13048, *S. infantis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* DSMZ 50071, *E. faecalis* ATCC 29212, *L. innocua*, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* DSMZ 20044, *B. subtilis* DSMZ 1971, *E. coli* CFAI ATCC 25922, *S. marrescens* ATCC 13048 mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zonu göstermemiştir (Şekil 4.7-Şekil 4.8).



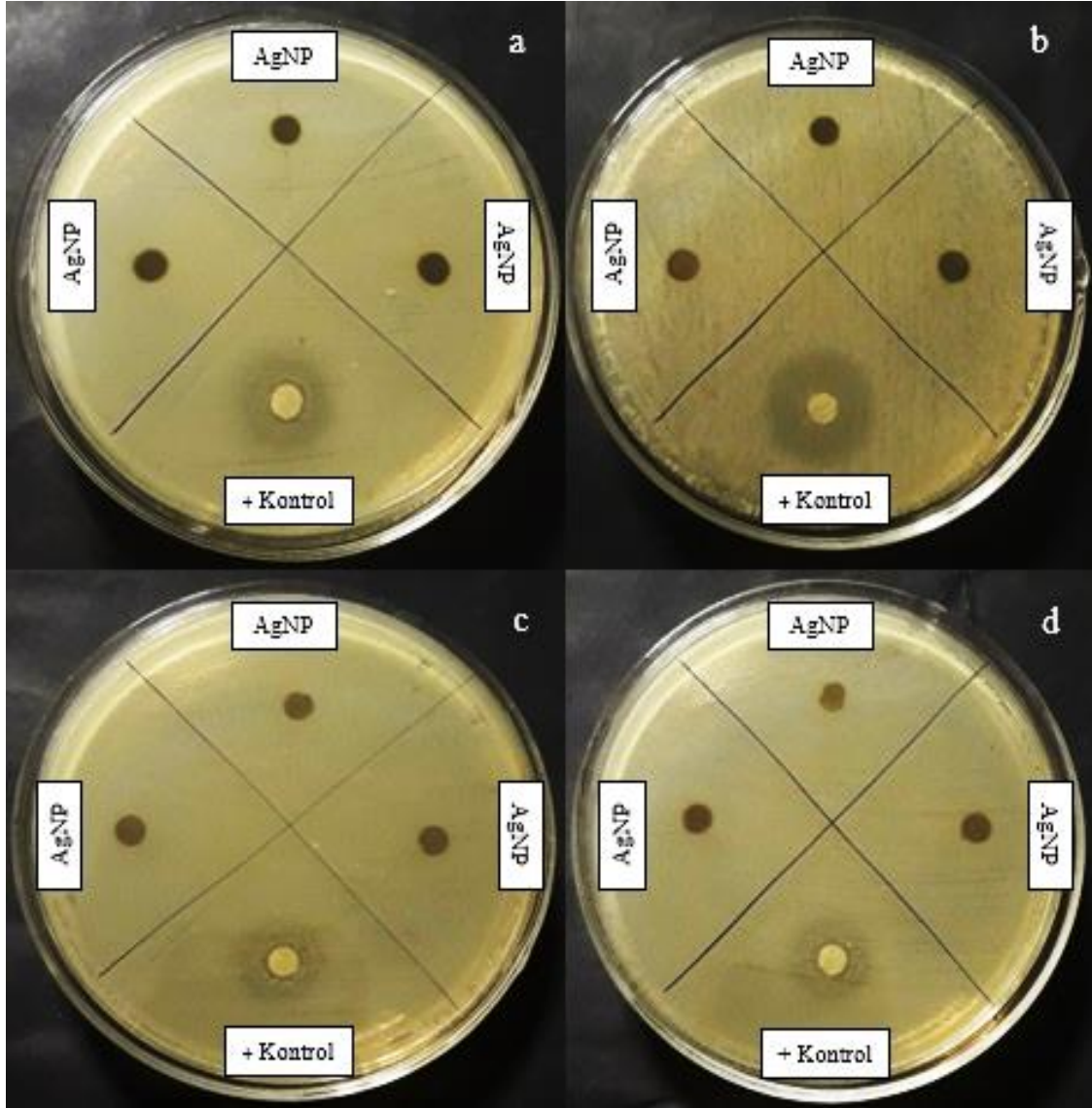
Şekil 4.5: Test edilen gram negatif mikroorganizmalara karşı bitki ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi (+ Kontrol: Tetrasiklin (TE 10), a) *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 b) *Pseudomonas aeruginosa* DSMZ 50071 c) *Salmonella typhimurium* d) *Escherichia coli* CFAI



Şekil 4.6: Test edilen gram pozitif mikroorganizmalara karşı bitki ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi (+ Kontrol: Tetrasiklin (TE 10), a) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 b) *Enterococcus durans* c) *Staphylococcus epidermidis* DSMZ 20044 d) *Bacillus subtilis* DSMZ 1971).



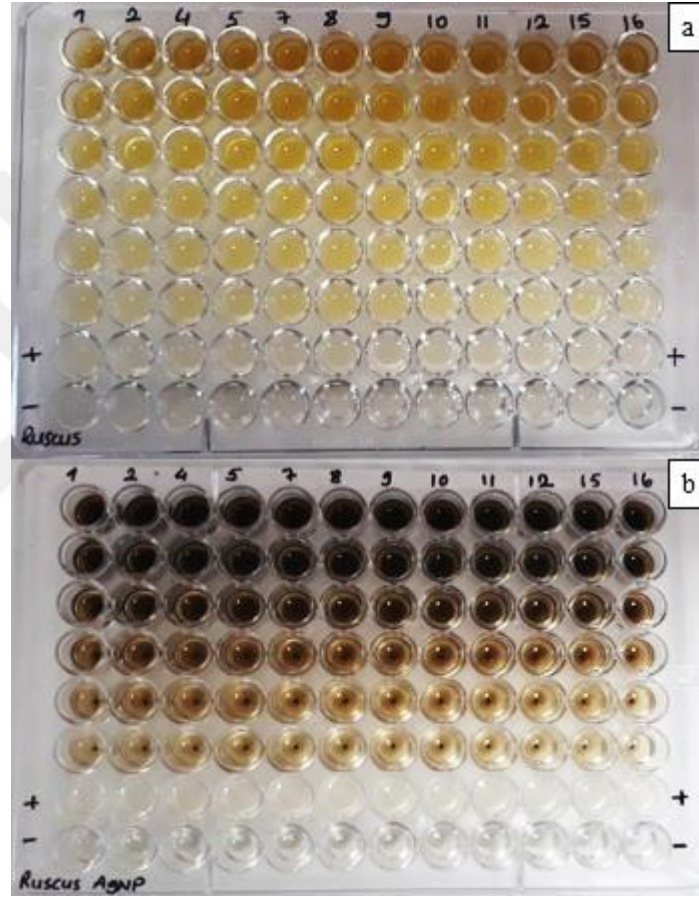
Şekil 4.7: Test edilen gram negatif mikroorganizmalara karşı biyolojik sentezlenen AgNP'nin antimikrobiyal aktivitesi (+ Kontrol: Tetrasiklin (TE 10), a) *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 b) *Klebsiella pneumoniae* c) *Salmonella enteritidis* ATCC 13075 d) *Serratia marcescens* ATCC 13048).



Şekil 4.8: Şekil 4.8: Test edilen gram pozitif mikroorganizmalara karşı biyolojik sentezlenen AgNP'nin antimikrobiyal aktivitesi (+ Kontrol: Tetrasiklin (TE 10), a) *Listeria innocua* b) *Enterococcus durans* c) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 d) *Bacillus subtilis* DSMZ 1971).

4.2.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) Sonuçları

Disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal etki gösteren bitki ekstraktı ve AgNP' nin minimum inhibe eden konsantrasyon değeri 96 kuyucuklu mikropalakalar kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.9). İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra spektrofotometre de (600 nm) ölçüm yapılmıştır. Tablo 4.2' de test edilen bileşiklerin bakterilere karşı minimum inhibe edici değerleri (mg/ml) verilmiştir.



Şekil 4.9: MİK sonuçlarının değerlendirilmesi için 96 kuyucuklu dilüsyon plağı (a: Bitki ekstraktı b: AgNP).

Tablo 4.2: Test mikroorganizmalarına karşı yeşil sentez AgNP' nin MİK sonuçları.

Mikroorganizma Adı	AgNP	Birimi
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	0,03	mg/ml
<i>Salmonella infantis</i>	0,12	mg/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,03	mg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSMZ 50071	0,06	mg/ml
<i>Salmonella kentucky</i>	0,03	mg/ml
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,03	mg/ml
<i>Listeria innocua</i>	0,06	mg/ml
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13075	0,03	mg/ml
<i>Enterococcus durans</i>	0,03	mg/ml
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,03	mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,03	mg/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSMZ 20044	0,03	mg/ml
<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971	0,03	mg/ml
<i>Escherichia coli</i> CFAI ATCC 25922	0,03	mg/ml
<i>Saratia marrescens</i> ATCC 13048	0,03	mg/ml

Tablo 4.2’de bitki ekstraktının ve biyolojik olarak sentezlenen AgNP’ nin MİK değerleri gösterilmiştir. Buna göre, hazırlanan %100’lük bitki ekstraktının tüm mikroorganizmalara karşı inhibe edici etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir.

Biyolojik olarak sentezlenen AgNP’ nin ise, test edilen mikroorganizmalardan *Salmonella infantis*’e karşı 0,12 mg/ml konsantrasyonunda minimum inhibe edici etki göstermiştir. AgNP’ nin, test edilen mikroorganizmalardan *Pseudomonas aeruginosa* DSMZ 50071 ve *Listeria innocua* suşlarına karşı 0,06 mg/ml konsantrasyonunda minimum inhibe edici etki gösterirken, diğer 12 bakteri suşlarına karşı 0,03 mg/ml konsantrasyonunda minimum inhibe edici etki göstermiştir.

4.2.3 Minimum Bakterisidal Konsantrasyon (MBK) Sonuçları

Minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) değeri mikroorganizmaların üremesini önleyen minimum madde miktarı olarak tanımlanabilmektedir. Çalışma da belirlenen mikroorganizmalarda gözle görülür bir şekilde üremenin olup olmadığı ve mikropilaka kuyucuklarından alınan mikroorganizma suşlarının antibiyotik içermeyen besiyerine ekim yapılarak bakterilerin üremesini %99,9 oranında sonlandıran minimum bakterisidal konsantrasyonları belirlenmiştir ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

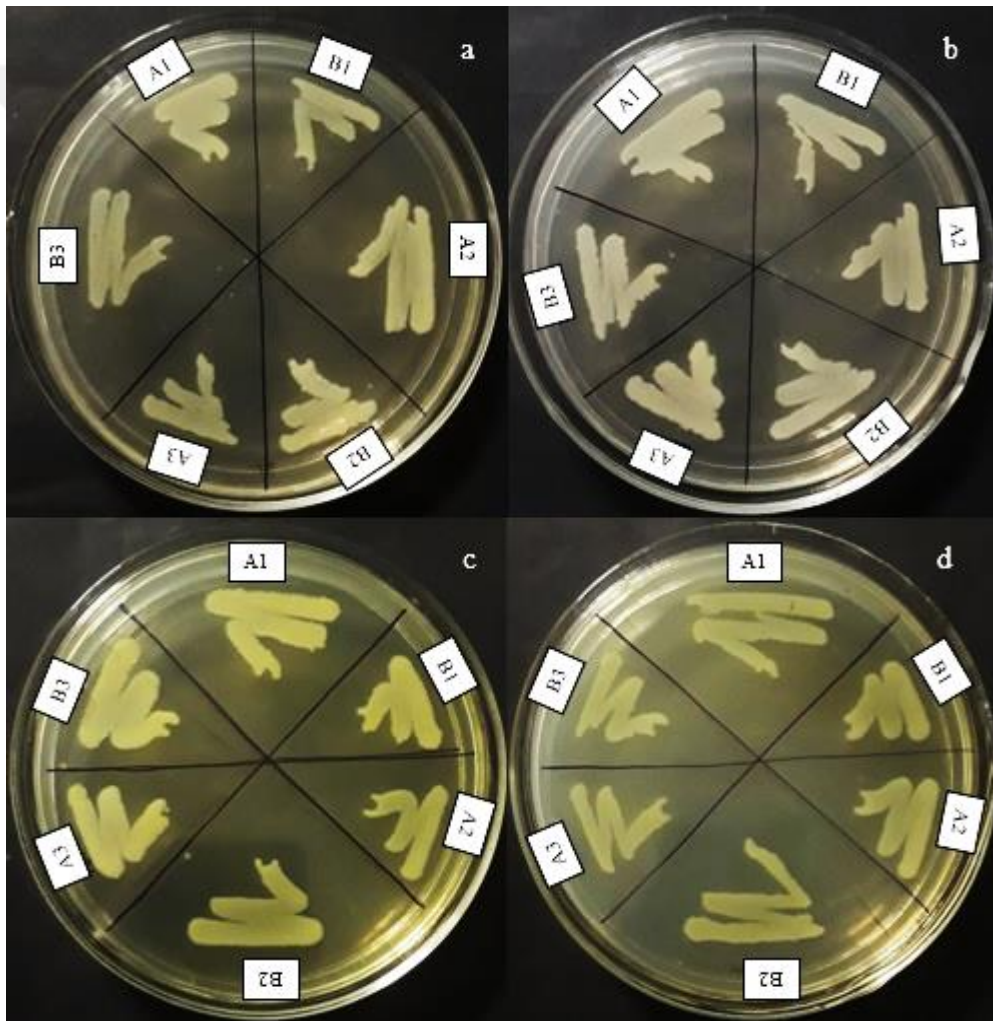
Tablo 4.3: Çalışılan yeşil sentez AgNP’nin minimum bakterisidal konsantrasyonları.

Mikroorganizma Adı	AgNP	Birimi
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	0,03	mg/ml
<i>Salmonella infantis</i>	0,25	mg/ml
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,03	mg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSMZ 50071	0,12	mg/ml
<i>Salmonella kentucky</i>	0,03	mg/ml
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,03	mg/ml
<i>Listeria innocua</i>	0,12	mg/ml
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13075	0,06	mg/ml
<i>Enterococcus durans</i>	0,03	mg/ml
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,03	mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,03	mg/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSMZ 20044	0,03	mg/ml
<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971	0,03	mg/ml
<i>Escherichia coli</i> CFAI ATCC 25922	0,03	mg/ml
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13048	0,03	mg/ml

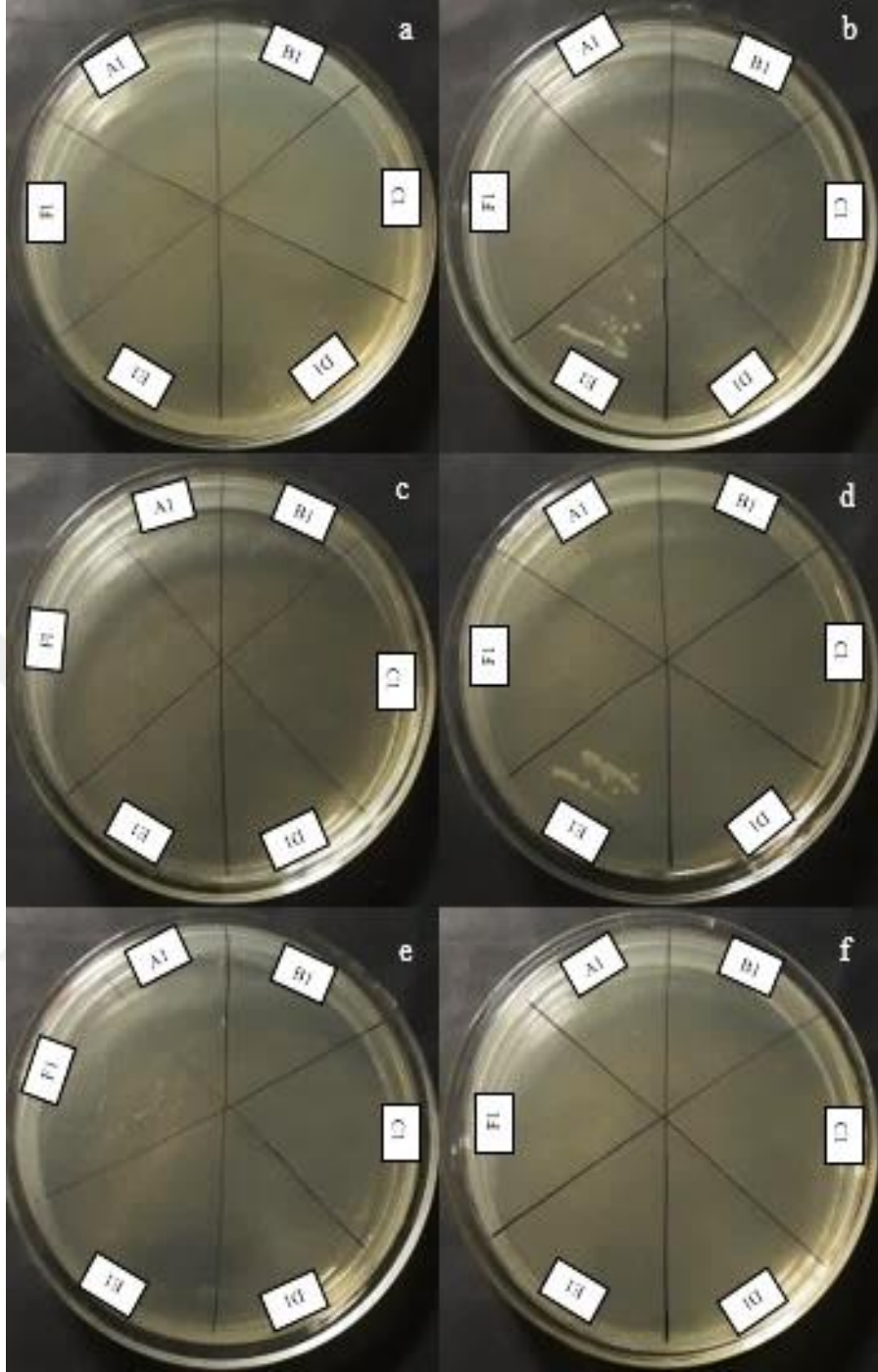
Tablo 4.3’de bitki ekstraktının ve biyolojik olarak sentezlenen AgNP’ nin, %99,9’a kadar üremesini inhibe eden en düşük bakterisidal konsantrasyonlar (MBK) gösterilmiştir. Buna göre, hazırlanan %100’lük bitki ekstraktının tüm mikroorganizmalara karşı %99,9 oranında inhibe edici etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.10).

Biyolojik olarak sentezlenen AgNP'nin, *Salmonella infantis*' e karşı %99,9 oranında inhibe eden en düşük bakterisidal konsantrasyonu 0,25 mg/ml olarak tespit edildi.

Biyolojik olarak sentezlenen AgNP'nin, *Salmonella enteritidis* ATCC 13075 bakterisine karşı %99,9 oranında inhibe eden en düşük bakterisidal konsantrasyonu 0,06 mg/ml olarak tespit edilirken, *Pseudomonas aeruginosa* DSMZ 50071 ve *Listeria innocua* bakteri suşlarına karşı 0,12 mg/ml olarak tespit edildi. Ayrıca diğer 11 bakteri suşuna karşı %99,9 oranında inhibe eden en düşük bakterisidal konsantrasyonu 0,03 mg/ml olarak tespit edildi (Şekil 4.10-Şekil 4.11).



Şekil 4.10: Bitki ekstraktının MBK sonuçları (A1=A2=A3: %100 konsantrasyon, B1=B2=B3: %50 konsantrasyon, a: *P. aeruginosa* (A1,B1), *S. kentucky* (A2,B2), *E. faecalis* (A3,B3), b: *L. innocua* (A1,B1), *S. enteritidis* (A2,B2), *E. durans* (A3,B3), c: *S. typhimurium* (A1,B1), *S. aureus* (A2,B2), *S.epidermidis* (A3,B3), d: *B. subtilis* (A1,B1), *E. coli* (A2,B2), *S. marrescens* (A3,B3).



Şekil 4.11: AgNP'nin MBK Sonuçları (A1: 1 mg/ml, B1: 0,5 mg/ml, C1: 0,25 mg/ml, D1: 0,12 mg/ml, E1: 0,06 mg/ml, F1: 0,03 mg/ml, a: *K. pneumoniae*, b: *P. aeruginosa* DSMZ 50071, c: *E. faecalis* ATCC 29212, d: *L. innocua*, e: *S. enteritidis* ATCC 13075, f: *E.durans*).

4.3 Antibiyofilm Aktivite Sonuçları

Bitki ekstraktının ve AgNP'nin, Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'de farklı konsantrasyonlarda test mikroorganizmalarına karşı antibiyofilm etki sonuçlarına bakıldığında, ekstraktın en düşük konsantrasyonunda (%3,13) *S. infantis* suşunun biyofilm oluşumunu inhibe etmediği ve AgNP'nin en düşük konsantrasyonunda (0,03 mg/ml) ise *E. coli* CFAI ATCC 25922 suşunun biyofilm oluşumunu inhibe etmediği tespit edildi. Bunun yanı sıra diğer farklı konsantrasyonlarda test mikroorganizmalarının tümünün biyofilm oluşumunu inhibe ettiği tespit edildi.

Tablo 4.4: Bitki ekstraktının farklı konsantrasyonlardaki biyofilm inhibisyon değerleri (%).

Mikroorganizma Adı	100	50	25	12,5	6,25	3,13
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	43,8	39,4	48,9	48,3	43,2	9
<i>Salmonella infantis</i>	45,8	41,4	37,5	30,5	12,4	-
<i>Escherichia coli</i> CFAI ATCC 25922	30,9	44,5	32	44,2	44,8	40,7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6	12,2	10,1	2,7	1,3	6,8
<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSMZ 20044	25	19,6	24,7	21,9	9,4	15
<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971	46,5	44,2	41,1	38	24	13,3

Tablo 4.4' de bitki ekstraktının, test mikroorganizmalarına karşı biyofilm oluşumu üzerine etkileri gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, bitki ekstraktının en düşük konsantrasyonunda *S. infantis* suşu haricindeki diğer tüm mikroorganizmaların biyofilm oluşumunu inhibe ettiği tespit edildi.

%100'lük bitki ekstrakt konsantrasyonunda, test mikroorganizmalarının biyofilm oluşumunu en az 6,00- en yüksek 46,5 değer aralıklarında inhibe etmiştir.

%50'lik bitki ekstrakt konsantrasyonunda, test mikroorganizmalarının biyofilm oluşumunu 12,2-44,5 değer aralıklarında inhibe etmiştir.

%25'lik ekstrakt konsantrasyonunda, test mikroorganizmalarının biyofilm oluşumunu 10,1-48,9 değer aralıklarında inhibe etmiştir.

%12,5'lük ekstrakt konsantrasyonunda, test mikroorganizmalarının biyofilm oluşumunu 2,7-48,3 değer aralıklarında inhibe etmiştir.

%6,25'lik ekstrakt konsantrasyonunda, test mikroorganizmalarının biyofilm oluşumunu 1,3-44,8 değer aralıklarında inhibe etmiştir.

%3,13'lük ekstrakt konsantrasyonunda, test mikroorganizmalarının biyofilm oluşumunu 6,8-40,7 değer aralıklarında inhibe etmiştir.

Tablo 4.5: AgNP'nin farklı konsantrasyonlardaki biyofilm inhibisyon değerleri (mg/ml).

Mikroorganizma Adı	1	0,5	0,25	0,12	0,06	0,03
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	15	29,7	31,1	31,9	26,8	10,7
<i>Salmonella infantis</i>	60	65,5	62,6	63,4	55,8	53,2
<i>Escherichia coli</i> CFAI ATCC 25922	11,1	10,7	11,1	11,7	7,9	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	25,2	36,3	34,3	33,8	17,2	8,6
<i>Staphylococcus epidermidis</i> DSMZ 20044	17,2	18	24,6	22,8	8,4	1,1
<i>Bacillus subtilis</i> DSMZ 1971	38	36,9	38,4	34,7	25	28,4

Tablo 4.5'de AgNP'nin test mikroorganizmalarına karşı biyofilm oluşumu üzerine etkileri gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, AgNP'nin en düşük konsantrasyonunda *E. coli* CFAI ATCC 25922 suşu haricindeki diğer tüm mikroorganizmaların biyofilm oluşumunu inhibe ettiği tespit edildi.

1 mg/ml AgNP konsantrasyonunda, test mikroorganizmalarının biyofilm oluşumunu 11,1-60 değer aralıklarında inhibe etmiştir.

0,5 mg/ml AgNP konsantrasyonunda, test mikroorganizmalarının biyofilm oluşumunu 10,7-65,5 değer aralıklarında inhibe etmiştir.

0,25 mg/ml AgNP konsantrasyonunda, test mikroorganizmalarının biyofilm oluşumunu 11,1-62,6 değer aralıklarında inhibe etmiştir.

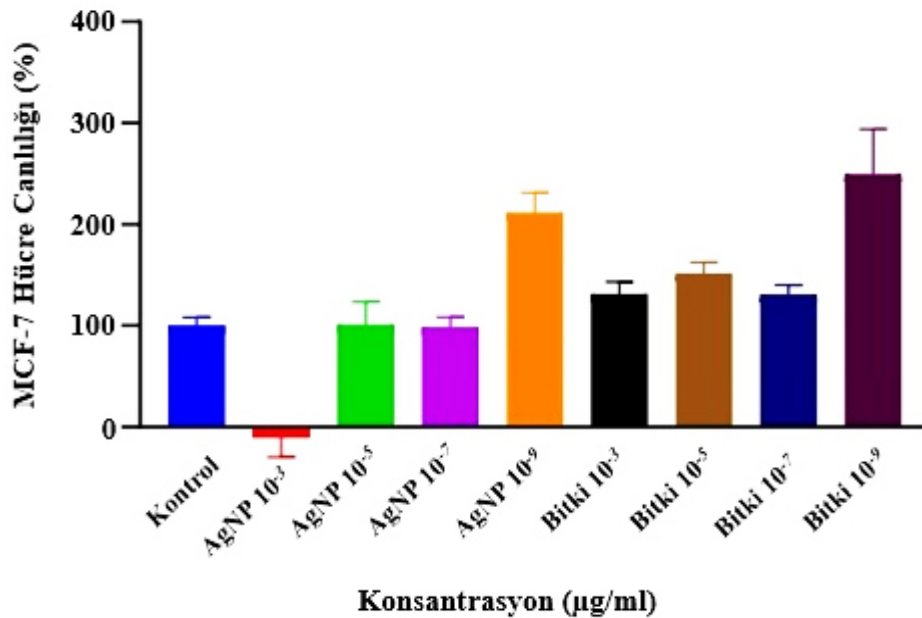
0,12 mg/ml AgNP konsantrasyonunda, test mikroorganizmalarının biyofilm oluşumunu 22,8-63,4 değer aralıklarında inhibe etmiştir.

0,06 mg/ml AgNP konsantrasyonunda, test mikroorganizmalarının biyofilm oluşumunu 7,9-55,8 değer aralıklarında inhibe etmiştir.

0,03 mg/ml AgNP konsantrasyonunda, test mikroorganizmalarının biyofilm oluşumunu 1,1-53,2 değer aralıklarında inhibe etmiştir.

4.4 Antikanser Aktivite Sonuçları

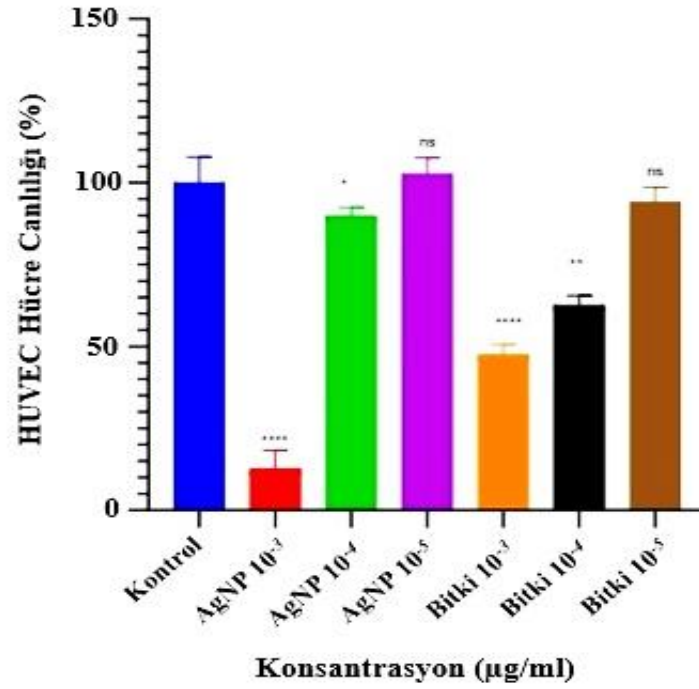
Bitki ekstraktı ve yeşil sentezlenmiş AgNP' nin 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} ve 10^{-9} $\mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyonları MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi ve 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$ 'lık konsantrasyonları HUVEC hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi MTT ile belirlenmiştir (Şekil 4.12; Şekil 4.13).



Şekil 4.12: *Ruscus aculeatus* L. bitki ekstraktının ve yeşil sentezlenmiş AgNP'nin MCF-7 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri

Şekil 4.12’ de MCF-7 hücre hattına uygulanan AgNP ve bitki ekstraktına ait farklı konsantrasyonlarda ki (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} ve 10^{-9} $\mu\text{g/ml}$) hücre canlılık oranları gösterilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, uygulanan AgNP konsantrasyonlarında belirlenen en düşük değer 10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ ’dir. Uygulanan diğer konsantrasyonların ise daha az sitotoksik etkiye sahip olduğu görüldü. Bitki ekstraktında ise, uygulanan konsantrasyonların sitotoksik etkinin olmadığı görüldü. Bu sonuç, biyosentezlenmiş AgNP’lerin MCF-7’ye karşı sitotoksik etkisinin daha güçlü olduğunu göstermektedir.

Yeşil sentezlenen AgNP’ nin, IC_{50} değeri MCF-7 hücre hattı için 0,06 $\mu\text{g/ml}$ iken bitki ekstraktının IC_{50} değeri 6,91 $\mu\text{g/ml}$ ’dir.



Şekil 4.13: *Ruscus aculeatus* L. bitki ekstraktının ve yeşil sentezlenmiş AgNP’nin HUVEC hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri

Şekil 4.13’de HUVEC hücre hattına uygulanan AgNP ve bitki ekstraktına ait farklı konsantrasyonlarda ki (10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$) hücre canlılık oranları gösterilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, uygulanan AgNP konsantrasyonlarında belirlenen en düşük değer 10^{-3} $\mu\text{g/ml}$ ’dir. Uygulanan diğer konsantrasyonlarında sitotoksik etkisinin daha az olduğu görüldü. Bitki ekstraktında ise, kontrol grubu ile kıyaslandığında belirlenen en düşük değer

10^{-3} µg/ml'dir ve bu değere kıyasla 10^{-4} ve 10^{-5} µg/ml'lık konsantrasyon değerlerinin daha az sitotoksik etkiye sahip olduğu görüldü.

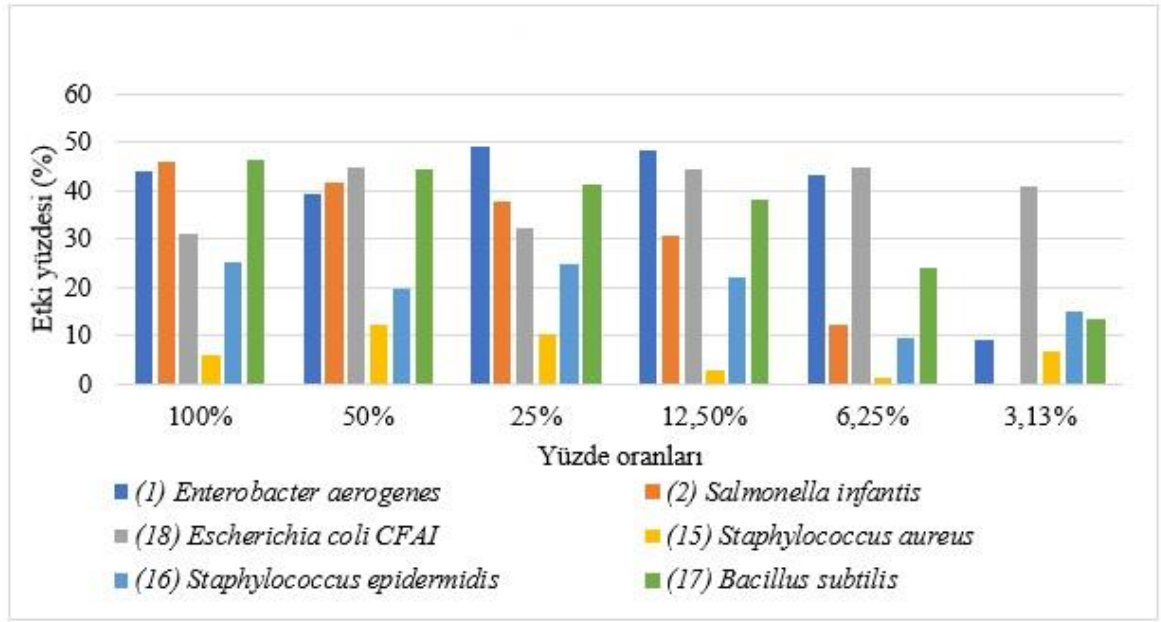
Yeşil sentezlenen AgNP'nin, IC₅₀ değeri HUVEC hücre hattı için 0,04 µg/ml iken bitki ekstraktının IC₅₀ değeri 18,4 µg/ml'dir.

4.5 İstatistiksel Analiz Sonuçları

Antibiyofilm oluşumunda farklı bitki ekstrakt yüzdelerinin uygulamalarında elde edilen verilerin tanımlayıcı istatistik bulguları verilmiştir. Tanımlayıcı istatistikte varyans analizi yapılmıştır. Bu bulgulara göre en yüksek varyans % 6,25 oranında 329,745 bulunurken, en düşük varyans ise %25 oranında 185,617 olarak belirlenmiştir. Skewness testinde ise %6,25 ve %3,13 oranlarında pozitif bir sonuç elde edilmiştir. Kurtosiste ise %100, %25, % 12,5 ve %3,13 oranlarında pozitif sonuçlar bulunmuştur.

Antibiyofilm oluşumunda farklı bitki ekstrakt yüzdelerinin Pearson korelasyon testi bulgularına göre uygulama yüzdelerinin içerisinde incelendiğinde çalışmada kullanılan mikroorganizmalar ile istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p < 0.01$). Uygulama yüzdeleri içerisinde ise %100 ile %50 ($p = 0.876$), ve %12,5 ($p = 0.815$) arasında olumlu yönde anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Aynı şekilde %100 uygulama ile %25 uygulama arasında $p = 0.947$ oranında anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.01$). Çalışmada %50 ile %25 ($p = 0.846$) ve %12,5 ($p = 0.893$) arasında, ayrıca %12,5 ile %6,25 ($p = 0.910$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Antibiyofilm oluşumunda bitkinin farklı yüzdelerdeki etkisini gösteren grafik Şekil 4.14 'de verilmiştir. Çalışmada en yüksek oranların *E.aerogenes* ve *B. subtilis* suşlarına karşı elde edildiği görülmektedir. En düşük etkiyi ise *S. aureus* suşuna karşı elde edilmiştir (Şekil 4.14).



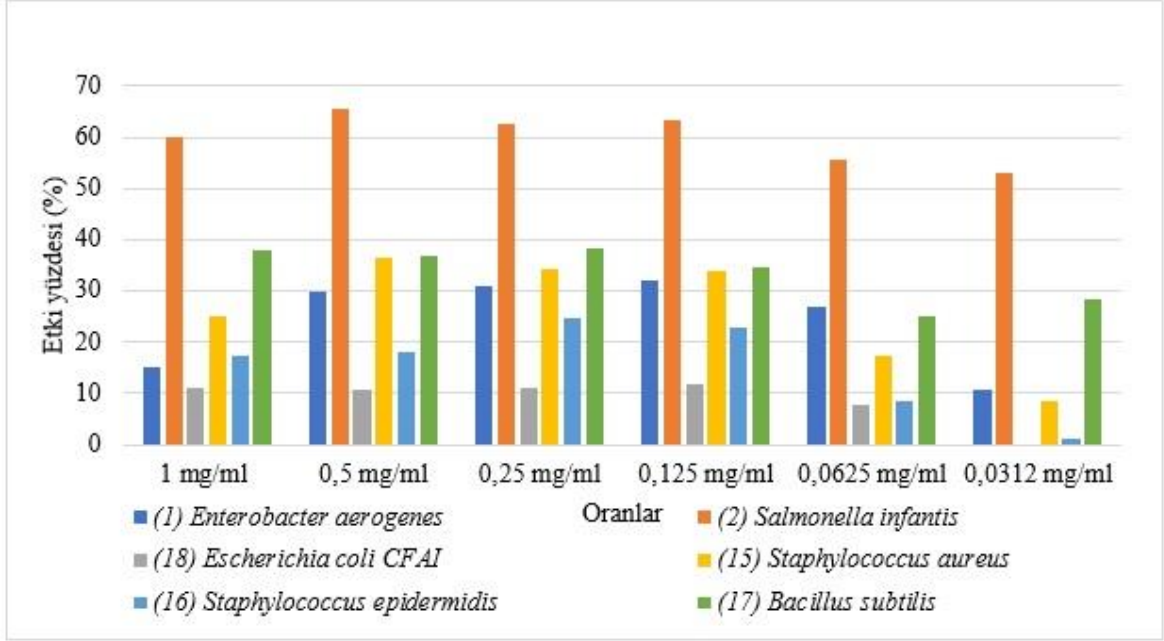
Şekil 4. 14: Antibiyofilm oluşumunda bitki ekstraktının farklı yüzde etki grafiği.

Bitki ekstraktının antibiyofilm oluşumunda ki mikrororganizmalardan elde edilen verilerin tanımlayıcı istatistik bulgularına göre *S.aureus*, *S.epidermidis* ve *E.coli* suşlarında varyans düşük bulunurken diğer suşlarda daha yüksek varyanslar elde edilmiştir.

Bitki ekstraktının antibiyofilm oluşumunda ki mikrororganizmalardan elde edilen verilerin pearson korelasyon testi bulgularına göre; çalışmada yüzde uygulamalar ile suşlar arasında incelendiğinde *S. infantis* ($p=-0.959$) suşu ve *B. subtilis* ($p=-0.939$) suşu negatif yönde anlamlı bir korelasyon gösterdiği bulunmuştur ($p<0.01$). *S. infantis* suşu ile *B. subtilis* suşu arasında da pozitif yönde anlamlı korelasyon olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$). Çalışmada kullanılan diğer suşların arasında korelasyon bulunmadığı görülmektedir ($p<0.01$).

Antibiyofilm oluşumunda farklı AgNP uygulama oranlarının pearson korelasyon testi bulguları verilmiştir. Mikroorganizma suşlarının uygulamalar ile bir korelasyon göstermediği bulunmuştur. Uygulama oranları ise kendi içerisinde anlamlı korelasyonun bulunduğu istatistiki olarak belirlenmiştir. Çalışmada sadece 1mg/ml uygulaması ile 0.0625 mg/ml ($p=0.888$) uygulaması arasında $p<0.05$ oranında anlamlı korelasyon olduğu bulunmuştur. Diğer uygulamalar arasında ise $p<0.01$ oranında yüksek oranda istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç bize uygulamalar arasında elde edilen verilerin paralel olduğunu korelasyon analizi ile doğrulanmıştır.

Antibiyofilm oluşumunda farklı AgNP uygulama oranlarının mikroorganizmadaki etkinliklerinin gösterilmesi Şekil 4.15'te verilmiştir. *S. infantis* suşuna karşı en yüksek antibiyofilm özelliği gösterdiği görülmektedir. En düşük etki ise *E.coli* suşuna karşı bulunmuştur.



Şekil 4. 15: Antibiyofilm oluşumunda farklı AgNP oranlarının mikroorganizmalardaki yüzde etki grafiği.

AgNP'nin antibiyofilm oluşumunda mikroroganizmaların etkinliği pearson korelasyon testi yapılarak incelenmiştir. Çalışmada uygulama oranları ile *B. subtilis* suşu arasında negatif yönde ($p=-0.838$) istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). *S. infantis* suşu ile *E. coli* ($p=0.845$) ve *S. epidermidis* ($p=0.893$) suşu arasında anlamlı bir korelasyon olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). *S. infantis* suşu ile *S.aureus* suşu arasında yüksek oranda anlamlı korelasyon olduğu belirlenmiştir ($p=0.988$). *E. coli* suşu ile *S.aureus* ($p=0.884$) ve *S. epidermidis* ($p=0.912$) suşu arasında istatistiki olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). *S. epidermidis* suşu ile *B. subtilis* suşu arasında istatistiki olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0.812$).

Varyans analizlerinde ise uygulama oranlarında birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Uygulama miktarı 0,125 mg/ml oranına kadar düzenli bir azalma olduğu belirlenmiştir.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada, *Ruscus aculeatus* L. yaprak ekstraktının ve yeşil sentez yöntemiyle sentezlenen AgNP' nin test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları farklılık göstermektedir. Bitki ekstraktının antimikrobiyal sonuçlarına göre; disk difüzyon yönteminde hazırlanan konsantrasyonda elde edilen sonuçlar birbirine yakın gözlemlenirken, %100' lük bitki ekstraktının tüm mikroorganizmalara karşı inhibe edici etkisinin olmadığı ve AgNP' nin test mikroorganizmalarına karşı inhibe edici etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Antibiyofilm sonuçlarına göre ise her iki maddenin de biyofilm oluşumunu inhibe ettiği gözlemlendi ve bunun yanı sıra sitotoksik aktivite çalışmalarında belirlenen konsantrasyonlarda bitki-AgNP kompleksinin MCF-7 ve HUVEC hücre hattı üzerinde en düşük konsantrasyon değeri 10^{-3} µg/ml olarak saptanmıştır ve ekstraktın MCF-7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı ancak HUVEC hücre hattı üzerinde en düşük konsantrasyon 10^{-3} µg/ml olduğu gözlemlenmiştir.

Ruscus cinsi geleneksel olarak geniş farmakolojik özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır. *Ruscus* türlerinin yeraltı kısımları, vazokonstriktif ve venotonik etkileriyle bilinir. *Ruscus aculeatus* L. bitkisinden elde edilen çeşitli ürünler varis, hemoroid, kronik venöz yetmezlik ve ortostatik hipotansiyon tedavisi için Avrupa pazarlarında mevcuttur. Fitokimyasal bakış açısından, steroidal saponinler ve bunların aglikonları, *Ruscus* cinsi üyelerinin gözlemlenen kardiyovasküler ve diğer farmakolojik aktivitelerinden sorumlu metabolitler olarak kabul edilir. Yağ asitleri ve flavonoidler, cinsin diğer ana bileşenleridir (Nazemiyeh vd., 2018). Hadžifejzović ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, *Ruscus aculeatus* L. ve *Ruscus hypoglossum* L. özütlerinin mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak antimikrobiyal aktivitelerini incelenmiştir. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella typhimurium* ve *Escherichia coli* mikroorganizmalarına karşı etkilerine bakılmış ve test edilen bileşiklerin tümünün MİK değerleri 0.05 - 0.2 mg/ml arasında değişen ve MBK değerleri ise 0.05 - 0.4 mg/ml arasında değiştiği belirlenmiştir. Toplam fenolik içerik (TPC), Folin - Ciocalteu (FC) reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. Antioksidan aktiviteyi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi ile belirlemiştirlerdir. Çalışma sonuçlarında, *Ruscus* ekstraktlarının ve

izole edilmiş bileşiklerin antibakteriyel ve özellikle antifungal aktivitesinin karşılaştırılabilir olduğunu ve bazı durumlarda standart ilaçlardan daha iyi olduğunu belirlemişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, bitki ekstraktının antimikrobiyal aktivitesi belirlemek için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır ve bitki ekstraktı *E. aerogenes* ATCC 13048, *S. infantis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* DSMZ 50071, *S. kentucky*, *E. faecalis* ATCC 29212, *L. innocua*, *S. enteritidis* ATCC 13075, *E. durans*, *S. typhimurium*, *S. marrescens* ATCC 13048, *S. epidermidis* DSMZ 20044, *B. subtilis* DSMZ 1971 mikroorganizmalarına karşı inhibisyon zonu gösterirken, *S. aureus* ATCC 25923 ve *E. coli* CFAI ATCC 25922 mikroorganizmalarına karşı herhangi bir inhibisyon zonu göstermemiştir. MİK ve MBK değerlerinde ise bitki ekstraktının tüm mikroorganizmalara karşı inhibe edici etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Çalışma da kullanılan %100' lük ekstraktın, AgNP sentezi için kullanılacak ekstrakt protokolüne göre hazırlanmış olmasından dolayı bu sonuçların elde edildiği düşünülmektedir. Eğer toplam fenolik bileşikler farklı metotlarla belirlenir ve bu yöntemler uygulanırsa daha iyi antimikrobiyal sonuçların alınacağı düşünülmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlarda AgNP'nin disk difüzyon sonuçlarında etki gözlemlenmemesinin nedeninin nanopartiküllerin suda çözünmediği için diskler üzerinde emilim gerçekleşmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bitki ekstraktının MİK ve MBK sonuçlarında etki olmaması hazırlanan ekstraksiyon işleminde distile su kullanıldığı için verimliliğin düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İleri ki çalışmalarda ekstraksiyon işlemi sırasında metanol veya etanol gibi çözücüler kullanılarak çalışma denenebilir.

Baydoun ve arkadaşlarının (2012) yaptıkları çalışmada, *Ruscus aculeatus* L. ve *Pleurotus ostreatus* ekstraktlarının insan akut T hücreli lenfositik lösemi modeli olan Jurkat hücre hattının hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerindeki etkisini MTT ve Annexin V-FITC test kiti ile tespit etmişlerdir. *R. aculeatus* ve *P. ostreatus* özütlerinin hem Jurkat hücreleri hem de insan birincil lenfositleri için toksik olduğunu ve LDH salınımı ve MTT deneylerinde Jurkat hücreleri için birincil lenfositlere göre önemli ölçüde daha toksik olduğu belirlemişlerdir. Çalışmamızda da, bitki ekstraktının sitotoksik aktivitesi insan meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) üzerinde MTT yöntemi ile tespit edilmiştir. Sonuçlara göre bitki-AgNP kompleksinin MCF-7 ve HUVEC hücre hattı üzerinde en düşük konsantrasyon değeri 10^{-3} µg/ml olarak saptanmıştır. Ancak

bitki ekstraktının MCF-7 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı ve HUVEC hücre hattı üzerinde en düşük konsantrasyon değerinin 10^{-3} µg/ml olduğu gözlemlenmiştir.

Awwad ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmada, *Ceratonia siliqua* L. yaprak ekstraktı kullanılarak, sulu gümüş nitrat çözeltisi ile gümüş nanopartiküllerin (AgNPs) yeşil sentezini yapmışlardır. AgNP'lerin karakterizasyonu UV-vis spektroskopisi, SEM, FT-IR, XRD ve Atomik Absorpsiyon Spektroskopisi ile yapmışlardır. UV-vis spektrumları, 420 nm'de sentezlenmiş gümüş nanopartiküller için yüzey plazmon rezonansı vermiştir ve ortalama nanopartikül boyutu farklı konsantrasyonlarda 5-40 nm arasında değiştiğini göstermişlerdir. Yaptığımız çalışmaya göre yeşil sentez yöntemiyle hazırlanan AgNP'lerin Uv-vis spektrumları 426 nm'de yüzey plazmon rezonansı vermiştir ve ortalama nanopartikül boyutu Debye-Scherrer formülüne göre 32,56 nm olarak hesaplanmıştır.

Yapılan literatür araştırmalarına göre *R. aculeatus* L. bitkisi kullanılarak yeşil sentez metodu ile AgNP'lerin sentezinin gerçekleştirilmemesine ve bunun yanında antimikrobiyal, antibiyofilm ve antikanser aktivite çalışmalarına rastlanılmamıştır. Ancak çim atıklarını kullanarak yeşil sentez yöntemi ile AgNP sentezlenmesini ve antimikrobiyal, antikanser çalışmalar incelendiğinde, AgNP'lerin *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*'ye karşı MİK değeri yaklaşık 3 µg/ml olarak hesaplamışlardır ve *Fusarium solani*'ye karşı en yüksek inhibitör etkisi 20 µg/ml AgNP konsantrasyonunda % 90'a yakın olduğunu belirlemişlerdir. Kanser hücresi büyümesi üzerinde inhibe edici bir etkiye, AgNP konsantrasyonunun 5 µg/ml'ye yükseltilmesiyle ulaştıklarını ve bu sayede kanser hücrelerinin hayatta kalması yaklaşık % 30 azaldığını göstermişlerdir. Yaptığımız çalışmaya göre sentezlenen AgNP'nin 15 farklı test mikroorganizmasına karşı MİK değerleri 0.03-0,12 mg/ml arasında gözlemlenirken MBK değerleri 0,03-0,25 mg/ml arasında farklılık göstermektedir. %100'lük bitki ekstraktının ise tüm mikroorganizmalara karşı inhibe edici etkisinin bulunmadığı gözlemlenmiştir.

Biyosentezlenmiş AgNP'nin MCF-7 hücre hattı üzerinde denenen 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} ve 10^{-9} µg/ml'lik konsantrasyonlarında en düşük konsantrasyon değeri 10^{-3} µg/ml olarak belirlenirken diğer konsantrasyonlarda sitotoksik aktivite daha az gözlemlenmiştir. Bitki ekstraktında ise, uygulanan konsantrasyonların sitotoksik etkinin olmadığı görüldü. Bu sonuç, biyosentezlenmiş AgNP'lerin MCF-7'ye karşı sitotoksik etkisinin daha güçlü

olduğunu göstermektedir (Azizi vd., 2017). Yeşil sentezlenen AgNP' nin, IC₅₀ değeri MCF-7 hücre hattı için 0,06 µg/ml iken bitki ekstraktının IC₅₀ değeri 6,91 µg/ml'dir.

HUVEC hücre hattına uygulanan AgNP ve bitki ekstraktına ait 10⁻³, 10⁻⁴ ve 10⁻⁵ µg/ml'lık konsantrasyonlar kontrol grubu ile kıyaslandığında, uygulanan AgNP konsantrasyonlarında belirlenen en düşük değer 10⁻³ µg/ml'dir. Uygulanan diğer konsantrasyonlarında sitotoksik etkisinin daha az olduğu görüldü. Bitki ekstraktında ise, kontrol grubu ile kıyaslandığında belirlenen en düşük değer 10⁻³ µg/ml'dir ve bu değere kıyasla 10⁻⁴ ve 10⁻⁵ µg/ml'lık konsantrasyon değerlerinin daha az sitotoksik etkiye sahip olduğu görüldü. Yeşil sentezlenen AgNP'nin, IC₅₀ değeri HUVEC hücre hattı için 0,04 µg/ml iken bitki ekstraktının IC₅₀ değeri 18,4 µg/ml'dir. Bitkinin etken maddeleri belirlendiğinde hem antimikrobiyal hem de antikanser aktivitenin daha yüksek çıkacağı tahmin edilmektedir.

AgNP'ler üzerine yapılan mevcut çalışmalar, çeşitli insan patojenik Gram-pozitif, Gram-negatif bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliklerinin olduğunu göstermiştir. Mandal ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonuçlarına göre, AgNP'lerin *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans*' a karşı, doza bağlı bir şekilde sırasıyla %96, %90 ve %75 minimum inhibisyon konsantrasyonda (MİK değeri 250 µM) etkili antibiyofilm aktivite göstermiştir. AgNP' lerin antimikrobiyal etkisinin, hücre zarı geçirgenliğinin değiştirilmesi, proteinler ve DNA gibi makromoleküller ile etkileşim yoluyla olduğuna ve dolayısıyla replikasyon mekanizmasını ve hücresel süreçleri etkilediğine inanılmaktadır. Yaptığımız çalışmada da AgNP' nin en düşük konsantrasyonunda (0,03 mg/ml) *E. coli* bakteri suşu haricindeki diğer tüm mikroorganizmaların biyofilm oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan *R. aculeatus* L. bitkisinin yeşil sentez metodu ile AgNP'lerin sentezlenmemesi ve antimikrobiyal, antibiyofilm gibi antikanser aktivitelerinin incelenmemiş olması çözümü bulunmaya çalışılan kanser hastalığı için bitkisel alternatif imkânı sağlayacaktır. İleri ki çalışmalarda farklı kanser türleri üzerinde hem bitki ekstraktlarının hemde AgNP' lerin etki mekanizmasını aydınlatmak için moleküler düzeyde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sayede yeni terapötik ajanların kullanımına imkân sağlanabilir. Aynı zamanda biyomedikal alanda etkili bir antikanser, antibiyofilm ve antimikrobiyal ajan tasarımları için umut vadetmektedir.

BÖLÜM 6

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışmasına başlamadan önce *R. aculeatus* L. ekstraktının antibiyofilm aktivite çalışmalarına ve bitkinin yaprak ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle üretilen AgNP'nin antibiyofilm, antimikrobiyal ve antikanser aktivite çalışmalarına yapılan literatür taramalarında rastlanılmamıştır. Bitkinin yaprak kısmı kullanılarak hazırlanan ekstraktın ve biyosentezi yapılan AgNP'nin farklı metotlar kullanarak antibiyofilm, antimikrobiyal ve antikanser aktiviteleri incelenmiştir. Çalışılan ekstrakt ve AgNP literatür çalışmalarındaki benzer verilerle karşılaştırarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

Bu çalışma ile beraber literatür çalışmalarında da belirtildiği gibi bitkilerin antibiyofilm, antibakteriyel ve antikanser aktivitelerini etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır. Bunlar çalışmada kullanılan test mikroorganizmaları, sentez yöntemi, kullanılan konsantrasyon aralıkları ve ekstrakt hazırlama protokolleri gibi faktörler olabilmektedir. Bu sebeplerden dolayı yapılan çalışmada önceki çalışmalara göre farklı sonuçlar elde edilebilmektedir.

Son zamanlarda nanopartiküller, kronik hastalık teşhisinde terapötik ajanların verilmesi, deri ve yanık yaralarında bakteriyel enfeksiyonların azaltılması, gıda ve giyim endüstrisinde antimikrobiyal ajan olarak bakteriyel kolonizasyonun önlenmesi için başarıyla kullanılmaktadır.

Nanopartiküllerin üretimi için bitkilerin son zamanlarda artan keşfi, kimyasal, fiziksel sentezlere göre avantajlar eklemiştir. Çünkü kimyasal ve fizyolojik yöntemlerin kompleks bir yapıya sahip olması, yüksek maliyetli olması ve çevre dostu olmaması bilim insanlarını biyolojik yöntemlere yönlendirmektedir. Biyolojik yöntemler basit, daha ucuz, toksik madde kullanımı gerektirmediği için biyomedikal ve farmakolojik uygulamalara daha uygundur ve ticari üretime elverişlidir. Son yıllarda ortaya çıkan biyofilm oluşturma yeteneklerinden dolayı patojenik bakterilerin antimikrobiyal ajanlara karşı direnci, büyük bir sağlık sorunu oluşturmaktadır ve antibiyotiklere karşı mikrobiyal direnci azaltmak için geniş bir spektrum aktivitesine sahip gümüş bazlı nanopartiküllerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapılan çalışmalar AgNP'lerin gıda, ilaç endüstrilerinde kullanılabileceğini ve kanser tedavisi için alternatif tıp olarak kabul edilebileceğini göstermiştir. Bunun yanı sıra *bitki*+AgNP komplekslerinin potansiyel bir antioksidan, antimikrobiyal ve sitotoksik aktivitesine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Yaptığımız çalışmanın sonuçlarına göre, bitki ekstraktından daha iyi sonuçlar almak için farklı ekstrakt hazırlama metotları kullanılabilir ve distile su yerine metanol, etanol gibi çözücüler kullanılabilir. Ayrıca bitkinin etken maddeleri farklı metotlarla belirlendiğinde hem antimikrobiyal hem de antikanser aktivite sonuçlarının daha yüksek çıkacağı öngörülmektedir. Çalışmamız moleküler çalışmalarla devam ettirilebilir ve araştırmacılara ileri ki çalışmalar için yeni bir alan oluşturabilmektedir.



KAYNAKLAR

- Adebayo-Tayo, B., Salaam, A. ve Ajibade, A. (2019). Green synthesis of silver nanoparticle using *Oscillatoria Sp.* extract, Its Antibacterial, Antibiofilm potential and Cytotoxicity activity. *Heliyon*, 5(10): e02502.
- Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M.I., Kumar, R. ve Sastry, M. (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 28(4): 313-318.
- Ahn, E.Y., ve Park, Y. (2020). Anticancer prospects of silver nanoparticles green synthesized by plant extracts. *Materials Science and Engineering: C*, 116, 111253.
- Akhtar, M.S., Panwar, J. ve Yun, Y.S. (2013). Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 1(6): 591-602.
- Alt, V., Bechert, T., Steinrücke, P., Wagener, M., Seidel, P., Dingeldein, E., Domann, E. ve Schnettler, R. (2004). An in vitro assessment of the Antibacterial properties and Cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*, 25(18): 4383-4391.
- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L. ve Boyd, M.R. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research*, 48(3): 589-601.
- Allison, D.G. (2003). *The Biofilm Matrix*. *Biofouling*, 19(2): 139-150.
- Ateşoğlu, İ. (2008). Bartın Balamba Orman İçi Dinlenme Yeri Rekreasyon Hizmetlerinin Ekonomik Değerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Mühendisliği Anabilim Dalı, Zonguldak, 24 s.
- Awwad, A.M., Salem, N.M. ve Abdeen, A.O. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using carob leaf extract and its Antibacterial activity. *International Journal of Industrial Chemistry*, 4(1): 29.
- Azizi, M., Ghourchian, H., Yazdian, F., Bagherifam, S., Bekhradnia, S. ve Nyström, B. (2017). Anti-cancerous effect of albumin coated silver nanoparticles on MDA-MB 231 human breast cancer cell line. *Scientific Reports*, 7(1): 1-18.
- Bagherzade, G., Tavakoli, M.M. ve Namaei, M.H. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(3): 227-233.
- Balaban, M. (2018). Meyve Atığı Ekstraktlarının Antibiyofilm Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gebze, 4-5 s.

- Banerjee, P., Satapathy, M., Mukhopahayay, A. ve Das, P. (2014). Leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles from widely available Indian plants: synthesis, characterization, antimicrobial property and toxicity analysis. *Bioresources and Bioprocessing*, 1(1): 3.
- Bar, H., Bhui, D.K., Sahoo, G.P., Sarkar, P., De, S.P. ve Misra, A. (2009). Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 339(1-3): 134-139.
- Bassil, N.M., Abdel Massih, R., El Chami, N., Smith, C.A. ve Baydoun, E. (2012). *Pleurotus ostreatus* and *Ruscus aculeatus* extracts cause non-apoptotic Jurkat cell death. *Journal of Plant Studies* Vol.1, No.1.
- Behravan, M., Panahi, A.H., Naghizadeh, A., Ziaee, M., Mahdavi, R. ve Mirzapour, A. (2019). Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leaf and root aqueous extract and its Antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 124, 148-154.
- Beykaya, M., ve Çağlar, A. (2016). Bitkisel özütler kullanılarak gümüş nanopartikül (agNP) sentezlenmesi ve antimikrobiyal etkinlikleri üzerine bir araştırma. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 16(3): 631-641.
- Çelikboyun, P. (2015). *Ruscus aculeatus* L. ve *Punica granatum* L. Bitkilerinin Ekstrelerinin ve Boyanmış Kumaş Örneklerinin Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, 20 s.
- Çoşkunçay, S. (2017). Gümüş Nanopartiküllerin Atkestanesi (*Aesculus hippocastanum*) Yaprak Özütü İle Biyosentezi, Biyolojik Aktivite Ve İlaç Salınım Özelliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, 12 s.
- Das, R.K., Gogoi, N. ve Bora, U. (2011). Green synthesis of gold nanoparticles using nycnthes arbortristis flower extract. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(5): 615-619.
- Dıblan, S., Kadiroğlu, P., ve Aydemir, L.Y. (2018). FT-IR spectroscopy characterization and chemometric evaluation of legumes extracted with different solvents. *Food and Health*, 4(2): 80-88.
- Donlan, R. M. (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*, 7(2): 277.
- Duncan, T.V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(1): 1-24.

- Erci, F. (2018). Yeşil Sentez İle Elde Edilen Metal Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Ve Antibiyofilm Etkinliklerinin Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, İstanbul. 12 s.
- Esmeray, E. ve Özata, O. (2019). Nanopartiküllerin çevre mühendisliğinde kullanımı ve temel laboratuvar malzemeleri ile gümüş nanopartikül (AgNPs) sentezi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (16): 521-527.
- Fabrega, J., Renshaw, J.C. ve Lead, J.R. (2009). Interactions of silver nanoparticles with *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Science and Technology*, 43(23): 9004-9009.
- Faydaoğlu, E. ve Sürücüoğlu, M.S. (2013). Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal, antioksidan aktiviteleri ve kullanım olanakları. *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6(2): 233-265.
- Franco-Molina, M.A., Mendoza-Gamboa, E., Sierra-Rivera, C.A., Gómez-Flores, R.A., Zapata-Benavides, P., Castillo-Tello, P., Alcocer-González, J.M., Miranda-Hernández, D.F., Tamez-Guerra, R.S. ve Rodríguez-Padilla, C. (2010). Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 29(1): 148.
- Grieve, M. (1984). *A Modern Herbal*. Penguin, London, UK.
- Gupta, K., Hazarika, S.N., Saikia, D., Namsa, N.D. ve Mandal, M. (2014). One step green synthesis and Antimicrobial and Antibiofilm properties of *Psidium guajava* L. leaf extract-mediated silver nanoparticles. *Materials Letters*, 125, 67-70.
- Gurunathan, S., Han, J.W., Kwon, D.N. ve Kim, J.H. (2014). Enhanced Antibacterial and Antibiofilm activities of silver nanoparticles against gram-negative and gram-positive bacteria. *Nanoscale Research Letters*, 9(1): 1-17.
- Gün, İ. ve Ekinci, F.Y. (2009). Biyofilmler: Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam. *Gıda*, 34(3): 165-173.
- Gürmen, S. Ve Ebin, B. (2008). Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri-1. İstanbul Teknik Üniversitesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, *Metalurji Dergisi*, 150: 31-38.
- Hadžifejzović, N., Soković, M., Glamočlija, J., Stojković, D., Petrović, S., Kukić-Marković, J. ve Nahrstedt, A. (2009). Antimicrobial activity of selected extracts and some compounds from *Ruscus aculeatus* L., *R. hypoglossum* L. and *R. alexandrinus* garsault (Ruscaceae). *Planta Medica*, 75(09): PJ38.
- Hadžifejzović, N., Kukić-Marković, J., Petrović, S., Soković, M., Glamočlija, J., Stojković, D. ve Nahrstedt, A. (2013). Bioactivity of the extracts and compounds of *Ruscus aculeatus* L. and *Ruscus hypoglossum* L. *Industrial Crops And Products*, 49, 407-411.

- Heydari, R. ve Rashidipour, M. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles using extract of Oak fruit hull (jaft): synthesis and in vitro cytotoxic effect on MCF-7 cells. *International Journal of Breast Cancer*.
- Hood, S.K. ve Zottola, E.A. (1995). Biofilms in Food Processing. *Food Control*, 6(1): 9-18.
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol.
- Jahan, I. (2019). Green Synthesis of Metal Nanoparticles, Their Chemical and Biochemical Characterizations. Phd Thesis. Yıldız Technical University Graduate School of Natural and Applied Sciences. Department of Bioengineering. Program of Bioengineering. İstanbul. 99 p.
- Kalishwaralal, K., Barathmanikant, S., Pandian, S.R.K., Deepak, V. ve Gurunathan, S. (2010). Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(2): 340-344.
- Kaviya, S., Santhanalakshmi, J., Viswanathan, B., Muthumary, J. ve Srinivasan, K. (2011). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Citrus sinensis* peel extract and its Antibacterial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79(3): 594-598.
- Khatami, M., Sharifi, I., Nobre, M.A., Zafarnia, N. ve Aflatoonian, M.R. (2018). Waste-grass-mediated green synthesis of silver nanoparticles and evaluation of their Anticancer, Antifungal and Antibacterial activity. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 11(2): 125-134.
- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.Y., Kim, Y.K., Lee, Y.S., Jeong, D.H. ve Cho, M.H.(2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1): 95-101.
- Klaus-Joerger, T., Joerger, R., Olsson, E. ve Granqvist, C. (2001). Bacteria as workers in the living factory: metal accumulating bacteria and their potential for materials science. *Trends Biotechnol*, 19 (1): 15–20.
- Krishnakumar, K., Dineshkumar, B. ve Ramesh, P.R. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using *Hydnocarpus pentandra* leaf extract: In-vitro Cyto-Toxicity studies against MCF-7 cell line. *Journal of Young Pharmacists*, 10(1): 16.
- Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P. T. ve Mohan, N. (2010). Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76(1): 50-56.
- Kuppusamy, P., Yusoff, M.M., Maniam, G.P. ve Govindan, N. (2016). Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications—an updated report. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(4): 473-484.

- Luís, Â., Domingues, F. ve Duarte, A.P. (2011). Bioactive compounds, RP-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some *Portuguese* shrub species extracts. *Nat. Prod. Commun*, 6, 1863–1872.
- Lu, X., Wang, J., Al-qadiri, H.M., Ross, C.F., Powers, J.R., Tang, J. ve Rasco, B.A. (2011). Determination of total phenolic content and Antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and Shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 129(2): 637–644.
- Mariadoss, A.V.A., Ramachandran, V., Shalini, V., Agilan, B., Franklin, J. H., Sanjay, K. ve Ernest, D. (2019). Green synthesis, characterization and Antibacterial activity of silver nanoparticles by *Malus domestica* and its cytotoxic effect on (MCF-7) cell line. *Microbial Pathogenesis*, 135, 103609.
- Markowska, K., Grudniak, A.M. ve Wolska, K.I. (2013). Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochimica Polonica*, 60(4): 523–530.
- Martinez-Gutierrez, F., Boegli, L., Agostinho, A., Sánchez, E.M., Bach, H., Ruiz, F.ve James, G. (2013). Antibiofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Biofouling*, 29(6): 651-660.
- Mellado-Mojica, E., Seeram, N.P. ve Lopez, M.G. (2016). Comparative analysis of maple syrups and natural sweeteners: Carbohydrates composition and classification (differentiation) by HPAEC-PAD and FTIR Spectroscopy-chemometrics. *J. Food Compos. Anal*, 52, 1–8.
- Mimaki, Y., Kuroda, M., Kameyama, A., Yokosuka, A. ve Sashida, Y. (1998). Steroidal saponins from the underground parts of *Ruscus aculeatus* and their Cytostatic activity on HL-60 cells. *Phylorhmcstry*, Vol. 48, No. 3. pp. 485-493.
- Mittal, A.K., Chisti, Y. ve Banerjee, U.C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2): 346-356.
- Mohanty, S., Mishra, S., Jena, P., Jacob, B., Sarkar, B. ve Sonawane, A. (2012). An investigation on the Antibacterial, Cytotoxic and Antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(6): 916-924.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and Cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1): 55-63.
- Nazemiyeh, H., Zengin, G., Mehrad, H., Farhoudi, M. ve Bahadori, M.B. (2020). LC-MS/MS-based steroidal saponins profiling and biological activities of *Ruscus hyrcanus* woronow. *European Journal Of Integrative Medicine*, 101245.
- Nematollahi, F. (2015). Silver nanoparticles green synthesis using aqueous extract of *Salvia limbata* CA mey. *International Journal of Biosciences*, 6(2): 30-35.

- Nesrin, K., Yusuf, C., Ahmet, K., Ali, S.B., Muhammad, N. A., Suna, S. ve Fatih, Ş. (2020). Biogenic silver nanoparticles synthesized from *Rhododendron Ponticum* and their Antibacterial, Antibiofilm and Cytotoxic activities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 179, 112993.
- Özbek, H. (2005). Cinsel ve jinekolojik sorunların tedavisinde bitkilerin kullanımı. *Van Tıp Dergisi*, 12 (2): 170-174.
- Padera, R.F. (2006). Infection in ventricular assist devices: The Role of Biofilm. *Cardiovascular Pathology*, 15(5): 264-270.
- Patil, M.P. ve Kim, G.D. (2017). Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind Antibacterial activity of silver and Anticancer activity of gold nanoparticles. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 101(1): 79-92.
- Pelgrift, R.Y. ve Friedman, A.J. (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65 (13-14), 1803-1815.
- Pereira, L., Mehboob, F., Stams, A.J., Mota, M.M., Rijnaarts, H.H. ve Alves, M.M. (2015). Metallic nanoparticles: Microbial synthesis and unique properties for biotechnological applications, bioavailability and biotransformation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(1): 114-128.
- Pitkethy, M.J. (2003). Nanoparticles as building blocks?. *Materials Today*, 6(12): 36-42.
- Raghunandan, D., Ravishankar, B., Sharanbasava, G., Mahesh, D.B., Harsoor, V., Yalagatti, M. S. ve Venkataraman, A. (2011). Anti-cancer studies of noble metal nanoparticles synthesized using different plant extracts. *Cancer Nanotechnology*, 2(1-6): 57-65.
- Rai, M., Yadav, A. ve Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1): 76-83.
- Rai, M.K., Deshmukh, S.D., Ingle, A.P. ve Gade, A.K. (2012). Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5): 841-852.
- Ramar, M., Manikandan, B., Marimuthu, P.N., Raman, T., Mahalingam, A., Subramanian, P. ve Munusamy, A. (2015). Synthesis of silver nanoparticles using *Solanum trilobatum* fruits extract and its Antibacterial, Cytotoxic activity against human breast cancer cell line MCF-7. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 140, 223-228.
- Ramsden, J.J. (2005). What is nanotechnology? Department of Advanced Materials, Cranfield University, Bedfordshire, UK. *Nanotechnology Perceptions*, 1. 3-17.
- Ravichandran, R. (2010). Nanotechnology applications in food and food processing: Innovative green approaches, opportunities and uncertainties for global market. *International Journal of Green Nanotechnology: Physics and Chemistry*, 1(2): P72-P96.

- Razavi, M. (2017). Biomaterials for Tissue Engineering (Vol. 4). *Bentham Science Publishers*.
- Se, K.W., Ghoshal, S.K., Wahab., R.A., Ibrahim, R.K.I. ve Lani, M.N. (2018). A simple approach for rapid detection and quantification of adulterants in stingless bees (Heterotrígona Ítama) honey. *Food Res. Int.* 105, 453–460.
- Seil, J.T. ve Webster, T.J. (2012). Antimicrobial applications of nanotechnology: Methods and literature. *International Journal Of Nanomedicine*, 7, 2767-2781.
- Silva, S.D., Feliciano, R.P., Boas, L.V. ve Bronze, M.R. (2014). Application of FTIR-ATR to moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and Antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 150, 489–493.
- Singh, A., Jain, D., Upadhyay, M.K., Khandelwal, N. ve Verma, H.N. (2010). Green synthesis of silver nanoparticles using *Argemone mexicana* leaf extract and evaluation of their Antimicrobial activities. *Dig J Nanomater Bios*, 5(2): 483-489.
- Singh, M., Singh, S., Prasad, S., ve Gambhir, I. S. (2008). Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3(3): 115-122.
- Sondi, I. ve Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1): 177-182.
- Stoimenov, P.K., Klinger, R.L., Marchin, G.L. ve Klabunde, K.J. (2002). Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 18(17): 6679-6686.
- Suman, T.Y., Rajasree, S.R., Kanchana, A. ve Elizabeth, S.B. (2013). Biosynthesis, characterization and cytotoxic effect of plant mediated silver nanoparticles using *Morinda citrifolia* root extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 106, 74-78.
- Şarışen, Ö. ve Çalışkan, D. (2005). Fitoterapi: Bitkilerle Tedaviye Dikkat. *Sted*, Cilt 14. Sayı 8: 182-187.
- Tanker, N., Koyuncu, M. ve Çoşkun, M. (2007). Farmasötik botanik. 3.basım, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:93, Ankara, 151 s.
- Temel, A. ve Eraç, B. (2018). Bakteriyel biyofilmler: Saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 48(1): 1-13.
- Tripathy, S., Rademan, S. ve Matsabisa, M.G. (2019). Effects of silver nanoparticle from *Dicoma anomala* Sond. root extract on MCF-7 cancer cell line and NF54 parasite strain: An in vitro study. *Biological Trace Element Research*. 1-13.
- Van der Zande, M., Undas, A.K., Kramer, E., Monopoli, M.P., Peters, R.J., Garry, D. ve Bouwmeester, H. (2016). Different responses of Caco-2 and MCF-7 cells to silver nanoparticles are based on highly similar mechanisms of action. *Nanotoxicology*, 10(10): 1431-1441.

- Vieira, A. (2010). A comparison of traditional Anti-inflammation and Anti-infection medicinal plants with current evidence from biomedical research: Results from a Regional Study. *Pharmacognosy Res.* 2, 293–29.
- Vithiya, K. ve Sen, S. (2011). Biosynthesis of nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(11): 2781.
- Yamanaka, M., Hara, K. ve Kudo, J. (2005). Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by Energy-filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11): 7589-7593.
- Yanık, F. (2019). *Triticum aestivum* L. (Buğday)'da Gümüş Nanopartikülleri ile Oluşturulmuş Programlı Hücre Ölümünün Belirlenmesi. Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 32 s.
- Yıldız, N. 2011. Gümüş Nanopartiküllerin Liken Özü ile Biyosentezi. Ankara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, Ankara.
- Yılmaz, G. (2012). Akdeniz Florasında Bulunan Tavşan Kirazı (*Ruscus aculeatus* L.) Türünün Çoğaltılması Ve Kesme Yeşillik Olarak Kullanılabilme Özelliklerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya, 5 s.
- Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z.S. ve Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today*, 20(5): 595-601.
- Wolfgang, L. (2007). Bottom-up Methods for Making Nanotechnology Products.
- Zaki, A. (2007). Processing and synthesis techniques for the preparation of nanomaterials.

