

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



**GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN ATKESTANESİ (*Aesculus hippocastanum*) YAPRAK ÖZÜTÜ İLE BİYOSENTEZİ,
BİYOLOJİK AKTİVİTE VE İLAÇ SALINIM
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Proje No: FYL-2015-5897

Tez Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP
Fen Fakültesi/ Biyoloji Bölümü

Seval ÇOŞKUNÇAY
Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Bölümü

Mart 2017

KAYSERİ

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN ATKESTANESİ
(*Aesculus hippocastanum*) YAPRAK ÖZÜTÜ İLE
BİYOSENTEZİ, BİYOLOJİK AKTİVİTE VE İLAÇ
SALINIM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Hazırlayan
Seval ÇOŞKUNÇAY**

**Danışmanlar
Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP
Prof. Dr. Fatih DUMAN**

Yüksek Lisans Tezi

**Mart 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.


Seval ÇOŞKUNÇAY

YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Gümüş Nanopartiküllerinin Atkestanesi (*Aesculus hippocastanum*) Yaprak Özütü ile Biyosentezi, Biyolojik Aktivite ve İlaç Salınım Özelliklerinin Belirlenmesi” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi 'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Seval ÇOŞKUNÇAY



Danışmanlar
Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP



Prof. Dr. Fatih DUMAN




Biyoloji Bölümü A.B.D. Başkanı
Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP ve Prof. Dr. Fatih DUMAN danışmanlığında Seval ÇOŞKUNÇAY tarafından hazırlanan “Gümüş Nanopartiküllerinin Atkestanesi (*Aesculus hippocastanum*) Yaprak Özü ile Biyosentezi, Biyolojik Aktivite ve İlaç Salmım Özelliklerinin Belirlenmesi” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

17/02/2017

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP

Üye : Doç. Dr. Ertuğrul YÜZBAŞIOĞLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. Selcen BABOĞLU AYDAŞ

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 14/03/2017 tarih ve 2017/13-93.. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

16.03.2017
Prof. Dr. Mehmet AKKURT
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi sayın danışman hocalarım Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP ve Prof. Dr. Fatih DUMAN' a teşekkürü bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarım sırasında karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımlarından dolayı Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. İsmail ÖÇSOY'a ve aynı laboratuvarı paylaştığımız Arş. Gör. Mithat GÜLLÜ' ye teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: FYL-2015-5897) teşekkür ederim.

Ayrıca; çalışmalarım süresince sabır göstererek beni daima maddi ve manevi destekleyen annem Sevgi ÖZDEŞ'e, babam Sedat ÖZDEŞ'e, kardeşim Aybüke Nur ÖZDEŞ'e ve değerli eşim Fatih ÇOŞKUNÇAY'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Seval ÇOŞKUNÇAY

Kayseri, Şubat 2017

**GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN ATKESTANESİ (*Aesculus hippocastanum*)
YAPRAK ÖZÜTÜ İLE BİYSENTEZİ, BİYOLOJİK AKTİVİTE VE İLAÇ
SALINIM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Seval ÇOŞKUNÇAY

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Şubat 2017
Danışmanlar: Doç. Dr. Fatma ÖZTÜRK KÜP
Prof. Dr. Fatih DUMAN**

ÖZET

Bu tez çalışmasında atkestanesi bitkisinin (*Aesculus hippocastanum*) yaprak özütü ile gümüş nanopartiküllerin (AgNP) biyosentezi gerçekleştirilerek karakterizasyonu yapılmıştır. Karakterizasyon sonucunda ~464 nm dalga boyunda spektrum gösteren, -29 mV elektriksel yüke sahip ve 50 ± 5 nm büyüklüğünde küresel boyutta nanopartiküllerin olduğu belirlenmiştir. Biyolojik AgNP'lerin yaprak özütü indirgenmesi sonucunda çeşitli fonksiyonel gruplara ait 3246, 2115, 1636, 1073, 589 cm^{-1} dalga boyunda spektrumlar tespit edilmiştir. AgNP'lerin, antimikrobiyal etkisi, serbest radikal giderim aktivitesi, pBR322 DNA ile etkileşimi ve ilaç salınım özellikleri *in vitro* ortamda incelenmiştir. Antimikrobiyal aktivite ölçümü için 14 bakteri ve 3 maya suşu kullanılmıştır. Biyolojik AgNP'lerin yalnızca bakteri suşlarına karşı etkili olduğu mayalar üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Serbest radikal giderim aktivitesi en yüksek konsantrasyonda (100 ppm) %54,72 olarak belirlenmiştir. Biyolojik AgNP'lerin pBR322 DNA ile olan etkileşimi sonucunda DNA yapısı üzerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. İlaç salınımı çalışmalarında resveratrol ile bağlanmış AgNP'lerden resveratrolün pH 7,4'de yaklaşık %33,3 oranında serbest kaldığı gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyosentez, AgNP, Biyolojik aktivite, Atkestanesi, Resveratrol

**BIOSYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES USING HORSE CHESTNUT
(*Aesculus hippocastanum*) LEAF EXTRACT, DETERMINATION OF BIOLOGIC
ACTIVITIES AND DRUG RELEASE PROPERTIES**

Seval COSKUNCAY

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M.Sc. Thesis, February 2017

Supervisor: Asst. Prof. Fatma OZTURK KUP

Prof. Dr. Fatih DUMAN

ABSTRACT

In this thesis study, biosynthesis and characterization of silver nanoparticles (AgNP) using the leaf extract of horse chestnut plant (*Aesculus hippocastanum*) and their characterisation was achieved. In the characterization result the nanoparticles with spherical size of 50 ± 5 nm had an electrical charge of -29 mV with a spectrum of ~ 464 nm. As a result of the leaf extract reduction of the biological AgNPs, spectra of 3246, 2115, 1636, 1073, 589 cm^{-1} wavelengths belonging to various functional groups were detected. The antimicrobial effect, the free radical scavenging activity, the interaction with pBR322 DNA and the drug release properties of AgNPs were investigated *in vitro*. A total of 14 bacteria and 3 yeast strains were used for antimicrobial activity measurement. It was determined that biological AgNPs have indicated effect only against bacterial strains and that there is no effect on yeast. The free radical scavenging activity was determined to be 54.72% at the highest concentration (100 ppm). No change was observed in the result of the interaction of biological AgNPs with pBR322 DNA. Resveratrol-bound AgNPs were found to release about 33.3% of resveratrol at pH 7.4 in drug release studies.

Key words: Biosynthesis, AgNP, Biological activity, Horse chestnut, Resveratrol

İÇİNDEKİLER

GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN ATKESTANESİ (*Aesculus hippocastanum*) YAPRAK ÖZÜTÜ İLE BİYOSENTEZİ, BİYOLOJİK AKTİVİTE VE İLAÇ SALINIM ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
KABUL VE ONAY	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Atkestanesi (<i>Aesculus hippocastanum</i>) Bitkisinin Genel Özellikleri	4
1.2. Atkestanesi' nin Yapısında Bulunan Bileşikler	6
1.3. Gümüş ve Metalik Gümüş.....	7
1.4. Antibakteriyel Gümüş	9
1.5. Nanopartiküller	10
1.6. Nanopartiküllerin Sentezi	11
1.6.1. Kimyasal Sentez.....	11
1.6.2. Biyolojik Sentez	12
1.7. Antimikrobiyal aktivite	13

1.8. Antioksidant Aktivite.....	14
1.9. İlaç Salınımı	14

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Materyal	21
2.1.1. Bitki Örneği.....	21
2.1.2. Mikroorganizma Örnekleri	21
2.1.3. Besiyerleri.....	25
2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Tamponlar ve Çözeltiler	25
2.2. Gümüş Nanopartiküllerinin (AgNP) Biyolojik Sentezi	27
2.3. Gümüş Nanopartiküllerinin (AgNP) Kimyasal sentezi	27
2.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	27
2.5. Serbest radikal giderim aktivitesi.....	28
2.6. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları.....	28
2.7. İlaç Salınım Çalışmaları	30
2.8. DNA Etkileşimi Çalışmaları.....	31

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Atkestenesi Yaprak Özütü ile Gümüş Nanopartiküllerin Sentez ve Karakterizasyonu	32
3.2. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	37
3.2.1. Agar Difüzyon Sonuçları	37
3.2.2. MİK Sonuçları	38
3.3. Serbest Radikal Giderim Aktivite Sonuçları.....	41
3.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi İle Nanopartikül-DNA Etkileşimi Sonuçları	42
3.5. İlaç Salınım Çalışmaları	43

4. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ.....	49
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ.....	63

KISALTMALAR VE SİMGELER

%	:	Yüzde
°C	:	Santigrat derece
AgNP	:	Ag nanopartikülleri
BHT	:	Bütillenmiş hidroksi toluen
cfu/ml	:	Milimetredeki koloni oluşturma ünitesi birimi
cm	:	Santimetre
dk	:	Dakika
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DPPH	:	2,2-difenil-1-pikrilhidrozil
EDX	:	Enerji Dağılımlı X Işını Kırınımı
FT-IR	:	Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi
g	:	Gram
m	:	Metre
M	:	Molar
MIK	:	Minimal inhibe edici konsantrasyon
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
Mm	:	Mikrometre
mm	:	Milimetre
nm	:	Nanometre
ORAC	:	Oksijen radikal absorban kapasitesi
pH	:	Power of hydrogen (hidrojenin gücü)
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
RSV	:	Resveratrol
RSV@AgNP	:	Resveratrol+ AgNP
SEM	:	Taramalı (Scanning) elektron mikroskobu
TAE	:	Tris Asetik Asit Edta
TRAP	:	Toplam Radikal Yakalayıcı Parametre Yöntemi
TSC	:	Trisodyum sitrat
TTC	:	Trifenil tetrazomyum klorid

UV-vis	:	Ultraviyole ve Görünür Bölge Spektroskopisi
V	:	Volt
vb.	:	ve benzeri
XRD	:	X ışını kırınımı
μ l	:	Mikrolitre

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1	Biyolojik kaynaklı nanopartiküller	13
Tablo 2.1.	Kullanılan organizmalar ve kültür koleksiyon merkezi kodları.....	22
Tablo 3.1.	Biyolojik ve kimyasal AgNP ve yaprak özütünün antimikrobiyal etkisi.....	38
Tablo 3.2.	Test edilen mikroorganizmaların MİK değerleri	40
Tablo 3.3.	DPPH süpürme aktivitesi sonucu inhibisyon değerleri.....	41
Tablo 3.4.	Farklı pH ortamlarında <i>in vitro</i> resveratrol salınım miktarları.....	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	<i>Aesculus hippocastanum</i> bitkisinin genel ve bazı kısımlarının görünümü	5
Şekil 1.2.	Atkestanesi meyve ve tohumları	6
Şekil 1.3.	Metalik Gümüş.....	8
Şekil 1.4.	Nanoküre ve nanokapsül yapısının şematik gösterimi.....	10
Şekil 1.5.	İlaç salınımı	15
Şekil 2.1.	Mikrodilasyon Broth Tekniğinin Denemelerde Uygulanış Şekli	30
Şekil 3.1.	Biyoloji AgNP, kimyasal AgNP ve yaprak özütünün UV-Vis spektrumları.....	33
Şekil 3.2.	Biyoloji AgNP, kimyasal AgNP ve yaprak özütünün zeta potansiyel grafikleri	33
Şekil 3.3.	Biyolojik AgNP' nin SEM görüntüsü	34
Şekil 3.4.	Kimyasal AgNP' nin SEM görüntüsü	34
Şekil 3.5.	Biyolojik AgNP FT-IR spektrumları	35
Şekil 3.6.	Kimyasal AgNP FT-IR spektrumları	36
Şekil 3.7.	Atkestanesi yaprak özütü FT-IR spektrumları	36
Şekil 3.8.	DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidant aktivite değerleri.....	42
Şekil 3.9.	Farklı konsantrasyonlardaki biyolojik AgNP, yaprak özütü ve kimyasal AgNP'nin pBR322 DNA ile etkileşimi ile elde edilen agaroz jel görüntüsü.....	42
Şekil 3.10.	Biyolojik AgNP ve RSV@ Biyolojik Ag NP'nin UV spektrumları.....	43
Şekil 3.11.	Resveratrolün FT-IR spektrumları	44
Şekil 3.12.	RSV@ biyolojik AgNP FT-IR spektrumları.....	44
Şekil 3.13.	RSV@kimyasal AgNP FT-IR spektrumları.....	45
Şekil 3.14.	Resvaratrol, RSV@Biyolojik AgNP ve RSV@Kimyasal AgNP Zeta potansiyeli	45
Şekil 3.15.	Resveratrol standart grafiği.	46
Şekil 3.16.	pH 5.2' de gerçekleşen zamana bağlı resveratrol salınımı.	47
Şekil 3.17.	pH 7.4' de gerçekleşen zamana bağlı resveratrol salınımı.	47

GİRİŞ

Nanoteknoloji yeni bir bilim dalı olarak en çok ilgi çeken konulardan biridir. Boyutu 100 nanometreden küçük herhangi bir malzeme ile ilgilenen bu anabilim dalı yer bilimi, organik kimya, moleküler biyoloji, yarı iletken fiziği, mikro fabrikasyon gibi bilim alanlarını içerir ve doğal olarak çok geniştir [1]. Nanometre terimi, antik Yunanca’ da “cüce” anlamına gelen “nano” kökünden gelmektedir. Nanometre, metrenin milyarda biri kadar olan bir ölçüdür ve yaklaşık 10 atomluk bir genişliği kapsamaktadır ($1\text{nm}=10^{-9}\text{ m}$).

Nanoteknoloji ile elektronik nanoçiplerin geliştirilmesi, görüntüleme kapasitesinin artırılması, ilaç endüstrisi, antibakteriyel ajan, kozmetik ve diğer birçok alanda çalışmalar yapılmaktadır. Nanoteknolojide en fazla araştırılmış olan konulardan birisi nanopartiküllerdir.

Nanopartiküller, doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan, boyutları 10-100 nm arasında değişen, hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül olarak adlandırılan ve etkin maddenin partikül içinde çözündürüldüğü, hapsedildiği ve/veya yüzeye absorbe edildiği ya da bağlandığı matriks sistemlerdir [2].

Bu partiküllerin sentezi için farklı kimyasal ve fiziksel yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerle elde edilmiş partiküllerin birçoğunda, toksik kimyasallar kullanılmaktadır. Dolayısıyla elde edilen partiküller toksik özelliklere sahip olmaktadır. Bu nedenle herhangi bir toksik kimyasal kullanmadan, nanopartiküllerin hazırlanması gerekmektedir. Bu amaçla biyolojik yöntemleri kullanarak partiküllerin sentezlenmesi son yıllarda araştırılmakta olan bir yöntemdir.

Biyosentez, biyolojide canlı organizmalardaki kimyasal süreçleri belirtir ve enerji kullanılarak gerçekleştirilen bu süreçler basit yapıdaki maddelerden daha karmaşık

ürünler elde edilmesini sağlar. Nanoteknolojideki tanımı ise bitki, bakteri, mantar, maya, alg, virüs vb. canlı organizmalarla, kimyasallar kullanılarak nanopartikül sentezlemektir. Yeşil kimyaya ve diğer biyolojik proseslere karşı artan ilgi bilim insanlarını basit, uygun fiyatlı, biyomedikal ve farmakolojik uygulamalara uyumlu ayrıca geniş bir yelpazede ticari üretime elverişli olma gibi birçok avantaja sahip çevre dostu bir nanopartikül sentezine yönlendirmiştir [3]. Günümüzde birçok bakteri ve bitki hücrelerini kullanarak, nanopartiküllerin sentezi literatürde rapor edilmektedir.

Gümüş uzun yıllardan beri tıbbi ve endüstriyel işlemlerde, mevcut birçok bakteri suşuna ve mikroorganizmalara karşı inhibe edici bir madde olarak bilinmektedir. Gümüş ve gümüş nanopartiküllerin (AgNP) en çok kullanılan ve bilinen uygulamaları tıp alanındadır. Günümüzde nanopartikül üretim işlemlerinde çeşitli indirgeyici kimyasallar yaygın olarak kullanılmaktadır. Sentetik indirgeyici katkı maddelerinin toksik özellikleri veya biyolojik zararları nedeni ile doğal özütlerle dayalı gümüş nanopartiküllerin üretimi çevreci yaklaşımlar açısından en uygun yöntem olarak düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında AgNP' nin atkestanesi (*Aesculus hippocastanum*) yaprak özütü ile biyosentezi gerçekleştirilerek karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen AgNP'lerin FT-IR (Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi), SEM (Taramalı elektron mikroskopu), ZETA potansiyeli ve UV-VIS (Ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisi) analizleri ile karakterizasyonu yapılmıştır. Özellikleri belirlenen AgNP'lerin antimikrobiyal aktiviteleri gram pozitif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 29213, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Corynebacterium renale* ATCC 19412, *Micrococcus luteus* ATCC 10240, *Enterococcus faecalis* ATCC 292112) ve gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, , *Bacillus cereus* NRLL B-3008, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49838 *Proteus mirabilis* ATCC 25933) olmak üzere 14 bakteri ve 3 maya (*Candida albicans* ATCC 10231, *Candida tropicalis* ATCC 13803 ve *Candida krusei* ATCC 1424) şuşları kullanılarak belirlenmiştir.

AgNP' nin antioksidant aktivitesi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemine göre belirlenmiştir. In vitro ortamda resveratrol ile bağlanmış olan AgNP' nin ilaç salınım

özellikleri serbest kalan resveratrol miktarının belirlenmesi ile tespit edilmiştir. Aynı zamanda AgNP' nin DNA ile etkileşimi ve bağlanma ilgilerinin tespit edilmesi, pBR322 plazmid' inin DNA' sı ile yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1.1. Atkestanesi (*Aesculus hippocastanum*) Bitkisinin Genel Özellikleri

Atkestanesi bitkisinin taksonomik sistemdeki yeri şöyledir [4].

Alem: Plantae

Altalem: Tracheobionta

Üst Şube: Spermatophyta

Bölüm: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Altsınıf: Rosidae

Takım: Sapindales

Familya: Hippocastanaceae

Cins: Aesculus

Tür: *Aesculus hippocastanum*

Atkestanesi bitkisinin yaprak, çiçek, kapsül, meyve ve tohumunun görünümü ve bitkinin genel görünümü Şekil 1.1’de verilmiştir.



Şekil 1.1. *Aesculus hippocastanum* bitkisinin genel ve bazı kısımlarının görünümü

Atkestanesi her yıl yaprak döken, büyük bir ağaçtır. Uzunluğu 36 m'ye kadar ulaşabilir. Anavatanı Asya ve Hindistan'dır. Asya'nın kuzey ve orta kısımlarında doğal olarak yayılış göstermekle birlikte 16.yy ortalarında İngiltere'ye de tanıtılmıştır [5]. Çiçekleri kırmızı merkeze sahip beyaz veya pembe; yapraklar geniş, beş ya da yedi lobdan oluşan kalın, yeşil ve dikenli bir kılıf katman içeren kahverengi tohumları vardır [6].

Beyaz çiçekleri uç kısımdan yavaş yavaş kalınlaşan panikuladan dik bir şekilde uzanır. Çiçeklerin çoğu erkektir ama dişi ya da erselik olanları da vardır. Kaliks erimiş ve düzensiz 5 uca sahip çan şeklinde olup, petaller üçü yukarıda ikisi aşağıda olmak üzere dipte ve büyüdükçe sarıdan pembemsiye dönen benekli, 10-15 mm boyundadır. Petallerden daha uzun olan anterler 7 adet ve kırmızı renklidir. Ovaryum üst durumlu ve 3 odacıklıdır. Meyve kapsülü yeşil olup yumuşak dikenler içerir ve koyu renkli tohum bu kapsülün içerisinde [7].

Yaprakları 5-7 loblu, palmat, uzun ve 20 cm uzunluğunda petiyole sahiptir [7]. Özellikle genç ve taze olan tohumları oldukça zehirlidir. Alkaloid olarak saponin ve glikozit içerir. Dokunulduğunda zararlı olmayan bu tohumlar sadece yendiğinde toksik olurlar. Ancak bazı memeliler bu toksinleri bozup besin olarak kullanabilmektedir [8].



Şekil 1.2. Atkestanesi meyve ve tohumları

1.2. Atkestanesi' nin Yapısında Bulunan Bileşikler

Atkestanesi genel olarak saponin bileşenleri ile karakterize olmuştur. Bunların yanında atkestanesi, farmakolojik olarak aktif bileşenler de içermektedir [9]. Bunlar başta “aescin” olmak üzere ağaç kabuğunda; kumarin glikoziti olan eskulin ve bunun aglikonu olan aesculetin, oksikumarinik glikoziti olan fraksin ve skopolin bunların aglikonu fraksetin ve skopoletin, allantoin ve kuersetin, çiçeklerinde; flavonoid türevleri rutin ve kuersitrin, aescin, kolin ve purin, tohumlarında; nişasta, aescin, protein, yağlar, şeker ve kateşik tanenler yapraklarda; kuersitrin, izokuersitrin, kuersetin adlı flavonoidler ve karotenoidler bulunur [10].

Atkestanesi tohumları, en önemli triterpenoid saponin bileşenlerinden biri olan ve başlıca kimyasal bileşenleri oluşturan “aeskin” içermektedir. Aeskin, atkestanesi ağacının kurutulmuş olgun tohumlarının su ve etil alkol karışımı ile ekstraksiyonundan elde edilir. Aeskin, triterpen ester saponinlerinin (30’den fazla farklı saponinin) kompleks bir karışımından oluşur. Antienflamatuar, antiödematöz ve kapillar koruyucu özelliğinden dolayı aeskin, periferel vasküler bozuklukların tedavisi ile sellülitten korunma ve tedavisi için kozmetik sahada yaygın olarak kullanılmaktadır [9].

Genelde amorf ve renksiz olan, fakat kristal yapıda ve beyaz renkte türleri bulunan saponinler; su, etil alkol, metil alkol gibi polar çözücülerde çözünen moleküllerdir. Saponin içeren bitkiler ilave edilmiş diyetlerle beslenmeye bağlı olarak, plazma kolesterol düzeyinin azaldığı ve sonuç olarak daha düşük kardiyovasküler hastalığa yakalanma riskinin azaldığı rapor edilmiştir [10].

Atkestanesi cilt sağlığı için çok faydalıdır. Kırısklık giderme gibi cilt problemleri için kullanılan kremlerde ve ürünlerinde kullanılmaktadır. Ciltte oluşan geniş gözeneklerin kapatılması için atkestanesi bitkisinin damar büzme etkisi kullanılmaktadır. Kozmetik alanda bazı krem ve vücut bakım ürünlerinde botox etkisi olarak kullanılmaktadır. Variste ağrı azaltma ve dolaşım düzenleyici olarak kullanılmaktadır. Almanya Sağlık Bakanlığının bitkisel preparatların hazırlanması ve ruhsatlandırılmasından sorumlu E Komisyonu bu bitkinin varislerde kullanılabileceğini belirtmiştir. Bitkinin içinde bulunan aescin kılcal damar kanamalarını durdurma özelliğine sahiptir. Bu özelliğinden dolayı atkestanesi bitkisi basur tedavisinde de kullanılmaktadır [11].

1.3. Gümüş ve Metalik Gümüş

Atom numarası 74, elektron dağılımı Kr.4d105s1, atom ağırlığı 107.868 g/mol, erime noktası 960.8 °C, kaynama noktası 1950 °C, yükseltgenme basamağı +1, +2, +3 olan gümüş metali kimyasal bir ajandır. Herhangi bir elementten daha yüksek olan % 95’den fazla kızılötesi yansıtma özelliğine sahiptir. Gümüşle temas eden radyoaktif enerjinin % 95’i kaynağına geri dönüş yapacaktır. Böylece ortamdaki ısı kaybı oldukça azalacaktır. Bu özelliğinden dolayı gümüşün sardığı ortam uzun süre sıcak kalacaktır [12].



Şekil 1.3. Metalik Gümüş [12]

Gezeenin en çok ısı iletkenliğine ve en çok elektrik iletkenliğine sahip elementi gümüştür. Yalıtkan iki maddenin birbiriyle sürtünmesi sonucu ortaya çıkan elektriksel yük, gümüşün varlığı ile hızlı dağılır ve statik yükün verdiği stres gibi zararlardan korunma sağlar.

Gümüş aynı zamanda, insan vücudunun içinde ve dışında bir antimikrobiyal ajan gibi davranır. Az miktarlarda kullanıldığı zaman toksik değildir ve memeli hücrelere antimikrobiyal etkide bulunur. Antimikrobiyal kullanımında gümüşün en etkin formu, iyon halidir. Gümüş iyonları antimikrobiyal, antiviral ve antifungal özelliklere sahiptir ve dokuların yenilenmesinde rol oynayabilmektedir. Oldukça güvenli ve antimikrobiyal kabul edilmektedir [12].

Gümüşün güvenli durumlarının yanında zararlı yönleri de vardır. İnsanlar için toksik olmayan gümüş, güneşe uzun süre maruz kalan insanlarda deri, göz veya her ikisindeki pigmentleri tahrip etmektedir. Ayrıca “Argyria” yaralara gümüş bileşikler uygulandıktan sonra gümüşün ağza alınması, kana direk enjekte edilmesi, direk solunması veya mukozal yüzey uygulamaları ile meydana gelen bir durumdur. Gümüş bu durumda emilerek vücudun çeşitli yerlerine taşınır. Taşınan gümüşün vücutta birikmesi iç organlarda ve farklı dokularda gösterilmesine rağmen, toksik etkisi sadece birkaç durumda gözlenmiştir. Gümüş diğer metallerle karşılaştırıldığında en az toksik metallerden biridir.

1.4. Antibakteriyel Gümüş

Modern batı tıbbı gümüş elementini doğal ve suni olarak en etkili antimikrobiyal ajan olarak kabul etmektedir. İlk antibiyotik maddenin gümüş olduğu düşünülmektedir. Gümüş metal yaprağı tarihte sargı için kullanılmıştır. Bugün ise, neredeyse enfeksiyon kontrolünün kritik olduğu her yerde, bandajlardan yanık tedavisinde kullanılan ilaçlara kadar sağlık ürünlerinde çok geniş çaplı bir alanda antimikrobiyal özellikli olması nedeniyle gümüş kullanılmaktadır. Endüstriyel alanlarda da gümüş teknolojisi kullanılmaktadır. Yüzme havuzu filtrelenmesinde, içme suyu filtrelenmesinde ve savunma sistemlerinde gümüş yaygın olarak kullanılmaktadır [12].

Antimikrobiyal özellikteki gümüşün tarihi eskilere dayanmaktadır. Örneğin; Gümüş sikkeler, eski Roma ve Yunan medeniyetinde suyu temizlemek için kullanılmaktaydı. Bugün ise, NASA uzay mekiklerinde aynı amaç için hala gümüşü kullanmaktadır. 1800'lü yıllardan önce gümüş çeşitli tıbbi süreçlerde kullanılmaktaydı. %1 gümüş nitrat solüsyonu doğumdan sonra yenidoğan bebeklerde gonoreal oftalmi hastalığını engellemek için hala yaygın olarak kullanılmaktadır. On dokuzuncu yüzyılın son çeyreğinde bakterileri engellemek ve neden oldukları enfeksiyonları temizlemek için gümüş farklı şekillerde kullanılmaktadır [12].

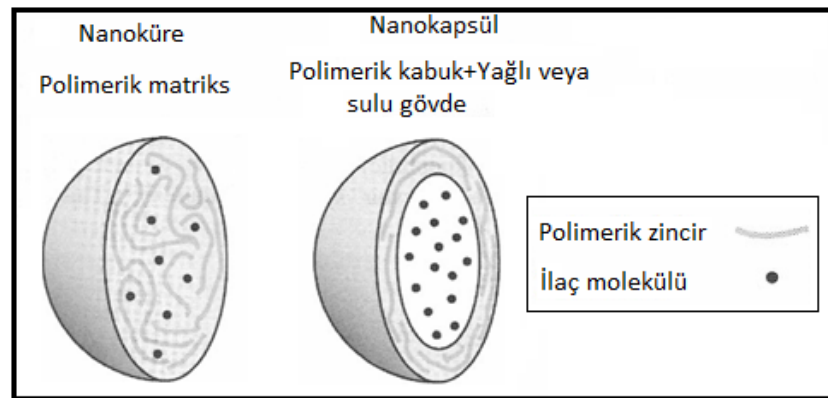
Gümüşün antibakteriyel özelliğinin en fazla proteinler üzerinde olduğu tahmin edilmektedir. Bu tahminler için çeşitli mekanizmalar açıklanmıştır. Bunlardan ilkinde proteinlerin yapısında bulunan tiyol gruplarında SH gruplarına bağlanan gümüşün proteinleri inaktif hale getirdiği belirtilmiştir. İkincisinde ise hücre duvarındaki transmembran proteinlerin bir araya gelerek, tiyol grupları ile kararlı S-Ag bağı oluşturduğu ve böylelikle enerji üretimi ve iyon transportunun engellendiği öne sürülmüştür. Üçüncü mekanizmada ise, gümüşün katalitik oksidasyonun bir parçası olabileceğidir. Dolayısıyla proteinlerde disülfid bağlarının ortaya çıkması görülebilir. Bu bağların oluşum mekanizması şöyle açıklanmıştır. Hücrede duvarındaki tiyol grupları gümüş ile tepkimeye girerek, katalizör görevi yapmaktadır. Su molekülü dışarı çıkar ve iki farklı aminoasit arasında bağ oluşur. Disülfid bağlarının oluşması nedeniyle de hücre içinde ve duvarında olan enzimlerin şekillerinde bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Enzimlerde ortaya çıkan bu şekil değişimleri, anahtar bölgelerini tetikleyerek enzimi inaktif hale getirir. Bakterilerin solunum sisteminde görevli olan proteinler bu

mekanizma ile inaktif olmaktadır. Örneğin; manitol, süksinat, glutamin ve pirulin enzimleri inaktiftir [13].

1.5. Nanopartiküller

Nanoteknoloji terimi ilk kez 1974’de Norio Taniguchi tarafından yayımlanan bir makalede kullanılmıştır. Norio Taniguchi nanoteknoloji’yi makalede şöyle tanımlamıştır: “Atom ya da molekülü ayırma, birleştirme, bozma sürecine nanoteknoloji denir” [14]. Nanopartiküller biyoloji, fizik ve kimyanın mühendislik ile bütünleştirildiği son dönemin en önemli yöntemlerinden biridir. Nanoteknoloji ile yapılmak istenen aynı materyalin minyatürize edilerek fiziksel özelliklerini değiştirmektir. Herhangi bir materyalin parçalanıp boyutları küçüldükçe fiziksel ve kimyasal özellikleri parçalanmamış şeklinden çok daha farklı olmaktadır [15].

Nanoteknolojinin gelişmesi ile birlikte nanokristal, nanopartikül, nanotüp gibi nano boyutlu malzemelerin üretilmesi sağlanabilmektedir. Son yıllarda büyük önem kazanan nanopartiküller, nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır [16]. Nanopartiküller, doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan, boyutları 10-100 nm arasında değişen hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül olarak adlandırılan ve etkin maddenin partikül içinde çözündürüldüğü, hapsedildiği ve/veya yüzeye absorbe edildiği ya da bağlandığı matriks sistemlerdir (Şekil 1.4.) [2].



Şekil 1.4. Nanoküre ve nanokapsül yapısının şematik gösterimi

Nanopartiküller diğer ticari malzemelerden genelde farklı ve üstün kabul edilen özellikler göstermektedir. Sıkça belirtilen nanopartikül özelliklerinin çekiciliğinin günümüzde bilinen nedenleri ise şöyledir:

- Kuantum boyut etkileri
- Elektronik yapısının boyut bağımlılığı
- Yüzey atomlarının benzersiz karakterleri
- Yüksek yüzey/hacim oranı

Nanopartikül sentezi bu yapıların sergiledikleri olağandışı özellikler sebebiyle yüksek aktiviteli katalizörler, optik uygulamalar için özel teknolojik malzemeler ile birlikte süper iletkenler, aşınmaya karşı katkılar, yüzey aktif maddeler, ilaç taşıyıcılar ve özel teşhis aletleri gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasının yolunu açmıştır [17]. Nanopartiküller farklı özelliklerine göre farklı sınıflandırmalar bulunmakla birlikte basit olarak şu şekilde sınıflandırılabilirler [18].

1. Karbon bazlı nanopartiküller (fullerenes, çok duvarlı karbon nanotübler vb.),
2. Metal bazlı nanopartiküller (altın kolloidler, nanokabuklar, nanoçubuklar, süperparamagnetik demiroksit nanopartiküller vb.),
3. Yarı iletken bazlı nanopartiküller (kuantum noktaları vb.).

1.6. Nanopartiküllerin Sentezi

1.6.1. Kimyasal Sentez

Nanopartiküllerin sentezlenme yöntemleri; “Bottom up” aşağıdan yukarıya ve “Top Down” yukarıdan aşağı olarak isimlendirilmektedir. Top down yöntemlerinde dışarıdan mekaniksel veya kimyasal işlemler ile enerji verilen malzeme nano boyuta parçalanmaktadır ve bu parçalanma işlemi bu yöntemlerin esasını oluşturur. Bottom up yöntemlerde ise, mekanik öğütme ve aşındırma gibi işlemler esas alınmaktadır. Bu tekniklere yüksek enerjili öğütme veya yüksek hız değirmenleri denilmektedir. Çünkü klasik öğütme işlemlerinden çok daha fazla enerji tüketimi olmaktadır. Bottom up yaklaşımına dâhil yöntemler ise; atomik veya moleküler boyuttaki yapıları kimyasal reaksiyonlar ile büyütürken partikül oluşumunun gerçekleştirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Kullanılan polimer baz alındığında, biyoyumluluk, parçalanma davranışı, uygulama yolu, ilacın istenilen salım profili, biyomedikal uygulama tipi, polimer seçimine bakıldığında, ilk yıllarda monomerlerin çeşitli ortamlarda in situ polimerizasyonuna dayanmaktadır. İlerleyen yıllarda, tam olarak karakterize edilmiş

önceden sentezlenmiş polimer veya doğal makromoleküllerin dispersiyonlarına dayalı yöntemler geliştirilmiştir [19].

1.6.2. Biyolojik Sentez

Metal nanopartiküllerin klasik sentez yöntemleri kompleks ve çok maliyetli olmaktadır. Ayrıca nanopartiküllerin sentezlenmesinde ve stabilize edilmesinde kullanılan kimyasal ayırıcılar toksiktir ve atıkları ile de doğa dostu oldukları söylenemez. Biyosentez ise basit ve az maliyetli olup, toksik madde kullanımı gerektirmez. Farmakolojik ve biyomedikal uygulamalara uygun, geniş yelpazede ticari üretime elverişlidir. Bu sebeple biyolojik yaklaşımlar üzerinde çalışılmaktadır.

Biyosentez, biyolojide canlı organizmalardaki kimyasal süreçleri belirten terimdir ve enerji kullanılarak gerçekleştirilen bu süreçler basit yapıdaki maddelerden daha karmaşık ürünler elde edilmesini sağlar.

Nanoteknoloji’deki tanımı ise bitki, mikroorganizma, mantar, maya, alg, virüs vb. canlı organizmaları kullanarak nanotanecek sentezlemektir. Yeşil kimya da denilen sentez yöntemi metalik nanopartiküllerin sentezinde kullanılmaktadır [20].

Biyosentez günümüzde sıkça kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Bir tepkimenin ya da bir materyalin yeşil olabilmesi için;

1. Güvenli olması
2. Tek bir tepkime basamağından oluşması
3. Atık üretimi gerçekleştirmemesi
4. Yenilenebilir hammaddelerin kullanımı ile elde edilebilmesi
5. Çevresel olması
6. Ürün ayrıştırılmasının basit olması
7. % 100 verim vermesi koşullarını sağlaması gerekmektedir. Birçok tepkimede ise bu koşulların tamamını yerine getirmek oldukça zordur.

Toksik kimyasallar bulundurmadığı ve doğal sınırlama maddeleri bitkiler tarafından doğrudan sentezlenebildiği için nanopartikül sentezi için bitkiler iyi bir seçenektir. Altın ve gümüş nanopartiküller bitki özütlerinden elde edilmektedir. Bitkinin yanı sıra mantar, maya ve bakteri gibi canlılardan da nanopartikül sentezlenmektedir. Çok hücreli ve multikültürel organizmalar hücre içi ve hücre dışı inorganik nanopartiküller üretebilirler. Biyolojik sentezlenen nanopartiküllerin bazıları Tablo 2.1’de gösterilmiştir [21] [22].

Tablo 1.1 Biyolojik kaynaklı nanopartiküller [21]

Kaynak	Bilimsel ismi	Lokalitesi	Ürettiği nanopartikül	Büyüklik (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>Schizosacchomyce pombe</i>	Hücre içi	CdS	200
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Hücre içi	Magnetite	20-50
Maya	Yeast strain MKY3	Hücre dışı	Ag	2-5
	<i>Candida glabrata</i>	Hücre içi	CdS	200
	<i>Schizosacchomyce pombe</i>	Hücre içi	CdS	200
Bakteri	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Hücre içi	Ag	200
	<i>Lactobacillus</i> strains	Hücre içi	Ag, Au	-
	<i>Escherichia coli</i>	Hücre içi	CdS	2-5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Hücre dışı	Au	5-32

1.7. Antimikrobiyal aktivite

Virüs harici mikroorganizmaları öldüren veya onların büyümelerini engelleyen maddelere antimikrobiyal maddeler denir [23]. Son yıllarda artan mikrobiyal kaynaklı

hastalıklar sonucu insanlar bitkilerde antimikrobiyal aktiviteleri araştırmaya yönelmiştir. Antimikrobiyal aktivite düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan testlerden bazıları şöyledir:

- 1) Disk difüzyon testleri
- 2) Dilüsyon testleri:
 - a. Agar dilüsyon testleri
 - b. Broth dilüsyon testleri
 1. Makrodilüsyon (tüp dilüsyon) yöntemi
 2. Mikrodilüsyon testleri
- 3) Gradient strip testleri (E-test, MICE)
- 4) Otomatize yöntemler

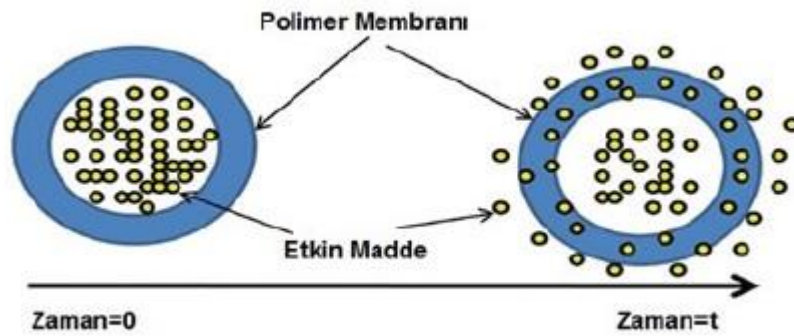
1.8. Antioksidant Aktivite

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücuttaki var olan savunma sistemlerine antioksidanlar denir. Canlı dokularda istenmeyen oksidasyon reaksiyonlarını önleyen maddeler antioksidanlardır. Vitaminler ve mineraller yanında bazı enzimler de antioksidantlardır. Antioksidanlar, oksidatif stresle oluşan serbest radikaller olarak adlandırılan zararlı moleküllere karşı koruyucu etkiye sahiptirler. Antioksidanlar; serbest radikalleri etkisiz hale getirerek oksidasyon sürecini engellerler. Bu esnada kendileri okside olurlar. Bu antioksidant maddelerin aktivite ölçümü için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi, Toplam Radikal Yakalayıcı Parametre (TRAP) Yöntemi, Krosin beyazlatma ve DPPH yöntemi bunlardan bazılarıdır [24].

1.9. İlaç Salınımı

Organizma için gerekli olan etkin maddenin salım hızını kontrol ederek hedef hücreye ulaştıran sistemlere “kontrollü salınım sistemler” adı verilir. Bir başka deyişle, kontrollü salım sistemleri ilacı taşıyan ve taşıdıkları ilacı istenilen hız ve sürede salabilen uygulama şekilleridir. İlaç alanındaki çalışmaların asıl hedefi; ilaç dozunu minimuma indirmek, doz uygulama aralığını uzatmak, hastanın yan ve zararlı etkilerden etkilenmemesini sağlayarak yaşam kalitesini arttırmaktır. Bu beklentilere en iyi yanıt veren sistemler “kontrollü salınım sistemleri” dir [25].

İlaç salım sistemleri kimyasal bir uyarıya cevap olarak ilacın serbest bırakıldığı sistemlerdir. Kontrollü salınım sistemleri etkin maddenin bölgesel veya sistematik olarak önceden belirlenmiş oranlarda ve spesifik zaman aralıklarında salınım yapmasını sağlar. Etkin madde salınımı, dozaj formu içerisinde kullanılan polimerin özellikleri ile bağlantılıdır. Bu nedenle kullanılacak olan polimerin özelliklerinin, formülasyona uygunluğunun ayrıntılı olarak tetkik edilmesi gerekmektedir [25].



Şekil 1.5. İlaç salınımı [25]

İlaçların polimer ya da lipit sistemlerinden salımı için dört genel mekanizma bulunmaktadır:

- 1) İlaçların sistemden difüzyonu
- 2) Bir kimyasal ya da enzimatik reaksiyonla sistemin bozunmasını takiben ilaç salımı ya da ilaç molekülünün sistemden kopması
- 3) Sistemin şişmesi ya da osmoz yoluyla çözücü hareketlenmesi
- 4) Fizyolojik bir gereksinime cevap olarak salımının gerçekleşmesi

Ayrıca bu mekanizmaların kombinasyonu da mümkündür [25].

1.10. Literatür Özeti

Jha ve Prasad (2010) tarafından yapılan çalışmada *Cycas* (yalancı sagu palmyesi) yaprak özütü kullanılarak 2-6 nm boyutunda AgNP'lerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada X ray verilerinin analizi sonucu AgNP'lerinin yüzey merkezli kübik hücre

yapısına sahip olduğu, UV-Vis çalışmalarında ise yüzey plazmon rezonansının 449 nm olduğu da ortaya konmuştur [26].

Yıldız ve ark. (2011), AgNP’ nin liken zt (*Cetraria islandica L.*) ile biyosentezini gerçekleştirmişlerdir. Bu alışma ile sahip oldukları üstün optik ve elektronik özellikleriyle son yıllarda birçok alanda kullanımı araştırılan AgNP’ nin daha ucuz ve daha uyumlu biyosentezini ortaya koymaya çalışmışlardır [20].

Bilgili ve Aydın (2012), yaptıkları çalışmada AgNP sentezine pH etkisini araştırmışlar, bu çalışmalarında endemik bir bitki türü olan *Liquidambar orientalis* (Günlük–Sığla ağacı) yapraklarından elde ettikleri bitki özütünü kullanmışlar ve pH 5,5-6 civarında en çok nanopartikülün elde edildiği sonucuna varmışlardır [27].

Singh ve ark. (2011), *Zingiber officinale* (zencefil) bitkisi kullanarak gümüş ve altın nanopartikülü üretimine yeşil materyal yaklaşımını inceledikleri çalışmada bitkinin yaprak özütünü kullanmışlar ve nanopartiküllerin büyümesini UV-vis spektrofotmetresi ile izleyerek, taramalı elektron mikroskobu, X ışını kırınım ve fourier transform kızılötesi spektroskopisi kullanarak karakterize etmişlerdir. Yapılan alışma sonucunda taramalı elektron mikroskobundan alınan sonuçlara göre, 10 nm ve 30.31 nm ortalama boyutlarında AuNP ve AgNP dağılımı gözlenmiştir. Bu gözlemler ve X ışını kırınımı çalışmaları ise nanopartiküllerin gümüş ve altın olduğunu ve yeşil yaklaşım ile bu bitkiden nanopartikülü sentezlendiğini doğrulamıştır [28].

Yılmaz ve ark. (2011), *Stevia rebaudiana* (şeker otu) yaprak özütü kullanarak biyolojik olarak AgNP sentezlemişlerdir. X ışını kırınımı ve taramalı elektron mikroskobunda yapılan incelemeler sonucunda nanopartiküllerin küresel ve 2-50 nm çapı arasında çok yönlü dağıldığı gözlenmiştir. Dağılmadan sonra yeniden agregasyon gözlenmiş ve agregasyonların gerçekleşmesinde ketonların rol oynadığı kızılötesi absorbiyon yöntemi ile ortaya konmuştur. Bu sonuç doğrultusunda ketonların gümüş iyon taşınımında aktif rolde olduğunu göstermişlerdir [29].

Dizaji ve ark. (2012), *Rhodopseudomonas palustris* bakterisinden elde edilen hücre özütünü kullanarak AgNP retimi gerçekleştirmiş ve yaptıkları çalışma sonucunda bakterideki çoğalmanın nanopartiklde çoğalmaya neden olduğunu saptamışlardır. AgNP’ nin antibakteriyel özelliği araştırılmış, MIC ve MBC değerleri *E.coli* için 0.187

$\mu\text{g.ml}^{-1}$ ve *S.aureus* için $0.37 \mu\text{g.ml}^{-1}$ bulunmuştur. Sitotoksosite sonuçları ise partiküllerin 0,6 ppm den fazla derişimlerde L929 hücreleri için toksik olduğu ve 5 ppm de de hücrelerin yarısında ölüme yol açtığı belirlenmiştir [13].

Günaydın ve Bodur (2015), ceviz yaprakları özütünden elde ettiği nanopartikülleri cerrahi maske yapımında kullanmıştır. Ceviz yaprakları özütü ile gümüş nitrat karışımı 19 saat bekletilerek nanopartikül elde edilen bu çalışmada, dairesel olacak şekilde çapları 2,5 ve 8 cm olan iki farklı boyutta maske kumaşları nanopartikül ile kaplanarak, kontrol grupları olarak *S. aureus* ve *E. coli* bakterileri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda kontrol gruplarından alınan %98-99 oranlarında bakteri ölümünün gözlenmesi, antibakteriyel cerrahi maske yapımında nanopartiküllerin çok başarılı olduğunu ortaya koymuştur [30].

Venkatpurwar ve ark. (2011), AgNP sentezinde yeşil sentezden yararlanmışlardır. Kırmızı deniz alginden (*Porphyra vietnamensis*) elde edilen sülfatlanmış polisakkaritten indirgen olarak faydalanan araştırma grubu ayrıca elde edilen AgNP' nin *E.coli* ve *S. aureus* üzerindeki antibakteriyal aktivitelerini ölçmüşlerdir. Sonuç olarak 13 ± 3 nm çapında AgNP sentezlenmiş ve sentezlenen AgNP' nin *E. coli*'ye karşı yüksek bir antibakteriyal direnç gösterirken *S. aureus* üzerinde daha düşük etkili olduğu belirlenmiştir [31].

Khandelwal ve ark. (2010)' da tarafından yapılan çalışmada *Argemone mexicana*' nin (Meksika haşhaşı) yaprak özütü kullanılarak AgNP' nin biyosentezi gerçekleştirilmiş ve bu nanopartiküller UV-vis absorbsiyon spektroskopisi, FTIR, XRD ve taramalı elektron mikroskobu ile karakterize edilerek 30 nm çapında yapı göstererek bakterilere ve funguslara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma ile *Argenome mexicana* bitkisinin yaprak özütü ilk kez nanopartikül sentezinde kullanılmıştır [32].

Kim ve ark. (2007), literatürde tanımlandığı gibi 2×10^{-3} M sodyum borohidridin 300 ml'lik sulu solüsyonu ile 1×10^{-3} M gümüş nitratin 100 ml sulu solüsyonunun karıştırılması sonrası stabilize edici ajanlar ve vakum evaporatorlar kullanılarak hazırladıkları gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında, *E.coli*, ve *S.aureus* kullanarak AgNP' nin çeşitli mikroorganizmalardaki mikrobiyal aktiviteleri inhibe edici etkisini ortaya koymuşlardır. Müller Hilton agar

kullandıkları bu çalışmanın sonucunda AgNP' lerinin *E.coli* ve *S.aureus* üzerinde düşük konsantrasyonlarda bile etkili olduğu ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda AgNP' nin antimikrobiyal kontrol sistemlerinde ve değişik medikal cihazların mikroorganizmalardan korunmasında kullanımının etkili olduğunu belirtmişlerdir [33].

Venkata ve Savithramma (2013), Hindistan'ın Andra Pradesh şehrinin Kurnool bölgesinde Vitiligo hastalığının tedavisi için yoğun olarak kullanılan, *Cabada fruticosa*'nın antimikrobiyal aktivitesini ölçmek için AgNP kullanmışlardır. UV-Vis spektrofometresi ve AFM ile karakterize ettikleri nanopartiküllerin yuvarlak şekilde ve ortalama 35,1 nm çapında olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu bitkinin içerdiği sekonder metabolit ve diğer bileşenlerin çeşidine göre antimikrobiyal aktivitesinin değiştiğini ancak her durumda bu hastalığın tedavisinde başarılı olduğunu göstermiştir [34].

Gade ve ark. (2010), *Opuntia ficus-indica* (hint inciri) bitkisini kullanarak AgNP sentezlemişler, *in vitro* antibakteriyal aktivitesini ve bu aktivitenin gerçekleşmesinde rol oynayan mekanizmaları çalışmışlardır. Bu çalışma sonucunda, ampisilin ve streptomisin maddesinin en yüksek antibakteriyal aktiviteyi oluşturduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen verilere göre, nanopartiküllerin formasyonunun, bioredüksiyon ve nanopartiküllerin formasyonuna yol açan bir ara kompleksten oluşan iki basamaklı bir mekanizma olduğu ortaya konmuştur [35].

Abdel-Aziz ve ark (2014) *Chenopodium murale* yaprak özütü kullanılarak sentezlenen AgNP' nin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Taramalı elektron mikroskobu analizleri sonucu AgNP' nin 30-50 nm çapında olduğu belirlenmiş ve *C. murale* yaprak özütünün içerdiği esansiyel yağdaki toplam fenolik bileşenler üzerinde çalışma yapılarak yaprak özütü içeren AgNP' nin, bitki özütü ve gümüş nitrat çözeltisinden daha yüksek antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir [36].

Vanmathi ve ark. (2014), AgNP' nin antihelmintik, antikanserojenik ve antioksidant aktivitesini ölçmek için *Fusarium oxysporum* kullanarak elde ettiği özütü kullanmışlardır. Ve yapılan çalışmalar sonucunda bu AgNP' nin aktivitelerinin antihelmintik, antikanserojenik ve antioksidant aktivitelerinin içinde en yüksek olanının antioksidant aktivitesi olduğu sonucuna varmışlardır [37].

Mittal ve ark. (2012), *Rhododendron dauricum*'un çiçek ekstraktından klasik yöntemlerle elde ettikleri AgNP' nin antioksidant kapasitesini ölçmüşlerdir. Antioksidant kapasitesini ölçmek için DPPH metodunu kullandıkları bu çalışma sonucunda, çiçek özütünün flavonoidler, fenolik, triterpenoid ve kumarin bileşikleri içerdiğini ve bu bileşenlerin yüksek antioksidant kapasitesi olduğunu ortaya koymuşlardır [38].

Lee ve ark. (2010) *Elsholtzia splendens* bitkisinin nanopartikül yüklü ekstraktından antioksidan aktiviteyi ölçmüş ve özütte bulunan kitosan nanopartiküllerinin *E. splendens*' in antioksidant kapasitesini artırdığını belirtmişlerdir [39].

Torres ve ark. (2012) yılında yaptıkları çalışmada *Pantoea agglomerans* bakterisini kullanarak selenyum nanopartiküllerinin biyosentezini gerçekleştirmiş ve antioksidant kapasitesini ölçmüşlerdir. X ışını dağılımı spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu ile karakterize ettikleri ve görüntüledikleri selenyum nanopartikülleri üzerinde insan umbilikal damar endotelyal hücrelerini kullanarak antioksidant kapasite ölçümü yapmışlar ve sonuç olarak 100 nm den daha küçük selenyum nanopartiküllerinin antioksidant kapasitesinin insan sağlığı ile alakalı olduğunu, gıda takvitesi ile potansiyel antioksidant kapasiteye sahip olduğunu ortaya koymuşlardır [40].

Duman ve ark. (2016) papatya çiçeğinin özütü ile elde ettikleri CuO nanopartiküllerin antioksidant aktivitesini ve plazmid DNA (pBR322) ile etkileşimini çalışmışlardır. CuO nanopartiküllerini karakterize etmek için UV-vis spektroskopisi, FT-IR, DLS, X ışını kırınımı, EDX spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu kullandıkları bu çalışma sonucunda DPPH metodu ile antioksidant aktiviteyi belirlemişler ve CuO nanopartiküllerinin DNA'nın çift heliks yapısını hem bozduğunu hem de kırdığını bulmuşlardır [41].

Wang ve ark (2000) yılında, Kadmiyum sülfid nanopartikülleri ile DNA oligomer bağlanması etkileşimi üzerine bir çalışma gerçekleştirmişler ve yaptıkları çalışma sonucunda ise, kadmiyum sülfatın DNA oligomer bağlanması üzerindeki etkisinin minimum olduğu sonucuna varmışlardır [42].

Sözmen (2008)' de yapmış olduğu yüksek lisans tezinde akıllı polimerlerin karakterizasyon yöntemine yeni bir yaklaşımla quartz kristal mikro dengeleyici sistemlerle (QCM) daha hızlı, gerçek zamanlı, uygulaması kolay, hassas, sürekli tekrarlanan işlemler nedeni ile takip etme zorunluluğu olmayan etkin bir alternatif yöntem geliştirmek için çalışmıştır. Ve geliştirilen bu yöntemin uygulanabilirliğini ilaç salınım sistemi kullanarak ortaya koymuştur [43].

Doğan ve Başal, (2009)' da yaptıkları çalışmada elektrolif çekim yöntemi ile elde edilen biyopolimer nanoliflerin ilaç salınımı, doku iskelesi ve yara örtüsü olarak kullanımına değinmiş ve yaptıkları çalışma sonucunda ilaç salınımı sisteminin elektrolif çekim yöntemi ile elde edilen biyopolimer nanoliflerinin salınımında oldukça etkili olduğunu ortaya koymuşlardır [44].

Asmaz ve Aroğuz, (2010)' da manyetik nano süngerlerin şişme davranışları ve kontrollü ilaç salımı üzerine çalışma yapmışlardır. Çalışmada jelatin kaplı manyetik nanosüngerler hazırlanarak kontrollü ilaç salınımında kullanılmıştır. Çalışma sonucunda manyetik nano süngerlerin ilaç salınımı için uygun materyaller olduğu ortaya koyulmuştur [45].

Kahraman ve Şanlı, (2012) yaptıkları çalışmada kanser ilacı 5-fluorouracil'in magnetit içeren kitosan/metil selüloz nanokürelerden kontrollü salımı üzerinde durmuşlar ve ilaç salınım sistemi ile ilacı hedeflenen uygun bölgeye taşımayı başarmışlardır. Sonuç olarak ise, bu sistemin genel toksisiteyi azaltıp etkiyi artırdığını gözlemlemişlerdir [46].

Mert ve Karagözler, (2013) altın nanopartiküllerin ilaç salınım sistemindeki kullanımı üzerine bir çalışma yapmış ve yaptıkları çalışma sonucunda altın nanopartiküllerin çok yönlü bir ilaç salınım sistemi olduğunu ortaya koymuşlardır [47].

Ak ve ark., (2014) akciğer kanseri tedavisine yönelik yeni bir ilaç taşıyıcı sistem olarak pemetrexed yüklü nanopartiküller üzerine çalışma yapmışlar ve ilaç salınım sisteminin bu ilaç için başarılı olduğunu ortaya koymuşlardır [48].

Ferrati ve ark., (2015) devamlı testosteron yerine koyma tedavisinde nanokanal salınım sistemi üzerinde çalışmışlar ve nanokanal ilaç salınım sisteminin devamlı testesteron yerine koyma tedavisinde başarılı olduğunu ortaya koymuşlardır [49].

2. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Bitki Örneği

Bu çalışmada AgNP' nin sentezinde Atkestanesi (*Aesculus hippocastanum*) bitkisinin yaprakları kullanılmıştır. Bitki örnekleri Erciyes Üniversitesi kampüs alanı içerisinde toplanmıştır. Toplanan bitkilerin yaprakları önce çeşme suyu daha sonra deiyonize su ile yıkandıktan sonra iki hafta boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kurutulmuş bitki yaprakları öğütücü ile toz haline getirilmiştir.

2.1.2. Mikroorganizma Örnekleri

Çalışmada sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitelerini belirlemek amacıyla 14 bakteri ve 3 maya örneği olmak üzere toplam 17 mikroorganizma kullanılmıştır. Kullanılan mikroorganizmaların isimleri ve kültür koleksiyon kodları Tablo 2.1'de gösterilmektedir.

Tablo 2.1. Kullanılan organizmalar ve kültür koleksiyon merkezi kodları

	MİKROORGANİZMA	ORGANİZMA KODU
1	<i>Bacillus cereus</i>	NRLL B-3008
2	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
3	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
4	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
5	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
6	<i>Klebsiella pneumonia</i>	ATCC 13883
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCT 25923
9	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
10	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19115
11	<i>Micrococcus luteus</i>	ATCC 10240
12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 49838
13	<i>Corynebacterium renale</i>	ATCC 19412
14	<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 25933
15	<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 13803
16	<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
17	<i>Candida krusei</i>	ATCC 1424

Bacillus cereus: 1x3-4 µm büyüklüğünde, gram pozitif, çubuk şeklinde, endospor oluşturan, fakültatif aerobik bir bakteridir. Bir toprak bakterisi olan *Bacillus cereus* emetik ve enterotoksin salgılaması ile birçok tipteki besine etki ederek gıda zehirlenmelerine yol açabilir [50].

Bacillus subtilis: Toprakta yaygın şekilde bulunan gram pozitif çubuk şekilli bakteridir. Tıpkı *B. cereus* gibi *B. subtilis*'de endospor oluşturan bir bakteridir ve bu özelliği ile ekstrem koşullara karşı aşırı dayanıklıdır. *B. subtilis* hali hazırda toprak, hava, bitki vs. gibi her ortamda bulunmaktadır. İnsan vücudunun dahil olduğu bu ortamlarda inaktif olarak bulunur ve aktifleştğinde birçok enzim üreterek hastalıklara vs. yol açarlar [51].

Enterobacter aerogenes: Toprak, su ve günlük ürünler ile hayvan ve insanların doğal gastrointestinal florasında bulunan gram negatif bakteridir. Çubuk şeklindeki bu bakteri

çeşitli büyüklüklerde olup spor oluşturmaz ve hareketli ve hareketsiz, aerobik ya da anaerobik olabilir [52].

***Enterococcus faecalis*:** Hareketsiz, gram pozitif, küre biçiminde bakteridir. Tek başına, çiftler halinde ya da kısa zincirler halinde, genellikle insanların büyük bağırsaklarında bulunur. Fermantatif metabolizmaya sahip bir fakültatif anaerobik organizmadır. Antibiyotiğe en dirençli bakteri olarak da bilinmektedir. Birçok doğal antibiyotik direnç maddesi içerir [53].

***Escherichia coli*:** Escherichia coli, ortalama 2-6 µm boyunda, 1-1,5 µm eninde Gram negatif bir basil peritriş kirpikleri sayesinde hareketlidir. Hareketsiz suşları da vardır. Bazı suşlarda kapsül veya mikrokapsül bulunmaktadır. Spor oluşturmazlar ve fakültatif anaerobturlar [54].

***Klebsiella pneumonia*:** Birçok hastalığa neden olabilen gram negatif bakteridir. Pnömoni, kan enfeksiyonları, yara ya da ameliyat bölgesi enfeksiyonları ve menenjit bu hastalıklardan bazılarıdır [55].

***Pseudomonas aeruginosa*:** Gram negatif, nonfermantatif olan bakteri, spor üretmez. Düz ve hafif kıvrımlıdır. Çubuk şekilli bu bakteriler tek veya çoklu kamçıları ile genellikle hareketlidir ve doğada yaygın bulunurlar [56].

***Staphylococcus aureus*:** *Micrococcaceae* familyasına ait olan *Staphylococcus aureus* bakterisi gram pozitif, fakültatif anaerob, spor oluşturmayan, hareketsiz ve katalaz pozitif olan bir bakteridir [57].

***Staphylococcus epidermidis*:** Çekirdeklerin salkım halinde bulunduğu stafilokoklardan bir bakteri türü olan *Staphylococcus epidermidis*, gram pozitif, katalaz pozitif, kogülaz negatif özelliktedir. Doğal olarak insan üst solunum yollarında bulunur. Penisilin ve metisilini de içeren geniş bir antibiyotik grubuna direnç gösterirler [58].

***Listeria monocytogenes*:** Fakültatif anaerob, gram pozitif bakteridir. Listeriosis adı verilen enfeksiyona neden olur [59].

***Micrococcus luteus*:** Gram pozitif, hareketsiz, saprofitik bir bakteridir. Üreaz ve katalaz pozitifdir. Kum, toprak, su, hava ve memeli derisinin normal florasında yer alır. Ayrıca insan ağız, mukoza, orofarinks ve üst solunum yollarında da doğal olarak bulunur [60].

***Pseudomonas fluorescens*:** Zorunlu aerobik, gram negatif, çubuk şeklinde bakteridir. Bitkiler, toprak ve su gibi yüzeyler gibi birçok çevrede bulunan bir bakteridir. Hareket etmek için birden çok polar kamçıları vardır ve demir toplayarak bunların hareketini sağlarlar [61].

***Corynebacterium renale*:** Gram pozitif, çubuk şeklinde 1.3 ila 2.6 µm arasında değişen uzunluktadır. Spor oluşturmazlar ve kapsüle sahip değildirler. Fakültatif anaerob olan bu bakteri hayvan patojenidir. Ve genellikle böbrek rahatsızlıklarına neden olur [62].

***Proteus mirabilis*:** Enterobacteriaceae familyasında bulunan *Proteus mirabilis*; toprakta, suda ve insan gastrointestinal sisteminde yaşayabilen ve insanlarda enfeksiyonlara sebebiyet veren bir bakteridir. Bu genusa ait mikroorganizmalar; hareket organelleri içermeleri, H₂S oluşturmaları ve üreaz enzimine sahip olmaları bakımından bir çok mikroorganizma türünden rahatlıkla ayrılabilir [63].

***Candida tropicalis*:** *Candida* cinsine ait bir maya olup, yaygın bir tıbbi maya patojeni olmasıyla kolaylıkla tanınabilir. Zeytin ağacından biyodizel üretimi için bu bakteri kullanılabilir [64].

***Candida albicans*:** Saccharomycetaceae familyası mensubu *Candida albicans* , maya formundaki fungus türlerinden oluşmaktadır.. Doğal flora elemanı olduğu bilinen bu bakteri, özellikleri bağışıklık sistemi baskılanmış ve vücudu içine yabancı materyal yerleştirilmiş hastalarda, fırsatçı patojen olarak çelikti enfeksiyonlardan sorumlu olmaktadır [65].

***Candida krusei*:** Çikolata üretiminde kullanılan bir maya olan *Candida krusei*, hastane kaynaklı patojenlerin başında gelir. Flukonazole karşı doğal bir direnç göstermektedir. Maksimum 43-45 °C’ de maksimum gelişme gösterir [66].

2.1.3. Besiyerleri

Sabouraud %4 Dekstroz Agar Besiyeri (gr/lt) : 10,0 gr pepton; 40,0 gr D(+) glikoz; 15,0 gr agar 121°C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Sabouraud %2 Dekstroz Sıvı Besiyeri (gr/lt) : 5,0 gr pepton (et), 5,0 gr pepton (kazein), 20,0 gr D(+) glikoz 121°C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Müller Hinton Agar Besiyeri (gr/lt): 2,0 gr et özütü, 17,5 gr kazein hidrolizat, 1,5 gr nişasta, 17.0g agar 121°C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Müller Hinton Sıvı Besiyeri (gr/lt): 2,0 gr et özütü, 17,5 gr kazein hidrolizat, 1,5 gr nişasta 121°C’ de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

2.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Tamponlar ve Çözeltiler

Mikroorganizmaların üreme durumlarının tayininde kullanılan kimyasal madde:

2,3,5- Triphenyltetrazolium Chloride 250 mg tartılarak 100 ml etanolde (%96) iyice çözülmüş ve sprey özellikli cam şişede buzdolabında saklanmıştır.

McFarland No: 0.5 Bulanıklık Standardı:

0,5 ml BaCl₂ (% 1.175) ve 99,5 ml H₂SO₄ (0.36 N) karıştırılarak 10 ml’ lik kapaklı tüpe doldurulmuş ve kapağı parafilm ile sıkıca kapatılan tüp, karanlıkta oda sıcaklığında saklanmıştır.

Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan Standart Maddeler:

-Kloramfenikol (30 µg)

-Flukonazol

-Ampisilin (10 µg)

Biyolojik nanopartikül sentezi için kullanılan çözeltiler

5 mM Gümüş nitrat (AgNO₃): 0,050 gr AgNO₃ tartılıp 60 ml distile suda çözülür.

Kimyasal nanopartikül sentezi için kullanılan çözeltiler

4 mM Gümüş nitrat (AgNO_3): 3,39 mg tartılıp 5 ml distile suda çözülür.

1 mM Sodyum borohidrid (NaBH_4) : 1,70 mg tartılıp 45 ml deiyonize su da çözülür

3,55 mM Trisodyum sitrat (TSC): 46,98 mg tartılıp 45 ml deiyonize suda çözülür.

0,1 M Sodyum hidroksit (NaOH): 0,079 gr tartılıp 20 ml deiyonize suda çözülür.

Antioksidant aktivite için kullanılan çözeltiler

0,1 mM DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) : 0,0027 gr tartılıp 70 ml metanolde çözülür.

BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen): 100 ppm konsantrasyonda metanol içerisinde çözülerek hazırlanır.

İlaç salınımı için kullanılan çözeltiler

Resveratrol (RSV) : %1'lik etanol içerisinde $50\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda hazırlanır.

Fosfat tamponu: 8 gr NaCl , 0,2 gr KCl , 1,44 gr Na_2HPO_4 , 0,24 gr KH_2PO_4 ' i 1 litre distile suda çözülür. HCl ile pH 7.4' e ayarlanır.

DNA etkileşimi çalışmaları için kullanılan çözeltiler:

-Tris Asetik Asit EDTA (TAE) Tamponu (x50) (pH 8.0): 242 g Tris, 57,1 ml Glasiyal asetik asit, 0,5 M 100 ml EDTA (pH 8.0), maddeler distile su içerisinde çözülerek hacim 1000 ml' ye tamamlanmıştır.

-Yükleme tamponu: % 0,1 bromfenol mavisi, % 0,1 ksilen cyanol

-TE: 10mM Tris-HCl, 0,1 Mm EDTA

-Etidyum bromür: 10 mg/ml derişimde hazırlanmış ve koyu renkli şişelerde muhafaza edilmiştir.

2.2. Gümüş Nanopartiküllerinin (AgNP) Biyolojik Sentezi

AgNP' nin biyolojik sentezi aşağıdaki yöntemle yapılmıştır [41]:

- 1) Kurutulmuş bitki yaprakları havanda ezilerek toz haline getirilmiştir ve 20 gr tartılarak üzerine 100 ml distile su eklenmiştir.
- 2) Hazırlanan çözelti yaklaşık 5 dakika boyunca kaynatılır. Kaynama işlemi bittikten sonra karışım oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır.
- 3) Oda sıcaklığına getirilen karışım Whatman No 1 filtre kağıdı ile süzülür ve filtratlar sentezde kullanılmak üzere +4 derecede bekletilmiştir.
- 4) Hazırlanan yaprak özütünden 20 ml alınarak üzerine 5 mM 60 ml AgNO_3 çözeltisi eklenir. Karışım oda sıcaklığında renk değişimi gerçekleşene kadar karıştırılmıştır.
- 5) Renk değişimi gözlemlendikten sonra karışım 4-5 kez 10.000 g de 10 dk santrifüj edilmiştir. Bu sayede nanopartiküller diğer organik moleküllerden arınacaktır.
- 6) Her seferinde süpernatant distile su ile yer değiştirilmiştir.
- 7) Son olarak dipte kalan kısım etüvde kurutulmuştur.

2.3. Gümüş Nanopartiküllerinin (AgNP) Kimyasal sentezi

AgNP' nin kimyasal sentezi için 45 ml 1 mM sodyum borohidrid (NaBH_4) ve 3,55 mM trisodyum sitrat (TSC) karışımı 30 dakika boyunca 60 °C' de ısıtılmıştır. 30 dakikanın sonunda 4 mM AgNO_3 çözeltisinden 5 ml damla karışıma eklenmiş ve sıcaklık 90 °C' ye kadar çıkarılmıştır. Sıcaklık 90 °C'ye ulaştığında 0,1 M NaOH kullanılarak karışımın pH'sı 10,5' e ayarlanmış ve ısıtma işlemine renk değişimi gerçekleşene kadar devam edilmiştir. Renk değişimi gerçekleştikten sonra karışım oda sıcaklığında soğutulmuştur. Reaksiyona girmemiş reaktiflerden arınması için karışım 12000 rpm' de 15 dk santrifüj edilmiştir. Deiyonize su ile üç kez yıkanıp kullanılmak üzere 4 °C' de saklanmıştır [67].

2.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Biyolojik ve kimyasal olarak sentezlenen AgNP'lerin özelliklerinin belirlenmesi için FT-IR, SEM (Zeiss Evo 10) 25 kV çalışma geriliminde kullanılarak görüntüler elde edilmiştir. ZETA potansiyeli (Malvern), ve UV-Vis spektrometre (Perkin Elmer)

analizleri Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (ERNAM) ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (TAUM) 'inde hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır.

2.5. Serbest radikal giderim aktivitesi

AgNP' nin serbest radikal giderim aktiviteleri DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) serbest radikali kullanılarak belirlenmiştir. Yöntem radikalın karakteristik mor renginde meydana getirilen renk değişikliğinin 512 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmesi esasına dayanmaktadır [39]. Yöntem aşağıdaki gibidir:

- 1) Sentezlenen AgNP' den 50 µl alınarak deney tüplerine aktarılmıştır..
- 2) Üzerlerine 1 ml 0,1 mM DPPH radikalının metanol ile hazırlanan çözeltisi eklendikten sonra vorteks ile karıştırılıp oda sıcaklığında, karanlıkta 2 saat bekletilmiştir.
- 3) Aynı işlem bileşik yerine çözücü içeren bir kör tüpü için eş zamanlı olarak tekrarlanmıştır.
- 4) Karışımların absorbans değerleri 517 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Her bileşik için ölçümler üç kez tekrarlanmış ve sonuçların ortalaması alınmıştır.
- 5) Çözeltilerinin serbest radikal temizleyici etkisi DPPH absorpsiyonunun % inhibisyonu olarak belirtilmiştir. Bu değer aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Radikal giderim aktivitesi (\% İnhibisyon)} = 100 \times (A \text{ kontrol} - A \text{ örnek}) / A \text{ kontrol}$$

Aynı işlemler pozitif kontrol olarak kullanılan sentetik antioksidan BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen) için tekrarlanmıştır.

2.6. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

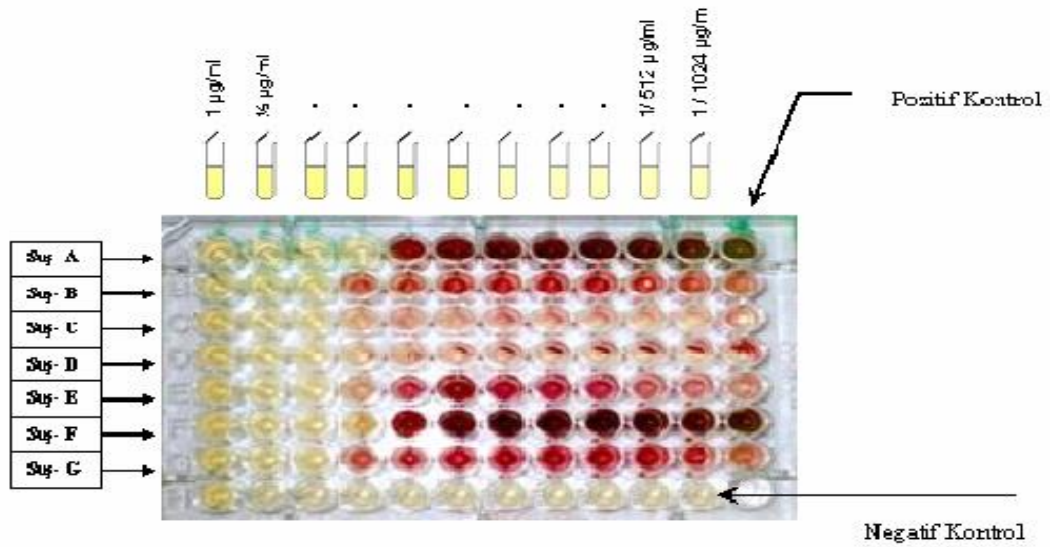
AgNP' nin ve yaprak özütünün antimikrobiyal aktivite denemeleri agar kuyucuk difüzyon yöntemi ile analiz edilmiştir [68]. Çalışmada 7' şer adet Gram pozitif ve negatif 14 bakteri ve 3 adet maya suşu olmak üzere toplam 17 mikroorganizma kullanılmıştır (Tablo 2.1).

Stok kültürlerden, bakteriler nutrient sıvı besiyerinde 35 °C’ de 24 saat, maya suşları Saboruod Dekstroz sıvı besiyerinde 30 °C’ de 48 saat inkübasyona bırakılarak yetiştirilmiştir.

Sıvı ortamlarda geliştirilen her mikroorganizma kültüründen tekrar sıvı ortamları içeren tüplere %1 oranında aşılansarak 18 saat ekponansiyel faza gelene kadar yetiştirilmiş ve kültürlerin yoğunlukları Mc Farland 0,5’e göre ayarlanmıştır [68].

Yoğunlukları ayarlanan mikroorganizmalardan 100 µl alınarak Muller hinton agar besi ortamına yayma ekim ile ekilmiş ve sonrasında 6 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Açılan kuyucuklar içerisine AgNP ve yaprak özütünden 100 µl ilave edilip inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra inhibisyon zonlarının çapı ölçülerek etkileri belirlenmiştir [69]. Denemeler üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

Agar kuyucuk yönteminde mikroorganizmalara karşı etkili olduğu tespit AgNP’ nin en düşük inhibe edici konsantrasyonları (MİK) 96 kuyucuklu mikrotitrasyon petrileri kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 2.21.). Mikrotitrasyon petrilerinin ilk kuyucuklarına 90 µl sıvı besiyeri ve 100 µl stok AgNP ve yaprak özütü (%20’lik) pipetlenip karıştırıldıktan sonra 100 µl alınarak bir sonraki kuyucuğa pipetlenip bu seyreltmelere son kuyucuğa kadar devam edilerek her kuyucuktaki konsantrasyon bir öncekinin yarısı olacak şekilde ayarlanmıştır (100, 50, 25, 12,5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19, 0.09, 0.045 ppm) ve son olarak da her kuyucuğa 100 µl organizma ilave edilerek bakteriler için 35°C’de 24 saat, mayalar için 30 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda test bileşiklerinin MİK değerleri petrilerin üzerlerine sıkılan trifenil tetrazolyum klorid (TTC)’ in 37°C’ de 3 saatlik inkübasyonu sonucu meydana gelen renklenmeye bakılarak tespit edilmiştir (Şekil 2.1). Üremenin gözlemlendiği en küçük numaralı kuyucuğun temsil ettiği konsantrasyon MİK olarak saptanmıştır. Deneyler üç paralel olarak tekrarlanmıştır.



Şekil 2.1. Mikrodilasyon Broth Tekniğinin Denemelerde Uygulanış Şekli [70]

2.7. İlaç Salınım Çalışmaları

AgNP' nin ilaç salınım özelliklerinin belirlenmesi Kumar ve ark.'larının (2014) çalışmasına göre yapılmıştır [71]. İlk olarak resveratrolün AgNP ile birleşmesini sağlamak amacıyla 10µg/ml konsantrasyonda %1'lik etanol içerisinde hazırlanmış 6 ml resveratrol (RSV) çözeltisi üzerine 30 ml AgNP damla damla ilave edilerek 2 saat 150 rpm'de oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Hazırlanan RSV@AgNP solüsyonu 18,600 g'de 1 saat santrifüj edilmiş ve pellet distile su içerisinde çözülerek UV spektrofotometre ve FT-IR analizleri yapılmıştır.

Hazırlanmış olan RSV@AgNP' den resveratrolün *in vitro* geri salınımı iki farklı pH ortamında (pH 5.2 ve pH 7.4) membran diyaliz metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Resveratrol ile kaplanmış gümüş nanopartiküller 37 °C'de fosfat tamponunda (pH 5.2 ve pH 7.4) diyaliz tüpüne (Molecular weight cut-off (MWCO) =10 kDa) yerleştirilmiş ve 100 rpm' de karıştırılmıştır. Resveratrol salınım miktarını belirlemek için 30 dakikalık periyotlarda 1'er ml örnek alınıp UV visible spektrofotometrede 304 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Salınımı gerçekleşen resveratrol miktarını hesaplamak için %1'lik etanol içerisinde 1 mg/ml ile 50 mg/ml arasında konsantrasyonlarda hazırlanmış resveratrolün 304 nm dalga boyunda ölçümleri ile oluşturulan standart eğri kullanılmıştır.

2.8. DNA Etkileşimi Çalışmaları

AgNP' nin ve plazmid DNA arasındaki etki agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan AgNP'lerin 20 µl si üzerine 2 µl plazmid DNA (0,5 µg/ml) ilave edilmiştir. Örnekler 37 °C' de 24 saat karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra AgNP –DNA karışımının 10 µl'si yükleme tamponu ile karıştırılıp %1'lik agaroz jelle yüklenerek TAE tamponu içerisinde 60 V'ta 2 saat süre ile elektroforez yapılmıştır. Elektroforezden sonra jeller etidyum bromür (0,5 µg/ml) ile boyanarak görüntüleme sisteminde fotoğrafları alınmıştır. Denemeler üç tekrarlı olarak yapılmıştır [72].

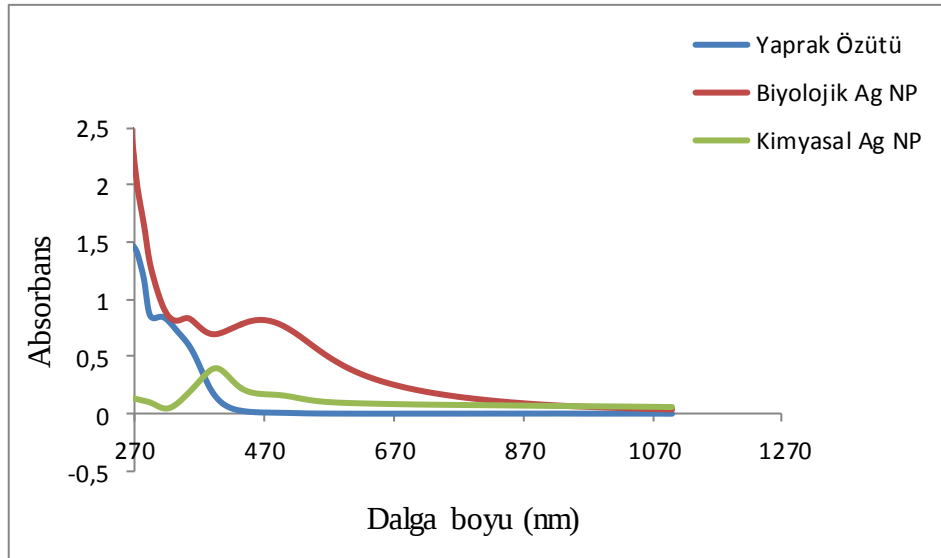
3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Atkestanesi Yaprak Özütü ile Gümüş Nanopartiküllerin Sentez ve Karakterizasyonu

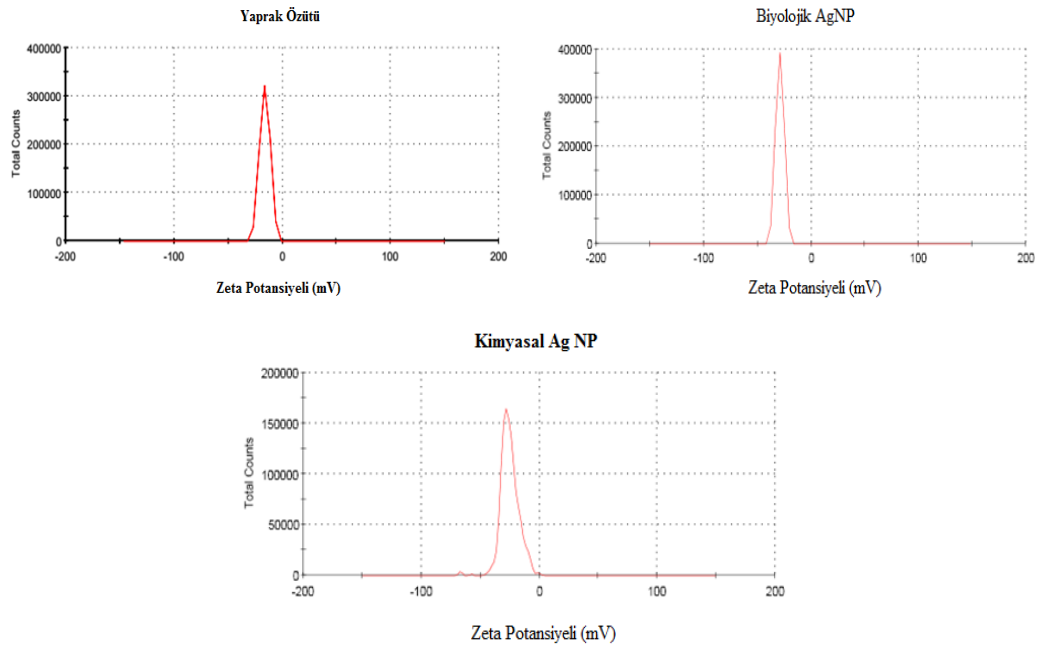
UV-Vis spektrofotometre kullanımı metalde var olan lokalize yüzey plazmon rezonansını uyarak, bir elektrik alan oluşturup belirli bir dalga boyunda rezonans meydana getirir ki o dalga boyunda güçlü ışın saçılmasına neden olmaktadır. Bu sayede spektrofotometrik ölçümlerin değerlendirilmesi; farklı dalga boylarında renksel ya da kolorimetrik olarak kullanılan skala değerlendirmesi yapılır. Atkestanesi yaprak özütü AgNP kompleksindeki Ag^+ iyonunun Ag^0 iyonuna indirgenmesi, yüzey plazmon rezonansının uyarılmasını sağlamıştır ve sonuç olarak UV-Vis spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. UV-Vis ölçümlerine göre 420-470 nm dalga boyunda AgNP oluşması beklenir.

Atkestanesi yaprak özütünün UV-vis ölçümü ile ~311 nm absorbans piki verdiği görülmüştür. Kimyasal ve biyolojik olarak sentezlenen AgNP' nin UV-Vis spektrumu sırasıyla ~396 nm ve ~464 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 3.1).



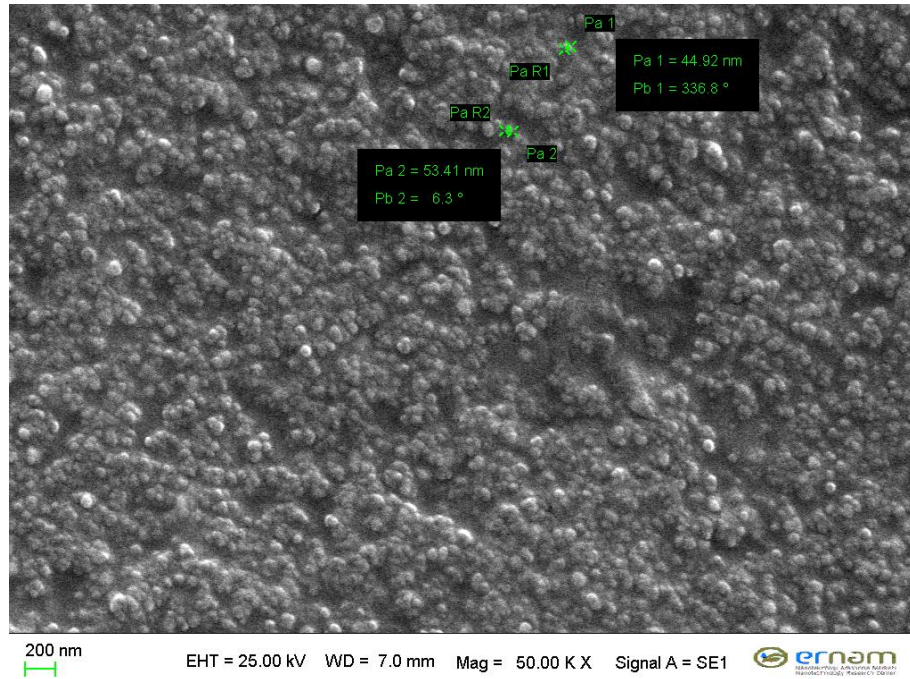
Şekil 3.1. Biyoloji AgNP, kimyasal AgNP ve yaprak özütünün UV-Vis spektrumları

Sentezlenen nanopartiküllerin ve yaprak özütünün elektriksel yükü zeta analizi ile belirlenmiştir. Yapılan ölçüm sonuçlarına göre yaprak özütü, biyolojik AgNP ve kimyasal AgNP' nin elektriksel yükü sırasıyla -16 mV, -29 mV, -25 mV olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.2)

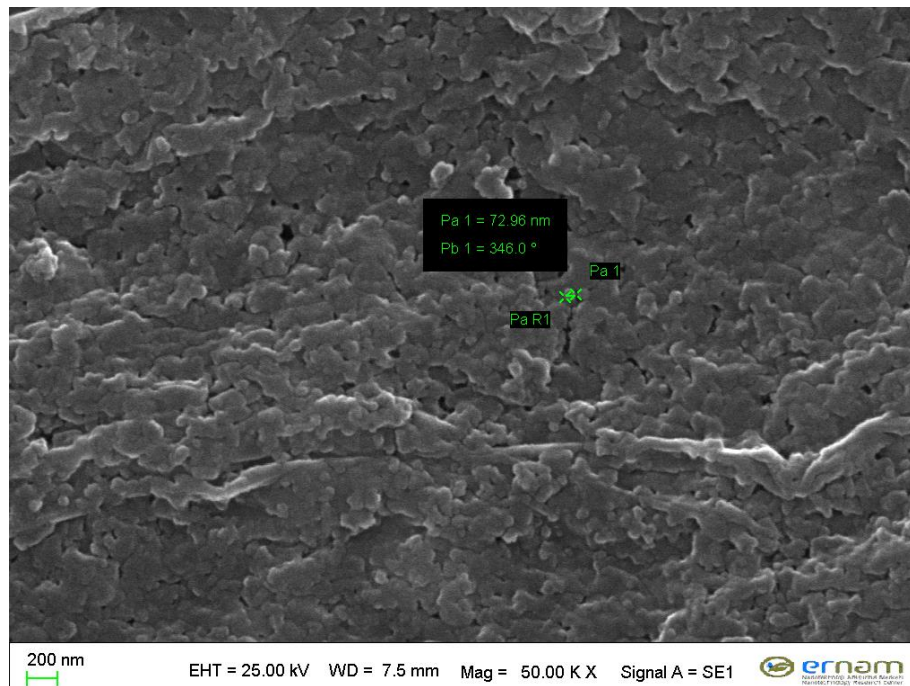


Şekil 3.2. Biyoloji AgNP, kimyasal AgNP ve yaprak özütünün zeta potansiyel grafikleri

Sentezlenen nanopartiküllerin yüzey morfolojileri ve boyutları SEM ile belirlenmiştir. Yapılan görüntüleme sonucunda biyolojik AgNP' nin küresel boyutta ve 50 ± 5 nm büyüklüğünde (Şekil 3.3), kimyasal AgNP' nin küresel boyutta ve 70 ± 5 nm büyüklüğünde (Şekil 3.4) olduğu belirlenmiştir.



Şekil 3.3. Biyolojik AgNP' nin SEM görüntüsü

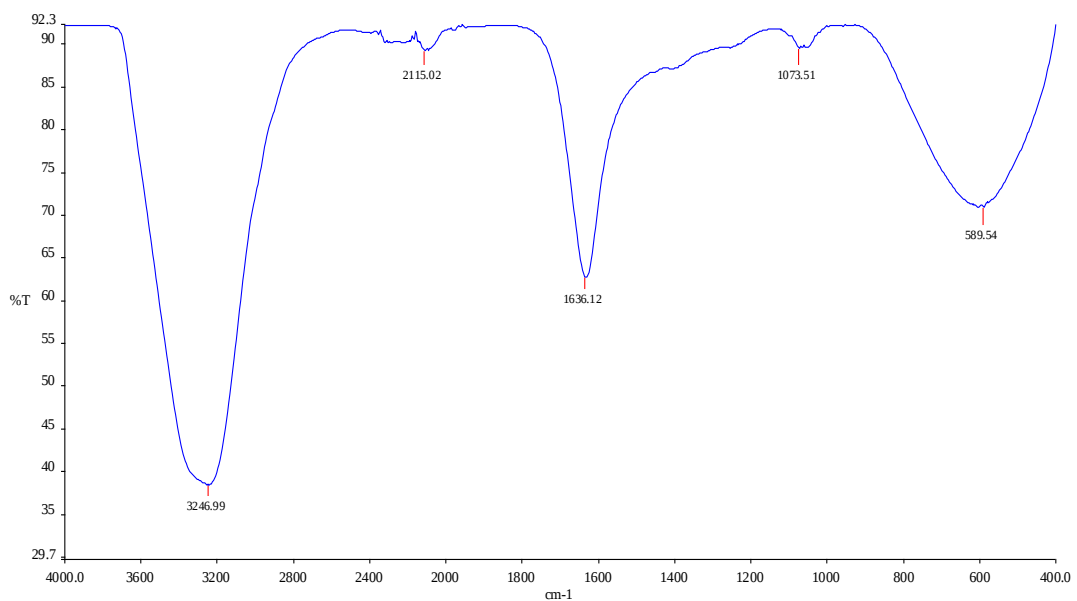


Şekil 3.4. Kimyasal AgNP' nin SEM görüntüsü

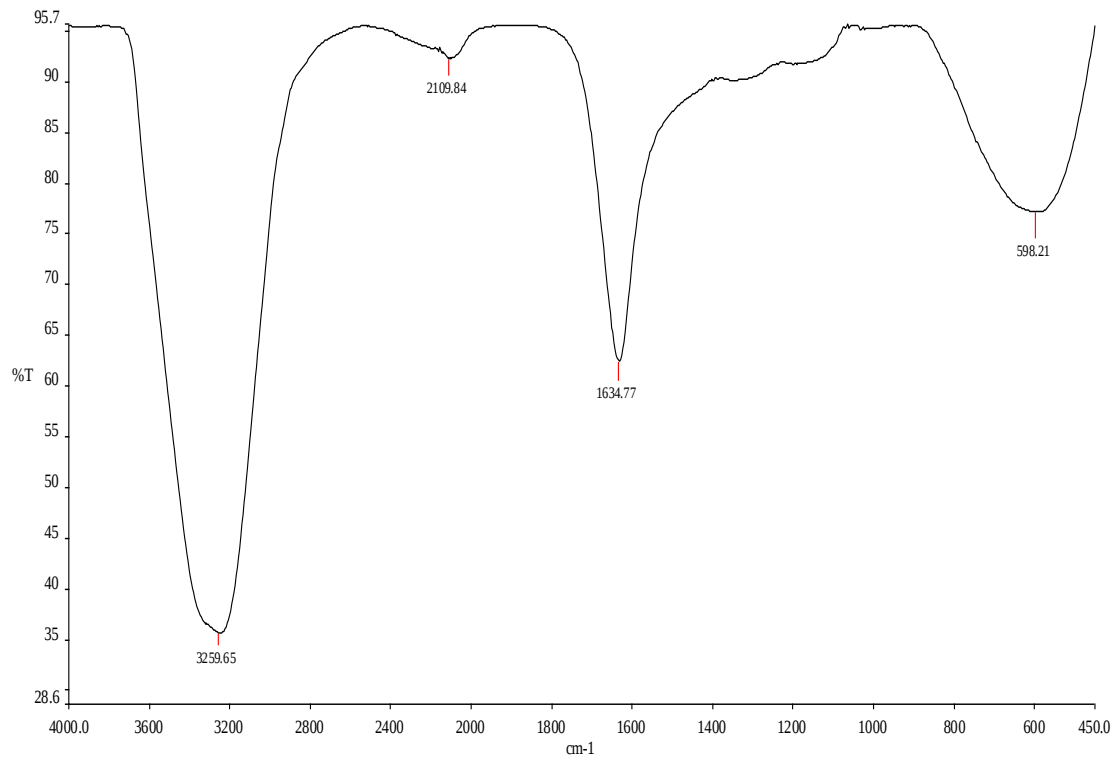
AgNP'lerin biyolojik indirgenmesinden ve stabilizasyonundan sorumlu moleküllerdeki çeşitli fonksiyonel grupların varlığı FT-IR analizleri ile belirlenmiştir. Gözlemlenen şiddetli bantlar, fonksiyonel grupları tanımlamak için standart değerlerle karşılaştırılmıştır. Biyolojik AgNP'lerin yaprak özütü indirgenmesi ile 3246, 2115, 1636, 1073, 589 cm^{-1} dalga boyunda spektrumlar gösterdiği belirlenmiştir. 3246 cm^{-1} dalga boyundaki titreşimlerin saponin yapısındaki -OH gruplarından kaynaklandığı belirlenmiştir. 2115, 1636 ve 1073 cm^{-1} dalga boyunda aromatik bileşiklerin -CH gruplarından kaynaklanan güçlü dalgalanmalar ölçülmüştür. 589 cm^{-1} dalga boyunda -CO gruplarında ve -CC gruplarında gerilme titreşimleri görülmektedir (Şekil 3.5).

Kimyasal AgNP 3259 cm^{-1} dalga boyunda O-H gruplarından kaynaklanan belirgin bantlar vermiştir. 2109, 1634 cm^{-1} dalga boyunda -CH gruplarından kaynaklanan güçlü dalgalanmalar göstermiştir. 598 cm^{-1} C=O gruplarında ve C=C gruplarında gerilme titreşimleri görülmektedir (Şekil 3.6).

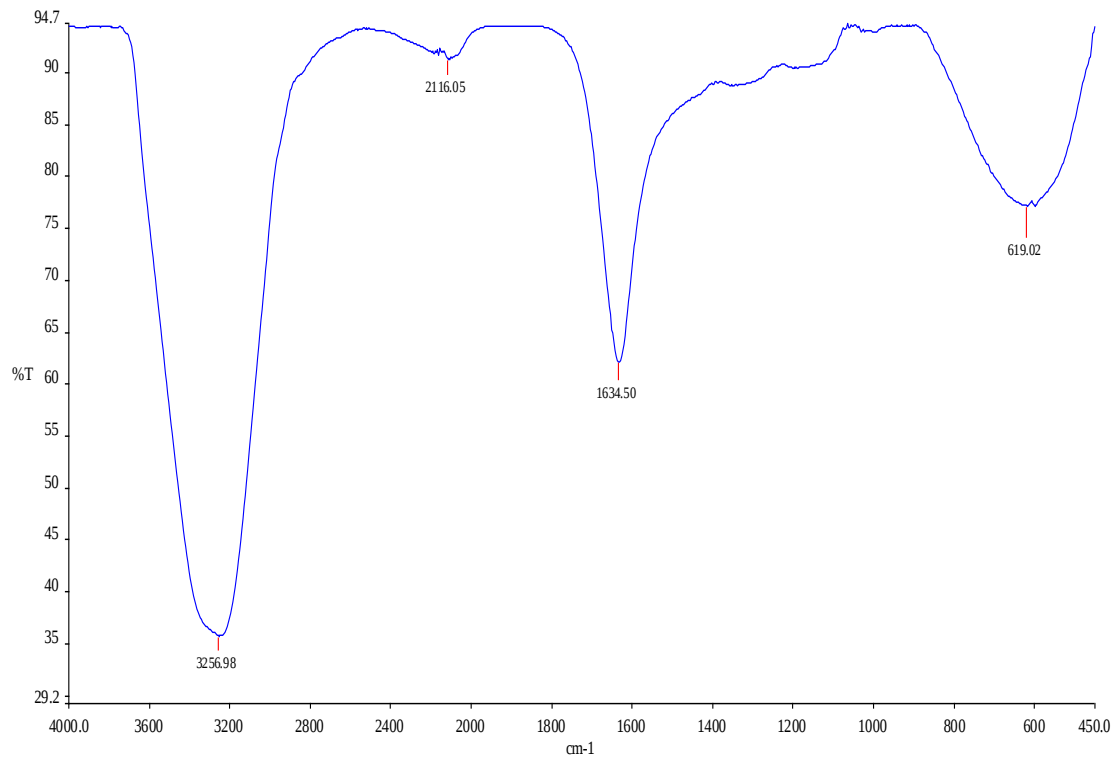
Yaprak özütünün 3256 cm^{-1} dalga boyunda O-H gruplarından kaynaklanan belirgin bantlar vermiştir. 2116, 1634 cm^{-1} dalga boyunda -CH gruplarından kaynaklanan güçlü dalgalanmalar göstermiştir. 619 cm^{-1} -CO gruplarında ve -CC gruplarında gerilme titreşimleri görülmektedir (Şekil 3.7).



Şekil 3.5. Biyolojik AgNP FT-IR spektrumları



Şekil 3.6. Kimyasal AgNP FT-IR spektrumları



Şekil 3.7. Atkestanesi yaprak özütü FT-IR spektrumları

3.2. Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

3.2.1. Agar Difüzyon Sonuçları

Atkestanesi yaprak özütü ve AgNP' nin antimikrobiyal aktiviteleri 100 ppm konsantrasyonun da agar kuyucuk yöntemi ile gram pozitif bakterilerinden, *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *B. subtilis* ATCC 29213, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *C. renale* ATCC 19412, *M. luteus* ATCC 10240, *E. fecalis* ATCC 292112, gram negatif bakterilerden *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, , *B. cereus* NRLL B-3008, *E. aerogenes* ATCC 13048, *K. pneumonia* ATCC 13883, *P. fluorescens* ATCC 49838 *P. mirabilis* ATCC 25933 olmak üzere 14 adet bakteri suşu ve mayalardan *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 13803 ve *C. krusei* ATCC 1424 olmak üzere 3 adet maya suşu kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Tablo 3.1 de gösterilmiştir.

Biyolojik olarak sentezlenen AgNP' nin çalışılan 14 bakteriye karşı etkili olduğu gözlenmiştir. Mayalara karşı herhangi bir etkisi tespit edilmemiştir. AgNP Gram (+) bakterilerinden *S. aureus* ATCC 25923'e karşı etki göstermiş olup zon çapı $17,5 \pm 2,12$ mm olarak ölçülmüştür. AgNP Gram (+) bakterilerinden *S. epidermidis* ATCC 12228 ve *Listeria monocytogenes* ATCC 19115'e karşı etkisi aynı olup $13 \pm 0,00$ mm inhibisyon zon çapı ölçülmüştür. AgNP Gram (+) bakterilerinden *B. subtilis* ATCC 29213 karşı etki göstermiş olup $15 \pm 2,64$ mm inhibisyon zon çapıyla etki göstermiştir. AgNP Gram (+) bakterilerinden *C. renale* ATCC 19412'e karşı $12 \pm 0,00$ mm inhibisyon zon çapıyla etkili olmuştur. AgNP Gram (+) bakterilerinden *M. luteus* ATCC 10240'e karşı etkisi $17 \pm 0,00$ mm inhibisyon zon çapıyla etkili olmuştur.

AgNP gram (+) bakterilerinden *E. fecalis* ATCC 292112 ve *B. cereus* NRLL B-3008'e karşı etkisi aynı olup $10,5 \pm 1,41$ mm inhibisyon zon çapı ölmüştür. AgNP gram (-) bakterilerinden *P. aeruginosa* ATCC 27853' e karşı etkisi $20 \pm 0,00$ mm inhibisyon zon çapı ölçülmüştür ve en dirençsiz bakteridir. AgNP gram (-) bakterilerinden *E. coli* ATCC 25922 ve *P. mirabilis* ATCC 25933' e karşı etkisi aynı olup $10 \pm 0,00$ mm inhibisyon zon çapı ölçülmüştür. AgNP gram (-) bakterilerinden *E. aerogenes* ATCC 13048' e karşı etkisi $11 \pm 0,00$ mm inhibisyon zon çapı ölçülmüştür. AgNP gram (-) bakterilerinden *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883'e karşı etkisi $12,5 \pm 0,70$ mm

inhibisyon zon çapı ölçülmüştür. AgNP gram(-) bakterilerinden *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49838'e karşı etkisi $8 \pm 0,00$ inhibisyon zon çapı ölçülmüştür ve en duyarlı bakteri olarak belirlenmiştir.

Kimyasal olarak sentezlenen AgNP' nin ve yaprak özütünün test edilen konsantrasyon da bakteri ve maya suşları üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

Tablo 3.1. Biyolojik ve kimyasal AgNP ve yaprak özütünün antimikrobiyal etkisi.

Mikroorganizmalar	Yaprak özütü	Biyolojik AgNP	Kimyasal AgNP	Ampisilin (50 µg)	Flukonazol (10 µg)
<i>S. aureus</i>	-	$17,5 \pm 2,12$	-	$51,66 \pm 0,58$	-
<i>S. epidermidis</i>	-	$13 \pm 0,00$	-	$20,6 \pm 0,59$	-
<i>B. subtilis</i>	-	$15 \pm 2,64$	-	$26,33 \pm 1,15$	-
<i>L. monocytogenes</i>	-	$13 \pm 0,00$	-	$31,8 \pm 0,00$	-
<i>C. renale</i>	-	$12 \pm 0,00$	-	$54,2 \pm 0,00$	-
<i>M. luteus</i>	-	$17 \pm 0,00$	-	$40,3 \pm 0,08$	-
<i>E. fecalis</i>	-	$10,5 \pm 1,41$	-	$28,33 \pm 1,52$	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	$20 \pm 0,00$	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	$10 \pm 0,00$	-	$16,66 \pm 1,15$	-
<i>B. cereus</i>	-	$10,5 \pm 1,41$	-	$26 \pm 0,00$	-
<i>E. aerogenes</i>	-	$11 \pm 0,00$	-	-	-
<i>K. pneumonia,</i>	-	$12,5 \pm 0,70$	-	$13,9 \pm 0,00$	-
<i>P. fluorescens</i>	-	$8 \pm 0,00$	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	-	$10 \pm 0,00$	-	$28,3 \pm 0,58$	-
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	$29 \pm 0,00$
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	$30 \pm 0,00$
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	$30 \pm 0,00$

-: İnhibisyon yok

*: İnhibisyon zonlarına 6 mm delik çapı dahil edilmiştir

3.2.2. MİK Sonuçları

Agar difüzyon yönteminde bakterilere karşı etkili olduğu tespit edilen bileşiklerin MİK değeri 96 kuyucuklu pleytler kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Tablo 3.2 de test edilen bileşiklerin bakterilere karşı minimum inhibe edici değerleri ($\mu\text{g ml}^{-1}$) verilmiştir.

Biyolojik olarak sentezlenen AgNP' nin test edilen mikroorganizmalardan *M. luteus*, *E. aerogenes* ve *C. renale*'ye karşı $12,5 (\mu\text{g ml}^{-1})$ MİK değeri ile etkili olmuştur.

AgNP' den test edilen mikroorganizmalardan MİK= 6,25 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) değeri ile *K. pneumonia*, *P. mirabilis* ve *B. subtilis* 'e karşı etkili olmuştur.

AgNP' den test edilen mikroorganizmalardan MİK= 3,125 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) değeri ile *B. cereus* ve *S. epidermidis* 'e karşı etkili olmuştur.

AgNP' den test edilen mikroorganizmalardan MİK= 1,56 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) değeri ile *E. coli*, *P. fluorescens*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *L. monocytogenes* 'e karşı etkili olmuştur.

AgNP' den test edilen mikroorganizmalardan MİK= 0,19 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) değeri ile *E. fecalis* 'e karşı etkili olmuştur.

Tablo 3.2. Test edilen mikroorganizmaların MİK değerleri

Konsantrasyonlar (ppm)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>B. subtilis</i> ATCC 29213	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	<i>C. renale</i> ATCC 19412	<i>M. luteus</i> ATCC 10240	<i>E. fecalis</i> ATCC 29212	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. cereus</i> NRL B-3008,	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048,	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>P. fluorescens</i> ATCC 49838	<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933
100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6,25	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
3,125	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
1,56	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
0,78	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
0,39	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
0,19	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
0,09	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0,045	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

3.3. Serbest Radikal Giderim Aktivite Sonuçları

Atkestenesi yaprak özütü, biyolojik ve kimyasal AgNP' nin antioksidan aktiviteleri DPPH yöntemiyle ölçülmüştür. Sonuçlar % inhibisyon olarak belirtilmiş ve sentetik antioksidan olan BHT' nin % inhibisyon değerleri ile karşılaştırılmıştır.

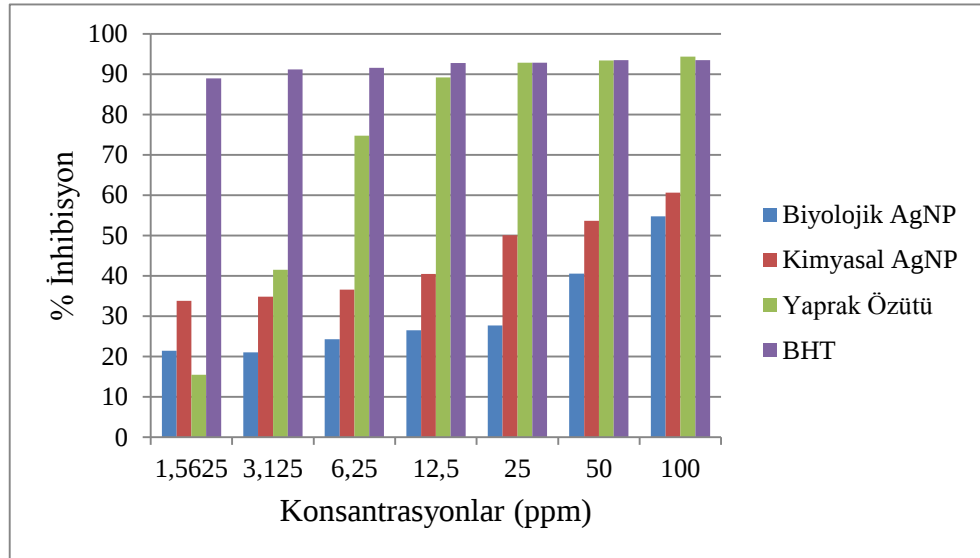
Çalışılan yaprak özütü, BHT, biyolojik ve kimyasal AgNP'nin % inhibisyon değerleri Tablo 3.3. gösterilmiştir.

Tablo 3.3. DPPH süpürme aktivitesi sonucu inhibisyon değerleri

% İnhibisyon değerleri				
Konsantrasyon (ppm)	Biyolojik AgNP	Kimyasal AgNP	Yaprak Özütü	BHT
1,5625	21,42±0,04 ^a	33,76±0,05 ^a	15,40±0,00 ^a	88,90
3,125	20,96±0,03 ^a	34,82±0,03 ^a	41,49±0,00 ^b	91,14
6,25	24,28±0,00 ^{ab}	36,56±0,06 ^{ab}	74,75±0,00 ^c	91,56
12,5	26,45±0,01 ^{ab}	40,42±0,02 ^{abc}	89,16±0,17 ^{cd}	92,75
25	27,62±0,02 ^{ab}	50,03±0,06 ^{bcd}	92,84±0,24 ^d	92,82
50	40,50±0,03 ^b	53,59±0,04 ^{cd}	93,42±0,95 ^d	93,48
100	54,72±0,02 ^c	60,63±0,08 ^d	94,36±0,11 ^d	93,48

*Her bir sütunda aynı küçük harflerle gösterilen değerlerin ortalamaları varyans analizi ve Tukey testine göre % 5 düzeyinde istatistiksel olarak önemli değildir.

Serbest radikal giderim aktivesinde en yüksek konsantrasyonda (100 ppm) biyolojik ve kimyasal olarak sentezlenen AgNP' nin % inhibisyon değerleri sırasıyla %54,72 ve % 60,63 olarak hesaplanmıştır. Yaprak özütünün ve BHT' nin inhibisyon değerleri ise sırasıyla % 94,36 ve % 93,48 olarak hesaplanmıştır. Konsantrasyon artışına bağlı olarak serbest radikal giderim aktivitesinde artış olmuştur. Yaprak özütünün serbest radikal giderim aktivitesi kontrol ile kıyaslandığında en yüksek olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.8. DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidant aktivite değerleri

3.4. Agaroz Jel Elektroforezi İle Nanopartikül-DNA Etkileşimi Sonuçları

Biyolojik ve kimyasal yöntemle sentezlenen AgNP' nin 5mM stok çözeltisinden 100, 50, 25, 12,5 ve 6.25 ppm konsantrasyonlarda olacak şekilde distile su ile seyreltmeler yapılmıştır. Hazırlanan çözeltiler pBR322 plazmit DNA ile +37 °C de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örnekler %1' lik agaroz jel üzerinde 60 V' ta 3 saat elektroforezle yürütülerek bileşiklerin DNA üzerindeki etkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

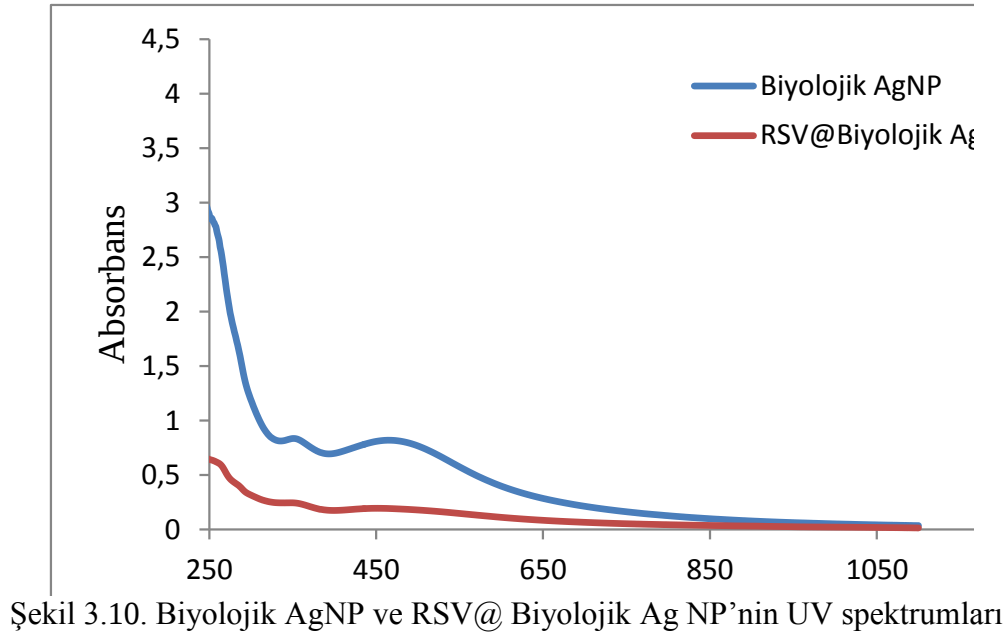
Agaroz jel elektroforez yöntemine göre incelenen nanopartikül-DNA etkileşim çalışmalarının gösterdiği sonuçlara göre biyolojik AgNP, yaprak özütü ve kimyasal AgNP'nin DNA üzerinde herhangi bir etkisi görülmemiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Farklı konsantrasyonlardaki biyolojik AgNP, yaprak özütü ve kimyasal AgNP'nin pBR322 DNA ile etkileşimi ile elde edilen agaroz jel görüntüsü. (1-7-13. Kontrol pBR322, 2-14.100 ppm, 3-15. 50 ppm, 4-16. 25 ppm, 5-17. 12,5 ppm, 6-18. 6,25 ppm. 8. %20, 9. %10, 10. %5, 11. %2,5, 12. %1,25)

3.5. İlaç Salınım Çalışmaları

Biyolojik ve kimyasal yöntemle sentezlenen AgNP' nin ilaç salınım özellikleri *in vitro* ortamda incelenmiştir. Yapılan çalışmada ilk olarak resveratrol ile AgNP'lerin bağlanması gerçekleştirilmiştir. Resveratrol ile biyolojik AgNP' nin bağlanması UV-Vis spektrofotometrede yapılan ölçümler ile belirlenmiştir (Şekil 3.10).



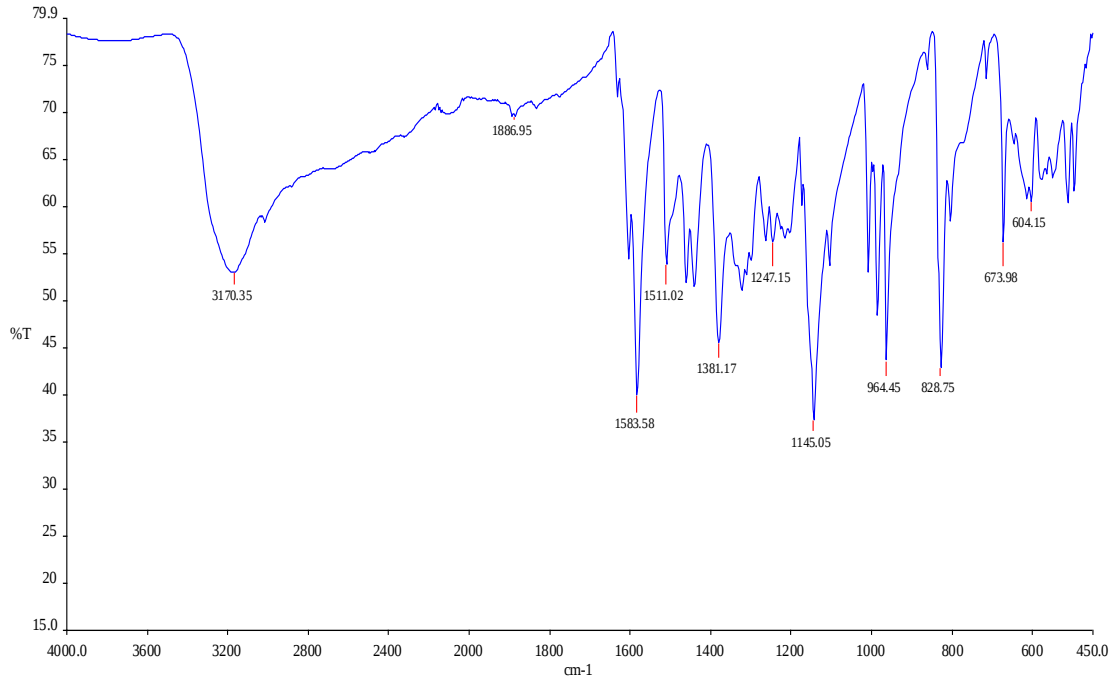
Şekil 3.10. Biyolojik AgNP ve RSV@ Biyolojik Ag NP'nin UV spektrumları

Bağlanmadan sonra AgNP'nin göstermiş olduğu 464 nm dalga boyundaki maksimum absorbansın ~10 nm (452 nm) azaldığı belirlenmiştir. FT-IR analizinin sonuçları ile bu bağlanmanın başarılı bir şekilde gerçekleştiği teyit edilmiştir. Resveratrol hidroksil gruplarıyla ilgili olan 3170 cm^{-1} dalga boyunda belirgin bantlar vermiştir. Ayrıca 1583, 1511, 1381, 1247, 1145, 964, 828, 675 ve 604 cm^{-1} dalga boylarında -CH gruplarından kaynaklanan güçlü dalgalanmalar göstermiştir. 1145, 964, 828 ve 675 cm^{-1} -CO gruplarında, 604 cm^{-1} CC gruplarının gerilme titreşimleri görülmektedir (Şekil 3.11).

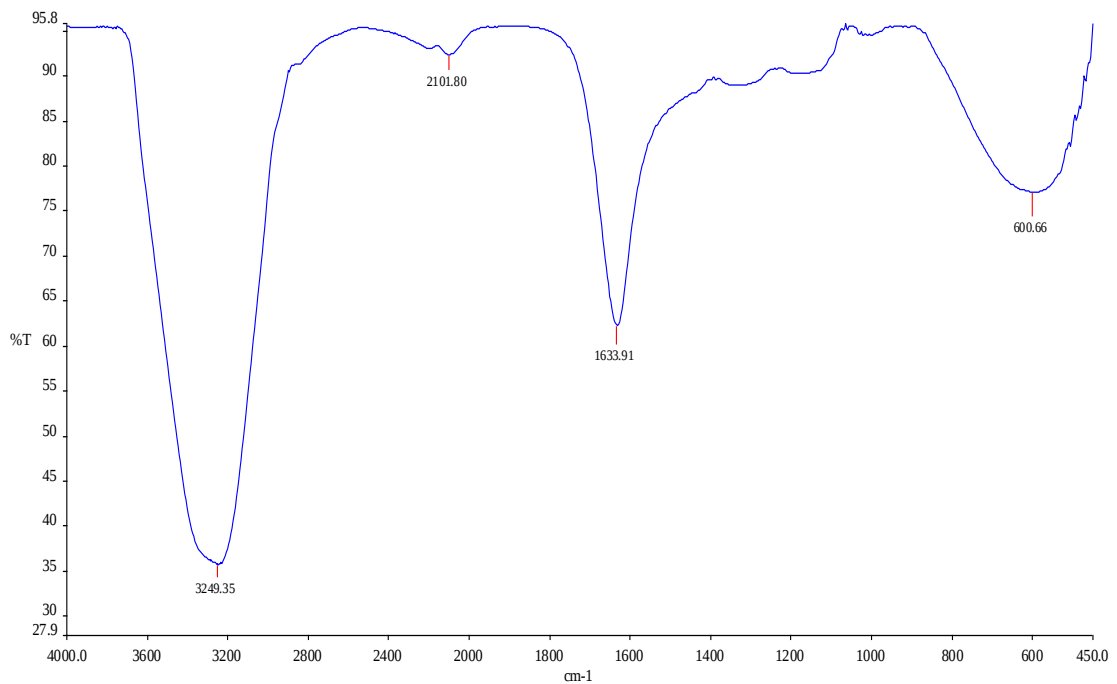
RSV@biyolojik AgNP' nin 3249 cm^{-1} dalga boyunda belirgin bantlar vermiştir. 2101, 1633 ve 600 cm^{-1} dalga boyunda -CH gruplarından kaynaklanan güçlü dalgalanmalar göstermiştir. 600 cm^{-1} -CO gruplarında ve -CC gruplarında gerilme titreşimleri görülmektedir (Şekil 3.12).

RSV@kimyasal AgNP' nin 3254 cm^{-1} dalga boyunda belirgin bantlar vermiştir. 2110, 1633 ve 627 cm^{-1} dalga boyunda -CH gruplarından kaynaklanan güçlü dalgalanmalar

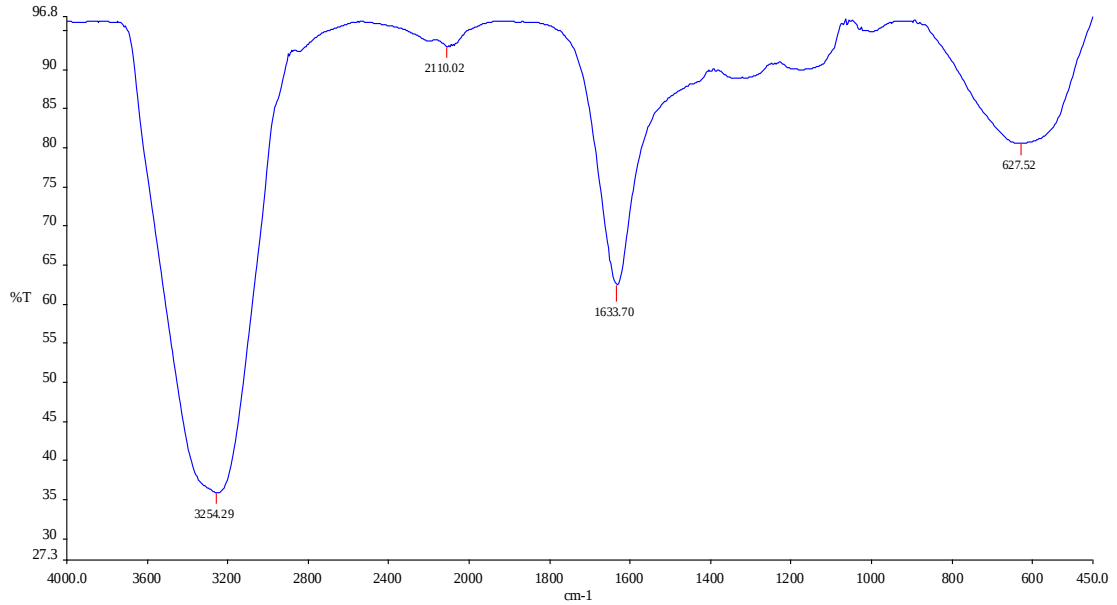
göstermiştir. 627 cm^{-1} $-\text{CO}$ gruplarında ve $-\text{CC}$ gruplarında gerilme titreşimleri görülmektedir (Şekil 3.13). RSV@AgNP' nin için standart resveratrol ve AgNP' nin fonksiyonel grupları ile eşleşen dalgalanmalar gözlemlendi.



Şekil 3.11. Resveratrolün FT-IR spektrumları

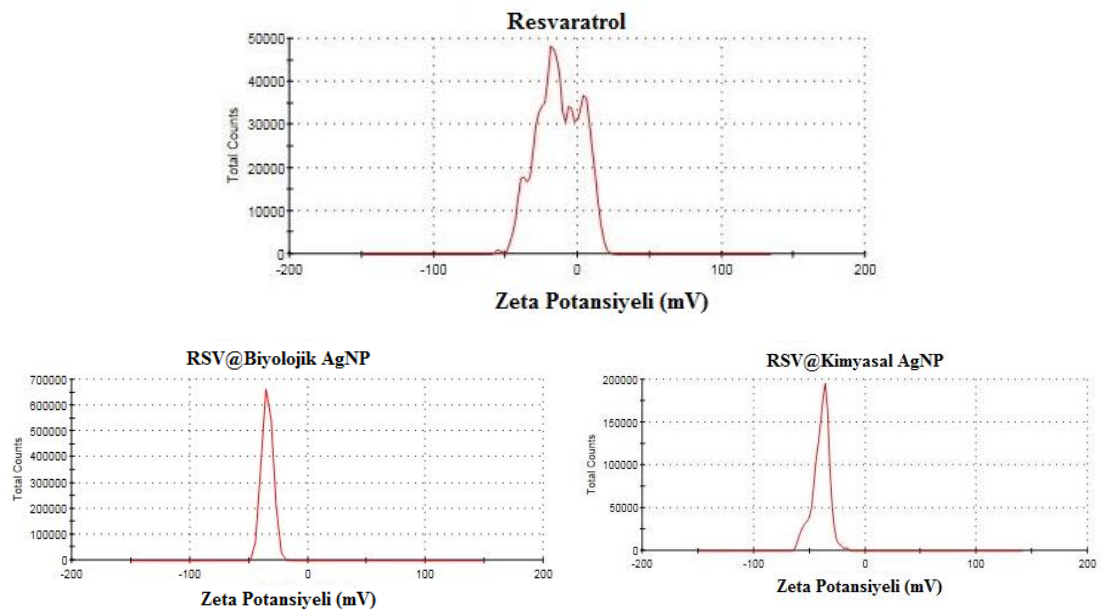


Şekil 3.12. RSV@ biyolojik AgNP FT-IR spektrumları



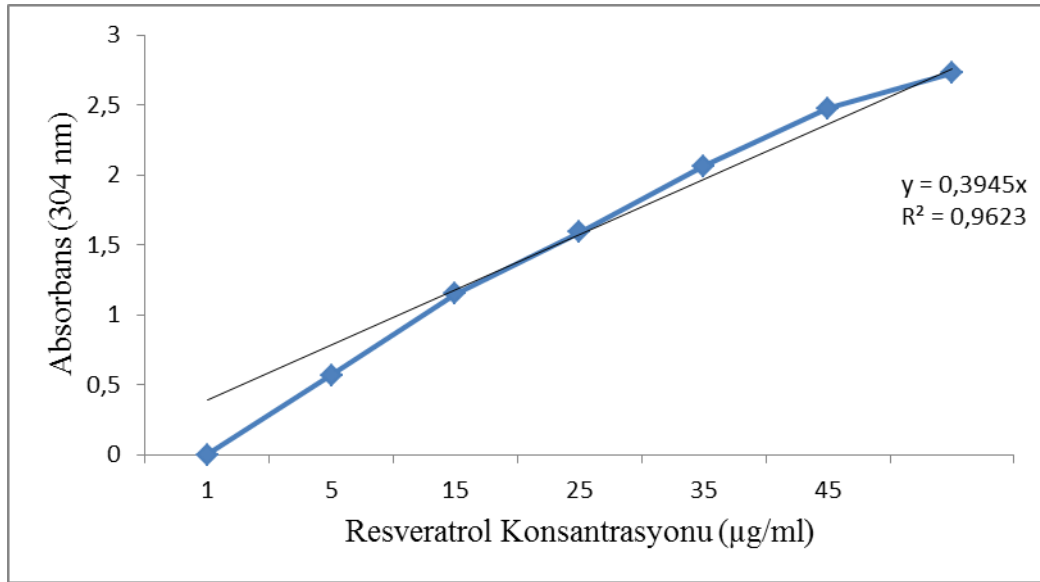
Şekil 3.13. RSV@kimyasal AgNP FT-IR spektrumları

Biyolojik ve kimyasal AgNP' nin resveratrol ile bağlanması sonucunda oluşan komplekslerin elektriksek yükü zeta analizi ile belirlenmiştir (Şekil 3.14). Resvaratrol' ün elektriksel yükü -12 mV, RSV@biyolojik AgNP' nin elektriksel yükü -34 Mv, RSV@kimyasal AgNP elektriksel yükü -39 Mv olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, resveratrolün nanoparçacıkların yüzeyine bağlandığı veya kompleksleştiğini, elektrostatik olarak kararlı nanoparçacıklar ürettiğini açıkça göstermektedir.



Şekil 3.14. Resvaratrol, RSV@Biyolojik AgNP ve RSV@Kimyasal AgNP Zeta potansiyeli

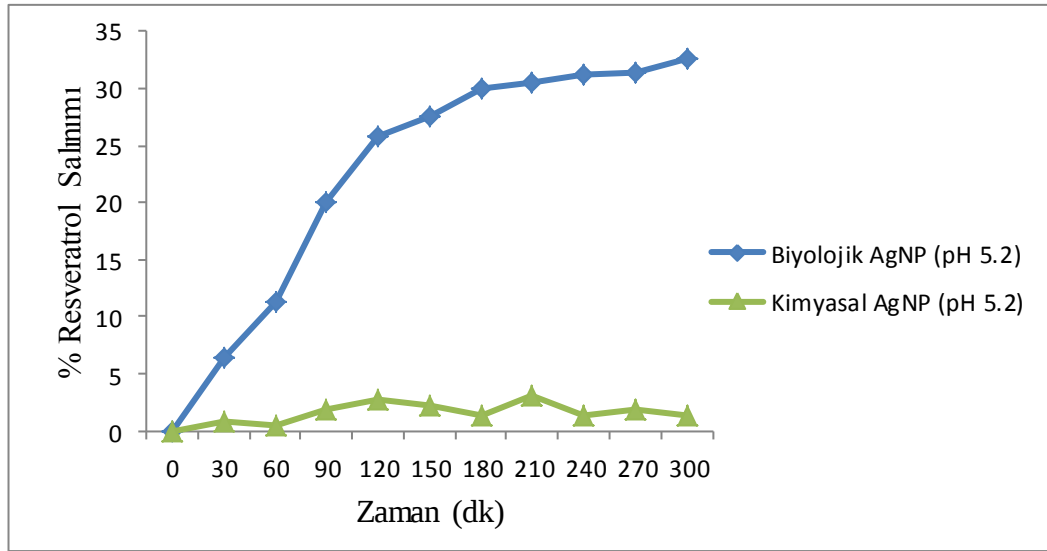
Gümüş nanopartikül ile bağlanmış olan resveratrolun salınımı farklı pH değerlerinde (pH 5.2 ve 7.4) zamana bağlı olarak 304 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak belirlenmiştir. RSV-AgNP yapısından salınan resveratrol miktarı hazırlanan standart resveratrol eğrisine göre değerlendirme yapılarak hesaplanmıştır.



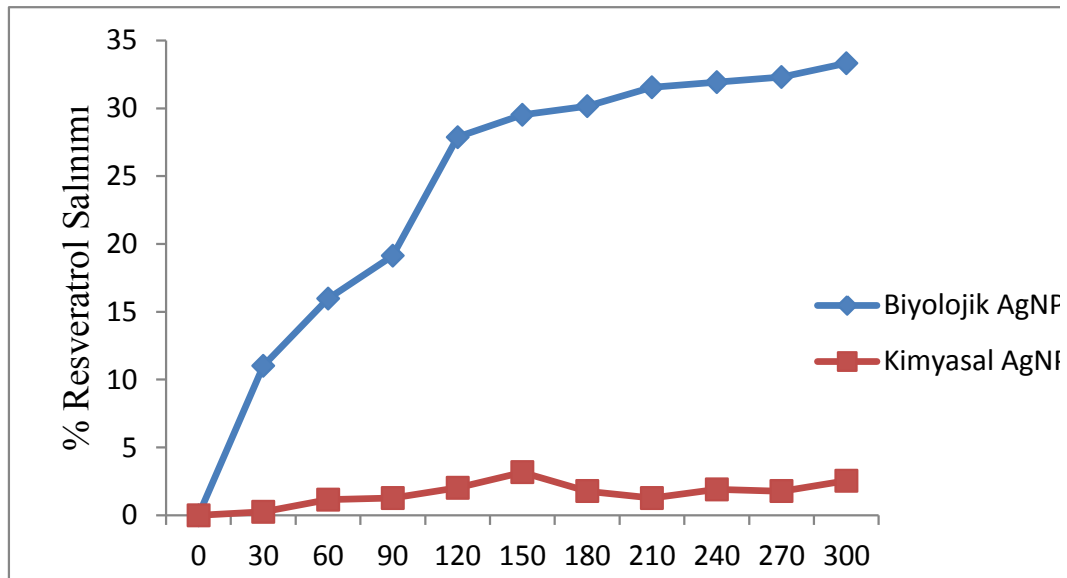
Şekil 3.15. Resveratrol standart grafiği.

Tablo 3.4. Farklı pH ortamlarında *in vitro* resveratrol salınım miktarları.

Resveratrol Salınımı (%)				
Zaman (dk)	Biyolojik AgNP (pH 5.2)	Biyolojik AgNP (pH 7.4)	Kimyasal AgNP (pH 5.2)	Kimyasal AgNP (pH 7.4)
0	0	0	0	0
30	6,33	11,02	0,76	0,25
60	11,28	15,96	0,5069	1,14
90	20,02	19,13	1,77	1,26
120	25,72	27,88	2,78	2,02
150	27,50	29,53	2,15	3,16
180	30,03	30,16	1,39	1,77
210	30,54	31,55	3,16	1,26
240	31,30	31,93	1,39	1,90
270	31,43	32,31	1,77	1,77
300	32,57	33,33	1,39	2,53



Şekil 3.16. pH 5.2’ de gerçekleşen zamana bağlı resveratrol salınımı.



Şekil 3.17. pH 7.4’ de gerçekleşen zamana bağlı resveratrol salınımı.

İlaç salınımı çalışmalarında 30 dk zaman aralıklarında ve farklı pH değerlerinde (pH 5.2 ve pH 7.4) örnekler alınmıştır. Resveratrolün bağlanıp geri salınması incelenmiştir. Biyolojik ve kimyasal olarak sentezlenen AgNP’ nin % resveratrol salınımı farklı pH da farkı çok azdır; pH 5.2 de ilk 30. dakikasında % resveratrol salınımı 6,33 iken pH 7.4 de % resveratrol salınımı 11,02 dir. Zamana bağlı olarak ilaç salınımının arttığı ve 5 saat sonra pH 5.2’de %32,57, pH 7.4’de ise %33,33 olduğu belirlenmiştir. Biyolojik olarak sentezlenen AgNP’nin zamana göre % resveratrol salınımı daha fazladır. Farklı pH ortamlarında *in vitro* resveratrol salınım miktarları Tablo 3.4. gösterilmiştir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

AgNP' lerin sentezi için kullanılan toksik kimyasallar nanopartikül kullanım alanını kısıtlamaktadır. Nanomalzemeler su, yiyecek, kozmetik ürünler, ilaçlar ve ilaç taşıyıcı sistemleri aracılığıyla vücut içerisine girebilmektedir. Bu şekilde vücut içerisine giren nanoboyutlu partiküller ve türevleri insan sağlığını önemli bir şekilde tehdit edici unsurlara dönüşebilmektedir [73]. Bu nedenle herhangi bir toksik kimyasal kullanmadan, nanopartiküllerin hazırlanması gerekmektedir. Günümüzde biyolojik sentez yöntemi, genel adıyla "yeşil kimya" yaklaşımı ile nanopartiküllerin sentezi oldukça ilgi çekmektedir. Çevre dostu ve zararlı kimyasalların kullanılmaması, sentezlenen AgNP' lerin tıp alanında kullanımını yaygın hale getirmiştir. Nanopartiküller birçok fonksiyona sahip ve iki ya da daha fazla malzemenin birleştirilmesi ile oluşan yapılardır. Tek başlarına etkinlik oranı düşük iken başka bir malzeme ile bir araya geldiğinde etkinliği çok daha yüksek yeni bir malzeme meydana gelmektedir.

Bu çalışmada atkestanesi bitkisinin yaprak özütü kullanılarak AgNP'lerin biyolojik olarak sentezi gerçekleştirilmiştir. Sulu ortamda hazırlanan yaprak özütü 5 mM AgNO₃ çözeltisi ile oda sıcaklığında karıştırılarak renk değişimi (kahverengi) gerçekleşmesi ile sentez tamamlanmıştır. Nanopartikül oluşumunu belirlemek için yapılan UV-Vis ölçüm sonucunda biyolojik AgNP' lerin spektrumu ~464 nm olarak belirlenmiştir. Yapılan ölçüm sonucunda biyolojik olarak AgNP' lerin sentezinin gerçekleştiği belirlenmiştir. Yapılan önceki çalışmalar ile AgNP' ler için 410 ile 470 nm arasında bir spektrumun gözlemlendiğini ve küresel nanoparçacıklara atfedilebileceğini önerilmektedir [74]. Aynı zamanda indirgeyici ajanlar olarak kimyasalların kullanılması ile sentezlemiş olduğumuz AgNP'lerin spektrumu ise ~396 nm olarak belirlenmiştir. AgNP'lerin yüzey yükü zeta potansiyelinin ölçümü ile belirlenmiştir. Yapılan ölçüm sonucunda yaprak

özütü, biyolojik AgNP ve kimyasal AgNP'nin yüzey yükü sırasıyla -16 mV, -29 mV, -25 mV olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.2). Yüksek negatif potansiyel değerin olması negatif-negatif itme kuvvetinden dolayı AgNP'lerde yüksek dağılım, uzun süreli kararlılık ve iyi kolloidal yapının oluştuğunu göstermektedir [75].

Sentezlenen nanopartiküllerin yüzey morfolojileri ve boyutları SEM analizi ile belirlenmiştir. Yapılan görüntüleme sonucunda biyolojik AgNP' nin küresel boyutta ve 50 ± 5 nm büyüklüğünde (Şekil 3.3), kimyasal AgNP' nin küresel boyutta ve 70 ± 5 nm büyüklüğünde (Şekil 3.4) olduğu belirlenmiştir.

Ag⁺ iyonlarının biyolojik olarak Ag⁰'a indirgenmesi ve AgNP'lerin stabilizasyonu için yaprak özütünde bulunan fonksiyonel grupların belirlenmesi FTIR analizleri ile yapılmıştır. FTIR sonuçlarına göre biyolojik AgNP'lerin yaprak özütü indirgenmesi ile 3246, 2115, 1636, 1073, 589 cm⁻¹ dalga boyunda spektrumlar gösterdiği belirlenmiştir. 3246 cm⁻¹ dalga boyundaki titreşimlerin OH gruplarından, 2115, 1636 ve 1073 cm⁻¹ dalga boyunda aromatik bileşiklerin –CH gruplarından, 589 cm⁻¹ dalga boyunda –CO ve –CC gruplarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir (Şekil 3.5). Kimyasal olarak sentezlemiş olduğumuz AgNP'lerin 3259, 2109, 1634, 598 cm⁻¹ dalga boyunda dalgalanmalar gösterdiği belirlenmiştir. Yaprak özütünde 3256, 2116, 1634, 619 cm⁻¹ dalga boyunda titreşimler elde edilmiştir (Şekil 3.6-3.7)

Jyoti ve arkadaşları (2016) *Urtica dioica*'nın yaprak özütünü kullanarak AgNP'lerin sentezini ve karakterizasyonu çalışmışlardır. Yaptıkları çalışmada UV-Vis spektrumunda; 414 nm'de AgNP sentezini doğrulayan tek, güçlü ve geniş bir pik gözlemlenmiştir. AgNP'lerin boyut dağılımını ve zeta potansiyelini DLS ile belirlemişler ve nanopartiküllerin ~36 nm boyutunda ve -24.1 mV zeta potansiyel değerine sahip olduğunu belirlemişlerdir. FT-IR sonuçlarına göre sentezlenen nanopartiküllerin alkol ve fenoldeki –OH gruplarından dolayı 3422 cm⁻¹ dalga boyunda, aromatik bileşiklerin yapısında bulunan –CH gruplarından dolayı 2921 ve 2856 cm⁻¹ dalga boylarında titreşimler gösterdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca proteinlerin yapısında bulunan N-H ve C-H gruplarından dolayı sırasıyla 1450 cm⁻¹ ve 1043 cm⁻¹ dalgalanmalar ölçmüşlerdir [76].

Yıldız ve ark. (2011), *Cetraria islandica* L. liken özütünü kullanarak nanoteknoloji alanında yaygın olarak araştırılan Ag nanopartiküllerin biyolojik olarak sentezini gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda farklı koşullarda sentezlenen örneklerin UV-Vis analizleri yapılmış ve 405-438 nm aralığında pikler elde edilmiştir. TEM analizi ile taneciklerin büyüklüğü ortalama 5.6- 28.6 nm olarak ölçülmüştür. Ag nanotaneciklerin sentezinin hangi bağlar üzerinden yürüdüğünü belirleyebilmek için elde edilen liken özütünün AgNO₃ ile etkileştirilmeden önce ve sonra FT-IR ile analizleri yapılmış ve etkileşimin öncesi ve sonrasındaki FT-IR spektrumlarında 1750 cm⁻¹ dalga sayısındaki bandın zayıfladığı ve 1650 cm⁻¹ dalga boyunda ki bandın kuvvetlendiği belirlenmiştir [20].

Sankar ve arkadaşları (2014), *Carica papaya* bitki özütü ile CuO nanopartiküllerinin sentezini ve karakterizasyonunu incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada FT-IR sonuçlarına göre sentezlenen nanopartiküllerin yapısına amid N-H, alken C-H, anhidrit C=O, C-O bağlandığını, 473 cm⁻¹ bantlarında Cu-O bağlandığını belirlemişlerdir [76].

Yapmış olduğumuz tez çalışmasında AgNP'lerin sentezi gerçekleştirildikten sonra karakterizasyonu yapılarak antimikrobiyal etkisi, antioksidan aktivitesi ve DNA ile olan etkileşimleri belirlenmiştir. Aynı zamanda in vitro ortamda resveratrol ile bağlanmış olan AgNP' nin ilaç salınım özellikleri serbest kalan resveratrol miktarının belirlenmesi ile tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal aktivite ölçümü için 8 gram pozitif ve 6 gram negatif olmak üzere toplam 14 bakteri ve 3 maya suşu kullanılmıştır. Biyolojik AgNP, yaprak özütü ve kimyasal AgNP'nin göstermiş olduğu inhibisyon zon çapı değerleri Tablo 3.1. verilmiştir. Yalnızca biyolojik AgNP'nin çalışılan bakteri suşlarına karşı etkili olduğu gözlenmiştir. Gram pozitif bakteriler arasında en yüksek inhibisyon zon çapı *S. aureus* ATCC 25923'te 17,5±2,12 mm, *M. luteus* ATCC 10240'da 17±0,00 mm olarak ölçülmüştür. En düşük inhibisyon zon çapı ise *E. fecalis* ATCC 292112 ve *B. cereus* NRLL B-3008'de 10,5±1,41 mm olarak belirlenmiştir. *B. subtilis* ATCC 29213 ve *C. renale* ATCC 19412'e karşı ölçülen inhibisyon zon çapı değerleri ise sırasıyla 15±2,64 ve 12±0,00 mm olarak belirlenmiştir. *S. epidermidis* ATCC 12228 ve *L. monocytogenes* ATCC 19115'e karşı etkisi aynı olup inhibisyon zon çapı 13±0,00 mm olarak belirlenmiştir.

Gram negatif bakteriler arasında en yüksek inhibisyon zon çapı $20 \pm 0,00$ mm olarak *P. aeruginosa* ATCC 27853'e karşı ölçülmüştür. *P. fluorescens* ATCC 49838'e karşı etkisi $8 \pm 0,00$ inhibisyon zon çapı ölçülmüştür. Biyolojik AgNP'nin *K. pneumonia* ATCC 13883, *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. coli* ATCC 25922 ve *P. mirabilis* ATCC 25933 karşı etkili olduğu belirlenmiş ve inhibisyon zon çapları sırasıyla $12,5 \pm 0,70$, $11 \pm 0,00$ ve $10 \pm 0,00$ mm olarak ölçülmüştür.

Agar difüzyon yönteminde bakterilere karşı etkili olduğu tespit edilen bileşiklerin en düşük inhibe edici konsantrasyon değeri (MİK) 96 kuyucuklu pleytler kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Biyolojik AgNP' nin test edilen mikroorganizmalardan *M. luteus*, *E. aerogenes* ve *C. renale*'ye karşı etkisi MİK=6,25 ($\mu\text{g ml}^{-1}$), *K. pneumonia* ve *B. subtilis*'e karşı etkisi MİK= 3,12 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) *P. mirabilis*, *B. cereus* ve *S. epidermidis*'e karşı etkisi MİK= 1,56 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) ve *E. fecalis*' e karşı etkisi MİK= 0,09 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) olarak belirlenmiştir. Test edilen mikroorganizmalardan *E. coli*, *P. fluorescens*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *L. monocytogenes*'e karşı MİK= 0,78 ($\mu\text{g ml}^{-1}$) değeri ile etkili olmuştur.

Logeswari ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada *Ocimum tenuiflorum* (kutsal fesleğen), *Solanum trilobatum* (itüzümü), *Syzygium cumini* (java eriği), *Centella asiatica* (gotu kola) ve *Citrus sinensis* (portakal) bitki özütlerini kullanarak gümüş nanopartiküllerin (Ag NPs) sentezini gerçekleştirmişlerdir. AgNP' lerin karakterizasyonunu UV–Vis, XRD, atomik yüzey mikroskobu (AFM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapmışlar ve analizler sonucunda *O. tenuiflorum*, *S. cumini*, *C. sinensis*, *S. tricobatum* ve *C. asiatica* bitkileri ile elde edilen nanopartiküllerin ortalama olarak sırasıyla 28 nm, 26,5 nm, 65 nm, 22,3 nm ve 28,4 nm boyutunda olduğu belirlenmiştir. Nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitesini *S. aureus*, *P.aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae*'ye karşı agar difüzyon yöntemi ile belirlemişlerdir. En yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *S. aureus* (30 mm) ve *E. coli* (30 mm)'ye karşı *S. tricobatum*, *O. tenuiflorum* bitki özütü ile sentezledikleri nanopartiküller tarafından oluşturulduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda sentezlenen AgNP' lerin, patojenik bakterilere karşı etkili antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu ve gümüş nanopartiküllerin nanoteknoloji ve nanotıp alanında kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir [77].

Sentezlenen biyolojik ve kimyasal AgNP' nin antioksidan aktiviteleri DPPH yöntemiyle belirlenerek % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen inhibisyon değerleri BHT ile karşılaştırılmıştır. En yüksek konsantrasyonda (100 ppm) yaprak özütü ve BHT' nin inhibisyon değerleri ise sırasıyla % 94,36 ve % 93,48 biyolojik ve kimyasal AgNP' nin % inhibisyon değerleri ise sırasıyla %54,72 ve %60,63 olarak hesaplanmıştır. Reddy ve ark. (2014) *Piper longum* (uzun biber) meyve özütü ile biyolojik olarak sentezledikleri AgNP'lerin ortalama %67 inhibisyon değeri ile standart ve meyve özütünden (~%80) daha düşük bir aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da biyolojik AgNP'nin serbest radikal giderim aktivitesi yaprak özütü ve standart BHT'den daha düşük bulunmuştur [78].

Duman ve ark. (2016) papatya çiçeğinin özütü ile elde ettikleri CuO nanopartiküllerin antioksidant aktivitesini ve plazmid DNA (pBR322) ile etkileşimini çalışmışlardır. CuO nanopartiküllerini karakterize etmek için UV-vis spektroskopisi, FT-IR, DLS, X ışını kırınımı, EDX spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskobu kullandıkları bu çalışma sonucunda DPPH metodu ile antioksidant aktiviteyi belirlemişler. CuO NP'lerin ortalama yüzde inhibisyonu % 87.27 ve CuO nanopartiküllerinin DNA'nın çift heliks yapısını hem bozduğunu hem de kırdığını bulmuşlardır [41]. Bizim yaptığımız çalışmada biyolojik ve kimyasal olarak sentezlemiş olduğumuz AgNP'lerin ve yaprak özütünün pBR322 DNA yapısı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

İlaç salınımı çalışmalarında biyolojik ve kimyasal yöntemle sentezlenen AgNP' nin ilaç salınım özellikleri incelenmiştir. Yapılan çalışmada resveratrol ile AgNP'lerin bağlanması gerçekleştirilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. UV-vis ve FT-IR sonuçları değerlendirilmiş resveratrolün bağlanması incelenmiştir. AgNP ile bağlanmış olan resveratrolün salınımı farklı pH değerlerinde (pH 5.2 ve 7.4) zamana bağlı olarak 304 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak belirlenmiştir. RSV-AgNP yapısından salınan resveratrol miktarı hazırlanan standart resveratrol eğrisine göre değerlendirme yapılarak hesaplanmıştır. Farklı pH ortamlarında resveratrol salınımı ile ilgili olarak önemli bir fark görülmemiştir. Biyolojik AgNP' nin % resveratrol salınımı pH 5.2 de ilk 30. dakikasında % 6,33 iken, pH 7.4 de % 11,02 dir. Zamana bağlı olarak resveratrol salınımının arttığı ve 5 saat sonra pH 5.2'de %32,57, pH 7.4'de ise %33,33 olduğu belirlenmiştir. Biyolojik olarak sentezlenen AgNP'nin zamana göre % resveratrol salınımı kimyasal AgNP den daha fazladır.

Kumar ve ark. (2014) etkili ilaç salıverme araçları olarak resveratrol ile konjuge edilmiş biyojenik altın nanopartiküllerin uygulanabilirliği ile ilgili çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada hem indirgeyici hem de sınırlandırıcı ajanlar olarak hizmet eden *Delftia sp* KCM-006 suşunun süpernatantını kullanarak biyolojik olarak altın nanopartikül sentezlemişlerdir. Sentezlenen altın nanopartikülleri resveratrol ile konjuge ederek, oluşan RSV-AuNP'lerden resveratrolün in vitro salınımını, 8 saat süreyle pH 5.2 ve pH 7.4'te PBS solüsyonunda değerlendirmişlerdir. Resveratrol salınım profilleri, pH 5.2'de, pH 7.4'e kıyasla daha yüksek bulunmuştur, yani resveratrolün % 95'i pH 5.2'de salınırken, sadece % 26'sı pH 7.4'te salınmıştır. Resveratrol ile konjuge edilen AuNP'lerin fizyolojik pH'da (7.4) plazmada daha uzun bir süre nanoparçacık yüzeyinde kaldığı ve böylece normal dokulara olan yan etkileri büyük oranda düşürdüğü gözlemlenmiştir. RSV-AuNP'ler tümör hücrelerine girdikten sonra, resveratrol, endositik bölmelerdeki asidik ortam (pH değerleri 4.5 ila 6.5 arasında değişir) nedeniyle hızlı bir şekilde serbest bırakılır. Bu, resveratrolün kısa bir süre içinde önemli miktarda birikmesine neden olur ve biyoaktif maddenin tümör hücrelerine etkin bir şekilde iletimini sağlar. Çalışma sonucunda yüksek stabilite ve biyouyumluluk sergileyen biyolojik olarak sentezlenmiş AuNP'lerin, ilaç iletim sistemi için farklı ilaçlara konjuge edilecek uygun nanomalzemeler olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür [71].

Yapmış olduğumuz çalışmada atkestanesi yaprak özütü kullanarak gümüş nanopartiküllerin biyolojik olarak sentezi gerçekleştirilmiştir. Antimikrobiyal ve antioksidant aktivite gösteren gümüş nanopartiküllerin tıpta geniş bir kullanım alanı bulabileceğini düşünmekteyiz. Basit, hızlı, ucuz ve çevre dostu biyolojik sentez yöntemi ile farklı uygulama alanlarında rahatlıkla kullanılabilecek yeni nesil nanomalzemelerin sentezi gerçekleştirebilmektedir. Farklı özellikteki malzemeler bir araya getirilip, aralarında sinerjistik etkinin sağlanması ile çok daha verimli nanoyapıların sentezi ve biyomedikal, biyoanalitik uygulamalarda kullanımının genişlemesi adına umut verici bir çalışma olmuştur. Bu konu ile ilgili yapılacak olan detaylı çalışmalar ile nanopartiküllerin kullanım alanları daha da genişletilebilir.

KAYNAKLAR

1. Wagner, A. J., Bleckmann, C. A., Murdock, R. C., Schrand, A. M., Schlager, J. J., & Hussain, S. M. 2007. Cellular interaction of different forms of aluminum nanoparticles in rat alveolar macrophages. **The Journal of Physical Chemistry B**, **111**(25): 7353-7359.
2. Derman, S., Kızılbey, K., & Akdetse, Z. M. 2013. Polymeric nanoparticles. **Mühendislik ve Fen bilimleri Dergisi**, **31**: 109-22.
3. Flippo E, Serra A, Buccolieri A, Manno D. 2010. Green synthesis of silver nanoparticles with surose and maltose: Morphological and structural characterization, **Journal of Non-Crystalline Solids**, **356**: 344-350
4. USDA. 1999. <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=AEHI> (Erişim Tarihi: 16 Mayıs 2016)
5. Grieve, M. 2015. <http://botanical.com/botanical/mgmh/c/chehor58.html> (Erişim Tarihi: 16 Mayıs 2016)
6. Czap, A. 2009. *Aesculus hippocastanum* L. **Alternative Medicine Review**, **1**: 278-82.
7. Heber, D. 2000. PDR for Herbal Medicines. Third Edition. Montuale: Medical Economics Company, 445-8
8. https://en.wikipedia.org/wiki/Aesculus_hippocastanum (Erişim Tarihi: 14 Nisan 2016)
9. Braun, L., Cohen, M. 2010. Herbs and Natural Supplements: An Evidence-based Guide Third Edition. **Journal of the Australasian College of Nutritional and Environmental Medicine**, **29**(1): 17.
10. Koçkar, Ö. M. 1989. Atkestanesi Ekstraksiyonu ve Essin İzolasyonu. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Eskişehir.
11. <http://www.beslenmedestegi.com/bitkisel-ilaclar/at-kestanesifaydalari> (Erişim Tarihi: 15 Nisan 2016)

12. Kırkıl, Ş. 2014. At keşanesi kabuklarından kimyasal aktivasyon yöntemi ile elde edilen aktif karbonlara gümüş adsorpsiyonu. Sakarya Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya.
13. Dizaji, A. N., Kutsal, T., Bişkin, E. 2012. *Rhodopseudomonas palustris* Kullanılarak Gümüş Nanopartiküllerin Üretimi. Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilimi, Ankara.
14. Cüce, M. 2009. <http://www.bilisimdergi.com/Nanoteknoloji-4-11.html> (Erişim Tarihi: 17 Nisan 2016)
15. Dikensoy, Ö. 2010. NanoPartiküller ve Plevra. **Plevra Bülteni**, 4: 7-9.
16. Tunca, E. Ü. 2015. Nanoteknolojinin Temeli Nanopartiküller ve Nanopartiküllerin Fitoremediasyonu. **Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi**, 5(2):23-34.
17. Gürmen, S., Ebin, B. 2008. Nanopartiküller ve üretim yöntemleri-1.**Metalurji Dergisi**, 150:31-38.
18. Berk, S., Akkurt, İ. 2012. Nanopartikül: Geleceğin korkulu rüyası. **Tuberk Toraks**, 60(2): 180-184.
19. http://www.nanott.hacettepe.edu.tr/nanobulten/13/nanobulten13_lr.pdf (Erişim Tarihi: 13 Mayıs 2016)
20. Yıldız, N. 2011. Gümüş Nanopartiküllerin Liken Özü ile Biyosentezi. **Ankara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi**, Ankara.
21. Vithiya. K., 2011. Biosynthesis of Nanoparticles.. Industrial Biotechnology Division, School of Bio Sciences and Technology, VIT University, Vellore-632014, TamilNadu, India.
22. Mohanpuria, P., Rana, N. K., Yadav, S.K. 2008. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. **Journal of Nanoparticle Research**, 10(3): 507-517.
23. http://www.eufic.org/article/en/artid/Antimikrobiyal_direnc_paylasilan_bir_sorumluluk-Turkish/ (Erişim Tarihi: 17 Mayıs 2016)

24. Okan, T. O., Varlıbaş, H., Öz, M., Deniz, İ. 2012. Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler. Kastamonu Üniversitesi, **Orman Fakültesi Dergisi**, **13** (1): 48-59
25. Çelik, G. 2013. İlaç Yüklü Nanolif Sistemlerden Kontrollü İlaç Salınımı, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Isparta.
26. Jha AK, Prasad K., 2010. Green synthesis of silver nanoparticles using Cycas leaf. **International Journal of Green Nanotechnology and PhytoChemistry**, **1**:110–117.
27. Bilgili, B., Ayhan, F. 2012. Gümüş nanopartikül (AgNP) sentezine pH etkisi. 26. *Ulusal Kimya Kongresi*, 1-6 Ekim, Muğla, Türkiye.
28. Singh, C., Sharma, V., Naik, P. K., KHandelwal, V., Singh, H. 2011. A green biogenic approach for synthesis of gold and silver nanoparticles using *Zingiber officinale*. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, **6**(2): 535-542.
29. Yilmaz, M., Turkdemir, H., Kilic, M. A., Bayram, E., Cicek, A., Mete, A., Ulug, B. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles using leaves of *Stevia rebaudiana*. **Materials Chemistry and Physics**, **130**(3): 1195-1202.
30. Günaydın, G., Bodur, A. 2015. Gümüş Nanopartiküllerin Cerrahi Maske Üzerinde Gösterdiği Antibakteriyel Etkinin Araştırılması (retrieved from: <https://prezi.com/w4ospij-655c/gumus-nanopartikullerinin-cerrahi-maske-uzerinde-gosterdigi/>) (Erişim Tarihi: 19 Mayıs 2016)
31. Venkatpurwar V., Pokharkar V. 2011. Green synthesis of silver nanoparticles using marine polysaccharide: Study of in-vitro antibacterial activity. **Material Letters**, **65**: 999-1002 .
32. Khandelwal, N. Singh, A., Jain, D., Upadhyay, M.K., Verma, H.N. 2010. Green synthesis of silver nanoparticles using *Argemone maxicana* leaf extract and evaluation of their activity, **Digestive Journal of Nanomaterial Biostruction**, **5**: 483–489.

33. Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, Y. K. 2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, 3(1): 95-101.
34. Venkata S.KP., Savithramma, N. 2013. Synthesis of Silver Nanoparticles and Antimicrobial Activity From *Cadaba Fruticosa*- an Important Ethnomedicinal Plant To Treat vitiligo of Kurnool District, Andhra Pradesh, India. **Journal Of Pharmacologic Research**, 3(12):1285-1292.
35. Gade, A., Gaikwad, S., Tiwari, V., Yadav, A., Ingle, A., Rai, M. 2010. Biofabrication of silver nanoparticles by *Opuntia ficus-indica*: in vitro antibacterial activity and study of the mechanism involved in the synthesis. **Current Nanoscience**, 6(4): 370-375.
36. Abdel-Aziz, M.S., Shaheen, M.S., El-Nekeety, A.A., Abdel-Wahhab, M.A. 2014. Antioxidant and antibacterial activity of silver nanoparticles biosynthesized using *Chenopodium murale* leaf extract. **Journal of Saudi Chemical Society**, 18: 356–363
37. Vanmathi, K., Sivakumar T. 2014. Antihelminthic, Anticancer, Antioxidant Activity Of Silver Nanoparticles Isolated From *F.oxysporum*, **International Journal of Current Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences**, 1 (1): 105-111.
38. Mittal, A. K., Kaler, A., Banerjee, U. C. 2012. Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity of Silver Nanoparticles Synthesized from Flower Extract of *Rhododendron dauricum*. **Nano Biomedicine & Engineering**, 4(3).
39. Lee, J. S., Kim, G. H., Lee, H. G. 2010. Characteristics and antioxidant activity of *Elsholtzia splendens* extract-loaded nanoparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(6): 3316-3321.
40. Torres, S. K., Campos, V. L., León, C. G., Rodríguez-Llamazares, S. M., Rojas, S.M., Gonzalez, M., Mondaca, M.A. 2012. Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity. **Journal of nanoparticle research**, 14(11): 1-9.

41. Duman, F., Ocsoy, I., & Kup, F. O. 2016. Chamomile flower extract-directed CuO nanoparticle formation for its antioxidant and DNA cleavage properties. **Materials Science and Engineering: C**, **60**: 333-338.
42. Wang, J., Liu, G., Polsky, R., & Merkoçi, A. 2002. Electrochemical stripping detection of DNA hybridization based on cadmium sulfide nanoparticle tags. **Electrochemistry communications**, **4**(9): 722-726.
43. Sözmen, N. N. 2008. Biyomedikal uygulamalarında akıllı polimer kullanılması ve karakterizasyon yönteminin kuartz kristal mikro dengeleyici sistemler ile geliştirilmesi, Başkent Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
44. Doğan, G., Başal, G. 2009. Elektrolif çekim yöntemine göre elde edilen biyopolimer nanoliflerin ilaç salınım sistemleri yara örtüsü ve doku iskelesi olarak kullanımları. **Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi**, **3**(2): 58-70.
45. Asmaz, A., Aroğuz, A. Z. 2010. Manyetik Nano Süngerlerin Şişme Davranışları ve Kontrollü İlaç Salımı. 24. *Ulusal Kimya Kongresi*, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, 29 Haziran-2 Temmuz 2010, Zonguldak.
46. Kahraman, A., Şanlı, O. 2012. Kanseri İlaç 5-fluorouracil'in Magnetit İçeren Kitosan/Metil Selüloz Nanokürelerden Kontrollü Salımı. *The European Corrosion Congress (EUROCORR)*-, 9-13 Eylül, İstanbul, Türkiye
47. Mert, T., Karagözler, A. A. Altın Nanopartiküllerin İlaç Salım Sistemlerinde Kullanımı. 24. *Ulusal Kimya Kongresi*, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, 29 Haziran-2 Temmuz 2010, Zonguldak
48. Ak, G., Yılmaz, H., Şanlıer, Ş. H. 2014. Akciğer Kanseri Tedavisine Yönelik Yeni Bir İlaç Taşıyıcı Sistem: Pemetrexed Yüklü Nanopartiküller. 24. *Ulusal Kimya Kongresi*, Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, 29 Haziran-2 Temmuz 2010, Zonguldak
49. Ferrati, S., Nicolov, E., Zabre, E. 2015. Devamlı testosteron yerine koyma tedavisinde nanokanal salınım sistemi. **The Journal of Sexual Medicine**, **12**(6): 1375-80.
50. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bacillus_cereus (Erişim Tarihi: 21 Mayıs 2016)

51. http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2009/B_subtilis.html (Erişim Tarihi: 21 Mayıs 2016).
52. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Enterobacter_aerogenes (Erişim Tarihi:21 Mayıs 2016)
53. http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2005/E_faecalis.htm (Erişim Tarihi: 21 Mayıs 2016)
54. Ocak, H. Ö, DR. (2014). Kan Kùltürlerinden İzole Edilmiş Kinolon Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. İzolatlarında Plazmid Aracılı Kinolon Direncinin Araştırılması. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Uzmanlık Tezi, Trabzon.
55. <http://www.cdc.gov/HAI/organisms/klebsiella/klebsiella.html>_(Erişim Tarihi: 22 Mayıs 2016)
56. Paşa, Ö. 2014. Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde genişlemiş spektrumlu, metallo ve ampc tipi beta laktamaz varlığının araştırılması, Ampc tipi beta laktamaz üretiminin genotipik olarak saptanması. Mustafa Kemal Üniversitesi, Uzmanlık Tezi, Hatay.
57. Küçükçetin, A., Milci, S. 2008. *Staphylococcus aureus* ile kontamine olan peynirlerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri. **Gıda Dergisi**, **33**(3):251-258.
58. https://tr.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_epidermidis_(Erişim Tarihi: 24 Mayıs 2016)
59. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Listeriosis> (Erişim Tarihi: 25 Mayıs 2016)
60. https://en.wikipedia.org/wiki/Micrococcus_luteus (Erişim Tarihi: 25 Mayıs 2016).
61. http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2009/P_fluorescens.html (Erişim Tarihi: 25 Mayıs 2016)
62. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Corynebacterium_renale (Erişim Tarihi: 26 Mayıs 2016)
63. Coker, C., Poore, C.A., Li, X., Mobley, H.L.T., 2000, Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. **Microbes and Infection**, **2**: 1497–1505.

64. https://en.wikipedia.org/wiki/Candida_tropicalis (Erişim Tarihi:26 Mayıs 2016)
65. <http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes/yeast.htm> (Erişim Tarihi:26 Mayıs 2016)
66. https://en.wikipedia.org/wiki/Candida_krusei (Erişim Tarihi: 27 Mayıs 2016)
67. Agnihotri, S., Mukherji, S., Mukherji, S. 2014. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Advances**, **4**(8): 3974-3983.
68. Bulut, D.C., 2014. Bazı Pirazol-3-Karboksilli Asit Türevlerinin Biyolojik Aktiviteleri ve DNA ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 31-34 s.
69. Perez C. 1990. An antibiotic assay by the agar-well diffusion method. **Acta Biology of Medicine Experiment**, **15**:113-115.
70. Karael, C., 2006. Yeni Sentezlenmiş Bazı Pirazolin Eklenmiş Triazaol Türevlerinin Antimikrobiyal Aktivite ve Toksiklerinin Belirlenmesi. Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 67 s.
71. Kumar, C. G., Poornachandraa, Y., Kumar, M. S., 2014. Green synthesis of bacterial gold nanoparticles conjugated toresveratrol as delivery vehicles. **Colloids and Surfaces B:Biointerfaces**, **123**: 311–317
72. Asmafiliz, N., Kilic, Z., Ozturk, A., Hokelek, T., Koç, L.Y., Acik, L., Kisa, O., Albay, A., Ustundag, Z., Solak, A.O, 2009. Phosphorus-nitrogen compounds. 18. Syntheses, stereogenic properties, structural and electrochemical investigations, biological activities, and DNA interactions of new spirocyclic mono- and bisferrocenylphosphazene serivatives, **Inorganic Chemistry**, **48**: 10102–10116,
73. Gençer, Ö. 2009. Bakır Ve Bakır Oksit Nanopartiküllerinin Ultrasonik Sprey Piroiliz (usp) Yöntemi İle Üretimi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul.
74. Zaheer, Z., Rafiuddin. 2012. Silver nanoparticles to selfassembled films: green synthesis and characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, **90**: 48-52.

75. Jyoti K., Baunthiyal M., Singh A. 2015. Characterization of Silver Nanoparticles Synthesized Using *Urtica dioica* Linn. Leaves and Their Synergistic Effects with Antibiotics. Department of Biotechnology, Govind Ballabh Pant Engineering College, Pauri Garhwal, Uttarakhand, 246194, India ,
76. Sankar, R., Manikandan, P., Malarvizhi, V., Fathima, T., Shivashangari, K. S., Ravikumar, V. 2014. Green synthesis of colloidal copper oxide nanoparticles using *Carica papaya* and its application in photocatalytic dye degradation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, **121**: 746-750.
77. Logeswari, P., Silambarasan, S., & Abraham, J., 2012. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. **Journal of Saudi Chemical Society**, **19**(3): 311–317.
78. Reddy, N. J., Vali, D. N., Rani, M., Rani, S. S., 2014. Evaluation of antioxidant, antibacterial and cytotoxic effects of green synthesized silver nanoparticles by *Piper longum* fruit. **Materials Science and Engineering**, **34**: 115–122.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Seval ÇOŞKUNÇAY

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 20.10.1987, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

email: ozdes.seval@gmail.com

Yazışma Adresi: Kılıçaslan mah. Sivas Bulvarı Doktorlar Apt. No:69\09

Melikgazi\KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Fen Bilimler Enstitüsü	-
Lisans	EÜ FEF Biyoloji	2013
Ön lisans	EÜ Tekstil Teknolojisi	2009
Lise	Fevzi Çakmak Lisesi	2004

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2016- Halen	Şehit Hüseyin DANACI Halk Eğitim Merkezi	Ücretli Öğretmen

YABANCI DİL

İngilizce