



T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI

Plantago Lanceolata Bitkisinin Doku Kültüründe Rejenerasyonu, Bitki Ekstraktından Nanopartikül Sentezi, Antibakteriyel ve Yara İyileştirici Etkisinin Araştırılması

Proje No: FYL-2019-3590

Proje Türü: Yüksek Lisans

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Musa TÜRKER

Kimya-Metalurji Fakültesi/Biyomühendislik Bölümü

Araştırmacı

Sultan YILMAZ

Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyomühendislik Anabilim Dalı

Temmuz, 2020

İSTANBUL

Önsöz:

Bu projede doğal kaynaklı yara iyileştirme potansiyeli olan *Plantago lanceolata* bitkisi, doğal kaynaklara, tabiat şartları ve mevsimlere bağlı kalmamak, materyale her an ulaşmak, doğal kaynakları tahrip etme riskini ortadan kaldırmak amacı ile laboratuvar ortamında doku kültürü yöntemi ile üretilmesi gerçekleştirilmiştir. Bitkinin özütü elde edilerek yara iyileştirmede etkisi olduğu düşünülen antimikrobiyal etkiye sahip gümüş nitrat kullanılarak bitki özütünden nanoparçacık sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen nanoparçacıkların (NP) UV ve FTIR yöntemleri karakterizasyonu yapılmıştır. Sentezlenen NP'ların bakteriler üzerinde antimikrobiyal etkisi ve özel hücre serileri üzerinde yara iyileştirme etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak sentezlenen AgNP'ların hem antimikrobiyal hem de yara iyileştirme etkisi saptanmıştır.

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün FYL-2019-3590 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PLANTAGO LANCEOLATA BİTKİSİNİN DOKU KÜLTÜRÜNDE
REJENERASYONU, BİTKİ EKSTRAKTINDAN NANOPARTİKÜL
SENTEZİ, ANTİBAKTERİYEL VE YARA İYİLEŞTİRİCİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sultan YILMAZ tarafından hazırlanan tez çalışması 10.06.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Musa TÜRKER
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Musa TÜRKER
Yıldız Teknik Üniversitesi



Doç. Dr. Rabia ÇAKIR KOÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi



Doç. Dr. Zafer Ömer ÖZDEMİR
Sağlık Bilimleri Üniversitesi



Danışmanım Prof. Dr. Musa TÜRKER sorumluluğunda tarafımca hazırlanan ‘‘*Plantago lanceolata* bitkisinin doku kültüründe rejenerasyonu, bitki ekstraktından nanopartikül sentezi, antibakteriyel ve yara iyileştirici etkisinin araştırılması’’ başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Sultan YILMAZ

İmza

**Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü'nün FYL-2019-3590 numaralı projesi ile
desteklenmiştir.**

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiv
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	2
2 BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ	4
2.1 Bitki Doku Kültürü Teknikleri	5
2.1.1 Kallus Kültürü.....	5
2.1.2 Organ Kültürü	6
2.1.3 Embriyo Kültürü	6
2.1.4 Hücre Süspansiyon Kültürü	7
2.1.5 Protoplast Kültürü.....	7
2.1.6 Saçak Kök Kültürü.....	8
2.1.7 Biyoreaktörler	8
2.1.8 Biyotransformasyon.....	9
2.2 Bitki Doku Kültürünün Uygulama Alanları	10
2.3 Sekonder Metabolitlerin Üretimi.....	10
2.4 Sekonder Metabolitlerin Tıpta Uygulama Alanları	11
3 NANOTEKNOLOJİ	14
3.1 Nanopartiküller.....	14
3.1.1 Metalik Nanopartiküller.....	15
3.2 Nanopartiküllerin Sentezlenmesi.....	17

3.2.1 Bottom to top (Kimyasal yaklaşımlar).....	19
3.2.2 Top to bottom (Fiziksel yaklaşımlar).....	19
3.2.3 Biyosentez (Yeşil Sentez).....	20
3.3 Bitki Özütleri Kullanılarak Yeşil Sentez Nanoparçacıkların Üretimi.....	20
3.4 Mikroorganizmalar Kullanılarak Nanopartiküllerin Sentezi.....	23
3.4.1 Algler	23
3.4.2 Bakteriler	23
3.4.3 Mantarlar.....	24
3.4.4 Virüsler	25
3.4.5 Mayalar	25
3.5 Nanopartiküllerin Fitofabrikasyonunu Etkileyen Parametreler.....	26
3.5.1 pH'nin Etkisi.....	26
3.5.2 Reaksiyon Sıcaklığının Etkisi.....	27
3.5.3 Etkileşme ya da İnkübasyon Süresinin Etkisi.....	27
3.5.4 Reaktan konsantrasyonu	27
3.6 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	28
3.6.1 Mikroskopik Tabanlı Teknikler	28
3.6.2 Spektroskopi Tabanlı Teknikler.....	28
3.6.3 Işık Saçma Teknikleri	29
3.6.4 X-Ray Temelli Teknikler.....	30
4 YARA İYİLEŞMELERİ	30
4.1 Yara İyileşmelerinde Gümüş Nitratın Etkisi	31
4.2 Yara iyileştirici Testler	31
4.2.1 WST	31
4.2.2 Hücre Çizik Testi	31
4.3 Antibakteriyel Testler	32
4.3.1 Disk Difüzyon Testi.....	32
4.3.2 Mikrodilüsyon Testi.....	32
5 MATERYAL VE METOD	34
5.1 Materyaller	34
5.1.1 Cihaz ve Ekipmanlar.....	34
5.1.2 Kimyasal Malzemeler	35
5.2 Metod.....	35

5.2.1 Tohumların İn vitro Çimlendirilmesi.....	35
5.2.2 Bitki Ekstraktının Hazırlanması.....	37
5.2.3 Gümüş Nanopartikül Sentezi (AgNO ₃)	38
5.2.4 Sentezlenen Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	39
5.2.5 Fitozentezlenmiş Nanopartiküllerin Antibakteriyel Çalışmaları	40
5.2.6 Fitosentezlenmiş Nanopartiküllerin Sitotoksosite Testi	42
5.2.7 Fitosentezlenmiş Nanopartiküllerin Migrasyon Testleri	43
6 DENEYSEL VERİLERİ VE SONUÇLARI	44
6.1 Plantago major ve Plantago lanceolata Bitkilerinin Rejenerasyonu.....	44
6.1.1 Plantago lanceolata Bitkisinin Rejenerasyonu.....	44
6.1.2 Plantago major Bitkisinin Rejenerasyonu.....	46
6.2 Gümüş Nanopartikülün Sentezi ve Karakterizasyonu.....	47
6.2.1 Gümüş Nanopartikülün Sentezi	47
6.2.2 Gümüş Nanopartikülün Karakterizasyonu.....	48
6.3 Antibakteriyel Testler	51
6.3.1 Disk Difüzyon Yöntemi.....	51
6.3.2 Mikrodilüsyon Yöntemi.....	52
6.4 Yara İyileştirici Testler	53
6.4.1 Hücre Sitotoksosite Testi	53
6.4.2 Hücre Migrasyon Testi	54
7 SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKÇA	63
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	70

SİMGE LİSTESİ

dk	Dakika
°C	Derece
g	Gram
%	Yüzde
uL	Mikrolitre
um	Mikrometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
pH	Power of Hydrogen (Hidrojen gücü)
rcf	Relative Centrifugal Force (Bağıl Merkezkaç Kuvveti)
rpm	Revolutions per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)

KISALTMA LİSTESİ

AFM	Atomic Force Microscopy (Atomik Kuvvet Mikroskobu)
ATR	Attenuated Total Reflection (Zayıflatılmış Toplam Yansıma)
BAP	6-Benzylaminopurine (6-Benzilamino Pürin)
BBD	Bitki Büyüme Düzenleyicileri
BSC	Biological Safety Cabinet (Biyolojik Güvenlik Kabini)
CCK8	Cell Counting Kit-8 (Hücre Sayım Kiti)
DLS	Dynamic Light Scattering (Dinamik Işık Saçılımı)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media (Dulbecco'nun Modifiye Edilmiş Eagle Ortamı)
ECM	Extracellular Matrix (Hücre Dışı Matriks)
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetal Sığır Serumı)
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Fourier Dönüştürücü Infrared Spektroskopisi)
IAA	Indole acetic acid (İndol asetik asit)
LB	Luria-Bertani
MS	Murashige and Skoog
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
NAA	1-Naphthaleneacetic acid
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Nikotinamid Adenin Nükleotit)
NP	Nanopartikül
PBS	Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Tuz)
SEM	Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
SPR	Surface Plasmon Resonance (Yüzey Plazmon Rezonans)
TEM	Transmission Electron Microscopy (Geçirmeli Elektron Mikroskobu)
TMV	Tütün Mozaik Virüsü
UV	Ultra-Viyole
WST	Water Soluble Tetrazolium Salts (Suda Çözünebilir Tetrazolyum Tuzu)
XRD	X-ray Diffraction (X Işınımı Kırınımı)
QD	Quantum Dot (Kuantum Noktası)
2,4-D	2 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D diklorofenoksiasetik asit)

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Bitki in vitro doku kültürü kullanılarak biyoaktif bileşiklerin büyük ölçekli üretimi için kullanılan mevcut yöntemleri şeması.....	5
Şekil 2.2 Bitki hücresinden ikincil metabolitlerin üretimi	9
Şekil 2.3 Bitki doku kültürü uygulamaları.....	11
Şekil 3.1 Biyoteknolojide metalik nanopartiküllerin çeşitleri ve uygulamaları.....	15
Şekil 3.2 Gümüş nanopartiküllerin farklı sentez yaklaşımları	18
Şekil 3.3 Nanoteknolojide ,“yukarıdan aşağıya“ ve aşağıdan yukarıya“ yaklaşımlarının gösterilmesi.....	19
Şekil 3.4 Bitki ekstraktı kullanılarak sentezlenen AgNP’lerin proses şeması.....	21
Şekil 3.5 Nanopartikül sentezinin mekanizması (M^{+} -metal iyonu)	23
Şekil 3.6 Monodispersiyonlu, kararlı ve yüksek verimli biyolojik nanopartiküller üretme parametreleri.....	27
Şekil 5.1 Çimlenen <i>P. lanceolata</i> ve <i>P. major</i> bitkilerinin kavanozlara aktarılması.....	38
Şekil 5.2 <i>Plantago major</i> bitkisi ve bitki ekstraktı.....	39
Şekil 5.3 <i>Plantago lanceolata</i> bitkisi ve bitki ekstraktı	39
Şekil 5.4 A)Sentez öncesi <i>P. major</i> bitki ekstraktı ve $AgNO_3$ çözeltisi B)Sentez ürünü.....	40
Şekil 5.5 A)Sentez öncesi <i>P. lanceolata</i> ekstraktı ve $AgNO_3$ çözeltisi B) Sentez ürünü	41
Şekil 5.6 Disk difüzyon yöntemi aşamaları.....	43
Şekil 5.7 Mikrodilüsyon yöntemi aşamaları.....	44
Şekil 5.8 WST ajanıyla muamele edilmiş hücrelerin 24 ve 48. saatlerdeki durumu.....	45
Şekil 6.1 A) Kök gelişimi hedeflenen hipokotil ve kotiledon eksplantları B)Sürgün gelişimi hedeflenen yaprak eksplantları C)Gövde gelişimi hedeflenen hipokotil ve kotiledon eksplantları D) Gelişme gösteren eksplantların farklı konsantrasyonda BAP ve NAA içeren ortama aktarılması E) Eksplantlardan kök ve gövde gelişimi gözlenmesi F)Kök ve gövde gelişimi gözlenen bitkilerin toprağa aktarılması.....	48
Şekil 6.2 A ve C)Kök gelişimi hedeflenen hipokotil ve kotiledon eksplantları	

B ve D) Gövde gelişimi hedeflenen hipokotil ve kotiledon eksplantları	
E)Sürgün gelişimi hedeflenen yaprak eksplantları	
D)Gelişme gösteren eksplantların farklı konsantrasyonda BAP ve NAA içeren ortama aktarılması	50
Şekil 6.3 <i>Plantago lanceolata</i> bitkisinin 418 nm’de, <i>Plantago major</i> bitkisinin 440 nm’de UV-Görünür bölge absorbansı	51
Şekil 6.4 <i>Plantago lanceolata</i> bitkisinden sentezlenmiş AgNP’ün FT-IR sonuçları	52
Şekil 6.5 <i>Plantago major</i> bitkisinden sentezlenmiş AgNP’ün FT-IR sonuçları	53
Şekil 6.5 <i>Plantago lanceolata</i> bitkisinden sentezlenmiş AgNP’ün Zetasizer sonucu 81 nm	53
Şekil 6.6 <i>Plantago major</i> bitkisinden sentezlenmiş AgNP’ün Zetasizer sonucu 93 nm	54
Şekil 6.7 A)0.1 mg/mL kanamisin, bitki ekstraktı ve AgNP B)0.05 mg/mL kanamisin, bitki ekstraktı ve AgNP C)0.01 mg/mL kanamisin, bitki ekstraktı ve AgNP	55
Şekil 6.8 0.1 mg/mL AgNP (0.02 mm) ve kanamisinin (0.03 mm) inhibisyon çapının ölçülmesi	55
Şekil 6.9 Mikrodilüsyon testi	56
Şekil 6.10 24-48. saatlerde WST testi sonuçları	57
Şekil 6.11 0.1 ,0.05 ve 0.01 mg/mL AgNP’ün 0, 24 ve 48 saatlerindeki migrasyon görüntüleri	58
Şekil 6.12 0.1, 0.05 ve 0.01 mg/mL bitki ekstraktının 0, 24 ve 48 saatlerindeki migrasyon görüntüleri	59

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Bitki Doku Kültürü Uygulamaları	11
Tablo 2.2 Teröpatik kullanım için onaylanmış bitki kaynaklı doğal ürünlerden bazıları.....	13
Tablo 3.1 Gümüş nanopartiküllerin uygulama alanları.....	17
Tablo 6.1 <i>Plantago lanceolata</i> bitkisinin rejenerasyonu.....	47
Tablo 6.2 Gelişim gözlenen eksplantların kavanozlara aktarılması ve oluşan etki.....	48
Tablo 6.3 <i>Plantago major</i> bitkisinin rejenerasyonu.....	49
Tablo 6.4 Gelişim gözlenen eksplantların kavanozlara aktarılması ve oluşan etki.....	49

***Plantago lanceolata* Bitkisinin Doku Kültüründe Rejenerasyonu, Bitki Ekstraktından Nanopartikül Sentezi, Antibakteriyel ve Yara İyileştirici Etkisinin Araştırılması**

Sultan YILMAZ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Musa TÜRKER

Bitki doku kültürü ticari öneme sahip tıbbi bitkilerin elde edilmesinde sürekli doğaya bağımlı kalmama, laboratuvar şartlarında bitkiyi sürekli temin edebilme imkanı sağlamaktadır. Geçtiğimiz birkaç yıl boyunca anti-enflamatuvar, antimikrobiyal ve antikanserojenik etkilere sahip bitkilere nanoteknoloji alanında ilgi duyulmakta ve biyomedikal uygulamalar için önemli ve umut verici özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada tıbbi etkisi olan ve yara iyileştirmelerinde kullanılan *Plantago lanceolata* ve *Plantago major* bitkileri, bitki doku kültürü tekniğiyle çoğaltıldı. Doğal ve kültür ortamından elde edilen örneklerin kimyasal kullanmadan doğal ortamda su kullanılarak ekstraktları elde edildi. İçerisinde kaplayıcı, indirgeyici, stabilize edici molekülleri bulunduran bitki ekstraktları gümüş nanopartikül sentezinde kullanıldı. Bu araştırmada bitki doku kültürü tekniğiyle üretimi ve gümüş nanopartiküllerin (AgNP) sentezi için *Plantago lanceolata* bitkisi kullanılmıştır.

Plantago lanceolata bitkisi doku kültüründe rejenere edilmiştir. Doğadan toplanan ve doku kültüründe üretilen bu bitkinin doğal ekstraktlarından başarılı olarak elde edilen nanoparçacıkların karakterizasyonu için UV-Vis spektroskopisi, Fourier Transforms Infrared (FT-IR) spektroskopisi ve Zeta boyut analizi ölçümleri yapılmıştır. Zeta boyut

analizine göre gümüş nanopartiküllerin ortalama boyutları 61-100 nm arasında ölçülmüştür.

Üç farklı konsantrasyonda (0.1, 0.05, 0.01 mg/mL) hazırlanan AgNP, bitki ekstraktı ve kanamisin'in antibakteriyel potansiyelleri disk difüzyon yöntemi ve mikrodilüsyon testi kullanılarak Gram-negatif (*Escherichia coli*) bakterisi üzerinde incelenmiştir. Disk difüzyon yönteminde yüksek konsantrasyon olan 0.1 mg/mL AgNP'de 10 mm, kanamisinde ise 12 mm inhibisyon çapı gözlenirken bitki ekstraktında inhibisyon çapı gözlenmemiştir. Mikrodilüsyon testiyle; AgNP, bitki ekstraktı ve kanamisin'in 500 mg/mL-15.6 mg/mL konsantrasyonları arasında seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Sonuçlardan yola çıkarak yüksek konsantrasyonda AgNP ve kanamisin'in aynı ölçüde ve etkin bir antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmada AgNP'lerin sitotoksik ve yara iyileştirici etkileri fare kas hücreleri (C2C12) üzerinde, WST hücre canlılık ve çizik testi yapılarak incelenmiştir. Yapılan hücre canlılık testinde, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde 0.1 ve 0.05 mg/mL'lik AgNP'nin C2C12 hücreleri üzerinde büyük ölçüde sitotoksik etki gösterdiği, ancak 0.01 mg/mL AgNP'nin temas süresinin azalmasıyla sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir. Yapılan çalışma AgNP'ün C2C12 hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisi olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Bitki doku kültürü, gümüş nanopartikül, yeşil sentez, *Plantago lanceolata*, yara iyileştirme

In vitro Regeneration of *Plantago lanceolata* Plant, Nanoparticle Synthesis from Plant Extract, Investigation of Antibacterial and Wound Healing Effects

Sultan YILMAZ

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Assoc. Prof. Dr. Musa TÜRKER

Plant tissue culture provides the opportunity not to be constantly dependent on nature in obtaining medical and commercially important plants, and to provide the plant continuously in laboratory conditions independently environmental conditions. Over the past few years, plants with anti-inflammatory, antimicrobial and anticarcinogenic effects have been interested in nanotechnology and are thought to have important and promising properties for biomedical applications.

In the present study, *Plantago lanceolata* plant, which have a medical effect and used in wound healing, were regenerated with the plant tissue culture technique. Extracts of natural and *in vitro* regenerated plants were obtained using water in natural environment without using chemicals. Plant extracts containing coater, reducing, stabilizing molecules were used in silver nanoparticle synthesis.

UV-Vis spectroscopy, Fourier Transforms Infrared (FT-IR) spectroscopy and Zeta-Sizer analysis were performed to characterize the nanoparticles successfully obtained from the extracts of the plant, collected from nature and produced in tissue culture. According to the Zeta-Sizer analysis, the average sizes of silver nanoparticles were measured between 61-100 nm.

Antibacterial potentials of Silver nanoparticles (AgNP) prepared in three different concentrations (0.1, 0.05, 0.01 mg/mL) were investigated comparing with Kanamycin on Gram-negative (*Escherichia coli*) bacteria using disc diffusion method and microdilution test. In disc diffusion method, 0.1 mg/mL AgNP, which is a high concentration, has an inhibition diameter of 10 mm, while Kanamycin has an inhibition diameter of 12 mm. With microdilution test; Serial dilutions were made between 500 mg/mL-15.6 mg/mL concentrations of AgNP, plant extract and Kanamycin. Based on the results, it was determined that high concentration AgNP and Kanamycin have the same and serious antibacterial effect.

Cytotoxic and wound-healing effects of AgNPs were investigated on mouse muscle cells (C2C12) by performing WST cell viability and scratch tests. In the cell viability test, it was determined that 0.1 and 0.05 mg / mL AgNP had a great cytotoxic effect on C2C12 cells during 24 and 48 hours incubation period, but it did not show cytotoxic effect with a decrease in exposure time of 0.01 mg/mL AgNP. The results revealed cytotoxic effect AgNP on C2C12 cell line.

Keywords: Silver nanoparticle, green synthesis, *Plantago lanceolata*, wound healing

1.1 Literatür Özeti

Plantago major ve *Plantago lanceolata*, Plantaginaceae familyasına ait çok yıllık bitkilerdir. Yaklaşık 15 cm yüksekliğinde olabilirler, ancak büyüme habitatlarına bağlı olarak boyutları değişmektedir. Yakın zamandaki etnofarmakolojik çalışmalar, *Plantago* bitkilerinin dünyanın birçok yerinde anestezik, antiviral, antienflamatuar, analjezik, antihistaminik, antiromatizmal, antitümör özelliklerinden dolayı tıpta kullanıldığını göstermektedir [1]

Bitki doku kültürü, aseptik ve kontrollü ortam altında tanımlı katı veya sıvı ortam üzerinde hücrelerin, dokuların ve organların büyümesini ve çoğalmasını ifade eder. Ticari teknolojisi; esas olarak aksiller tomurcuklarda, somatik embriyolardan, süspansiyon kültürlerindeki hücre kümelerinden ve biyoreaktörlerden hızlı bir şekilde çoğaltmanın sağlandığı mikro-çoğaltmaya dayanmaktadır [2]. İn vitro kültür teknikleri hastalıksız bitkilerin üretimi, nadir bitki genotiplerinin hızlı çoğaltılması, bitki genomunun dönüşümü ve önemli ticari değere sahip bitki kaynaklı metabolitlerin üretimi için vazgeçilmezdir [3].

Nanoteknoloji, kelimenin tam anlamıyla nano ölçekte uygulamaları olan teknoloji anlamına gelir ve tek tek atomlardan veya moleküllerden mikron altı boyutlara kadar değişen ölçeklerde fiziksel, kimyasal ve biyolojik sistemlerin üretimini, uygulanmasını ve sonuçta elde edilen nanoyapıların daha büyük sistemlere entegrasyonunu kapsar. Nanopartikül (NP); 1 ile 100 nm arasında bir yarıçapla birbirine bağlanmış atomların toplamıdır ve genellikle 10-105 atomdan oluşur [4].

Nanopartiküller fizikokimyasal yöntemler uygulanarak sentezlenebilir. Bununla birlikte bu yöntemler; toksik çözücülerin kullanımı, tehlikeli yan ürünlerin üretimi ve yüzey yapısının kusurlu olması da dahil olmak üzere birçok dezavantaja sahiptir. Kimyasal yöntemler genellikle parçacık reaktivitesini ve toksisitesini artırabilecek kompozisyon belirsizliği ve öngörülebilirlik eksikliği nedeniyle insan sağlığına ve çevreye zarar verebilecek birden fazla kimyasal tür veya molekülden oluşur. Toksik, pahalı kimyasallar

ve yüksek enerji tüketimi kullanmadan doğal indirgeyici, kapatıcı ve stabilize edici ajanlar kullanan verimli yeşil sentezin ilerlemesi araştırmacıları biyolojik yöntemlere çekmiştir. Yeşil sentezle üretilen partiküller, fizikokimyasal yaklaşımlardan farklıdır. Aşağıdan yukarıya bir yaklaşım olan yeşil sentez pahalı bir kimyasal indirgeyici ajanın, metal veya metal oksit nanopartiküllerin sentezini sağlamak için ağaç, bitki yaprakları veya meyveler gibi doğal bir ürünün özü ile değiştirildiği kimyasal indirgemeye benzer. Biyolojik varlıklar nanopartikül üretimi için büyük bir potansiyele sahiptir. Biyolojik sentezle üretilen nanopartiküller çevre dostu, sürdürülebilir, kimyasal kontaminasyon içermeyen, maliyeti düşük ve seri üretim için kullanılabilir durumdadır [5].

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmanın temel amacı:

1. *Plantago lanceolata* bitkisinin bitki doku kültürü tekniğiyle çoğaltmak.
2. Mikrodalga ışıması altında gümüş nanopartikülleri (AgNP) biyosentezlemek (yeşil sentez yöntemiyle).
3. Biyosentezlenmiş gümüş (AgNP'ler) nanopartikülleri kimyasal ve biyokimyasal özelliklerini detaylandırmak.
4. *Escherichia coli* bakterisine karşı biyosentezlenmiş gümüşün (AgNP) nanopartiküllerin antimikrobiyal potansiyelini araştırmak.
5. Biyosentezlenmiş gümüş (AgNP) nanopartiküllerin *in vitro* sitotoksik ve yara iyileştirici aktivitelerini araştırmak.

1.3 Hipotez

Bitki doku kültürü tekniği kullanılarak doğada bulunması güç, nesli tükenmekte ve tıbbi açıdan değerli olan bitkilerin üretimi sağlanıp bu araştırmadan standart bir protokol oluşturulabilir. Ayrıca, gümüş nanopartiküllerin yeşil sentezi için kullanılan bir metod olan mikrodalga ısıma yöntemiyle standart bir protokol geliştirilebilir. Protokolde biyoaktif moleküllere sahip bitki ekstraktlarından, gümüş nanopartiküllerin (AgNP) sentezi için indirgeyici ve kaplayıcı ajan olarak yararlanılabilir. Biyolojik bir sentez olan bu protokolda fizikokimyasal yöntemlerden farklı olarak toksik olmaması ve ekonomik olması beklenmektedir.

Bu nanopartiküllerin *Escherichia coli* türüne karşı çok düşük konsantrasyonda antibakteriyel aktivite göstermesi de bu deneyden mümkün olabilir. Bu protokolle ayrıca, fitosentezlenmiş gümüşün in vitro sitotoksik çalışmaları ve migrasyon testleriyle özellikle tıp alanı olmak üzere çeşitli sektörlerde uygulanması ve geliştirilmesi sağlanabilir.

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Bitki doku kültürü, aseptik şartlar altında suni hazırlanan katı veya sıvı besin ortamlarında bitki hücre, doku ve organlarının çoğaltılması ve büyütülmesi tekniğidir [2]. Bitki doku kültürünün temeli olan totipotensi kavramı 1902’de Haberlandt tarafından öne sürülmüş olup; bu kavrama göre, her bir bitki hücresi uygun çevresel koşullar sağlandığı sürece birbirinden bağımsız olarak ana bitkiye benzer şekilde bir bitki oluşturmaya yeteneğine sahiptir [6]. Çevresel koşullar arasında uygun besin kaynağı, pH, yeterli sıcaklık, uygun gaz ve sıvı ortamı bulunup bu kontrollü koşullar, kültürün büyüme ve çoğalması için elverişli ortam sağlar [7]. Uygun bir fitohormon rejiminin seçilmesi koşuluyla, bitki meristemleri, tomurcukları, yaprakları, gövdeleri, kökleri, vb. eksplantlar; kotiledon, hipokotil, kök, gövde, filizleme uçları gibi çeşitli ve karmaşık yapıların oluşumu ile sonuçlanan koordineli bölünme ve gelişime uğrayabilir [8].

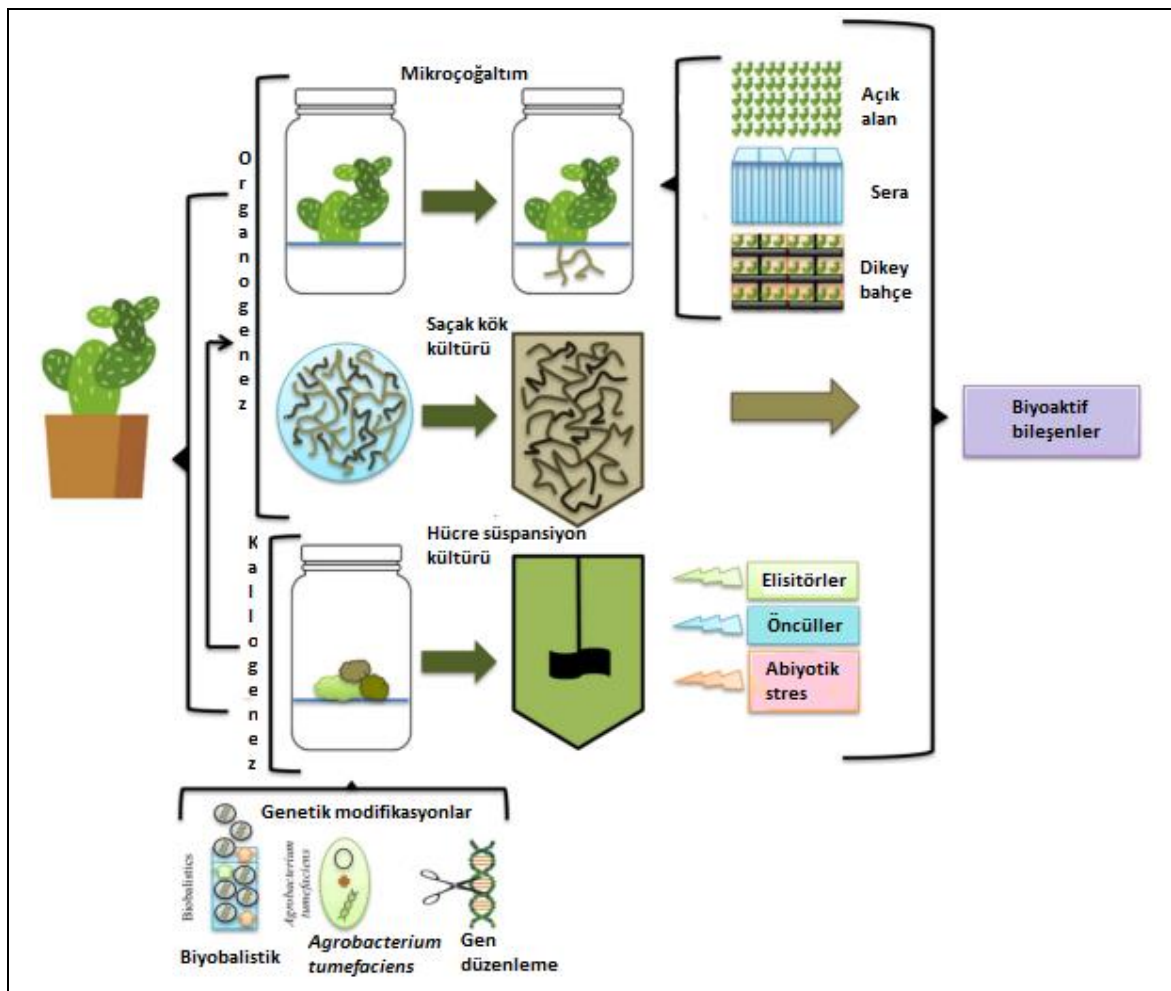
Bitki doku kültürü yöntemlerinin, geleneksel tarımsal üretim yöntemlerine göre avantajları;

- Yüksek kalitede hastalıksız ve tek tip bitki materyallerinin hızlı üretimi ve çoğaltılması
- Bitkilerin, iklim değişikliği ve toprak şartlarından bağımsız olarak her yerde kontrollü bir şekilde üretiminin sağlanması
- Hasatın; hızlı, temiz, doğru olması
- Herhangi bir türe ait spesifik metabolitleri üretmek için hücrelerin kolayca *in vitro* ekilebilmesi
- *In vitro* bitki hücreleri genellikle farklı profilde ve miktarlarda metabolit üretir ve bu üretim tekniğinin daha yönetilebilir, yeniden üretilebilir ve güvenilir olması.
- Birçok bileşiğin yüksek verimde üretimi için organ, doku ve hücrenin seçilebilmesi
- Yavaş büyüyen ve seyrek dağılmış türlerle, zayıf çimlenme oranına sahip düşük tohum veya tohum üretimi için hızlı çoğalmanın mümkün olması

- Bitki hücrelerinin besin ortamı içeren otomatik biyoreaktörlerde, yüksek verimlilik ve düşük işçilik maliyetleri ile yetiştirilebilmesi
- Polen, organ, doku ve hücreleri (bir tohum bankası olarak) uzun süre depolayarak gen havuzunun korunmasını sağlar [8].

2.1 Bitki Doku Kültürü Teknikleri

İn vitro kültür teknikleri artık hastalısız bitkilerin üretimi, nadir bitki genotiplerinin hızlı çoğalması, bitki genom transformasyonu ve önemli ticari değere sahip bitki kaynaklı metabolitlerin üretimi için vazgeçilmezdir [3].



Şekil 2.1 Bitki *in vitro* doku kültürü kullanılarak biyoaktif bileşiklerin büyük ölçekli üretimi için kullanılan mevcut yöntemlerin şeması [3]

2.1.1 Kallus Kültürü

Kallus, bitki eksplantlarının uygun hormonları bulunduran büyüme ortamına transfer edilmesinden birkaç hafta sonra eksplantlarda görülen farklılaşmamış bir doku küttlesidir.

Karasal bitkilerin tüm büyük ailelerinde yaralanmış doku, farklılaşmamış kallus hücreleri tarafından geri kazanılır ve bu kallus hücreleri, biyoteknolojik uygulamalar için *in vitro* olarak kültürlenebilir. Bitkinin hemen hemen herhangi bir kısmı kallus kültürleri oluşturmak için kullanılabilir. Bitki dokularından alınan eksplantlar, mikrobiyal enfeksiyonu önleyen steril koşullar altında elde edilir ve büyüme hormonları (oksin, sitokinin vb.) ile takviye edilmiş katı jel besiyeri üzerinde kültürlenirlerse yavaş yavaş *in vitro* olarak amorf ve renksizden kahverengiye kadar değişen bir hücre kütlesine dönüşür. Hücrelerin düzenli aralıklarla pasajlanmasıyla kallus kültürleri *in vitro* olarak süresiz olarak korunabilir. Farklılaştırılmış bitki hücreleri ve kültürlenmiş kallus hücreleri önemli ölçüde farklılık gösterir. Kallus hücreleri, farklılaşmamış meristemik hücrelere benzeyip sadece küçük boşluklar ortaya çıkarırlar ve diğer özelliklerin yanı sıra fotosentez için kloroplast içermezler. Kallus kültürleri, standart kültür ortamından farklı uygun büyüme ortamı altında tutulursa tam bir bitkiye farklılaşabilir. Bazı kallus kültürleri karanlık büyüme koşullarına ihtiyaç duyarken, diğerleri belirli gündüz-gece koşulları altında (örn; 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık) büyür. Kallus kültürleri genellikle $(25 \pm 2) ^\circ \text{C}$ 'de büyür [9].

2.1.2 Organ Kültürü

Organogenez; bitki organlarının üretimini, yani doğrudan meristemden veya dolaylı olarak farklılaşmamış hücre kütlelerinden (kallus) ortaya çıkabilecek kök, filiz ve yaprakların üretimini belirtir. Organogenez yoluyla bitki rejenerasyonu, kallus üretimi ve adventif meristemlerin besiyerinde bitki büyüme hormonlarının konsantrasyonunu değiştirerek organlara farklılaşmasını içerir [10]. Aynı zamanda, organojenik gövde doğrudan eksplantlardan elde edilirse organogenez doğrudan olabilir veya organojenik işlem ilkin eksplantlardan oluşturulmuş kallustan meydana gelirse dolaylı olabilir [11].

2.1.3 Embriyo Kültürü

Çiçekli bitkilerde çift döllenme, tek hücreli bir zigotun ve endospermin ilk hücresinin oluşmasına neden olur. Daha sonra zigot gelişimi, zigotun bir embriyoya dönüşmek üzere bir dizi karmaşık hücresel, moleküler, biyokimyasal ve morfolojik olayı böldüğü ve geçirdiği embriyogenez olarak adlandırılır. Embriyogenez ayrıca maternal dokudan veya döllenmemiş bir yumurta hücresinden oluşan apomiktik embriyolar olarak adlandırılan aseksüel embriyoların üretilmesi yoluyla döllenmeden de ortaya çıkabilir. Aseksüel embriyoların oluşumu, *in vitro* kültür tekniği olan gametofitik veya somatik embriyogenez yoluyla da elde edilebilir. Gametofitik embriyogenez, erkek veya dişi gametofitlerden

haploid embriyoların üretilebileceği bir işlemken somatik embriyogenez, somatik (sporofitik) hücrelerden yani gametler dışındaki hücrelerden embriyoları başlatır. *İn vitro* sistem, kısa sürede senkron gelişimli çok sayıda embriyo üretimi de dahil olmak üzere *in vivo* embriyoların kullanımına göre birçok avantaj sunar [12]. Somatik embriyogenez ise, tam bir bitki elde etmek için somatik bitki hücrelerinden (herhangi bir cinsel olmayan hücre) embriyo üretimidir. İşlem ilk eksplantlardan veya daha önce indüklenen kallustan kaynaklanıyorsa, doğrudan veya dolaylı da olabilir [11].

2.1.4 Hücre Süspansiyon Kültürü

Bitki hücre kültürü, bitki biyokimyası ve moleküler biyoloji ile ilgili temel çalışmalar için önemli bir araçtır ve farklılaşmış kültürler (tüm bitki ve organ kültürleri, filizler, kökler) veya farklılaşmamış kültürlerin (kallus, hücre süspansiyonları ve protoplastlar) rejenerasyonunu içeren mevcut yöntemlerdir. Farklılaştırılmış kültürler, hücre süspansiyon kültürlerinde her zaman eksprese edilmeyen dokuya özgü biyosentetik yolları çalışmak için faydalı olabilir. *İn vitro* ayrıştırılmış bitki hücre süspansiyon kültürleri, biyoreaktörlerde önemli kimyasalların büyük ölçekli üretimi için ve bitkilerin incelenmesi için basitleştirilmiş bir model sistemin avantajını sunduklarından hücre ve moleküler proseslerin incelenmesi için daha uygun bir yöntemdir. Hücre süspansiyon kültürleri; hücrelere yönelik beslenme, öncüler, büyüme hormonları ve sinyal bileşiklerine hızlı ve düzgün erişim sağlayan nispeten homojen bir hücre popülasyonu içerir [13].

Kallus dokusu, bitki hücre kültürü sistemlerinde önemli bir malzemedir. Sıvı bir ortama konulduğunda ve çalkalandığında hücreler, hücre süspansiyon kültürü oluşturmak üzere sıvının içinde yayılır. Bu tür hücreler teorik olarak totipotenttir ve ayrıca normalde sağlam bitki ile ilişkili bileşiklerin herhangi birini sentezleme potansiyeline sahiptir. Yeni hücreler oluşukça sıvı ortama dağılırlar ve kümeler haline gelirler. Süspansiyondaki hücreler, kallus kültüründeki hücrelere göre çok daha yüksek hücre bölünme oranları sergileyebilir [14].

2.1.5 Protoplast Kültürü

Protoplastlar, hücre duvarı enzimatik veya mekanik işlemle uzaklaştırılmış bitki hücreleridir. Bununla birlikte bu yaklaşımı geçmişte kullanmanın temel amacı; türler

arası hibritleşmelerdir. Mekanik izolasyon mümkün olmasına rağmen zarar görmüş hücrelerden salınan maddeler nedeniyle kültürde düşük verim, kalite ve performansla sonuçlanır [13]. Enzimatik izolasyon genellikle yüksek ozmotikumlu (bir bitkideki veya bitki hücre kültüründeki ozmotik basıncı takviye eden bir madde- örn; sukroz) basit bir çözeltide, hücre duvarı parçalayıcı enzimleriyle yapılan güvenli bir yöntemdir [15].

2.1.6 Saçak Kök Kültürü

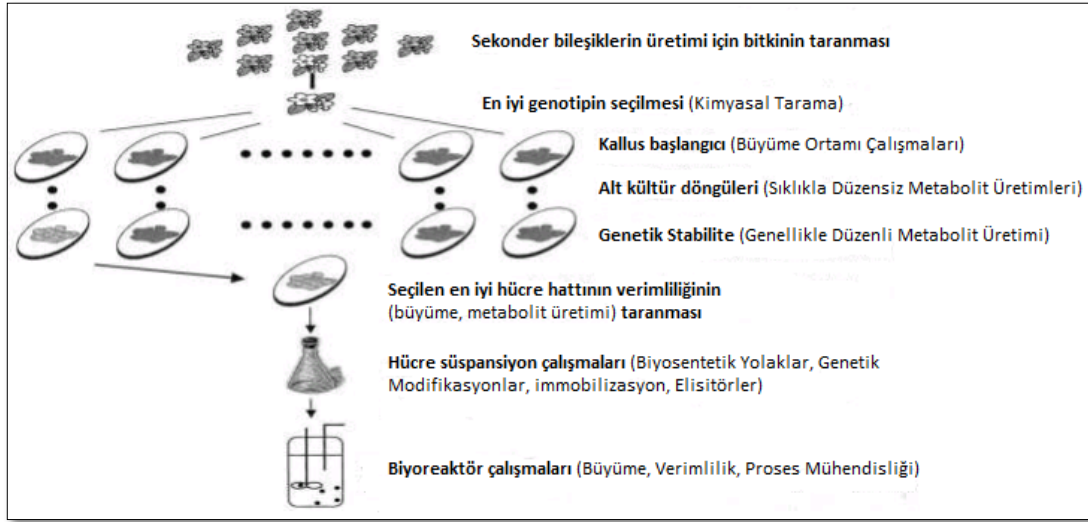
Saçak köklerin üretimi, bitki metabolik işlemlerini incelemek, değerli ikincil metabolitler veya rekombinant proteinler üretmek için bitki doku kültürü tekniği ile gerçekleştirilir. Saçak kök kültürü aynı zamanda doğal olarak ortaya çıkan Gram negatif toprak bakterisinden dönüştürülmüş kök kültürü olarak da adlandırılır ve kök indükleyen plazmitler (Ri plazmitleri) içerir. *Agrobacterium rhizogenes* enfeksiyonu tarafından üretilen saçak kökler, genetik ve biyokimyasal yapının yanı sıra yüksek bir büyüme oranına sahiptir. Saçak kök kültürü; bitkilerin metabolik süreçlerini, sekonder metabolitlerin üretimini, rekombinant proteinlerin üretimini, bitki genetik mühendisliğini, yapay tohum üretimi, biyolojik arıtma ve biyofarmasötikleri incelemek için kullanılan bir tür bitki dokusu kültürüdür [16].

2.1.7 Biyoreaktörler

Büyük ölçekli bitki doku kültürünün, bitkilerin mevcudiyetinden bağımsız olarak kontrollü bir biyokimyasal madde tedarik ettiği için geleneksel plantasyon yöntemlerine alternatif bir yaklaşım olarak görülmüştür. Doku kültürü teknolojisindeki güncel gelişmeler, transkripsiyon faktörlerinin değerli bileşiklerin üretimini arttırmada bitki metabolik mühendisliği için etkili yeni moleküler araçlar olduğunu göstermektedir.

Bitki özlerinden değerli bileşikler tanımlandıktan sonra çalışmanın ilk kısmı, ilgili maddeleri üreten bitki bireylerinin en büyük genetik havuzunun toplanmasından ibarettir. Bu çalışma, en değerli sekonder metabolitleri sunan hiper üretici bitkilerin taranmasına izin verir. Bununla birlikte sekonder bileşiklerin temel bir özelliği, sentezlerinin yüksek ölçüde indüklenebilir olmasıdır. En verimli bitkiler seçildikten sonra kallusla in vitro kültürlerle başlanır. Bu çalışma esas olarak yetiştiriciliğe en iyi adapte edilecek ortamı belirlemeye dayanmaktadır. Kallus elde edildiğinde genellikle birkaç alt-kültür döngüsü sırasında kallusun somaklonal bir değişime maruz kalabilecekleri iyi bilinmektedir. Bu in vitro varyasyon nedeniyle sekonder metabolit üretimi bir alt kültür döngüsünden diğerine geçişte değişkenlik gösterir. Genetik stabiliteye ulaşıldığında etkili bir metabolit üretimi sağlamak için farklı kallus hatlarını yeteneklerine göre taramak gerekir. Bu

nedenle her kallus, hücre içi ve hücre dışı metabolit konsantrasyonlarının yanı sıra büyüme hızı için de ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Bu her hücre hattının verimliliğinin değerlendirilmesine izin verir. Böylece hücre süspansiyonları ve reaktör çalışmalarına sadece en iyileri alınacaktır. Büyüme durduğunda birincil metabolizma için artık büyük miktarlarda karbona ihtiyaç duyulmaz ve ikincil bileşikler daha aktif olarak sentezlenir. Biyoreaktör çalışmaları, bitki hücre kültürlerinden ikincil metabolitlerin olası ticari üretimine yol açan son adımı temsil eder. Bu erlenmeyer şişelerinde yapılan çalışmaları ölçeklendirirken sayısız sorun çıkması nedeniyle önemli bir aşamadır. Bir biyoreaktörde biyokütle üretiminin başarılı bir şekilde optimizasyonundan sonra bitki hücresi kültürleri iyi bir sekonder metabolit üretimi elde etmek için iyi adapte edilmiş işlemlerden geçmelidir [17].



Şekil 2.2 Bitki hücresinden ikincil metabolitlerin üretimi [17]

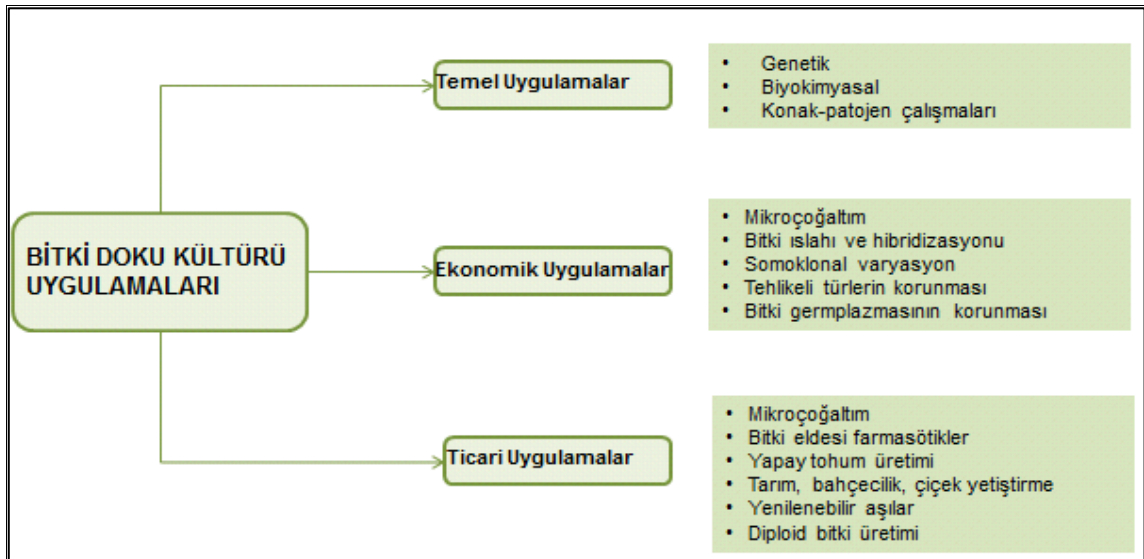
2.1.8 Biyotransformasyon

Biyotransformasyon, bitki hücrelerinde veya organ dokularında yüksek değerli kimyasal ürünler üretmek için kullanılabilecek bir başka stratejidir. Biyotransformasyon; bitki hücreleri, organ dokuları veya enzimler tarafından katalizlenerek tedarik edilen maddelerin kimyasal dönüşümünü içerir. Bu strateji ucuz, kullanılabilir ve bol ürünleri; nadir, pahalı ve yüksek değerli doğal ürünlere dönüştürme avantajına sahiptir. Yöntem; hidroliz, metilasyonlar, asetilasyon, izomerizasyonlar ve esterifikasyonlar dahil olmak üzere enzim reaksiyonlarından yararlanmaya dayanır [18].

2.2 Bitki Doku Kültürünün Uygulama Alanları

Bitki doku kültürü tekniklerinin uygulanmasıyla birlikte bitki biyoteknolojisi alanında gelişmeler sağlanmıştır. Optimum kültür şartlarına cevap verebilen bitkiler, çeşitli dokulardan hücre çoğalmasını ve gelişmesini sağlayabilmektedir. *In vitro* bitki hücre ve doku kültürü deneyleri, temel ve uygulamalı araştırmalarda büyük uygulamalar sağlamaktadır. Bu uygulamalar çeşitli alanlarda kullanılabilir. Bitki doku kültürü daha önce hücre bölünmesi, bitki büyümesi ve biyokimya incelemek için temel araştırmalarda kullanılmıştır. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte daha geniş ölçekte kullanılan teknikler son yıllarda doku kültürü çalışmalarını birkaç alanda çeşitlendirmiştir.

Genetik mühendisliğindeki ilerleme, doku kültürü biliminden daha fazla uygulama üretmek için çeşitli genetik araçlar sağlar. Bu araçlar *in vitro* koşullar altındaki gelişimi sırasında bitki hücresinde ve dokusunda moleküler yolları, bitki fizyolojisini veya somaklonal varyasyonu anlamak için kullanılabilir. Bu araştırmalar doku morfolojisini, biyokimyasal ve somatik hücre genetiğini incelemek için *in vitro* teknolojinin temel uygulamalarını oluşturur [15].



Şekil 2.3 Bitki Doku Kültürü Uygulamaları

2.3 Sekonder Metabolitlerin Üretimi

Tıbbi bitkiler, dünya nüfusunun çoğunluğu için hayat kurtarıcı ilaç kaynağıdır. Bitki hücrelerinin ticari olarak ilgilenilen doğal veya rekombinant bileşiklerin üretilmesi için kullanılması son on yılda ilgi kazanmıştır. Nükleik asitler, amino asitler, karbonhidrat,

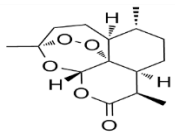
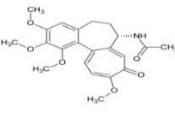
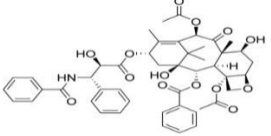
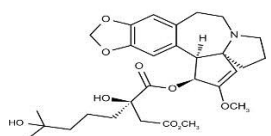
yağ, vb. gibi birincil metabolitlerden ayırt edilen sekonder metabolitler son derece çeşitlidir. Bunların binlerce tanesi çeşitli sınıflarda tanımlanmıştır. Her bitki ailesi, cinsi ve türü bu kimyasalların karakteristik bir karışımını üretir ve bazen bitkilerin sınıflandırılmasında taksonomik karakterler olarak kullanılabilir. Pek çok bilimsel kaynak rollerinin normal büyüme, gelişme ve üremedeki canlı hücreler için çok önemli olmadığını, fakat bir bitkinin ekolojik çevrede olabilecek olası zararlardan ve diğer topluluklardan korumak için savunma amacıyla hareket ettiklerini belirtir. Bu nedenle, bunlar genellikle belirli ihtiyaçlar için bitkilerde sentezlenirken, birincil metabolitler genellikle tüm türler arasında ortak biyolojik amaçlara sahiptir [19]. Yararlı bir biyoaktif bileşiğin tanımlanması ve izole edilmesi için sürekli üretim yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. İkincil metabolitler tipik olarak genellikle birden fazla kiral merkez ve değişken bağları kapsayan çeşitli ve karmaşık kimyasal yapısı ile karakterize edilir ve bu kimyasal sentezini zorlaştırır. Bu nedenle biyolojik aktif bileşenler yaygın olarak doğal kaynaklarından elde edilmektedir [20]. Bununla birlikte, kaynak bitkilerin çoğu yabani bitkiler oldukları için doğal ortamlarından hasat edilmesi, bu bitkilerin neslini tüketmenin yanı sıra bileşiklerin üretiminde bir darboğaz yaratma riski de sunmaktadır. Bunun dışında pek çok kaynak bitkinin yavaş büyüme oranları, ilgilenilen aktif bileşiklerin düşük konsantrasyonları ve sıklıkla biyosentezi indüklemek için biyotik veya abiyotik strese duyulan ihtiyaç gibi sorunlar bulunmaktadır. Tüm bu faktörler, ikincil metabolitlerin kaynak türlerinden çıkarılmasını oldukça yetersiz kılmakta ve ikincil metabolit üretimi için yeni yaklaşımlara olan ihtiyacı vurgulamaktadır [18].

2.4 Sekonder Metabolitlerin Tıpta Uygulama Alanları

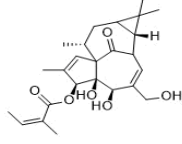
Doğal ürünler ve kombinatorial sentez ile üretilen moleküller arasındaki yapısal farklılıkların ayrıntılı analizi, kombinatorial sentezi daha verimli kılan özelliklerin ortaya çıkmasından kaynaklanmaktadır. Örneğin; kiral ayrılması, zor ve pahalıdır. Bu nedenle düşük sayıda kiral merkeze sahip moleküller oluşturmak elverişlidir. Çok daha az sayıda kiral merkezin yanı sıra sentetik bileşikler; daha düşük moleküler ağırlığa, daha fazla serbest dönebilen bağa, yüksek zincir uzunluğuna, daha az sayıda halkaya ve oksijene ama daha fazla azot, kükürt ve halojen atomuna sahip olma eğilimindedir. Diğer farklılıklar ise halka sistemlerinin karmaşıklığı ve doygunluk derecesidir. Bu yapısal farklılıklar; özellikle önemli ölçüde düşük kiral merkez sayısı, düşük boyut ve daha yüksek esneklik, sentetik bileşiklerin daha zayıf ve daha az spesifik aktivitesi ile sonuçlanır. Aksine doğal ürünler biyolojik işlevleriyle ilgili spesifik proteinler için

bağlanma afiniteleri ve biyosentez sırasında geliştirilen üstün kimyasal çeşitlilik ve karmaşıklığa sahip olmalarından dolayı daha etkili biyolojik etkilere sahiptir. Tablo 2.2’de anlaşılabacağı gibi bitki kaynaklı bu doğal ürünler, çeşitli moleküler hedefleri modüle eder ve çeşitli hastalık koşullarının tedavisi için kullanılır [21].

Tablo 2.4 Teröpatik kullanım için onaylanmış bitki kaynaklı doğal ürünlerden bazıları [12]

Genel İsim ve Kimyasal Yapısı	Bitki Türü	Ticari İsim	Endikasyon (Etki Mekanizması)
Artemisinin 	Artemisia annua L. [22]	Artemisin (1987)	Sıtma tedavisi (radikal oluşum)
Kolşisin 	Colchicum spp. [23]	Colcrys (2009)	Gut (tübülün bağlama)
Paclitaxel 	Taxus brevifolia [24]	Taxol (1993), Abraxane (2005), Nanoxel (2007)	Kanser kemoterapisi (mitotik inhibitör)
Omacetaxine mepesuccinate 	Cephalotaxus harringtonia [25]	Synribo (2012)	Onkoloji (protein transasyon inhibitörü)

Tablo 2.5 Teröpatik kullanım için onaylanmış bitki kaynaklı doğal ürünlerden bazıları
[12] (devamı)

Ingenol mebutate 	Euphorbia peplus L. [26]	Picato (2012)	Aktinik keratoz (hücre ölümünün indükleyicisi)
---	-------------------------------------	----------------------	---

Nanoteknoloji; boyutları 100 nm'den az olan malzemelerin (moleküller veya cihazlar) tasarımını, üretimini, karakterizasyonunu ve uygulamalarını içerir. Nanometrik ölçekteki materyallerin; biyoteknoloji, biyomühendislik, nanoteknoloji ve nanomedikal gibi birçok alanda kullanılabilecek yeni özellikler kazandığı gösterilmiştir. Bu tür malzemelere genellikle nanomalzemeler denir ve nanotüpler, nanoteller, nanoshells, nanopartiküller, kuantum noktaları, dendrimerler ve biyopolimerler olarak sınıflandırılabilirler. Bunlar arasında nanopartiküller nanomedikalde önemli bir rol oynamaktadır. Nanopartiküllerle ilgili olarak nanoteknolojideki hızlı gelişmeler, çapı birkaç nanometre düzeyinde ve hatta daha az olan farklı tip metalik veya manyetik parçacıkların sentezlenmesini mümkün kılmıştır. Ek olarak yüzeyleri biyoaktif moleküller veya adsorbe edilebilecek, kaplanabilecek, konjuge edilebilecek veya bunlara bağlanabilen görüntüleme problemleri ile modifiye edilebilir. Bu tür modifiye edilmiş sistemlerin geniş uygulanabilirliği nedeniyle hücre etiketlemesi ve hedeflemesi, doku mühendisliği, ilaç dağıtımı, ilaç hedeflemesi ve manyetik ilaç hedeflemesi, manyetik rezonans görüntüleme, hipertermi, manyetofeksiyon ve biyomoleküllerin analizi gibi alanlarda uygulanmaktadır [27].

3.1 Nanopartiküller

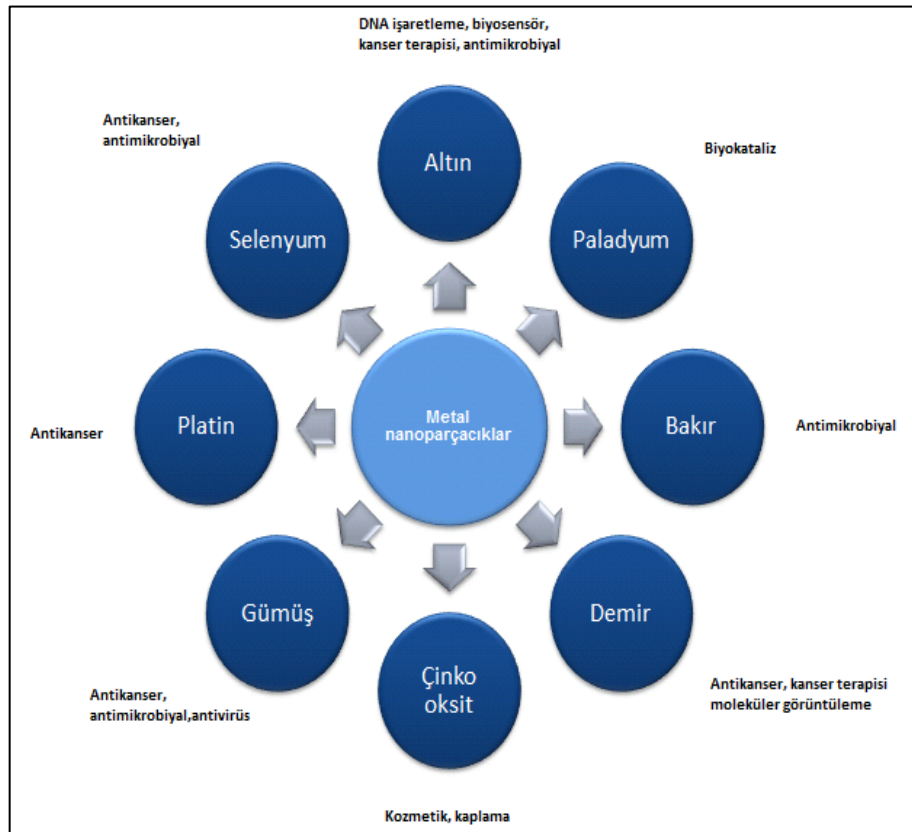
Nanopartiküller (NP'ler), en az 100 nm'den küçük bir boyutu olan partiküllü maddeleri içeren geniş bir malzeme sınıfıdır. Bakır, çinko, titanyum, magnezyum, altın ve gümüş kullanılarak farklı metalik nanomalzemeler üretilmektedir. Nanopartiküller, tıbbi işlemlerden tutun enerji depolamak için güneş ve oksit yakıt pilleri gibi çeşitli sanayi üretim dallarında, kozmetik veya kıyafet gibi günlük kullanımdaki çeşitli malzemelere geniş bir şekilde dahil edilmesine kadar çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır [28].

Farklı parametrelere; kökenlerine (doğal veya antropojenik), kimyasal bileşime (organik ve inorganik), oluşumlarına (biyojenik, jeojenik, antropojenik ve atmosferik), boyutlarına, şekillerine ve özelliklerine, araştırmada ve endüstrideki uygulamalarına göre çok çeşitli NP'ler sınıflandırılmıştır. Kimyasal bileşimlerine göre; karbon temelli

nanoyapılar, metal oksit nanoparçacıklar, Quantum dots (QDs), elemental metalik nanopartiküller ve organik polimerler olarak sınıflandırılmıştır

3.1.1 Metalik Nanopartiküller

Altın, gümüş, platin ve paladyum gibi metallerin nanopartikülleri; şampuan, sabun, deterjan, ayakkabı, kozmetik ürünleri ve diş macunu gibi hızlı tüketilen tüketim mallarının yanı sıra, tıbbi ve farmasötik uygulamalarda da yaygın olarak uygulanmaktadır. Altın nanopartiküller; tıpta, hastalık teşhislerinde ve taşıyıcı ilaç sistemlerinde yaygın olarak kullanılırken, gümüş nanopartiküller; sensör teknolojisi ve diğer birçok biyomedikal uygulamalarda kullanılmıştır. Platin nanopartiküller ise katalizör olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır ve birçok biyomedikal uygulamada alaşım, çekirdek kabuk ve bimetalik nanoyapılarda diğer nanopartiküllerle birlikte kullanılır. Benzer şekilde paladyum nanopartikülleri; kataliz ve elektrokataliz, algılama ve plazmonik dalga yönlendirmede geniş bir uygulama alanına sahiptir [29].



Şekil 3.1 Biyoteknolojide metalik nanopartiküllerin çeşitleri ve uygulamaları [30]

3.1.1.1 Gümüş Nanopartiküller ve Uygulama Alanları

Maksimum 1-100 nm boyutunda ve benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahip parçacıklar genellikle nanopartikül olarak adlandırılır. Gümüş nanopartiküller (AgNP'ler)

terapötik amaç, biyomoleküler tespit, ilaç geliştirme, gıda üretimi, antibakteriyel maddeler ve tarımsal amaçları içeren biyolojik uygulamalar için en verimli nanopartikül örneklerinden biridir [31]. Gümüşün tıbbi özellikleri 2000 yıldan uzun süredir bilinmektedir. 19. yüzyıldan beri gümüş bazlı bileşikler birçok antimikrobiyal uygulamada kullanılmıştır. Gümüş iyonlarının ve gümüş bazlı bileşiklerin 16 ana bakteri türü olan mikroorganizmalar için oldukça toksik olduğu bilinmektedir. Gümüş genellikle antimikrobiyal etkiyi indüklemek için nitrat formunda kullanılır ancak gümüş nanopartiküllere maruz kalınan mikrop için yüzey alanında büyük bir artış olur. Gümüş nanopartiküller birçok antibakteriyel uygulamada kullanım bulsa da, bu metalin mikroplar üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir. Gümüş nanopartiküllerin hücre lizisine neden olabileceği veya hücre transdüksiyonunu inhibe edebileceği varsayılmıştır [32]. Son kanıtlar gümüş nanopartiküllerin güçlü bir antienflamatuar etkiye sahip olduğunu ve yara iyileşmesini hızlandırdığını göstermektedir. Gümüş halen klinik olarak kullanılmaktadır ve AgNP kullanımı terapötik alanda değerli bir araç olarak ortaya çıkmaktadır. Gümüş sülfadiazin, yanık hastalarının topikal tedavisinde altın standarttır. Gümüşün kullanımı, gümüş iyonlarının insanlara toksisitesi ile ciddi şekilde sınırlandırılmıştır. Bununla birlikte nanoteknoloji; yüzey alanı-hacim oranlarının artması, bakterilere karşı daha fazla etkinliği ve en önemlisi insanlara daha düşük toksisitesi ile daha küçük gümüş parçacıklarının üretimini kolaylaştırmıştır [33].

AgNP'ler, mükemmel antibakteriyel yetenekleri ve üstün fiziksel özellikleri ile iyi bilinmekte ve ev dezenfektanları, tıbbi cihazlardan su arıtma ürünlerine kadar artan sayıda uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır. AgNP'ler, hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakteriler dahil olmak üzere geniş spektrumlu bakterilere karşı etkili bir biyosit olmuştur. AgNP'ler dışçılık malzemeleri, yanma tedavileri, paslanmaz çelik malzemelerin kaplanması ve güneş koruyucu losyonlar için ilaç ve eczacılıkta kullanılabilir. AgNP'ler; kaplamalara, nanofiberlere, ilk yardım bandajlarına, plastik sabunlara ve tekstillere kendi kendini temizleyen kumaşlara iletken dolgu maddesi olarak dahil edildiklerinde antibakteriyel, antiviral ve antifungal bir ajan olarak işlev görür. Nanopartiküller, biyosensörler için mükemmel etiketlerdir; çünkü optik absorpsiyon floresansı ve elektrik iletkenliği gibi sayısız teknikle tespit edilebilirler. Yüzey plazmon rezonans etkisi kullanılarak AgNP'ler çok yüksek bir hassasiyet kazanır ve ölçümler gerçek zamanlı olarak gerçekleştirilebilir. Nano ölçekte metallerin benzersiz fizikokimyasal özellikleri, bakım noktası teşhisi için nanobiyosensörler, in vivo

algılama/görüntüleme, hücre izleme ve hastalık patogenezi veya tedavi izlemesini izleme amaçlı nanoprobolar gibi çok çeşitli biyosensörlerin gelişmesine neden olmuştur. Nanopartiküller, yüksek bir yüzey enerjisinin yanı sıra yüksek bir yüzey alanı hacim oranına sahip olduğu için nanopartiküllerin kullanımıyla, tekstil fonksiyonlarının dayanıklılığında bir artışa yol açarak işlem görmüş kumaşlar için yüksek dayanıklılık sağlayabilir. AgNP'ler kendi kendini temizleyen veya antiodour giysiler, mobilya tekstilleri, mutfak bezleri, havlular, antibakteriyel yara pansumanları, hasta elbiseleri, yatak örtüleri veya yeniden kullanılabilir cerrahi eldivenler ve maskeler, koruyucu yüz maskeleri, biyolojik tehlikelere karşı giysiler, kozmetik ürünler, ultrahidrofobik kumaşlar üretmek için kullanılmıştır [34].

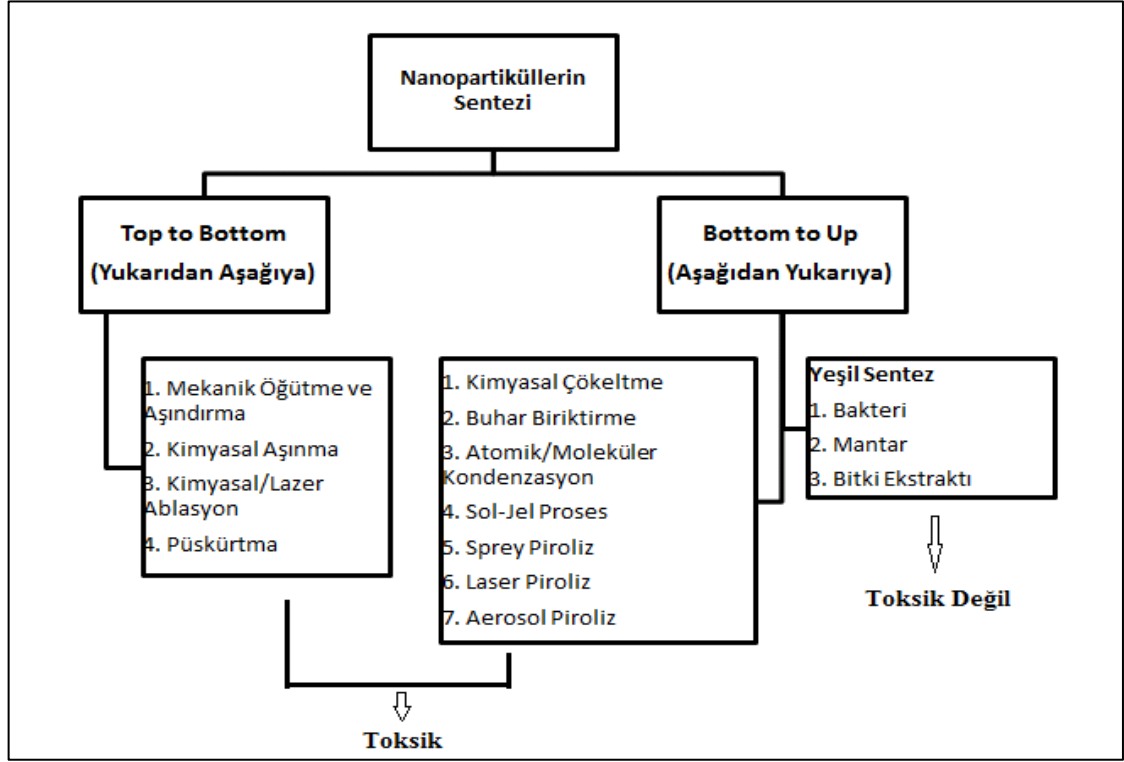
Tablo 6.1 Gümüş nanopartiküllerin uygulama alanları

Uygulandığı alan	Etkisi
Tekstil	Giyim üreticileri çoraplar için kumaşlara dahil edip koku oluşturunca bakterilerin nötralizasyonu için antibakteriyel faaliyetten yararlanmıştır [35].
Gıda	Buzdolabı yüzeyleri, saklama torbaları, gıda kaplarına entegre edip mikroorganizma üremesini engelleyerek raf ömrünü uzatmak istemiş [36]
Medikal	Diş malzemeleri, yara örtüleri, bandaj, endodonti dolgu malzemeleri, kardiyovasküler implant, kateter, kemik dolgusu, tanı teşhis, biyosensör, taşıyıcı ilaçlar [37]
Çevresel	Su arıtma sistemleri [38]

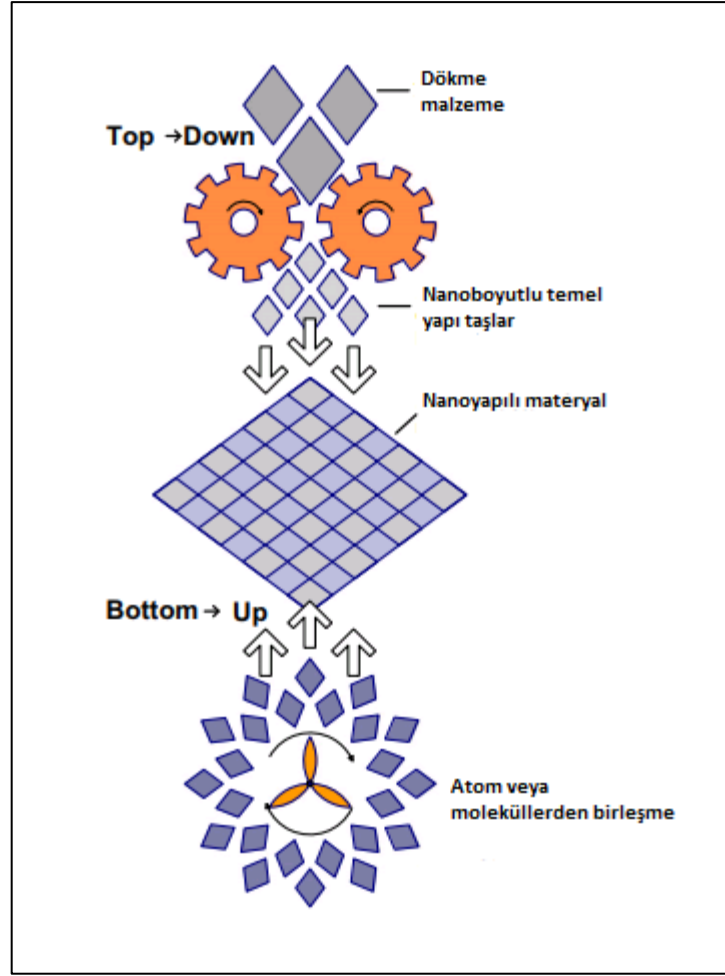
3.2 Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

Genel olarak nanopartiküller çeşitli biyolojik risklerden sorumlu toksik ve tehlikeli kimyasalların kullanılmasını içeren, çevre için oldukça pahalı ve potansiyel olarak tehlikeli olan çeşitli kimyasal ve fiziksel yöntemlerle hazırlanır. Nanopartiküllerin sentezi için biyolojik olarak esinlenen deneysel süreçlerin gelişimi, nanoteknolojinin önemli bir koluna dönüşmektedir. Genel olarak gümüş nanopartiküllerin sentezinde yer alan yukarıdan aşağıya (top to bottom) veya aşağıdan yukarıya (bottom to top) olmak üzere

iki yaklaşım vardır. Aşağıdan yukarıya doğru yaklaşımda nanopartiküller Şekil 3.2' de gösterildiği gibi kimyasal ve biyolojik yöntemler kullanılarak atomların yeni çekirdeklere birleşip nanoboyuttaki partikülleri oluşturmasıyla sentezlenirken; yukarıdan aşağıya yaklaşımında ise yığinsal malzemeye püskürtme, öğütme gibi mekaniksel veya kimyasal işlemlerle malzemenin nano boyuta kadar inebilecek küçük parçalara ayrılması esas alınmaktadır [39].



Şekil 3.2 Gümüş nanopartiküllerin farklı sentez yaklaşımları [39]



Şekil 3.3 Nanoteknolojide yukarıdan aşağıya ve aşağıdan yukarıya yaklaşımlarının gösterimi [40]

3.2.1 Bottom to top (Kimyasal yaklaşımlar)

Altan üste yaklaşımı katalizörlerin (indirgeyici ajan ve enzimlerin); katalizör karakteri, reaksiyon ortamı ve koşullar (stabilizatörler, sıcaklık ve çözücüler) tarafından izlenen nanoyapılar ürettiği homojen bir sistem içeren NP'lerin sentezi için daha kabul edilebilir yöntemlerdir [41]. Altan üste yaklaşımda kimyasal indirgeme bu yöntemin genel temasıdır. Gümüş iyonlarının indirgenmesi için sodyum borohidrit (NaBH_4), sodyum sitrat, askorbat, element hidrojen, tollen reaktifi gibi farklı organik ve inorganik indirgeme ajanları kullanılır. Bu yöntemin en büyük avantajlarından biri, kısa sürede çok miktarda nanopartikül sentezlenmesidir. Bu tip sentezlerde kullanılan kimyasallar toksiktir ve çevre dostu olmayan yan ürünlere yol açar [39].

3.2.2 Top to bottom (Fiziksel yaklaşımlar)

Yukarıdan aşağıya yaklaşımda, NP'ler normal olarak atmosferik basınçta bir tüp fırını kullanılarak yoğunlaştırma/buharlaştırma yoluyla üretilir. Bu yöntemdeki en büyük

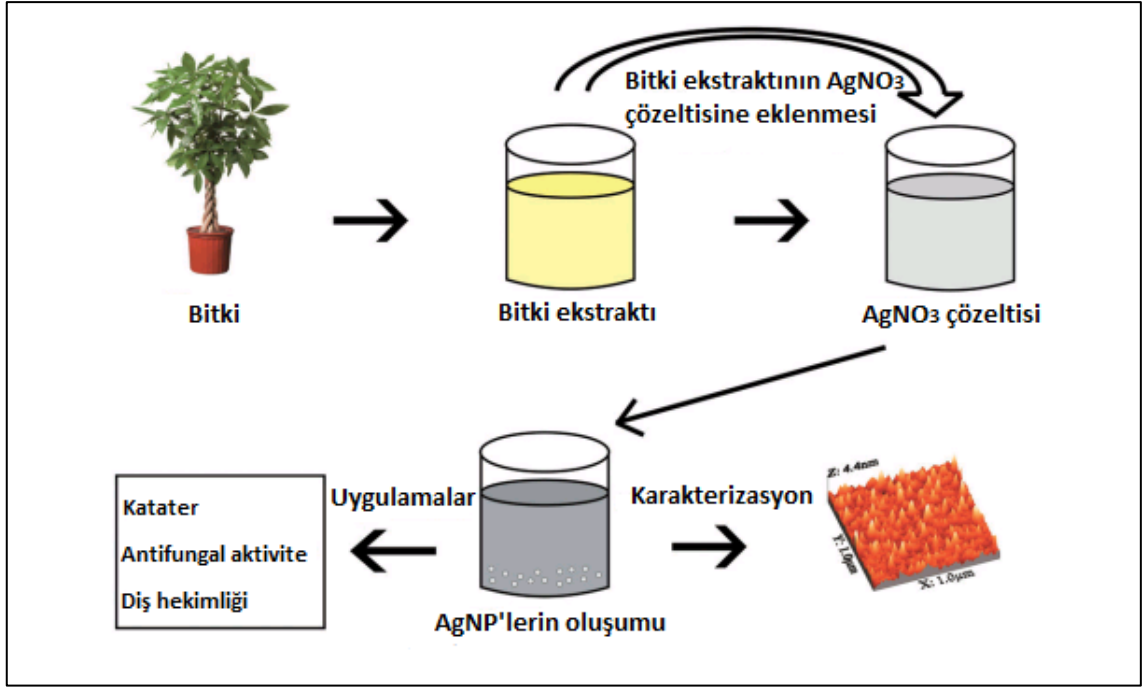
sınırlamalardan biri, ürünün yüzey yapısındaki kusurlardır ve nanopartiküllerin diğer fiziksel özellikleri yüzey kimyasına oranla yüzey yapısına büyük ölçüde bağlıdır [39].

3.2.3 Biyosentez (Yeşil Sentez)

Yeşil nano-biyoteknoloji, çeşitli biyoteknolojik araçların yardımıyla mikroorganizmaları, bitkileri, virüsleri veya onların lipid, protein gibi ürünlerini içeren biyolojik yollar kullanarak nanopartikülleri veya nanomalzemeleri sentezlemek anlamına gelir. Bu yöntemle sentezlenen nanopartiküller, tek adımlı bir prosedür kullanılarak sentezlendiklerinden daha fazla stabilite ve uygun boyutlarda farklı doğalara sahiptir. Kimyasal ve fiziksel yöntemlerde çevreye ve insan sağlığına zarar veren yüksek radyasyon, yüksek konsantrasyonlu indirgeyiciler ve stabilizatörler kullanılmaktadır. Bu nedenle nanopartiküllerin biyolojik sentezi tek adımlı bir biyo-indirgeme yöntemi olup çevre dostu sentez olan bu yöntemde daha az enerji kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin biyolojik bazlı sentezi, stabilize edici ve indirgeyici ajanların yardımıyla gerçekleşen aşağıdan yukarıya yaklaşımdan (bottom to up) yararlanır. Biyolojik bir sistem kullanarak nanopartiküllerin sentezi için üç ana adım izlenir; çözücü ortamının seçimi, çevre dostu ve çevre açısından iyi huylu bir indirgeyici madde seçimi ve sentezlenen partikülün stabilizasyonunu sağlayacak toksik olmayan bir kaplama ajanı malzemesinin seçimidir [42]. Yeşil sentezlerin kimyasal ve fiziksel yöntemlere göre ilerlemesinin sebebi çevre dostu, uygun maliyetli ve büyük ölçekli nanopartikül sentezi için kolayca ölçeklendirilebilmesidir. Ayrıca yüksek sıcaklık, basınç, enerji ve toksik kimyasallar kullanmaya gerek yoktur [43].

3.3 Bitki Özütləri Kullanılarak Yeşil Sentez Nanoparçacıkların Üretimi

Bitki biyoçeşitliliği, nanopartiküllerin sentezi için en ilginç biyokimyasallara ve verime sahip spesifik kaynaktır. Çok zengin genetik değişkenliği olan bitkiler; koenzim, vitamin bazlı ara ürünler ve tek bir adımda metal iyonlarını nanopartiküllere indirgeyebilecek pek çok ilginç biyomoleküle sahiptir. Dahası bu yöntemler herhangi zor ve hızlı teknik gereksinimi olmadan oda sıcaklığında ve basınçta kolayca uygulanabilir. Bitki metabolitleri; fenolik bileşikleri, alkaloidleri ve sterolleri içeren mükemmel indirgeyici ajanlar olarak işlev görür.

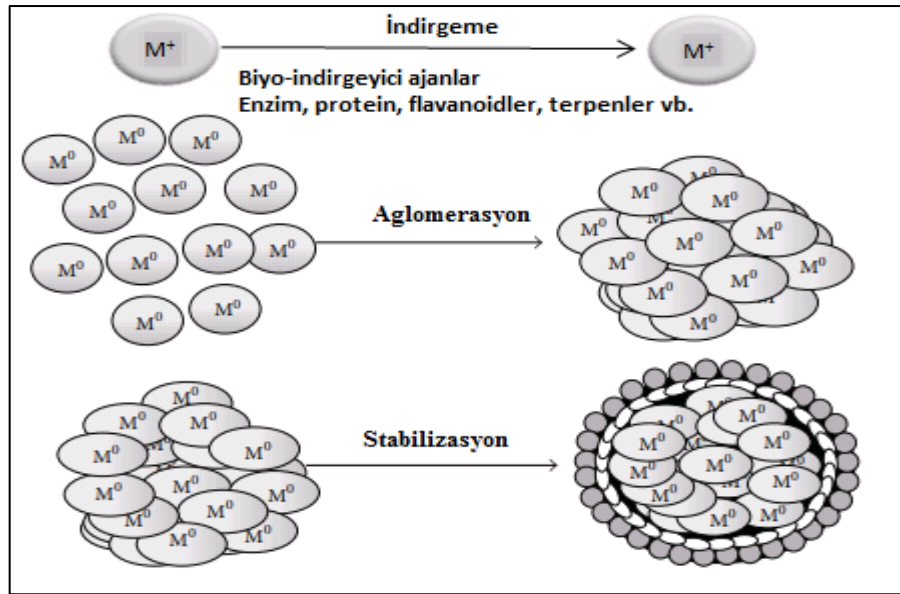


Şekil 3.4 Bitki ekstraktı kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin proses şeması [44]

Bitki aracılı nanoparçacık sentezinin daha popüler ve güvenilir uygulama potansiyelleri elde etmesinin önemli bir avantajı, bitki modifiyeli malzemelerin mikroorganizmalara kıyasla kültürlenmesinin daha kolay ve ucuz olmasıdır. Bitki özütlerinin nanopartikül sentezinde indirgeyici ajanlar ve dengeleyici ajanlar olarak hareket ettiğine inanılmaktadır. Bitki ekstraktının doğası ve kaynağı, son derece kritik bir şekilde sentezlenen nanopartiküllerin türünü ve morfolojisini etkileyen en önemli faktördür. Bunun nedeni farklı bitki özlerinin farklı konsantrasyonlarda biyokimyasal indirgeme ajanları içermesidir. Bitki özlerinden nanopartiküllerin üretiminde, bitki özü basitçe oda sıcaklığında bir metal tuzu çözeltisi ile karıştırılır. Reaksiyon birkaç dakika içinde tamamlanır ve biyokimyasal indirgemenin bir sonucu olarak metaller mono veya iki değerli oksidasyon durumlarından sıfır değerli durumlara dönüşür. Kültür ortamı kabında renk değişimi ile gözlenen bu işaretler, fiziksel olarak belirtilmiş nanopartiküllerin oluşumudur [45]. Biyojenik sentez olarak da adlandırılan yeşil sentez, AgNP'lerin sentezlenmesi için alternatif bir yaklaşım olarak kabul edilir ve fitoteknoloji olarak adlandırılan bitki kaynaklarının kullanımıyla, metal nanopartiküllerin yeşil sentezi ile ilgilenen ayrıca optimizasyon ve uygulamalarını içeren yeni bir alana yol açmıştır [46].

Nanopartiküllerin biyolojik sentezi; maliyetli ve toksik olan fiziksel ve kimyasal metodların yerini alan, daha ucuz ve toksik olmayan yöntemlerdir. Nanopartiküllerin sentezi için bitki özlerinin kullanımı mikroorganizmaların sahip olduğu biyolojik

tehlikeleri ölçeklendirme ve hücre kültürünün korunmasına yönelik ayrıntılı işlemlerden dolayı daha avantajlıdır. Biyolojik sentez yöntemleri daha yavaş kinetikleri olması, kristal büyümesi ve stabilizasyonu üzerinde kontrol konusunda daha iyi manipülasyon sunduklarından dolayı daha iyi metod olduklarını kanıtlamıştır. Bu yöntem çok çeşitli nanoteknolojik uygulamalar için boyut ve şeklin daha iyi kontrol edilmesini sağlayan sentez araştırmalarında bir artış sağlamıştır. Çevresel olarak iyi huylu malzemelerin yani bitki özünün, mikroorganizmaların ve enzimlerin AgNP'lerin sentezi için kullanımı çevreye duyarlılık, biyouyumluluk, toksik olmayan ve uygun maliyetli yöntem gibi pek çok fayda sağlamaktadır [34]. Bitki özleri kullanılarak nanopartiküllerin üretilmesinde özüt oda sıcaklığında bir metal tuzu çözeltisi ile karıştırılır. Reaksiyon dakikalar içinde tamamlanır. Bitki ekstraktının doğası, konsantrasyonu, metal tuzunun konsantrasyonu, pH, sıcaklık ve temas süresi gibi parametrelerin, nanopartiküllerin üretim hızını, miktarını ve diğer özelliklerini etkilediği bilinmektedir [47]. Sentez süreci Şekil 3.5'te gösterildiği gibi bitki özlerinin gümüş tuzları ile (çoğunlukla gümüş nitrat kullanılır) inkübasyonundan sonra başlar. Asıl AgNP'lerin sentezi, önce Ag^+ 'nın Ag^0 'ye iyonlarına indirgenmesini içeren ve daha sonra kolloidal AgNP'lerin oligomerik kümelerinin oluşumuna yol açan aglomerasyon ve stabilizasyonunu takip eden iki aşamalı bir işlemdir [48].



Şekil 3.5 Nanopartikül sentezinin mekanizması (M^+ -metal iyonu) [30]

3.4 Mikroorganizmalar Kullanılarak Nanopartiküllerin Sentezi

Birçok çalışma hem tek hücreli hem de çok hücreli mikroorganizmaların inorganik materyalleri sentezleme kabiliyetine sahip olduğunu göstermiştir. Biyolojik sentezle nanopartikül oluşumu, metalik iyonların mikroorganizma tarafından salgılanan enzimler, şekerler ve proteinler gibi biyomoleküller yoluyla indirgenmesi/yükseltgenmesi nedeniyle olduğu aşağıdan yukarıya bir yaklaşım olarak kabul edilebilir. Bununla birlikte, mikroorganizmalarda meydana gelen nanopartikül sentezi mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Bunun nedeni her mikroorganizma türünün belirli metalik iyonlarla farklı etkileşime girme eğiliminde olmasıdır. Belirli bir mikroorganizmanın etkileşimi ve biyokimyasal işleme faaliyetleri, pH ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerin etkisi nihayetinde belirli bir büyüklük ve morfolojiye sahip nanopartiküllerin oluşumunu belirler [49]. Bu nedenle metalik nanoparçacıkların sentezi için yüksek verimli, düşük maliyetli, toksik olmayan ve çevresel açıdan iyi huylu prosedürler geliştirme ihtiyacı artmaktadır. Hem tek hücreli hem de çok hücreli organizmaların hücre içi veya hücre dışı inorganik maddeler ürettiği bilinmektedir. Bu sebepten dolayı bitkiler ve bitkisel ürünler, algler, mantarlar, mayalar, bakteriler ve virüsler dahil olmak üzere doğada mevcut olan çok çeşitli biyolojik kaynaklar nanopartiküllerin sentezi için kullanılabilir [50].

3.4.1 Algler

Algler, suda yaşayan mikroorganizmalardır ve son araştırmalar bazılarının sadece ağır metaller biriktirmedeğini, aynı zamanda biyolojik olarak sentezlenen metalik nanopartiküller için de kullanılabileceğini göstermiştir [49]. Örneğin; kurutulmuş tek hücreli alg olan *Chlorella vulgaris*, daha sonra Au nanopartikülleri oluşturmak üzere indirgenmiş algal bağlı altın oluşturmak üzere tetra-kloroaurat iyonlarını sentezlemek için kullanılmış olup farklı şekillere sahip nanopartiküllerin hücre yüzeyleri yakınında biriktiği tespit edilmiştir [51]. *C. vulgaris*'in ekstraktı kullanılarak yapılan benzer bir çalışmada, oda sıcaklığında nanometre ölçekli gümüş plakalar ürettiği bulunmuştur. Çalışma, ekstrakt içerisindeki proteinlerin; indirgeyici madde, şekil kontrol değiştirici ve dengeleyici madde olarak görev yaptığını göstermiştir [52].

3.4.2 Bakteriler

Doğada bakteriler sıklıkla çeşitli ve bazen aşırı çevresel durumlara maruz kalır. Bu zor koşullarda hayatta kalmak çevresel streslerin etkilerine karşı koyma yeteneklerine bağlıdır. Bakterilerin doğal savunma mekanizmaları, bakterilerde ortamdaki yüksek metalik iyon konsantrasyonlarından kaynaklanan toksisite gibi çeşitli streslerle başa

çıkmaq için bulunur [49]. Doğal ortamı içerisinde prokaryotik bakteriler, metalik nanopartiküllerin sentezi için en kapsamlı şekilde araştırılmıştır. Nanopartikül sentezi için bakteri tercihinin sebeplerinden biri de göreceli manipölasyon kolaylığıdır [50]. Metalik nanoparçacıkların sentezi için kullanılan başlıca bakteri türleri arasında *Actinobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Lactobacillus spp.*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium sp.* ve *Pseudomonas sp.* bulunmaktadır.

Bakterilerin, hücre içi veya hücre dışı mekanizmalarla metalik nanopartikülleri sentezlediği bilinmektedir. Örneğin; Ag nanopartikülleri, bir elektron bağışlayan ve NAD'ye oksitlenen NADH'ye bağlı redüktaz enzimini içeren bir mekanizma vasıtasıyla *Pseudomonas stutzeri* AG259 bakteri kullanılarak sentezlenmiştir. Elektron transferi, Ag iyonlarının biyolojik olarak Ag nanopartiküllere indirgenmesine yol açar [53].

3.4.3 Mantarlar

Toleransları ve metal biyoakümüölasyon yetenekleri nedeniyle mantarlar, metalik nanopartiküllerin biyolojik üretimi üzerine yapılan çalışmaların merkezinde yer almaktadır. Mantarları nanopartikül sentezinde kullanmanın belirgin avantajı ölçek büyütmedeki kolaylığıdır. Mantarların hücre dışı enzimleri salgılamada son derece etkili olduğu göz önüne alındığında, büyük ölçekli enzim üretimini kolayca elde etmek mümkündür. Metalik nanopartiküllerin sentezi için mantar aracılı bir yeşil yaklaşım kullanmanın diğer avantajları arasında ekonomik canlılık ve biyokütle kullanımında kolaylık bulunmasıdır. Bununla birlikte, bu biyo-varlıkların nanopartiküllerin sentezinde kullanılmasının önemli bir sakıncası, ökaryotik organizmalarda spesifik enzimleri (metalik nanopartiküllerin sentezinde tanımlananlar) aşırı salgılamak için uygulanan genetik manipölasyonun prokaryotlardakinden nispeten daha zor olmasıdır [50].

Mantar kullanılarak gerçekleştirilen nanopartiküllerin biyosentezi, küresel olarak birçok araştırma grubu arasında yaygındır. Sentez, hem hücre dışı hem de hücre içi bölgelerde meydana gelir. Örneğin; *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* ve *Penicillium sp.* türleri hem Ag hem de Au nanopartiküller yaratmadaki biyosentetik yetenekleri nedeniyle sıkça rapor edilmiştir. Mantarlar, metalik nanopartiküllerin sentezi için bakteri karşıtlarına kıyasla bazı ilave özelliklere sahiptir. Örneğin; mantarlar biyokütle birimi başına büyük miktarda protein ve enzim salgırlar ve bu da daha fazla miktarda nanopartikül üretimini gerçekleştirir. Çalışmalar bazı mantarların hücre içi yüksek metal alım hacimlerine sahip olduğunu ve sentezlenen partiküllerin boyut olarak daha küçük olma eğiliminde olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, kültür koşulları metalik nanopartiküllerin biyosentezi

sırasında önemli bir etkiye sahip olabilir. Örneğin; sabit koşullar altında *Trichothecium sp.* mantar biyokütlesinin Au iyonlarının etkileşmesiyle hücre dışı altın nanopartikülleri sentezlenmiştir [54].

3.4.4 Virüsler

Nanomalzemelerin sentezinde virüslerin kullanımı, silikon dioksit (SiO_2), kadmiyum sülfid (CdS), demir oksit (Fe_2O_3) ve çinko sülfid (ZnS) gibi inorganik malzemeler sağlayabilen yeni bir tekniktir. CdS ve ZnS gibi yarı iletken malzemeler, elektronik endüstrisi için özellikle ilgi çekicidir ve bunların sentezi için yeşil kimya temelli yöntemler kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Kuantum noktalarını sentezlemek için virüslerin kullanımı son on yılda araştırılmıştır. Virüslerin çekici bir özelliği, metalik iyonlarla etkileşime girebilen oldukça reaktif bir yüzey oluşturan kapsid proteinlerinin yoğun yüzey kaplamasıdır. Örneğin; tütün mozaik virüsü (TMV) gibi tipik bir bitki virüsü, yüzeyini kaplayan 2130 kapsid protein molekülüne sahip olabilir. Protein dizisi, malzemelerin biriktirilmesi için bağlantı noktaları olarak işlev görebilir veya farmasötikler için üç boyutlu kaplar oluşturmak için kullanılabilir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, *Nicotiana benthamiana* (yuvarlak yapraklı yerli tütün) veya *Hordeum vulgare* (arpa) bitki özütleri eklenmeden önce düşük konsantrasyonlarda TMV, Ag veya Au tuzlarına eklenmiştir. Virüsün varlığı, sentezlenen nanopartiküllerin boyutunu azaltmakla kalmayıp aynı zamanda virüs olmayan çözeltilere kıyasla sayılarını çarpıcı şekilde arttırmıştır. Çalışma ayrıca yüksek TMV konsantrasyonlarında daha az serbest nanopartikül oluştuğunu ve TMV'nin nanotelleri oluşturmak için metalleşme yapan bir biyo-şablon olarak hareket ettiğini ortaya koymuştur [55]. Benzer çalışmalar, virüslerin nanoteller ve nanotüpler gibi nanometre ölçekli yapıların üretimi için bir şablon olarak kullanılabileceği potansiyelini de göstermiştir.

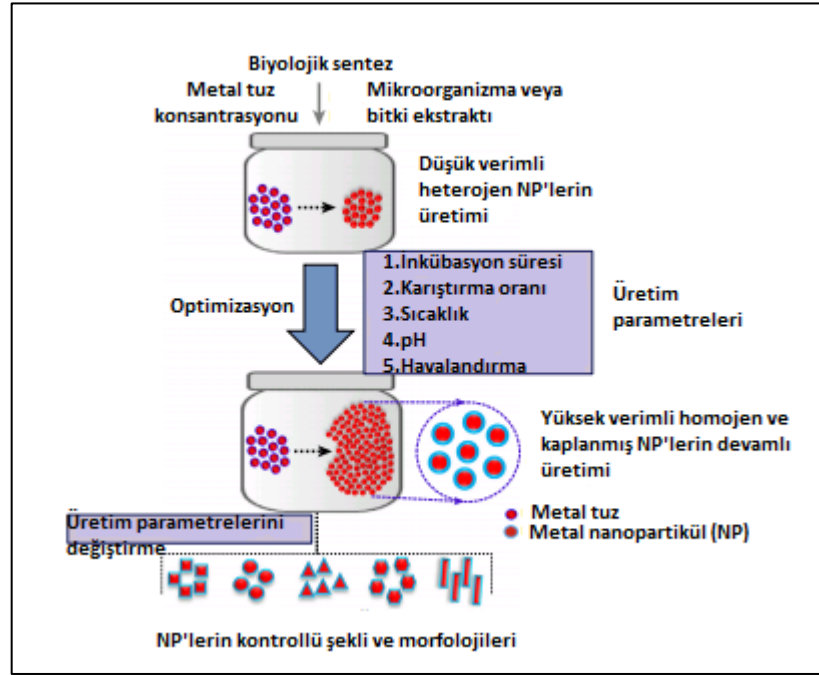
3.4.5 Mayalar

Diğer birçok mikroorganizma gibi mayalar da çevrelerindeki önemli miktarda toksik metalleri emme ve biriktirme kabiliyetine sahiptir. Metal toksisitesine adaptasyon; şelasyon, biyo çökeltme, biyo-emme ve hücre dışı salgılama gibi aktivitelere neden olan çeşitli detoksifikasyon mekanizmaları kullanan maya hücrelerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Partikül büyüklüğü ve özelliklerindeki değişiklik maya organizmaları tarafından sentez sırasında nanopartikülleri oluşturmak ve stabilize etmek için kullanılan farklı mekanizmalardan kaynaklanmaktadır. Yapılan bir çalışmada sentez basamağı sırasında *P. jadinii*'nin hem büyüme hem de hücresel aktivitelerinin kontrol edilmesiyle

nanopartikül büyüklüğü ve şeklinin kolayca düzenlendiği bulunmuştur [56]. Benzer bir çalışmada, hücre dışı ve hücre içi sentez sırasındaki biyokütle ve Au tuz konsantrasyonunun etkisi, deniz mayası *Yarrowia lipolytica* kullanılarak incelenmiştir. Yapılan çalışmalar hem biyokütlenin hem de Au tuzunun, oluşan nanopartiküllerin boyutunu ve morfolojisini etkilediğini ortaya koymuştur [57].

3.5 Nanopartiküllerin Fitofabrikasyonunu Etkileyen Parametreler

Biyosentezde sıkça karşılaşılan ana zorluklar nanopartiküllerin şeklini ve boyutunu kontrol etmenin yanı sıra çözelti fazında monodispersite elde edilmesidir. Metal nanopartiküllerin fitosentezini doğrudan engelleyebilecek veya bazı engellere neden olabilecek birkaç faktör vardır. Bununla birlikte pH, sıcaklık, reaksiyon veya inkübasyon süresi gibi faktörler kontrol edilerek bu zorluklar aşılmaya çalışılmıştır [29].



Şekil 3.6 Monodispersiyonlu, kararlı ve yüksek verimli biyolojik nanopartiküller üretme parametreleri [58]

3.5.1 pH'nin Etkisi

Daha önce yapılan araştırmalar sonucunda, pH'nin nanopartiküllerin biyosentezinde önemli bir rol oynayabileceği açıktır. Yapılan bir çalışmada pH'nin alfalfa biyokütlesi kullanılarak kolloidal altının biyosentezinde önemli bir faktör olduğu tespit edilmiş ve nanopartiküllerin boyutunun pH'daki değişim ile değiştiği sonucuna varılmıştır [59]. Yapılan diğer bir çalışmada ise benzer sonuçlara varılmış ve pH'nin çeşitli şekil ve büyüklükteki nanopartiküllerin oluşumundan sorumlu olduğu bildirilmiştir. Farklı bitki

özleri ve aynı bitkinin farklı kısımlarından gelen özütler bile farklı pH değerlerine sahip olabileceğinden nanopartiküllerin sentezinde verimli olunması için sentetik bir protokolün optimizasyonuna ihtiyaç vardır. Birkaç araştırmacı tarafından, daha yüksek pH'a kıyasla daha düşük pH'da (2–4), daha büyük nanopartiküllerin oluştuğu bildirilmiştir [60]. Bununla ilgili yapılmış bir çalışmada *Avena sativa* tarafından üretilen altın nanoparçacıklarının büyüklüğünün pH değerine oldukça bağlı olduğu bildirilmiştir. pH 2'de az miktarda da olsa büyük boyutlu nanopartiküller (25–85 nm) oluşturulmuş, ancak pH 3 ve 4'te büyük miktarda daka küçük boyutta nanopartiküller oluşturulmuştur [61].

3.5.2 Reaksiyon Sıcaklığının Etkisi

Gümüş nanopartiküllerin veriminin, sıcaklıktaki artışla pozitif bir korelasyon gösterdiği açıktır. Yapılan bir çalışmada altın nanopartiküllerinin yüksek sıcaklıklarda daha yüksek oranda oluştuğu ortaya koyulmuştur. Nanorod ve trombosit şeklindeki altın nanopartiküllerinin yüksek sıcaklıklarda sentezlendiği, küresel şekilli nanopartiküllerin ise düşük sıcaklıklarda oluştuğu gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmayla sıcaklığın, nanopartiküllerin boyutunu ve şeklini etkileyen önemli faktörlerden biri olabileceği gösterilmiştir [62].

3.5.3 Etkileşme ya da İnkübasyon Süresinin Etkisi

Daha önceki çalışmalar, temas ya da inkübasyon süresinin de nanopartiküllerin sentezini etkilediğini ileri sürmüştür. Bu, reaksiyonun tüm adımlarının tamamlanması için gereken zamandır. *Chenopodium* yaprak özü ile yapılan bir çalışmada temas süresindeki artışla UV'nin keskinliğinde de bir artış olduğu, nanopartiküllerin reaksiyondan 15 dakika sonra ortaya çıktığı ve 2 saate kadar arttığı ancak ondan sonra sadece hafif değişiklikler meydana geldiği bildirilmiştir [47]. Ayrı bir çalışmada, meyve bazlı sentezde gümüş ve altın nanopartiküllerin oluşumunun reaksiyonun 10. dakikasında başladığı, ek olarak hem gümüş hem de altın nanopartiküllerde tepe noktalarının keskinleşmesinden temas süresindeki artışın sorumlu olduğu tespit edilmiştir [63].

3.5.4 Reaktan Konsantrasyonu

Bitki özlerinde bulunan biyomoleküllerin konsantrasyonu, metalik nanopartiküllerin oluşumunu önemli ölçüde etkileyebilir. Yapılan çalışmada güneşte kurutulmuş

Cinnamomum camphora yaprağı ekstraktının reaksiyon ortamındaki miktarının değiştirilmesiyle, sentezlenen Au ve Ag nanopartiküllerinin şeklinin önemli ölçüde etkilendiği bulunmuştur [64]. Benzer şekilde, Aloe vera ekstraktı ile yapılan bir çalışmada ekstraktın bileşenlerinin şekil yönlendirme etkisi ile birlikte reaksiyonun yavaş hızının, tek kristalli altın nanoüçgen yapıların oluşumundan sorumlu olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, gümüş iyonlarının Aloe vera ekstraktı tarafından indirgenmesi küresel gümüş nanopartiküllerinin oluşmasına yol açmıştır [65].

3.6 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Kimyasal bileşim, yapı, boyut ve şekil gibi özellikler NP'leri ve bunların çevresel ve sağlık üzerindeki etkilerini karakterize eden özelliklerde önemli bir rol oynar. NP'lerin toksisite mekanizmalarını aydınlatmak, çevresel etkilerini ve davranışlarını desteklemek ve sonuçları NP'ler arasında tahmin edebilmek için farklı çalışmalarda kullanılan materyalleri mümkün olduğunca karakterize etmek esastır.

3.6.1 Mikroskopik Tabanlı Teknikler

Mikroskopik teknikler, numuneyi tarayan fiziksel bir prob kullanarak yüzey görüntüleri oluşturduklarından en çok kullanılan karakterizasyon araçlarıdır. AFM, SEM ve TEM gibi mikroskopi tabanlı teknikler, nanopartiküllerden alınan görüntülerden veri elde etmenin doğrudan yöntemleri olarak kabul edilir. Özellikle hem SEM hem de TEM, nanopartiküllerin boyut ve morfolojik özelliklerini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

3.6.1.1 AFM (Atomik Kuvvet Mikroskobu)

Boyut, morfoloji, yüzey dokusu ve pürüzlülük dahil birçok fiziksel özellik hakkında nitel ve nicel bilgi sağlayan bu teknik, prob ucunun geometrisi NP'lerin kendisinden büyük olduğu zaman NP'lerin boyutlarını daha fazla büyötmektedir [66].

3.6.1.2 Tarama ve İletim Elektron Mikroskopisi (SEM ve TEM)

Numunenin yüzeyi, kristal yapısı, temel bileşimi, büyüklüğü, şekli ve elektriksel iletkenlik gibi diğer özellikleri hakkında bilgi sağlar. Bununla birlikte, bu görüntüleme tekniklerinin çoğu ölçümden önce numunenin işleminden geçirilmesi (kaplama, kurutma, boyama, dondurma ve gömme) nedeniyle ölçümden önce ve ayrıca numune odasındaki vakum koşulları nedeniyle görüntülemeye eser yapıların görüntülenmesine neden olabilir [66].

3.6.2 Spektroskopi Tabanlı Teknikler

UV-vis, DLS, XRD, EDS, FT-IR ve Raman gibi spektroskopi tabanlı tekniklerin; kompozisyon, yapı, kristal faz ve nanopartiküllerin özellikleri ile ilgili verilerin belirlenmesinde dolaylı yöntemler olduğu kabul edilir.

3.6.2.1 UV-Vis

UV görünür spektroskopisi 190-380 nm arasındaki UV aralığını ve 380-800 nm arasındaki görünür aralığını kapsar. Her iki radyasyon türü madde ile etkileşime girer ve temel durumdan yüksek enerji durumlarına elektronik geçişleri teşvik eder. 300-800 nm arasındaki dalga boyları genellikle 2-100 nm arasında değişen metalik nanopartikülleri karakterize etmek için kullanılır. Örneğin; gümüş (Ag) nanopartiküller için absorpsiyon ölçümleri genellikle 400-450 nm arasındadır. Altın (Au) nanopartiküller ise genellikle 500-550 nm arasındaki tepe noktalarının varlığı ile tespit edilir [49].

AgNP'lerin süspansiyonu, elektromanyetik dalgalara yanıt olarak iletken bant elektronlarının kolektif salınımlarından kaynaklanan yüzey plazmon rezonansı (SPR) nedeniyle yoğun bir altın sarısı rengi gösterir. UV bölgesi altında AgNP'ler, boyuta bağlı olan yüzey plazmonlarının uyarılma modları nedeniyle karakteristik bir absorbans bandı verir. Bu SPR bantları, kuantum büyüklüğü etkilerine bağlı olarak kırmızı veya mavi kaymaya maruz kalır. Sonuç olarak absorbans zirveleri, partikül ebadı ve stabilitesini tahmin etmek için bir araç olarak kullanılabilir. Küçük AgNP'ler, maksimum 400 nm civarında bir absorbansa sahip olurken partikül boyutu nanoboyut dışına düştüğü zaman ise ortadan kalkacaktır [67].

3.6.2.2 FT-IR

FT-IR spektroskopisi, yüzey kimyasını araştırmak ve nanopartikül sentezi sırasında yüzeye bağlanan karboniller ve hidroksil parçaları gibi fonksiyonel gruplar gibi yüzey kalıntılarını tanımlamak için kullanılabilir [49].

3.6.2.3 Raman

Raman spektroskopisi, moleküllerin titreşim modlarının tespitinde faydalıdır ve sentez sırasında nanopartiküllerin yüzeyine bağlanan çeşitli kimyasal türlerin titreşim sinyallerini tanımlamak için kullanılabilir [49].

3.6.3 Işık Saçma Teknikleri

3.6.3.1 Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

DLS, partikül boyutunu belirlemek için yaygın olarak kullanılır. Ayrıca çözelti içerisinde makromoleküllerin ve kolloidlerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan müdahalesiz, hassas ve güçlü bir analitik araçtır [66].

3.6.4 X-Ray Temelli Teknikler

3.6.4.1 XRD (X Işını Kırınımı)

XRD incelemesi, yapısal bilgiyi belirlemek için daha sonra standart bir kristalografik veritabanında yer alan verilerle karşılaştırılan bir kırınım modeli üretmektedir. XRD verilerinin analizi; kristalit büyüklüğünü, yapısını, tercih edilen kristal yönelimini ve örneklerde mevcut olan fazları tanımlar [66].

Yara iyileşmesi, çeşitli doku ve hücre tiplerinin aktivitelerinin entegrasyonunu içeren karmaşık ve çok aşamalı bir işlemdir [68]. Yara iyileşmesi için nihai amaç, minimum yara izi ve maksimum fonksiyon ile hızlı bir iyileşmedir. Yara iyileşmesi; pıhtılaşma, iltihaplanma, proliferasyon ve matris-doku yeniden modelleme dahil olmak üzere çıkan olaylar serisi ile ilerler. Bu verimli ve yüksek kontrollü tamir işlemi için çok sayıda hücre sinyal olayı gereklidir [69].

4.1 Yara İyileşmelerinde Gümüş Nitratın Etkisi

Gümüş nitrat 1. Dünya savaşı döneminde yaralar için dezenfeksiyon maddesi olarak kullanılmıştır. Bununla birlikte etkili antibiyotiklerin mevcudiyeti nedeniyle gümüş içeren maddelerin mevcut kullanımı, yanık yaralarının tedavisi için kullanılan topikal gümüş sülfadiazin kremiyle sınırlıdır. Gümüşe olan ilgi ancak nanoteknolojideki gelişmelerle, saf gümüş partiküllerinin üretilmesini sağladıktan sonra tekrar artmıştır [70]. Farelerde yanık yarası modeli kullanılan bir çalışmada, AgNP'lerin güçlü antibakteriyel özellikleri ve iltihaplanmayı azaltma yetenekleri aracılığıyla yara iyileşmesini desteklediği gösterilmiştir [76].

4.2 Yara iyileştirici Testler

4.2.1 WST

Suda çözünabilir tetrazolyum (WST) tuzları, canlı hücrelerde mitokondriyal NADH enzimleriyle formazan kristalleri üreten hücre yaşayabilirlik analizleri için yeni nesil bileşikler olarak geliştirilmiştir. WST-1 ve WST-8 (2- (2-metoksi-4-nitrofenil) -3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-disülfenil) -2H-Tetrazolium), bir iyot tortusu içerir ve XTT veya MTS'ye kıyasla PMS (phenazine methosulphate)'nin varlığında daha stabildir. WST analizleri, formazan kristallerini yıkamak veya çözündürmek için herhangi bir ek adıma ihtiyaç duymaz ve tüm protokolü daha hızlı hale getiren kullanıma hazır bir çözelti olarak pazarlanır. [71].

4.2.2 Hücre Çizik Testi

In vitro çizik tahlili, in vitro hücre göçünü incelemek için basit ve ekonomik bir yöntemdir. Bu yöntem, birleştirilmiş monolayer hücrelerinde “çizik” olarak adlandırılan

yapay boşluk yaratılması üzerine yeni oluşturulan boşluğun kenarındaki hücrelerin çizdiği kapatmak için açıklığa doğru yeni hücre-hücre temasları tekrar kuruluncaya kadar hareket edeceği gözlemine dayanır. Temel adımlar, tek tabakalı hücrelerde bir çizik oluşturulması, başlangıçta görüntülerin yakalanması ve çizilmeyi kapatmak için hücre geçişi sırasında düzenli aralıklarla ve hücre geçiş hızını belirlemek için görüntülerin karşılaştırılmasını içerir. Bu basit yöntemin en büyük avantajlarından biri, hücrelerin in vivo göçünü bir dereceye kadar taklit etmesidir. İn vitro çizik tahlilinin bir başka avantajı ise hücre göçü düzenlemesinin (hücre dışı matris (ECM) ve hücre-hücre etkileşimleriyle) incelenmesi açısından uygun olmasıdır [72].

4.3 Antibakteriyel Testler

4.3.1 Disk Difüzyon Testi

Disk difüzyonu veya Kirby-Bauer testi klasik mikrobiyoloji tekniklerinden biridir. Kolaylık, verimlilik ve maliyet nedeniyle disk difüzyon yöntemi muhtemelen dünya çapında antimikrobiyal direnci belirlemek için en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde diskler, farklı antibiyotiklerin tanımlanmış çeşitli konsantrasyonlarıyla muamele edilir ve agarın yüzeyine yerleştirilir. İnkübasyondan sonra (35 °C'de 16-24 saat) antibiyotik disklerin her birinin çevresinde büyüme inhibisyon bölgeleri en yakın milimetreye kadar ölçülür. Bir diskin hemen yakınında büyüme gerçekleşmeyen net bir dairesel bölge, bu antimikrobiyallere duyarlılığı gösterir. Referans tabloları kullanarak bölgenin büyüklüğü MİK ile ilişkilendirilip sonuçların organizmanın bu antibiyotiğe duyarlı (S), orta derecede duyarlı (I) veya dirençli (R) olup olmadığı kaydedilir. Bu yaklaşımda hangi ortamın kullanıldığı, plakadaki agarın derinliği ve nem içeriği, kuluçka koşulları, doğru aşı yoğunluğu gibi bir dizi kritik adım vardır. Ayrıca diskler agar yüzeyine sıkıca temas etmelidir, aksi takdirde difüzyon hızı doğru olmaz. Disk yönteminin avantajı, herhangi bir özel ekipman gerektirmeyen test basitliğidir [73].

4.3.2 Mikrodilüsyon Testi

Broth seyreltme yöntemi, değişik seviyelerde antibiyotik içeren broth ortamının belirli bir aşı yoğunluğunda mikrobiyal aşılamaa bağlıdır; genellikle iki katına seyreltme kullanılır (örn. 1, 2, 4, 8 ve 16µg / mL). . Standartlaştırılmış bakteriyel süspansiyon tipik olarak $1-5 \times 10^5$ CFU/mL'dir. 35 °C'de inkübasyonun ardından bulanıklık görsel olarak veya otomatik bir okuyucu ile kaydedilir ve kesme noktası konsantrasyonu belirlenir. Büyümeyi engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK'i (minimum inhibisyon konsantrasyonu) temsil eder [66].

MATERYAL VE METOD

5.1 Materyaller

5.1.1 Cihaz ve Ekipmanlar

Cihaz ve Ekipmanlar	Marka
Ultrasonik banyo	Bandelin, SONOREX SUPER
Santrifüj cihazı	Sigma 2-16PK
Su saflaştırma sistemi	Purelab flex, veolia water solutions & technologies
Laboratuvar amaçlı mikrodalga	Milestone Microsynth microwave labstation
Manyetik karıştırıcı	VWR
Vorteks	Isolab
UV-vis spektroskopisi	Shimadzu UV-1700 spektrofotometre
Zeta analiz cihazı	Malvern Instruments Ltd
FTIR	Shimadzu IR Prestige-21 FTIR-ATR&JASCO
Steril 15 and 50 ml Falkon tüpleri	Isolab
0.45 µm Şırınga filtresi	Merck Millipore
250-1000 ml Erlen kabı	Isolab
Filtre kağıdı	Whatman No.1 & Whatman No.5
BSC-2 Laminer kabin	Labconco BSC
150 mL Bottle Top Filter	Fisher Brand
T25-T75 Flask	Corning
10-1000 µL'lik Mikropipetler	Eppendorf research
T24 kuyucuklu hücre kültürü plakaları	Costar (corning incorporated)
24 kuyucuklu hücre kültürü plakaları	Costar (corning incorporated)
96 kuyucuklu hücre kültürü plakaları	Costar (corning incorporated)

96 kuyucuklu çoklu kaplama plakası	Termo Fisher Scientific
Mikroskop	Nicon Eclipse TS100
15 ml'lik santrifüj tüpleri	Fisherbrand
Cam steril pastör pipetler(10-25-50 mL)	Costar Stripette
Santrifüj cihazı	VWR
İnkübatör	Sanyo Scientific
Laminer kabin sınıf II A2 Tip	Labconco

5.1.2 Kimyasal Malzemeler

Kimyasal Malzemeler	Marka
Gümüş nitrat (AgNO_3)	Sigma-Aldrich
Etanol	Merck
10xPBS	Fisher Scientific
TrypLE	Gibco
GMEM (Glasgow Minimum Essential Medium)	Gibco
DMSO (Dimetil sülfoksit)	MP Biomedicals
Hücre sayımı kiti kit-8	Dojindo

5.2 Metod

5.2.1 Tohumların İn vitro Çimlendirilmesi

- Malzemelerin Sterilizasyonu ve Besin Ortamının Hazırlanması**

Tohumların çimlendirilmesi için öncelikle MS (Murashige&Skoog) besin ortamı hazırlanmıştır. 100 mL'lik besin ortamı için 600 mg agar, 3 gr sukroz ve 440 mg MS besiyeri behere aktarılıp pH 5.8'e ayarlandıktan sonra kullanılacak pens, filtre kağıdı gibi diğer malzemelerle birlikte 121 °C'de 15 dk otoklavlanmıştır. Hazırlanan besin ortamı steril petrilere eklendikten sonra katılaşması beklenmiştir.

- **Tohumların Sterilizasyonu ve Besin Ortamına Eklenmesi**

Plantago lanceolata ve *Plantago major* bitki tohumları 1 dakika boyunca %70'lik etil alkolde daha sonra ise 5-7 dakika boyunca %10'luk NaOCl'de yıkanmıştır. Dezenfektanlardan arınması için tohumlar 3 defa steril sudan geçirilmiştir. Sterilizasyonu tamamlanan tohumlar besiyerine eklenmiştir. Petrilerde belirli uzunluğa ulaşan çimlenmiş tohumlar besiyeri hazırlandıktan sonra kavanozlara aktarılmıştır.



Şekil 5.1 Çimlenen *P. lanceolata* ve *P. major* bitkilerinin kavanozlara aktarılması

- **Bitki Eksplantlarının Hormonlu Ortama Aktarılması**

Kavanozlarda gelişen bitkilerden eksplantlar alınarak adventif kök, gövde gelişimi ve sürgün farklılaşmasını sağlamak amacıyla Bitki Büyüme Düzenleyicileri (BBD; oksin ve sitokinin hormonları) kullanılmıştır. Kök gelişimi için yaprak ve kök eksplantları, 2,4-D içeren; gövde gelişimi için hipokotil ve kotiledon eksplantları BAP ve NAA içeren; sadece sürgün gelişmiş eksplantlardan kök gelişimi sağlamak için BAP, 2,4-D, NAA içeren; sadece kök gelişmiş eksplantlardan sürgün gelişimi sağlamak için BAP içeren MS ortamına ekimler yapılmıştır.

- **Rejenere Olan Bitkinin Saksılara Aktarılması**

Hormonlu ortamlarda kök ve gövde gelişimi sağlanan bitkiler saksılara aktarılmış ve nem ihtiyacının karşılanması için üzeri streç filmle kaplanmıştır.

5.2.2 Bitki Ekstraktının Hazırlanması

- *Plantago major* ve *Plantago lanceolata* Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Yıldız Teknik Üniversitesi Davutpaşa Kampüsü'nde toplanan (Mayıs-Haziran) *Plantago major* ve *Plantago lanceolata* bitkilerinin yapraklarından 10'ar gram tartıldı. Yapraklar birkaç kez çeşme suyunda yıkandıktan sonra, ultra saflaştırılmış deiyonize sudan geçirildi. Yıkanan yapraklar bıçakla doğranarak 250 mL'lik behere koyuldu. 10 gram bitki ekstraktının üzerine 100 mL distile su eklendi. Ekstraksiyonun daha iyi gerçekleşmesi için behere manyetik balık koyularak bitki örnekleri, elektrikli ısıtıcıda 234 rpm 75-80 °C'de 20 dk bekletildi. Elektrikli ısıtıcıdan alınan beher oda sıcaklığında 5 dk bekledikten sonra filtre kağıdından geçirildi ve sonraki aşama için hazırlandı.



Şekil 5.2 *Plantago major* bitkisi ve bitki ekstraktı



Şekil 5.3 *Plantago lanceolata* bitkisi ve bitki ekstraktı

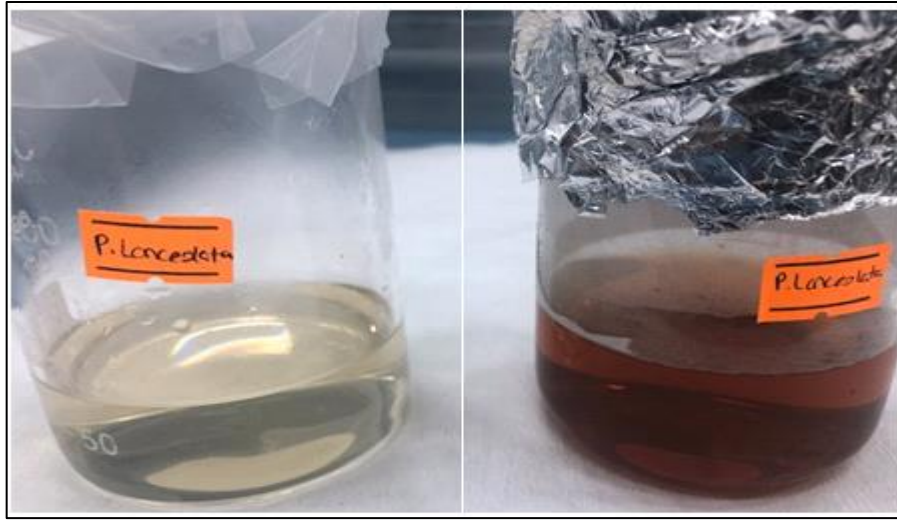
5.2.3 Gümüş Nanopartikül Sentezi (AgNO_3)

5.2.3.1 Plantajo major ve Plantago lanceolata Bitkisinden Gümüş Nanopartikül (AgNO_3) Sentezi

Gümüş nanopartikül sentezi için 100 mL'lik 1 M AgNO_3 çözeltisi hazırlanmıştır. Bitki ekstraktından 10-20 mL, AgNO_3 çözeltisinden 80-90 mL alınarak balon jojeye koyuldu. Mikrodalgada sentezin daha verimli gerçekleşmesi için 250 mL'lik jöjeye manyetik balık koyuldu. Mikrodalga 700 W, 90 °C'ye ayarlanıp 25 dk boyunca balon joje mikrodalga enerjisi verildi. Mikrodalgadan çıkarılan sentez ürünü 250 mL'lik behere aktarılıp, 5 dk boyunca sonikasyon işleminden geçirildi. Sonikasyon işlemi tamamlandıktan sonra 50 mL'lik falkon tüpe aktarılan ürün +4 °C, 5000 rpm'de 12 dk boyunca santrifüjlendi. Santrifüjden çıkan örneklerin pelletleri atılıp, süpernatantları alındı. Daha sonra +4 C'de buzdolabında bekletildi. Örnekler tekrardan +4 °C'de 10000 rpm'de 15 dk santrifüjden geçirildikten sonra süpernatantları atılıp, pelletlerin üzerine yıkama işlemi için 50 mL'ye tamamlanacak şekilde distile su eklendi. Tekrar +4 °C'de 10000 rpm'de 15 dk santrifüj edilen örneklerin süpernatantları atılıp, pelletlerin üzerine 5 mL distile su eklendi. Örnekler analizler için +4 °C'de saklandı.



Şekil 5.4 A)Sentez öncesi *P. major* bitki ekstraktı ve AgNO_3 çözeltisi B)Sentez ürünü



Şekil 5.5 A)Sentez öncesi *P. lanceolata* ekstraktı ve AgNO_3 çözeltisi B)Sentez ürünü

5.2.4 Sentezlenen Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

5.2.4.1 UV-Visible Spektroskopi Analizi

Metal iyonlarının bioredüksiyonunun tamamlanmasını izlemek için fitosentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin optik özellikleri için UV-vis spektrofotometre kullanılmıştır. UV-Vis spektroskopi sonuçları için, UV-Vis kuvars hücresi kullanılmış ve spektrumlar 190-800 nm aralığında toplanmıştır. UV-analiz için sentezlenmiş NP'leri içeren 1 ml çözelti, absorbansı normalleştirmek ve daha sonra UV-Vis (görünür) spektrumda taramayı hedeflemek amacıyla 2 ml ultra saflaştırılmış deiyonize su ile seyreltilmiştir. Blank (kör) olarak ultra saflaştırılmış deiyonize su kullanılmış ve spektrumlar sentezlerin tamamlanmasından kısa bir süre sonra alınmıştır.

5.2.4.2 FTIR Spektroskopik Analizi

Bitki özütlerinin sahip olduğu fitosentezlenmiş nanopartikülleri indirgeyen ve stabilize eden biyomoleküllerin, özelliklerini ve tanımlamalarını sağlayan en önemli karakterizasyon tekniğidir. Bu biyomoleküller, fonksiyonel gruplarıyla birlikte NP'lere de bağlı kalır. Bu nedenle, bu etkili fonksiyonel grupların varlığı FTIR spektrometresi kullanılarak incelenmiştir. Gümüş nanopartiküller için 600-4000 cm^{-1} aralığında Shimadzu IR Prestige-21 FTIR-ATR cihazı ve zayıflatılmış toplam yansıma (ATR) metodu ile IR spektroskopik ölçümler yapılmıştır.

5.2.4.3 Zetasizer ile Boyut Dağılımı Analizi

Gümüş nanopartiküllerin boyut dağılımını belirlemek için zeta analizörü kullanılmıştır. Fitosentezlenmiş numuneler sonikasyon cihazında 2 dakika boyunca sonike edilmiştir. Homojen bir çözelti elde edildikten sonra, süspansiyonlar büyük toplanmış parçacıkları çıkarmak için 2,5 μm gözenek boyutunda Whatman No.5 filtre kağıdı ile süzölmüş ve filtrelenen çözeltiler, zeta analizi için ultra saf su ile seyreltilip analizleri yapılmıştır.

5.2.5 Fitosentezlenmiş Nanopartiküllerin Antibakteriyel Çalışmaları

Fitosentezlenmiş gümüş nanopartiküllerin antibakteriyel çalışmaları disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri uygulanarak Gram pozitif bakterisi *E. Coli* üzerinde test edilmiştir.

5.2.5.1 Disk Difüzyon Yöntemi

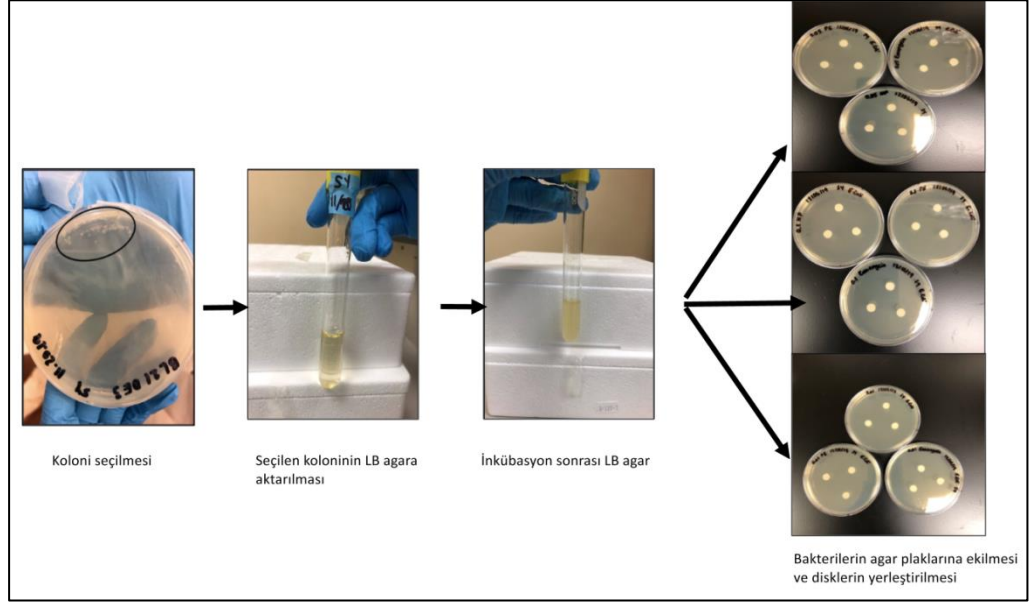
Disk difüzyon testi, bir antimikrobiyal ajanın antibakteriyel aktivitesini taramak için ön çalışma olarak tanımlanmıştır.

- **Bakterinin LB agara ekilmesi ve inokülasyonu**

-80 °C'den çıkarılan bakteriler sterilize edilmiş özeyle LB agara 90 derecelik açılarla ekilmiştir ve %5 CO_2 , 37 °C de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübatörden çıkarılan plaktan koloni seçilip ve 10 mL LB medium içeren tüpe aktarılmıştır. Bakterilerin üremesi için 24 saat inkübatörde bekletilmiştir.

- **Stok Solüsyonların Hazırlanması ve Diskle Muamelesi**

Diskler için 0.1-0.05-0.01 mg/mL gümüş nanopartikül, bitki ekstraktı ve antibiyotik (kanamisin) hazırlanmıştır. Antibakteriyel çalışma için 8 mm çapında filtre kağıtları kullanılmıştır. Diskler 100 μL stok solüsyonlarıyla muamele edildikten sonra LB agar üzerine yerleştirilmiş ve 24 saat sonra inhibisyon zonlarının çapı ölçülmüştür.



Şekil 5.6 Disk difüzyon yöntemi aşamaları

5.2.5.2 Mikrodilüsyon Yöntemi

MİK, seri seyreltme ile bakteri üremesini engellemek için antibakteriyel maddenin en düşük konsantrasyonu olarak tanımlanır.

- **Bakterinin LB agara ekilmesi ve inokülasyonu**

-80 °C'den çıkarılan bakteriler sterilize edilmiş özeyle LB agara 90 derecelik açılarla ekilmiş ve %5 CO₂, 37 °C de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübatörden çıkarılan plaktan koloni seçilip ve 10 mL LB medium içeren tüpe aktarılmıştır. Bakterilerin üremesi için 24 saat inkübatörde bekletilmiştir.

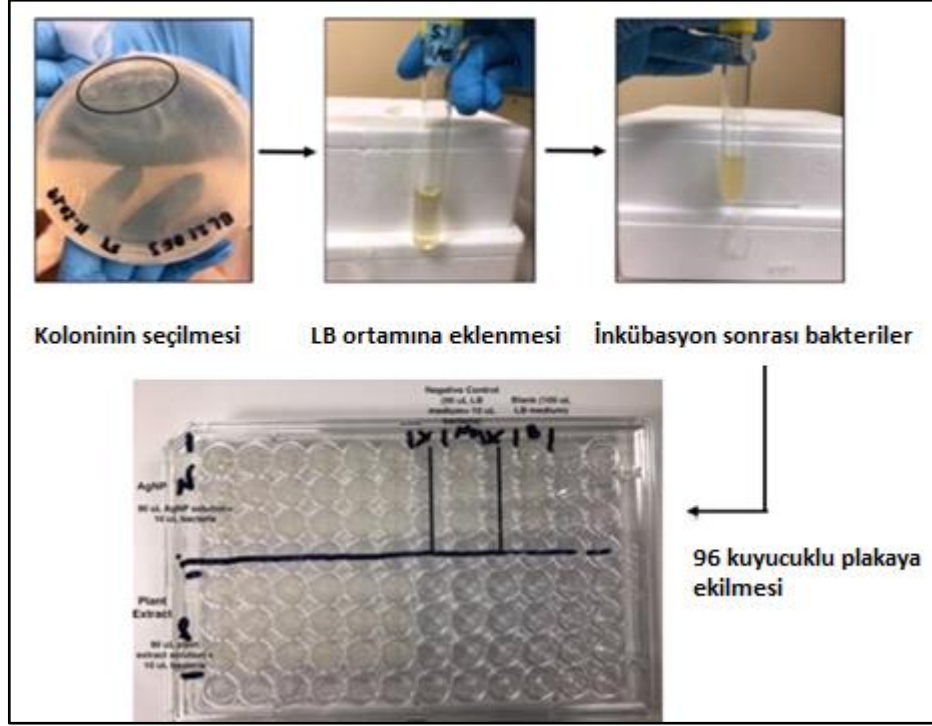
- **Seri dilüsyonların yapılması**

500 mg/mL stok çözeltisinden başlanarak 500, 250, 125, 62.5, 31.25 mg/mL dilüsyonlar hazırlanmıştır. Ependorf tüpler içerisine 500 µL LB medium eklenmiştir. Tek ependorf tüpe 0.1 mg/mL AgNP stok çözeltisinden 500 µL eklenip karışımı sağlanmıştır. Daha sonra bu tüpten 500 µL alınıp diğer tüpe transfer edilmiş ve dilüsyonlar bu şekilde devam etmiştir.

- **Bakterilerin 96 kuyucuklu plakalara ekilmesi ve ölçümlerinin alınması**

0.1 mg/mL'lik AgNP, plant ekstraktı ve kanamisin stok solüsyonlarından 90 µL kuyucuklara eklenip bunların üzerine 10 µL bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak Kanamisin, negatif kontrol olarak bakteri kültürü uygulanmıştır. 96

kuyucuklu plaka 600 nm dalga boyundaki plaka okuyucuya yerleştirilip 37 °C’de 5 saat boyunca ölçüm alınması sağlanmıştır.



Şekil 5.7 Mikrodilüsyon yöntemi aşamaları

5.2.6 Fitosentezlenmiş Nanopartiküllerin Sitotoksikite Testi

Sitotoksikite testi için WST kiti C2C12 hücre hatları için kullanılmıştır.

- **C2C12 hücre kültürü**

96 kuyucuklu plakaya 10K/well hücre ekildi ve hücreler monolayer (%70-80 confluency) hale gelinceye kadar 37 °C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültür edildi.

- **Hücrelerin AgNP ve bitki ekstraktı ile muamelesi**

Kültüre edilen hücrelere sırasıyla 0.1-0.05-0.01 mg/mL gümüş nanoapartikül çözeltisi ve bitki ekstraktı eklendi. Negatif kontrol olarak ise FBS-Free medium kullanılmıştır. Daha sonra 24-48 saat boyunca inkübe edildi.

- **WST ajanının kullanılması**

İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 10 µL CCK8 ve 100 uL FBS Free medya eklendi. Hücreler 3 kere 1x PBS ile yıkandı ve 100 µL CCK8 stoğu kuyucuklara eklendi. 2 saat boyunca %5 CO₂, 37 °C de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası kuyucuklardan 50 µL alınıp

plaka okuyuculara özel olan platelere eklendi ve 450 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirildi.

5.2.7 Fitosentezlenmiş Nanopartiküllerin Migrasyon Testleri

Migrasyon testi için C2C12 hücre serileri üzerinde hücre çizik testi uygulanmıştır.

- **C2C12 hücre kültürü**

96 kuyucuklu plakaya 10K/well hücre ekildi ve hücreler monolayer (%70-80 confluency) hale gelinceye kadar 37 °C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde kültür edildi.

- **Hücrelerde çiziklerin oluşturulması**

Monolayer hale gelen hücrelerde 200 µL lik pipet ucuyla çizikler oluşturuldu. Plate yüzeyinden ayrılan hücreleri uzaklaştırmak için 2 kere FBS içermeyen GMEM medium ile yıkama gerçekleştirildi.

- **Hücrelerin AgNP ve bitki ekstraktı ile muamelesi**

Kültür edilen hücrelere sırasıyla 0.1-0.05-0.01 mg/mL gümüş nanopartikül çözeltisi ve bitki ekstraktı eklendi. Negatif kontrol olarak ise FBS-Free medium kullanılmıştır. Daha sonra 0, 24 ve 48 saat boyunca faz kontrast mikroskobu ile görüntü alındı.

DENEYSEL VERİLER ve SONUÇLARI

6.1 *Plantago major* ve *Plantago lanceolata* Bitkilerinin Rejenerasyonu

6.1.1 *Plantago lanceolata* Bitkisinin Rejenerasyonu

BBD'siz MS (Murashige&Skoog) ortamında çimlendirilmiş tohumların yapraklarının daha iyi gelişmesi amacıyla yine MS ortamı bulunan kavanozlara aktarılması gerçekleştirilmiştir. Gelişen fidelerden yaprak, kök, hipokotil ve kotiledon eksplantları alınıp kök, gövde ve sürgün gelişimini sağlamak amacıyla Şekil 6.1'deki oksin (NAA, 2,4-D) ve sitokinin (BAP) bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) bulunan ortamlara ekilmiştir.

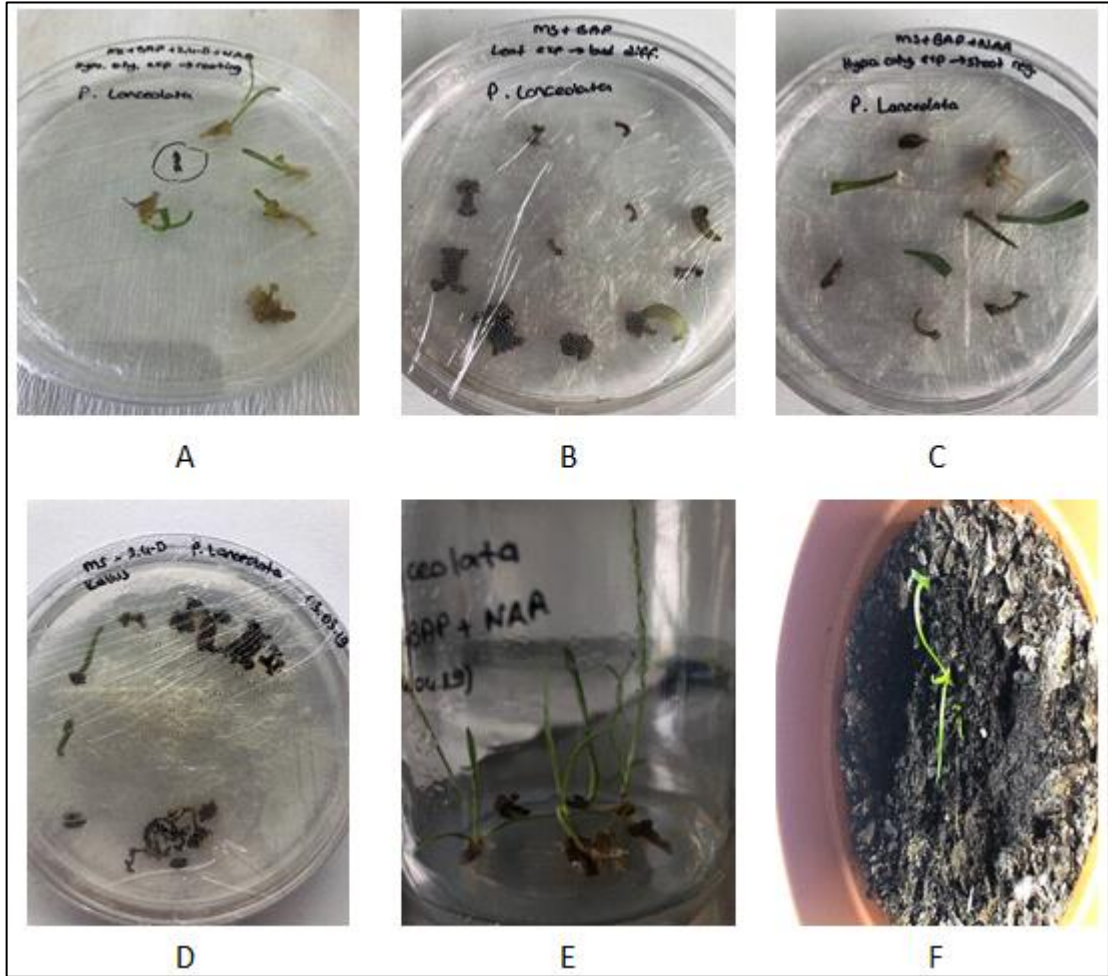
P. lanceolata bitkisinin eksplant kaynakları beklenen etki olan kök, gövde ve sürgün gelişimlerinin sağlanması amacıyla NAA, 2,4-D ve BAP BBD'lerinin farklı konsantrasyon ve kombinasyonları ile muamele edilmiş ve sonuçlar Tablo 6.1'de gösterilmiştir. Kök gelişimi gözlenen hipokotil ve kotiledon eksplantları Tablo 6.2'de gösterildiği gibi BAP ve NAA, bitki büyüme düzenleyicileri bulunan kavanozlara aktarılıp gövde gelişimi sağlanmış, kök gelişimi devam etmiştir.

Tablo 6.1 MS ortamında *Plantago lanceolata* bitkisinde farklı BBD konsantrasyonları ve kombinasyonların eksplantlar üzerinde oluşturduğu etkiler

	Eksplantın Kaynağı	BBD (mg/L)	Beklenen Etki	Gözlenen Etki
1	Yaprak ve kök	1.26 2,4-D	Kök gelişimi	Gelişim gözlenmedi
2	Hipokotil ve kotiledon	0.75 BAP+ 0.25 NAA	Gövde gelişimi	Kök gelişimi
3	Hipokotil ve kotiledon	0.26 BAP + 0.21 2,4-D + 0.5 NAA	Kök gelişimi	Kök gelişimi
4	Yaprak	4 BAP	Sürgün gelişimi	Gelişim gözlenmedi

Tablo 6.2 Kök gelişen eksplantların gövde oluşumu için yapılan uygulamalar

Eksplantın Kaynağı	BBD (mg/L)	Beklenen Etki	Gözlenen Etki
Kotiledon	0.52 BAP + 0.28 NAA	Gövde gelişimi	Kök büyümesi ve gövde oluşumu



Şekil 6.1 A) *P. lanceolata* bitkisinin hipokotil ve kotiledon eksplantlarından kök gelişimi B) Yaprak eksplantlarından sürgün gelişimi C) Hipokotil ve kotiledon eksplantlarından gövde gelişimi D) Kök gelişen eksplantların gövde formasyonu için farklı konsantrasyonda BAP ve NAA içeren ortama aktarılması E) Eksplantlardan kök ve gövde gelişimi tam bitkiler F) Doku kültüründe rejenere edilen bitkilerin toprağa aktarılması

6.1.2 *Plantago major* Bitkisinin Rejenerasyonu

MS ortamında çimlendirilmiş tohumların daha iyi gelişmesi amacıyla yine MS ortamı bulunan kavanozlara aktarılmıştır. Gelişen fidelerden yaprak, kök, hipokotil ve kotiledon eksplantları alınıp bu kök, gövde ve sürgün gelişimini sağlamak amacıyla Şekil 6.2'deki gibi oksin (NAA, 2,4-D) ve sitokinin (BAP) bitki büyüme düzenleyicileri bulunan ortamlara ekilmiştir.

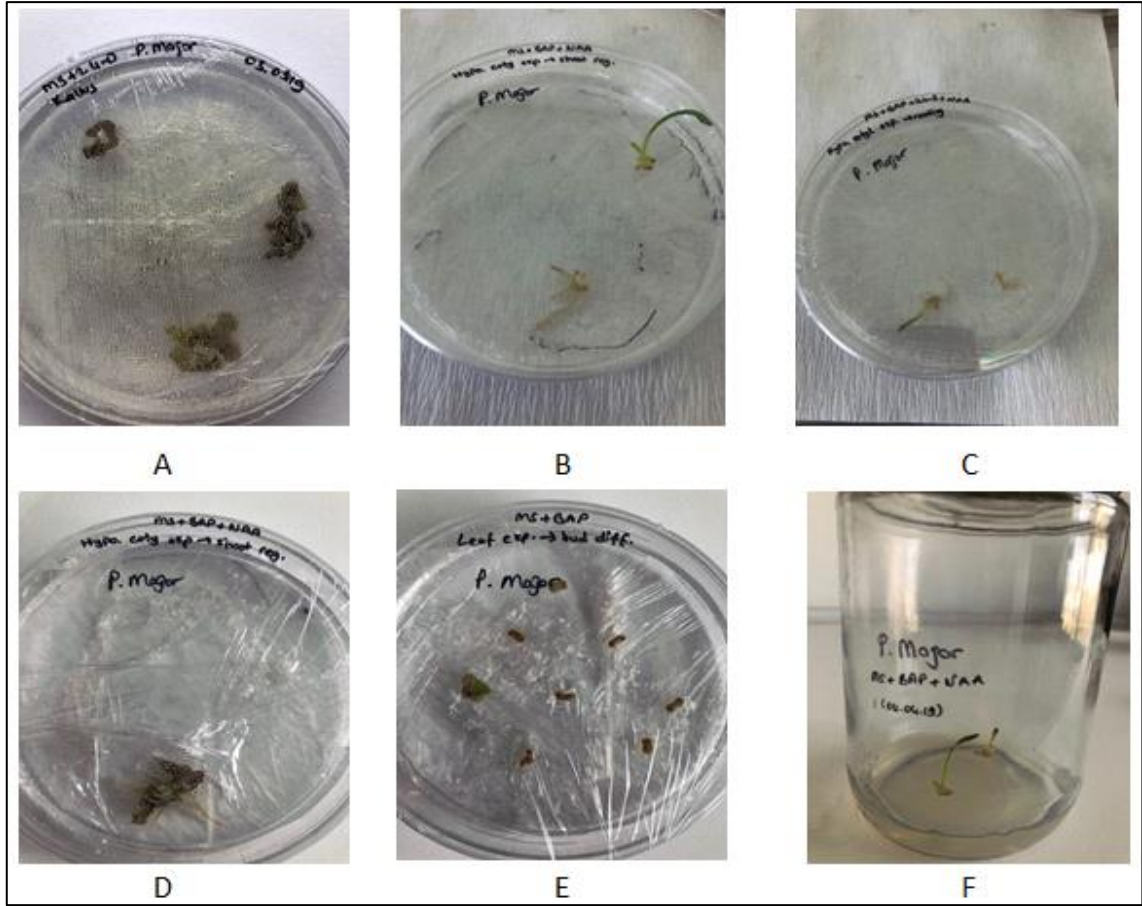
P. major bitkisinin eksplant kaynaklarından kök, gövde ve sürgün gelişimlerinin sağlanması amacıyla NAA, 2,4-D ve BAP hormonlarının farklı kombinasyonları ile muamele edilmiş ve sonuçlar Tablo 6.3'de gösterilmiştir. Kök gelişimi gözlenen hipokotil ve kotiledon eksplantları Tablo 6.4'de gösterildiği gibi BAP ve NAA konsantrasyonları bulunan kavanozlara aktarılmış ancak gövde gelişimi gözlenmemiştir.

Tablo 6.3 MS ortamında *Plantago major* bitkisinde farklı BBD konsantrasyonları ve kombinasyonlarının eksplantlar üzerinde oluşturduğu etkiler

	Eksplantın Kaynağı	BBD (mg/L)	Beklenen Etki	Oluşan Etki
1	Yaprak ve kök	1.26 2,4-D	Kök gelişimi	Kallus oluşumu
2	Hipokotil ve kotiledon	0.75 BAP+ 0.25 NAA	Gövde gelişimi	Kök gelişimi
3	Hipokotil ve kotiledon	0.26 BAP + 0.21 2,4-D+ 0.5 NAA	Kök gelişimi	Kök gelişimi
4	Yaprak	4 BAP	Sürgün gelişimi	Gelişim gözlenmedi

Tablo 6.4 Gelişim gözlenen eksplantların kavanozlara aktarılması ve oluşan etki

Eksplantın Kaynağı	BBD (mg/L)	Beklenen Etki	Oluşan Etki
Kotiledon	0.52 BAP+ 0.28 NAA	Gövde gelişimi	Gelişim gözlenmedi



Şekil 6.2 A ve C) *Plantago major* bitkisinde hipokotil ve kotiledon eksplantlarından kök gelişimi B ve D) Kök geliştiren hipokotil ve kotiledon eksplantlarının gövde gelişimi için farklı bir BBD konsantrasyonu ve kombinasyonu ile muamelesi E) Yaprak eksplantları D) Kök geliştiren eksplantların farklı konsantrasyonda BAP ve NAA içeren ortamlarda sürgün gelişimi

6.2 Gümüş Nanopartikülün Sentezi ve Karakterizasyonu

Gümüş nanopartiküller oluşturmak için taze hazırlanmış bitki ekstraktları kullanılmıştır. Bitki özleri, 10^{-3} M gümüş nitrat (AgNO_3) tuz çözeltisi ile karıştırıldığında, metal iyonları metal nanopartiküllere indirgenmiştir. Sentezlerden sonra fitosentezlenen AgNP'lerin miktarını ve kalitesini değerlendirmek için farklı karakterizasyon teknikleri kullanılmıştır.

6.2.1 Gümüş Nanopartikülün Sentezi

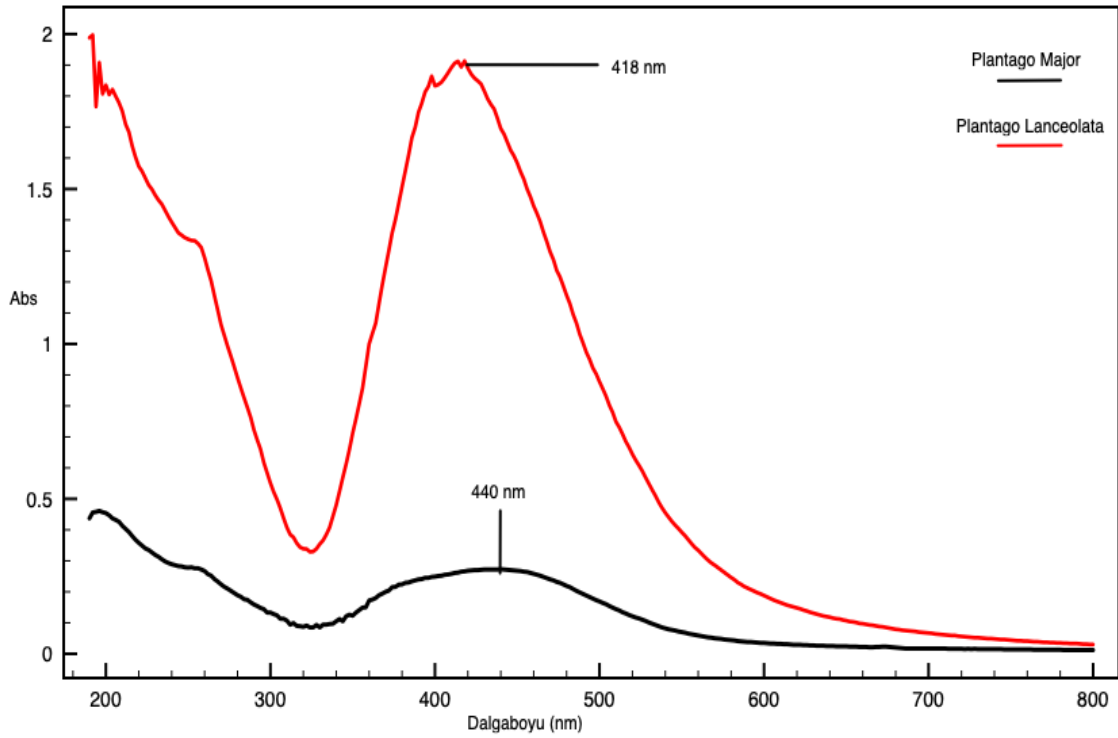
Gümüş nanopartiküllerin oluşumu ve üretimi, belli bir süre sonra reaksiyonun hemen renk değiştirmesiyle takip edilmiştir.

6.2.2 Gümüş Nanopartikülün Karakterizasyonu

6.2.2.1 UV-Visible Adsorbsiyon Spektroskopisi Çalışmaları

Gümüş nanopartiküllerin oluşumu UV-Vis spektroskopisi ile izlenmiştir. UV-vis spektroskopisi metalik nanopartiküllerin yapısal karakterizasyonu için önemli ve güvenilir bir araştırma sürecidir. UV-Vis spektroskopisi gümüş iyonlarının sulu çözeltilerde biyo-indirgemesini izlemiş ve kaydedilen spektrumlar, yüzey plazmon rezonans (SPR) spektrumlarını ayırt edici şekilde doğrulamıştır.

Plantago major'dan sentezlenen gümüş nanopartikülün 440 nm de band verdiği, *Plantago lanceolata*'dan sentezlenen gümüş nanopartikülün ise 418 nm'de band verdiği UV spektroskopisi ile ölçülmüştür.



Şekil 6.3 *Plantago lanceolata* ve *Plantago major* bitkisinin UV-Görünür bölge absorpsiyonu

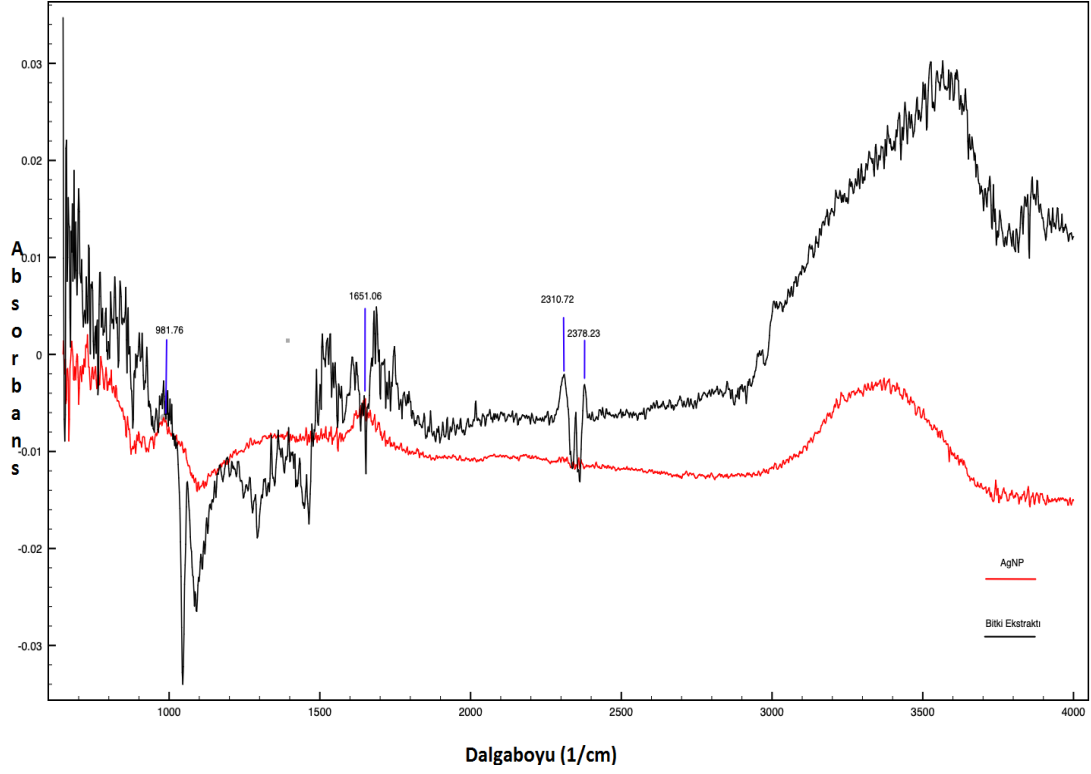
6.2.2.2 FTIR Analizi

Fitosentez edilmiş metalik gümüş nanopartikül numunelerinin IR spektroskopik ölçümleri AgNP'nin sentezlenmesi, kaplanması ve dengelenmesi gibi önemli roller oynayabilecek potansiyel biyomoleküllerin ortaya çıkarılması için yapılmıştır. Bu analiz sentezlenen gümüş nanopartiküllerin yapısı ve sahip olduğu fonksiyonel grupların tanımlamak amacıyla yapılmıştır. Alınan IR spektrumu ile fonksiyonel grubun alifatik ya da aromatik olduğu belirlenmektedir. IR spektrumunda 1200-600 cm^{-1} arasındaki bölge

parmak izi bölgesi olarak bilinirken, 3600-1200 cm^{-1} fonksiyonel grup bölgesi olarak bilinmektedir.

- ***Plantago lanceolata* bitki ekstraktı kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartikülün FTIR sonuçları**

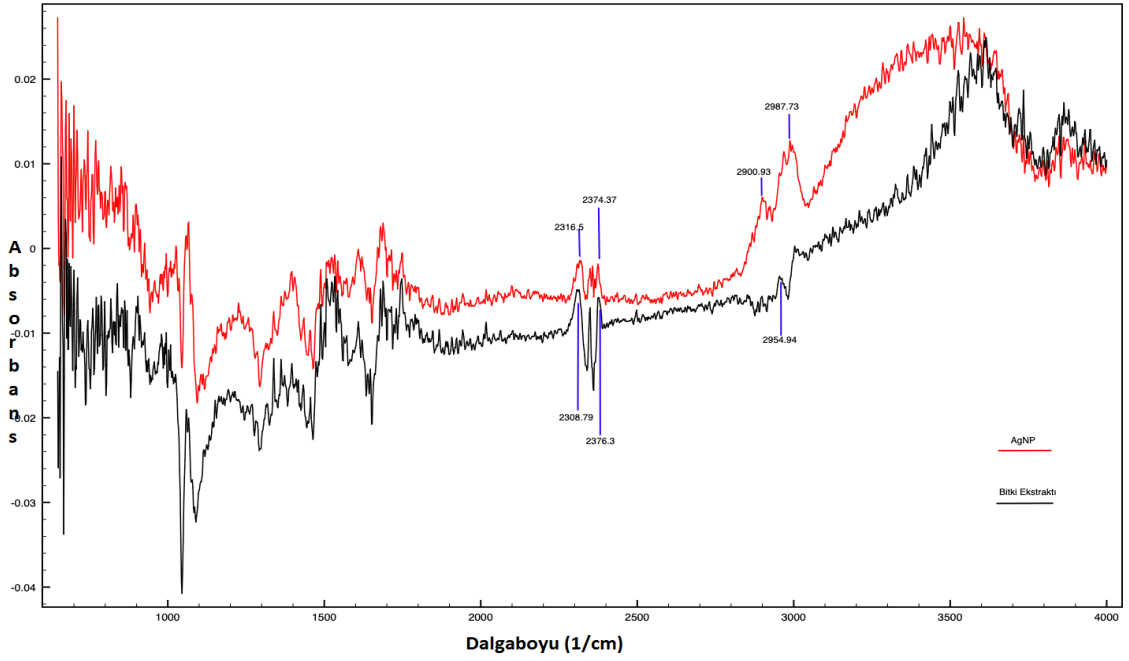
P. lanceolata bitkisinden sentezlenmiş AgNP'nin 981.76 cm^{-1} 'deki bant güçlü alken bağı (C=C), 1671.06 cm^{-1} 'de ise zayıf alken bağı (C=C) olarak tanımlanabilir.



Şekil 6.4 *Plantago lanceolata* bitkisinden sentezlenmiş AgNP'ün FT-IR sonuçları.

- ***Plantago major* bitki ekstraktı kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartikülün FTIR sonuçları**

Plantago major bitkisinden sentezlenen gümüş nanopartikülün ise 2316.5 cm^{-1} ve 2374.37 cm^{-1} bandı güçlü karbondioksit (O=C=O), 2900.93 cm^{-1} ve 2987.73 cm^{-1} bandı ise alken bağı (C-H) olarak tanımlanabilir.

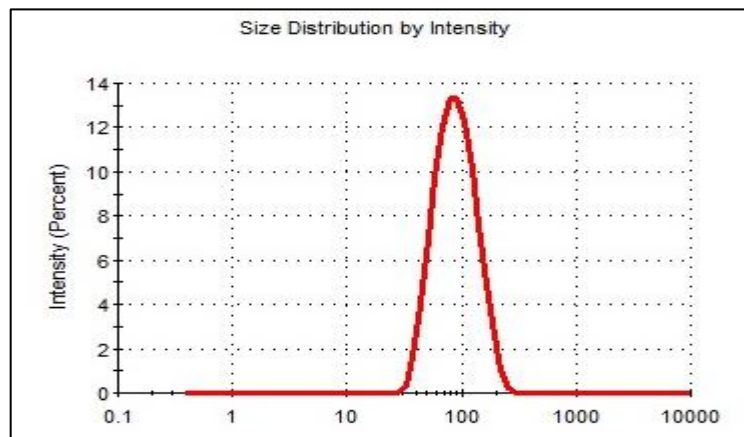


Şekil 6.5 *Plantago major* bitkisinden sentezlenmiş AgNP'ün FT-IR sonuçları.

6.2.2.3 Zeta Boyut Dağılımı Analizi

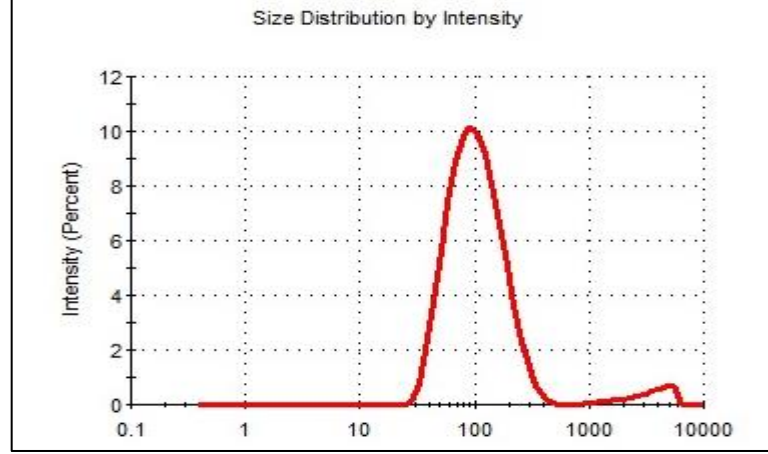
Nanopartiküllerin davranışını optimize etmek için parçacık büyüklüğü dağılımı ölçülmüştür. Toz haline getirilmiş AgNP numunelerin boyutunu hesaplamak için ultrasonik işlem uygulanarak ultra saf su ile seyreltilmiştir. Metalik gümüş nanopartiküllerinin yoğunlukla boyut dağılımı, çap (nm) cinsinden ortalama parçacık boyutu grafiğine göre kaydedilmiştir.

Plantago lanceolata (şekil 6.5) bitkisinden sentezlenen gümüş nanopartikülün Zetasizer ölçümü sonucu ortalama partikül boyutu 81 nm olarak ölçülmüştür.



Şekil 6.5 *Plantago lanceolata* bitkisinden sentezlenmiş AgNP'ün partikül boyutları

Plantago major (şekil 6.6) bitkisinden sentezlenen gümüş nanopartikülün boyutu 93 nm olarak gösterilmiş ve ölçümde safsızlık tespit edilmiştir. Membran filtre kullanılarak büyük parçacıkların uzaklaştırılması sağlanabilir.



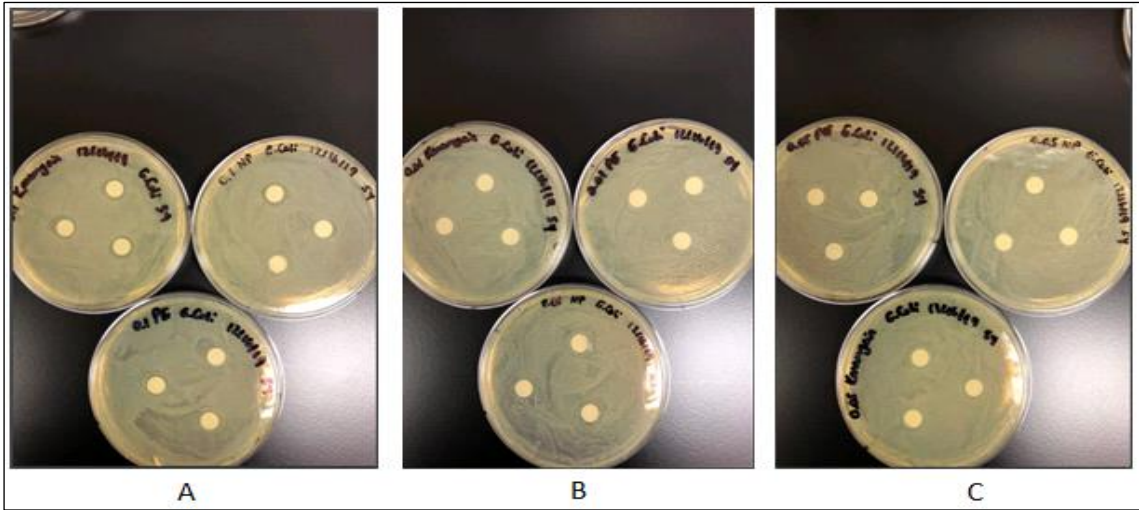
Şekil 6.6 *Plantago major* bitkisinden sentezlenmiş AgNP'ün partikül boyutları

6.3 Antibakteriyel Testler

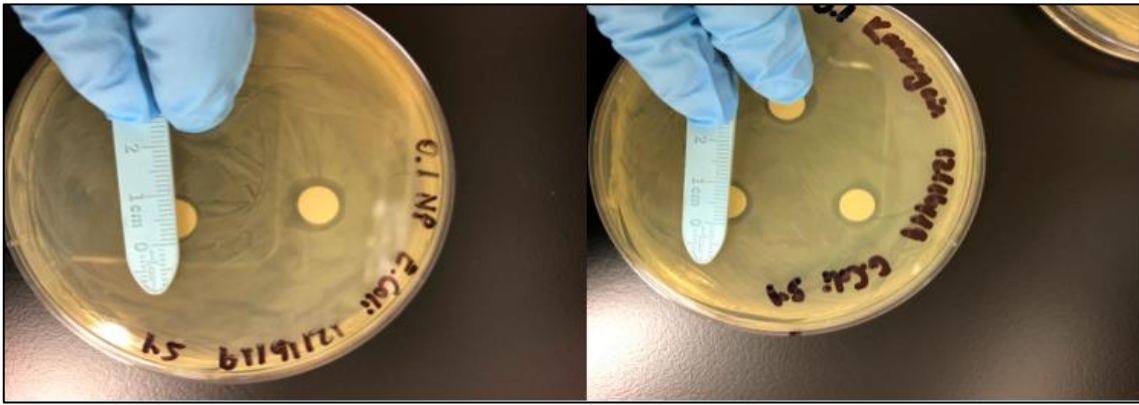
Plantago lanceolata bitkisinden sentezlenen gümüş nanopartikülün antibakteriyel etkisi *Esherichia coli* bakterisi üzerinde incelenmiştir. Antibakteriyel test olan disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri *E. coli* kültürlerine uygulanmıştır. 1 mg nanopartikül tozu 10 mL LB besiyeri ile süspanse edilerek 0.1 mg/mL stok solüsyon hazırlanmış ve bu solüsyon her iki antimikrobiyal test için kullanılmıştır. Gümüş nanopartikülün antibakteriyel etkisi bitki ekstraktı ve pozitif kontrol olan kanamisin kullanılarak karşılaştırılmıştır.

6.3.1 Disk Difüzyon Yöntemi

Farklı konsantrasyonlardaki (0.1-0.05-0.01 mg/mL) kanamisin, bitki ekstraktı ve AgNP ile muamele edilen disklerin inhibisyon zonları Şekil 6.7'de gösterilmiştir. Şekil 6.8'de kanamisinin 0.1 mg/mL'de 12 mm, AgNP'ün ise 10 mm inhibisyon zonu gösterdiği saptanmıştır. Çalışma sonucunda her üç konsantrasyonda da bitki ekstraktı ile muamele edilmiş diskte inhibisyon zonu gözlenmemiştir. Ayrıca 0.05 ve 0.01 mg/mL kanamisin AgNP disklerinde de inhibisyon zonu gözlenmemiştir.



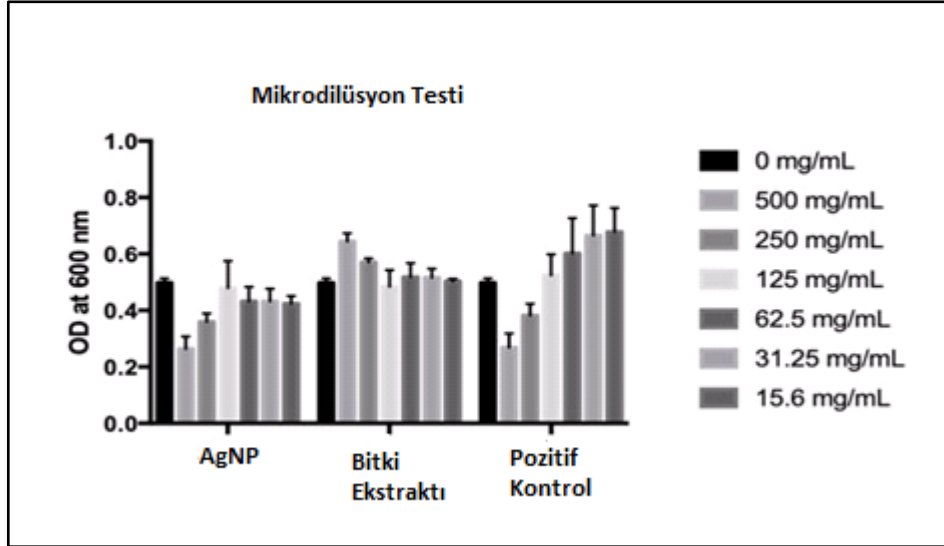
Şekil 6.7 A)0.1 mg/mL kanamisin, bitki ekstraktı ve AgNP B)0.05 mg/mL kanamisin, bitki ekstraktı ve AgNP C)0.01 mg/mL kanamisin, bitki ekstraktı ve AgNP



Şekil 6.8 0.1 mg/mL AgNP (10 mm) ve kanamisinin (12 mm) inhibisyon çapının ölçülmesi

6.3.2 Mikrodilüsyon Yöntemi

500 mg/mL-15.6 mg/mL arasında seri dilüsyonları hazırlanan gümüş nanopartiküller *E. coli* üzerinde test edilmiştir. Sonuçlar bitki ekstraktı ve pozitif kontrol olarak kullanılan kanamisine göre yorumlanmıştır. Şekil 6.9’da gösterildiği gibi 500 mg/mL AgNP’ün bakteriler üzerinde etkili bir antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada bitki ekstraktının antibakteriyel etki göstermediği tespit edilmiştir. Sonuçlarda yola çıkarak 500 mg/mL AgNP ve kanamisinin aynı ölçüde ve etkin bir antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir.

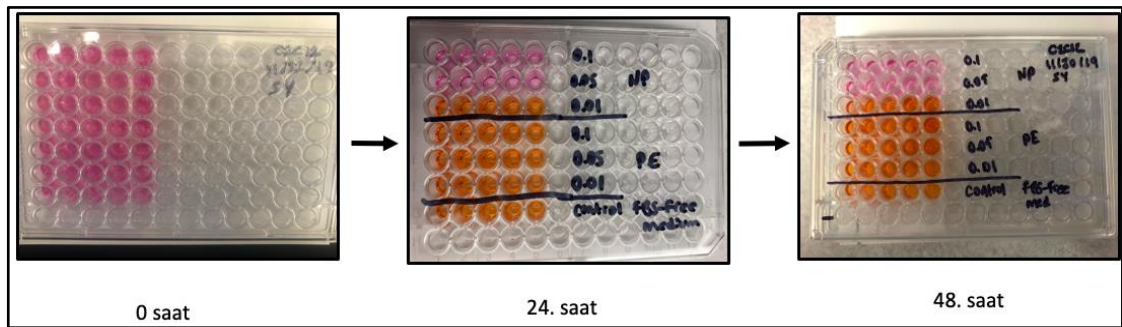


Şekil 6.9 Mikrodilüsyon testi

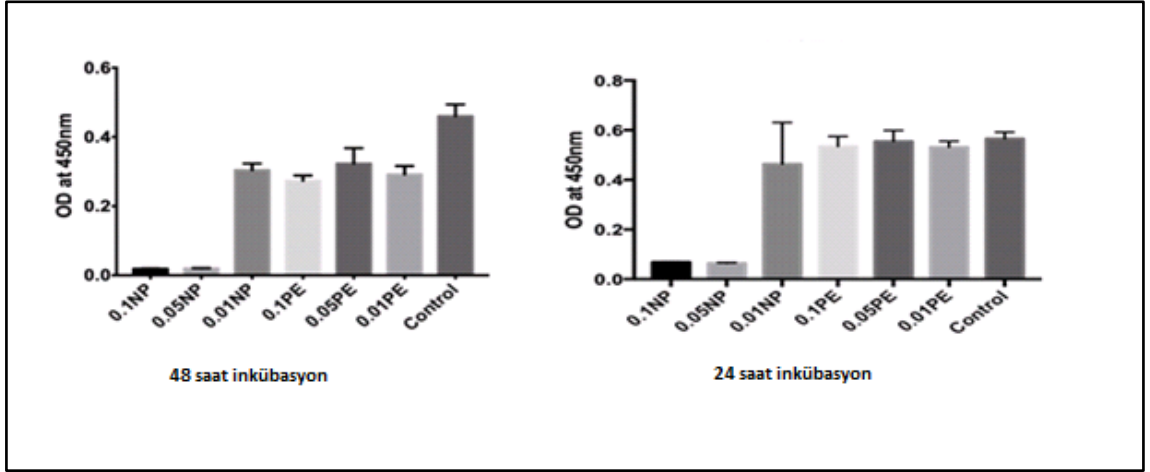
6.4 Yara İyileştirici Testler

6.4.1 Hücre Sitotoksikite Testi

Hücre sitotoksikite testi için hazırlanan 3 farklı konsantrasyondaki (0.1-0.05-0.01 mg/mL) bitki özütünden fitosentezlenmiş AgNP ve bitki ekstraktı hazırlanmış çözeltiler 24-48 saat C2C12 hücreleri ile muamele edilmiştir. Şekil 6.10'da görüldüğü üzere çalışmada 24 saat ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde yüksek konsantrasyonda gümüş nanopartiküllerin bitki ekstraktlarına göre büyük ölçüde sitotoksik etki gösterdiği, temas süresinin azalmasıyla birlikte bitki ekstraktı ve düşük konsantrasyon (0.01 mg/mL) AgNP'nin sitotoksik etkisinin azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 5.8 WST ajanıyla muamele edilmiş hücrelerin 24 ve 48. saatlerdeki durum

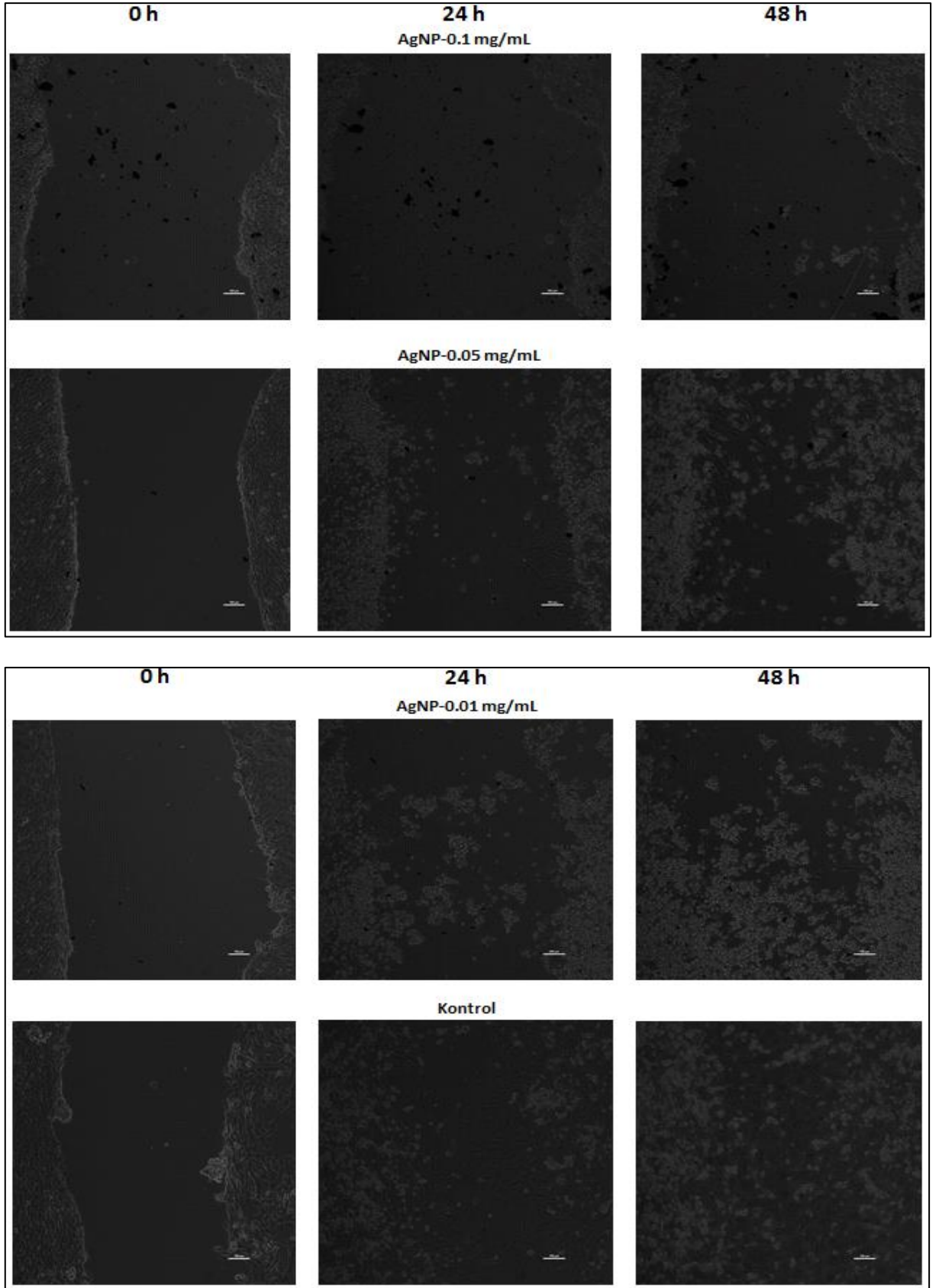


Şekil 6.10 24-48. saatlerde WST testi sonuçları

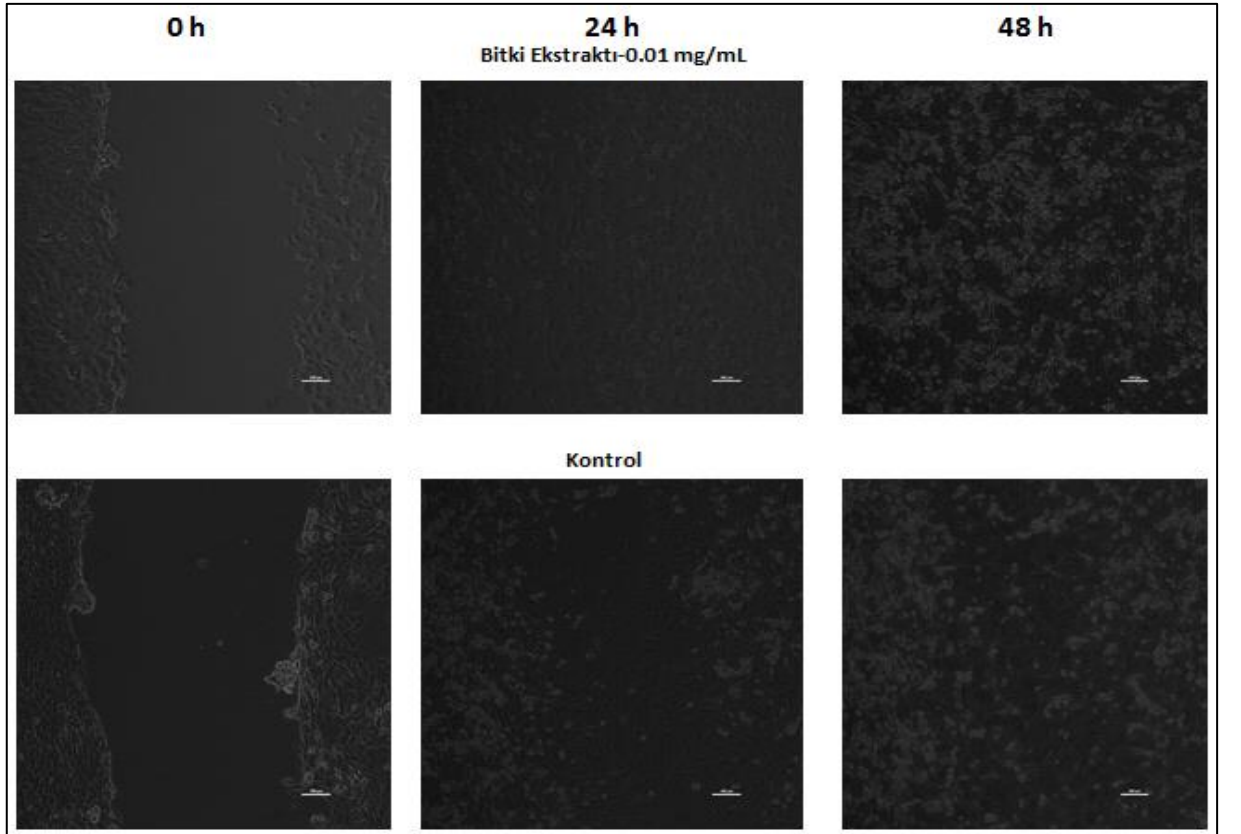
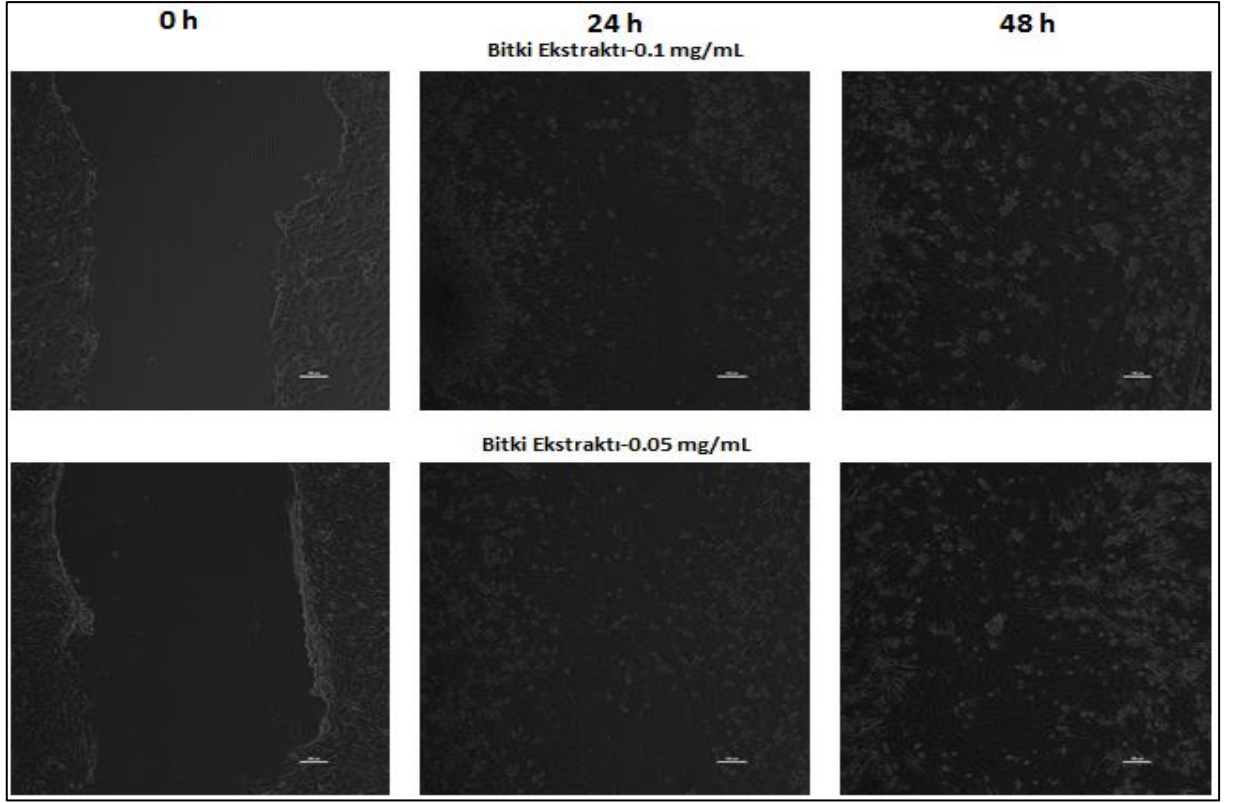
6.4.2 Hücre Migrasyon Testi

Hücre migrasyon testi için hazırlanan 3 farklı konsantrasyonda (0.1-0.05-0.01 mg/mL) bitki özütünden fitosentezlenmiş AgNP ve bitki ekstraktı çözeltileri hazırlanmış olup 0-24 ve 48. saatlerinde faz kontrast mikroskopunda incelenmiştir. AgNP'lerin hücre migrasyonu Şekil 6.11'de gösterilmiş olup 0.1 mg/mL AgNP'nin hücre migrasyonunu sağlamadığı gözlenmiştir. 48 saat sonunda 0.05 ve 0.01 AgNP'nin hücre migrasyonunu sağladığı ancak 0.01 mg/mL AgNP'de daha fazla migrasyon gerçekleştiği gözlenmiştir.

Bitki ekstraktlarının hücre migrasyonu Şekil 6.12'de gösterilmiş olup 0.01 mg/mL bitki ekstraktının kontrole en yakın şekilde yarada kapanmayı sağladığı tespit edilmiştir.



Şekil 6.11 0.1 ,0.05 ve 0.01 mg/mL AgNP'ün 0, 24 ve 48 saatlerindeki migrasyon görüntüleri



Şekil 6.12 0.1, 0.05 ve 0.01 mg/mL bitki ekstraktının 0, 24 ve 48 saatlerindeki migrosyon görüntüleri

SONUÇ VE ÖNERİLER

Plantago lanceolata bitkisinin rejenerasyonu için önceden yapılan çalışmalar referans alınmıştır. Bitki genotipi, ortam ve kullanılan kimyasalların kaynağından dolayı ortaya çıkan farklılıklar nedeni ile kullanılan BBD konsantrasyon ve kombinasyonları ve eksplant kaynakları yeniden modifiye edilmiştir [74]. Kotiledon, yaprak ve kök eksplantlarından kök gelişmesi için 5.71 μM 2,4-D kullanılmıştır. Fakat gelişme gözlenmemiştir. Diğer bir eksplant kaynağı olan hipokotil ve kotiledon eksplantlarında gövde gelişimi beklenirken daha önceki çalışmadan farklı olarak kök gelişimi gözlenmiş, yüksek konsantrasyonda BAP hormonunun kullanılmasıyla sürgün gelişmesi beklenen yaprak eksplantında ise gelişim gözlenmemiştir. Kültürün ilk aşamasında sitokinin ile karşılaştırıldığında oksin genellikle gerekli değildir, düşük konsantrasyonda sitokinin uygulaması ile birlikte pozitif sonuç vermektedir [77]. Yaptığımız çalışmada da yüksek konsantrasyonda BAP ve düşük konsantrasyonda NAA bitki büyüme düzenleyicileri birlikte kullanılmıştır. Kök gelişiminde NAA'nın BAP'a göre daha fazla etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Plantago major bitkisinin rejenerasyonu için önceki çalışmalar modifiye edilmiştir [78]. Yaprak ve kök eksplantlarından kök gelişimi sağlanması amacıyla 5.71 μM 2,4-D kullanılmış olup kallus gelişimi gözlenmiştir. Kipokotil ve kotiledon eksplantlarında ise kök gelişimi gözlenmiştir. *Plantago lanceolata* bitkisinde kullandığımız yüksek konsantrasyonda BAP ve düşük konsantrasyonda NAA bitki büyüme düzenleyicilerinden kök gelişiminde NAA'nın BAP'a göre daha fazla etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada bitki özütlerinden gümüş nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Sulu Ag^+ iyonlarının *Plantago major* ve *Plantago lanceolata* özütleri ile indirgenmesi UV tarafından görülebilir spektroskopi ve renk değişimi gözlemiyle kolayca analiz edilmiştir. İndirgeme işlemi sırasında AgNP'lerin oluşumu, reaksiyon çözeltisinin renginin görsel olarak gözlemlenebilen renksizden koyu kahverengiye değişmesiyle gözlemlenmiştir. *P. major* bitki ekstraktından sentezlenen nanopartiküller 440 nm'de

absorbsiyon bandı gösterirken iken, *P. lanceolata* bitkisinden sentezlenen nanopartikülün boyutu 418 nm’de absorbsiyon bandı göstermiştir.

Metal nanopartikül elektronlarının ışık dalgası ile rezonansa karşılıklı titreşimleri nedeniyle bir yüzey plazmon rezonans (SPR) absorbsiyon bandı veren serbest elektronları vardır. Bandların görünümü gümüş nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonansının özelliklerini gösterir. Bu bant, yüzey plazmonu titreşiminin uyarılması nedeniyle bölgedeki (400-450 nm) koloidal gümüş nanopartiküllerin absorbsiyonuna karşılık gelir. SPR bandının oluşumu boyut, şekil ve oluşan partiküller gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir [79]. SPR pikinin yoğunluğu zayıf ve bantının genişliğinin yüksek olması nanopartiküllerin oluştuğunu ve partikül boyutunda dağılımın geniş olduğunu göstermektedir [80].

Bununla birlikte *Plantago lanceolata* ve *Plantago major* bitkilerinden sentezlenen AgNP’lerin ve sulu bitki ekstraktlarının FTIR analizleriyle hem gümüş nanopartikülün hem de bitki ekstraktının sahip olduğu biyolojik moleküller tespit edilmiştir. Bu analizle birlikte gümüş nanopartikülün sentezinde indirgeme, sentezleme, kaplama ve stabilizasyon gibi faktörlerde rol alan fonksiyonel gruplar da belirlenmiştir. Yapılan çalışmada alkan (C-H gerilme), alken (C=C eğilme ve bükülme), alkin (C≡C gerilme) ve karbondioksit (O=C=O gerilme) gibi fonksiyonel gruplar standart IR korelasyon tablosu ile doğrulanmıştır. Analizde çıkan grupları destekleyen FTIR verileri, fitosentezlenmiş nanopartiküllerin stabilizasyon ve şekil kontrolünü sağlayan hem indirgeyici hem de stabilize edici ajan olarak hareket eden terpenoidler, polisakkaritler, fenolikler, alkaloidler, flavonlar, amino asitler, ve proteinler gibi biyomoleküller tarafından kapatıldığını ve stabilize edildiğini doğrulamıştır [81]. Bu nedenle bitki özütlerinin sahip olduğu tüm bu biyolojik moleküllerin, reaksiyon ortamındaki gümüş (AgNP’ler) nanopartiküllerin stabilizasyonu için olduğu kadar üretimi için de işlevleri yerine getirebileceği sonucuna varılabilir.

Çalışmada biyosentezlenmiş gümüş (AgNP’ler) nanopartiküllerin ortalama partikül boyut çapını (nm) belirlemek için Zeta boyutlandırıcı uygulanmıştır. DLS, mikrometre aralığından alt nanometre boyutlarına kadar olan parçacıkları ölçmek için en yaygın kullanılamdır [82]. Yapılan Zetasizer ölçümlerinde *P. lanceolata* bitkisinden sentezlenmiş nanopartiküllerin 100 nm’den küçük boyutlara sahip olduğu gözlenmiştir. Ancak *P. major* bitkisinden sentezlenen nanopartikülün ilk denemesinden sonraki çalışmalarda 100 nm boyutu altında sonuç alınamamıştır bunun sebebi olarak sentez

aşamasındaki parametrelerin *P. major* bitkisi için optimizasyonu sağlamayı gösterilebilir. Yapılan çalışmalarda bitki ekstraktının seçilmesinden sonra, partikül oluşumunu etkileyen ana parametrelerin ekstrakt konsantrasyonu, sıcaklık, metal tuzu, pH ve temas süresi olduğu belirtilmiştir [58].

Plantago lanceolata bitkisinden sentezlenen gümüş nanopartikülün antibakteriyel etkisi Gram negatif bakteri suşu olan *Escherichia coli* bakterisi üzerinde test edilmiştir. Antibakteriyel çalışmalar için mikrodilüsyon ve disk difüzyon methodları uygulanmıştır. Stok konsantrasyonu için 10 mL LB besiyerine 1 mg nanopartikül tozu eklenmiştir.

Gümüşün iyi bir antibakteriyel ajan olduğu bilinmektedir ancak gümüş kolloid parçacıklarının bakterilere karşı bakterisidal etkisinin mekanizması çok iyi bilinmemektedir. AgNP'lerin, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanlara benzer şekilde hareket etmesi mümkündür. Bu çalışmada bitki özütlerinden elde edilen AgNP'lerin antibakteriyel etkileri gözlenmiştir. Sentezlenen AgNP'ler hücre duvarı sentezine müdahale, protein sentezinin inhibisyonu, nükleik asit sentezine müdahale ve metabolik yolun inhibisyonu olmak üzere dört farklı etki mekanizması göstermiş olabilir [83].

Disk difüzyon yöntemi hızla çoğalan ve sık görülen bakterilerin yarı kantitatif in vitro duyarlılık testleri için kullanılmaktadır. Bu antibakteriyel çalışmada bitki özütlerinden sentezlenen AgNP, bitki ekstraktı ve kanamisin *E. coli* üzerindeki antibakteriyel etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak 0.1 mg/mL kanamisinin 12 mm inhibisyon çapı gözlenirken, AgNP'de 10 mm olarak gözlenmiştir.

Bir diğer antibakteriyel test olan mikrodilüsyon yöntemiyle antibakteriyel ajanların seri seyreltmesi yapılarak bakteri üremesini engellemek için antibakteriyel maddenin en düşük konsantrasyonu tespit etme deneyidir. Sonuçlarda yola çıkarak 500 mg/mL AgNP ve kanamisinin aynı ölçüde ve etkin bir antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Yapılan antibakteriyel bir çalışmada çözücü olarak etanol, kloroform ve hidroalkol kullanılmıştır. Etanol, kloroform ve hidro alkol arasında etanolün biraz daha yüksek inhibisyon bölgesi göstermiştir. Diğer çalışmada benzer bir sonuç bitki farklı olmasına rağmen etanolün, test edilen patojenlerin radyal büyümesini diğer çözücülerden büyük ölçüde azaltan en etkili çözücü olarak bulunduğu gösterilmiştir [87]. Bu çalışmadan yola çıkarak antibakteriyel etkiyi çözücü çeşidine bağlamak mümkündür. Suyun antibakteriyel etkisi olan maddeleri çözüp alamadığı ama diğer organik çözücülerin bitki özütü ile

birlikte antibakteriyel etkiye sahip etken maddeleri çözüp özüte kattığı söylenebilir. Amacımız tamamı ile doğal olan sentez aşamasında kimyasal madde kullanmadan elde edilen özütlerden sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antibakteriyel etkisini gözlemlemektir. *P. Major*'un antibakteriyel aktivitesini belirlemek için yapılan çalışmalarda, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etil asetat fraksiyonlarının, sulu fraksiyonlardan daha aktif olduğu bildirilmiştir. Diğer bir çalışmada ise metanol ve etanol bu bakterilere karşı antibakteriyel etkileri olduğu, sulu ekstraktın antibakteriyel etkisinin olmadığını gözlemlemiştir [88]. Burada antibakteriyel etkiyi çözücüye bağlamak mümkündür. Suyun antibakteriyel maddeleri iyi çözüp alamadığı ama diğer organik çözücülerin bitki özütü ile birlikte antibakteriyel etken maddeleri de çözüp özüte kattığı söylenebilir. Amacımız tamamı ile doğal kimyasal madde kullanmadan elde edilen özütlerden elde edilen nanopartiküllerin antibakteriyel etkisini gözlemektir. Biyoaktif ekstraktların kalitesi; ekstraksiyon prosesine, kullanılan solvente ve hammadde özelliklerine bağlıdır [89]. Literatürle kıyasladığımızda bu çalışmada *Plantago lanceolata* bitkisinin sulu ekstraktının antibakteriyel etki göstermediği doğrulanmıştır. *P. lanceolata* bitkisinin antibakteriyel etkisini daha iyi belirlemek amacıyla farklı ekstraksiyon yöntemlerinin denenmesi ve detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Gümüş nanopartiküllerin in-vitro sitotoksikite testi fare kas hücreleri (C2C12) üzerinde WST hücre canlılık testi aracılığıyla yapılmıştır. Sonuç olarak, 48 saatlik inkübasyon sonrasında 0.1 ve 0.05 mg/mL AgNP'nin etkin sitotoksikite etki gösterdiği, 0.01 mg/mL AgNP'nin ise çok düşük sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun dışında 0.1-0.05-0.01 mg/mL bitki ekstraktının da çok düşük seviyede sitotoksikite etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Benzer sonuçlar, Akta ve ark., (2006) tarafından, *P. lanceolata* ekstraktlarının neden olduğu mitotik indeksin azalmasıyla gözlemlenmiştir. Bu, sulu ekstrakttaki maddenin sitotoksik bir etkiye sahip olabileceğini gösterir [90]. Yapılan bir çalışmada *P. major* ekstraktının in vitro hücre çoğalmasını azalttığı kanıtlanmıştır [91]. *Plantago* türlerinin ekstraktları, birçok *Plantago* türünde bulunan ana flavonoid olarak luteolin 7-O- β -glukozitin varlığı nedeniyle farklı tümör hücre dizileri üzerinde sitotoksik bir etkiye sahiptir [92]. Yaptığımız çalışmada *P. lanceolata* bitkisinin sulu ekstraktının sitotoksik etki göstermesi literatürdeki çalışmalarla doğrulanmıştır.

24 saatlik inkübasyon sonrasında 0.1 ve 0.05 mg/mL AgNP'nin etkin sitotoksikite etki gösterdiği, 0.01 mg/mL AgNP'nin sitotoksik etki göstermediği gözlenmiştir. Bununla

birlikte 0.1-0.05-0.01 mg/mL bitki ekstraktının sitotoksik etki göstermediği gözlenmiştir. *P. major* ve *P. lanceolata* bitkilerinin MCF-7 hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada yaprak ekstraktlarının hücre proliferasyonunu azalttığı ve normal HUVEC hücreleri üzerinde de bazı etkileri olduğu gözlenmiştir. Bu araştırma, *P. major* ve *P. lanceolata*'nın önemli biyolojik olarak aktif bileşikler içerdiğini ve farklı ekstrakt konsantrasyonlarının çoğalmayı önleyici aktivite gösterdiğini göstermektedir [1]. Bir diğer çalışmada ise metanolik *P. lanceolata* yaprağı ekstraktı, üçlü negatif CAL51 hücrelerinin çoğalmasını önemli ölçüde inhibe etmiş, ancak diğer meme kanseri hücreleri üzerinde ise küçük bir etki göstermiş ve yüksek dozlarda sitopatik morfolojik değişikliklere neden olmuştur [93].

Yara iyileştirici etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan in vitro çizik (migrasyon) testi C2C12 fare kas hücreleri üzerinde *P. lanceolata* bitki ekstraktı ve AgNP'ün 3 farklı (0.1-0.05-0.01 mg/mL) konsantrasyonu uygulanmış olup 0-24-48 saatlerinde faz kontrast mikroskopuyla incelenmiştir.

0.1 mg/mL AgNP'nin sitotoksik etkisi geçen zamanla birlikte artmış olup hücre migrasyonu gözlenmemiştir. 48 saat sonunda 0.01 mg/mL AgNP'nin 0.05 mg/mL AgNP'ye göre daha fazla hücre migrasyonu gerçekleştirdiği gözlenmiştir. AgNP'lerin hücre migrasyonuna yönelik literatürde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada *Dendropanax morbifera* bitkisi kullanılarak sentezlenen AgNP'ün hücre apoptozunda bir artışa neden olduğu ve A549 hücrelerinin göçünde ise azalmayı etkilediği gözlenmiştir [94]. *Alternanthera tenella* bitki ekstraktı kullanılarak sentezlenen AgNP ise MCF-7 hücrelerinin göçünde önemli bir azalma göstermiştir [95]. Yapılan çalışmalarda AgNP'ün hücre göçünde etkili olmadığı belirtilmiştir. Yaptığımız çalışmada düşük konsantrasyonda *P. lanceolata* bitki ekstraktından sentezlenen AgNP'ün de hücre migrasyonunu sağladığı gözlenmiştir.

0.1 mg/mL bitki ekstraktının 48 saat sonra hücre göçünü sağlayarak yarayı kapattığı gözlenmiştir. 0.05 mg/mL bitki ekstraktının 0.1 mg/mL bitki ekstraktından daha etkili olduğu ve geçen süreyle yaranın kapandığı gözlenmiştir. En düşük konsantrasyon olan 0.01 mg/mL bitki ekstraktının kontrole en yakın şekilde yarada kapanmayı sağladığı tespit edilmiştir. Bitki ekstraktlarının belirli bileşiklerin süper optimal konsantrasyonu ile uygulanması, hücre çoğalmasını ve yer değiştirmesini engelleyebilir veya azaltabilir. Yapılan bir çalışmada *Plantago major* bitkisinin su, etanol ekstraktları hazırlanmış ve her iki ekstrakta en yüksek konsantrasyon (10.0 mg/mL)'da negatif kontrole kıyasla hücre

proliferasyonunu/göçünü önemli ölçüde önlediğini gösterilmiştir [96]. Bir diğer çalışmada *Astragalus* (10 ng/mL) ve *Simmondsia chinensis* (%5, v/v) tohumlarından elde edilen yüksek konsantrasyonlu bitki özleri daha az konsantre (1 ng/mL) ve (%1, h/h) ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunun ve göçünün daha düşük uyarılmasını üretmiştir [97], [98]. Yaptığımız çalışmada en düşük konsantrasyondaki bitki ekstraktının kontrole yakın hücre göçünü sağlaması literatürdeki çalışmalarla desteklenmiştir.

Bu çalışmada *Plantago lanceolata* bitkisi bitki doku kültüründe modifiye edilerek başarılı bir şekilde rejenere edilmiştir. Bu, tıbbi bitkileri elde etmek için sürekli doğaya bağımlı kalmama, laboratuvar şartlarında sürekli bitkiyi temin edebilme imkanı sağlamaktadır. Bu konuda bitkinin kök hücre yeteneğine sahip kallus adı verilen hücre serileri elde edilerek, elde edilecek AgNP'lerin kapsamlı antibakteriyel, sitotoksik, yara iyileştirici, migrasyon vs testleri özel bir hücre serisinde test etme çalışmaları yapılabilir. Bitkinin herhangi bir organik solvent kullanmadan su ile elde edilen özütünden AgNP sentezi gerçekleştirilmiştir. AgNP karakterizasyonu FTIR, Zetasizer ve UV spektroskopi analizleri ile kanıtlanmıştır. *Plantago lanceolata* bitkisinin doğal sulu özütlerinden AgNP sentezi ilk defa bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Fitosentezlenen AgNP içeren çözeltilerin antibakteriyel, sitotoksik, hücre migrasyon, yara iyileştirme etkileri incelenmiş sitotoksik etkilerinin doğal bitki ekstresinden daha etkili olduğu bulunmuştur. Böylece bitki özütünden AgNP'lerin sahip olduğu antimikrobiyal etkisinden dolayı tıbbi amaçlı olarak şıkullanılabileceği düşünülebilir. Ayrıca organik solventlerle elde edilecek özütlerden AgNP sentezi veya diğer metal nanopartikül sentezleri ile bitkinin sağlık etkileri incelenebilir.

- [1] S. D. Daştan, T. Daştan, S. Çetinkaya, D. Ateşşahin, and T. Karan, "Evaluation of In Vitro Anticancer Effect of *Plantago major* L. and *Plantago lanceolata* L. Leaf Extracts from Sivas," *Cumhur. Üniversitesi Sağlık Bilim. Enstitüsü Derg.*, 2016.
- [2] A. V Gaikwad, S. K. Singh, and R. Gilhotra, "Plant Tissue Culture-a Review," *Rev. Artic. J. Pharm. Res. Educ. J. homepage*, 2017.
- [3] C. A. Espinosa-Leal, C. A. Puente-Garza, and S. García-Lara, "In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds," *Planta*. 2018.
- [4] B. Bhushan, "Introduction to nanotechnology," *Springer Handbooks*. 2017.
- [5] I. Hussain, N. B. Singh, A. Singh, H. Singh, and S. C. Singh, "Green synthesis of nanoparticles and its potential application," *Biotechnology Letters*. 2016.
- [6] T. Winkelmann, T. Geier, and W. Preil, "Commercial in vitro plant production in Germany in 1985-2004," *Plant Cell. Tissue Organ Cult.*, 2006.
- [7] S. Suman, "Plant tissue culture: A promising tool of quality material production with special reference to micropropagation of banana," *Biochemical and Cellular Archives*. 2017.
- [8] A. El Meskaaoui, "Plant Cell Tissue and Organ Culture Biotechnology and Its Application in Medicinal and Aromatic Plants," *Med. Aromat. Plants*, 2013.
- [9] T. Efferth, "Biotechnology Applications of Plant Callus Cultures," *Engineering*. 2019.
- [10] A. Hussain, I. Ahmed, H. Nazir, and I. Ullah, "Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities," in *Recent Advances in Plant in vitro Culture*, 2012.
- [11] R. García-González, K. Quiroz, B. Carrasco, and P. Caligari, "Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges," *Cienc. e Investig. Agrar.*, 2010.
- [12] M. Elhiti, C. Stasolla, and A. Wang, "Molecular regulation of plant somatic embryogenesis," *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 2013.
- [13] N. R. Mustafa, W. De Winter, F. Van Iren, and R. Verpoorte, "Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures," *Nat. Protoc.*, 2011.
- [14] "Establishment of Cell Suspension Cultures and Plant Regeneration in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.)," *Turk. J. Botany*, 2014.
- [15] S. Bhatia, "Plant Tissue Culture," in *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, 2015.
- [16] V. V Korde, S. S. Dhas, and N. A. Gurave, "Hairy Root Culture: A Promising Approach in Biotransformation," *Pelagia Res. Libr. Asian J. Plant Sci. Res.*, 2016.
- [17] R. Tiwari and C. S. Rana, "Plant secondary metabolites: a review," *Int. J. Eng. Res. Gen. Sci.*, 2015.
- [18] Marisol Ochoa-Villareal, S. Howat, G. J. Loake, S. Hong, M. O. Jang, Y.W. Jin, E.K. Lee, "Plant cell culture strategies for the production of natural products," *BMB Rep.*, 2016.

- [19] Kabera J., Semana E., Mussa A., and He X., "Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties," *J. Pharm. Pharmacol.*, 2014.
- [20] L. B. Pickens, Y. Tang, and Y.-H. Chooi, "Metabolic Engineering for the Production of Natural Products," *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, 2011.
- [21] A. G. Atanasov, B. Waltenberger, E. M Pferschy-Wenzig, T. Linder, C. Wawrosch, P. Uhrin, V. Temml, L. Wang, S. Schwaiger, E. H. Heiss, J. M. Rollinger, D. Schuster, J. M. Breuss, V. Bochkov, M. D. Mihovilovic, B. Kopp, R. Bauer, V. M. Dirsch, H. Stuppne, "Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review," *Biotechnology Advances*. 2015.
- [22] D. L. Klayman, A. J. Lin, N. Acton, , J. P. Scovill, J.M Hoch, W. K. Milhous, A. S. Dobek, "Isolation of Artemisinin (Qinghaosu) from *Artemisia Annua* Growing in the United States," *J. Nat. Prod.*, 1984.
- [23] E. Leete and P. E. Nemeth, "The Biogenesis of the Alkaloids of *Colchicum*. I. The Incorporation of Phenylalanine into Colchicine," *J. Am. Chem. Soc.*, 1960.
- [24] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. Mcphail, "Plant Antitumor Agents.VI.The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*2," *J. Am. Chem. Soc.*, 1971.
- [25] R. G. Powell, S. P. Rogovin, and C. R. Smith, "Isolation of Antitumor Alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*," *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, 1974.
- [26] J. Hohmann, F. Evanics, L. Berta, and T. Bartók, "Diterpenoids from *Euphorbia peplus*," *Planta Med.*, 2000.
- [27] B. Baroli, M. G. Ennas, F. Loffredo, M. Isola, R. Pinna, and M. A. López-Quintela, "Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin," *J. Invest. Dermatol.*, 2007.
- [28] S. Hasan, "A Review on Nanoparticles : Their Synthesis and Types," *Res. J. Recent Sci. Res . J . Recent . Sci . Uttar Pradesh (Lucknow Campus)*, 2014.
- [29] M. S. Akhtar, J. Panwar, and Y. S. Yun, "Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, 2013.
- [30] A. K. Mittal, Y. Chisti, and U. C. Banerjee, "Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts," *Biotechnology Advances*. 2013.
- [31] S. Fahimirad, F. Ajalloueian, and M. Ghorbanpour, "Synthesis and therapeutic potential of silver nanomaterials derived from plant extracts," *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019.
- [32] S. Prabhu and E. K. Poulouse, "Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects," *Int. Nano Lett.*, 2012.
- [33] K. Chaloupka, Y. Malam, and A. M. Seifalian, "Nanosilver as a new generation of nanoprodukt in biomedical applications," *Trends in Biotechnology*. 2010.
- [34] R. Prasad, "Synthesis of Silver Nanoparticles in Photosynthetic Plants," *J. Nanoparticles*, 2014.
- [35] T. M. Benn and P. Westerhoff, "Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics," *Environ. Sci. Technol.*, 2008.

- [36] Q. Chaudhry, M. Scotter, J. Blackburn, B. Ross, A. Boxall, L. Castle, R. Watkins, R. Aitken, "Applications and implications of nanotechnologies for the food sector," *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 2008.
- [37] L. Ge, Q. Li, M. Wang, J. Ouyang, X. Li, and M. M. Q. Xing, "Nanosilver particles in medical applications: Synthesis, performance, and toxicity," *International Journal of Nanomedicine*. 2014.
- [38] K. M. M. Abou El-Nour, A. Eftaiha, A. Al-Warthan, and R. A. A. Ammar, "Synthesis and applications of silver nanoparticles," *Arabian Journal of Chemistry*. 2010.
- [39] S. Ahmed, M. Ahmad, B. L. Swami, and S. Ikram, "A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise," *Journal of Advanced Research*. 2016.
- [40] K. Sobolev and M. F. Gutiérrez, "How nanotechnology can change the concrete world," *Am. Ceram. Soc. Bull.*, 2005.
- [41] S. L. Pal, U. Jana, P. K. Manna, G. P. Mohanta, and R. Manavalan, "Nanoparticle: An overview of preparation and characterization," *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2011.
- [42] K. Parveen, V. Banse, and L. Ledwani, "Green synthesis of nanoparticles: Their advantages and disadvantages," in *AIP Conference Proceedings*, 2016.
- [43] K. Kalishwaralal, V. Deepak, S. R. K. Pandian, M. Kottaisamy, S. BarathManiKanth, B. Kartikeyan, S. Gurunathan, "Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Brevibacterium casei*," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2010.
- [44] M. Rafique, I. Sadaf, M. S. Rafique, and M. B. Tahir, "A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications," *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 2017.
- [45] P. Malik, R. Shankar, V. Malik, N. Sharma, and T. K. Mukherjee, "Green Chemistry Based Benign Routes for Nanoparticle Synthesis," *J. Nanoparticles*, 2014.
- [46] H. Duan, D. Wang, and Y. Li, "Green chemistry for nanoparticle synthesis," *Chem. Soc. Rev.*, 2015.
- [47] A. D. Dwivedi and K. Gopal, "Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, 2010.
- [48] Z. ur R. Mashwani, M. A. Khan, T. Khan, and A. Nadhman, "Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles," *Advances in Colloid and Interface Science*. 2016.
- [49] M. Shah, D. Fawcett, S. Sharma, S. K. Tripathy, and G. E. J. Poinern, "Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities," *Materials*. 2015.
- [50] K. N. Thakkar, S. S. Mhatre, and R. Y. Parikh, "Biological synthesis of metallic nanoparticles," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2010.
- [51] T. Luangpipat, I. R. Beattie, Y. Chisti, and R. G. Haverkamp, "Gold nanoparticles produced in a microalga," *J. Nanoparticle Res.*, 2011.

- [52] J. Xie, J. Y. Lee, D. I. C. Wang, and Y. P. Ting, "Silver nanoplates: From biological to biomimetic synthesis," *ACS Nano*, 2007.
- [53] A. Ahmad, M. I. Khan, S. Senapati, R. Kumar, R. Ramani, V. Srivinas, M. Sastry, "Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus* species," *Nanotechnology*, 2003.
- [54] A. Ahmad, S. Senapati, M. I. Khan, R. Kumar, and M. Sastry, "Extra-/Intracellular Biosynthesis of Gold Nanoparticles by an Alkalotolerant Fungus, *Trichothecium* sp.," *J. Biomed. Nanotechnol.*, 2006.
- [55] A. J. Love, V. Makarov, I. Yaminsky, N. O. Kalinina, and M. E. Taliany, "The use of tobacco mosaic virus and cowpea mosaic virus for the production of novel metal nanomaterials," *Virology*. 2014.
- [56] M. Gericke and A. Pinches, "Microbial production of gold nanoparticles," *Gold Bull.*, 2006.
- [57] M. Kowshik, S. Ashtaputre, S. Kharrazi, W. Vogel, J. Urban, K. M. Panikar., "Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3," *Nanotechnology*, 2003.
- [58] P. Singh, Y. J. Kim, D. Zhang, and D. C. Yang, "Biological Synthesis of Nanoparticles from Plants and Microorganisms," *Trends in Biotechnology*. 2016.
- [59] J. L. Gardea-Torresdey, K. J. Tiemann, G. Gamez, K. Dokken, S. Tehuacanero, and M. José-Yacamán, "Gold nanoparticles obtained by bio-precipitation from gold(III) solutions," *J. Nanoparticle Res.*, 1999.
- [60] J. J. Mock, M. Barbic, D. R. Smith, D. A. Schultz, and S. Schultz, "Shape effects in plasmon resonance of individual colloidal silver nanoparticles," *J. Chem. Phys.*, 2002.
- [61] V. Armendariz, I. Herrera, J. R. Peralta-videa, M. Jose-yacaman, H. Trioani, P. Santiago, J. L. Gardea-Torresday, "Size controlled gold nanoparticle formation by *Avena sativa* biomass: Use of plants in nanobiotechnology," *J. Nanoparticle Res.*, 2004.
- [62] M. Gericke and A. Pinches, "Biological synthesis of metal nanoparticles," *Hydrometallurgy*, 2006.
- [63] S. P. Dubey, M. Lahtinen, and M. Sillanpää, "Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles," *Process Biochem.*, 2010.
- [64] X. Yang, Q. Li, H. Wang, J. Huang, L. Lin, W. Wang, D. Sun, Y. Su, J. B. Opiyo, L. Hong, Y. Wang, N. He, L. Jia, "Green synthesis of palladium nanoparticles using broth of *Cinnamomum camphora* leaf," *J. Nanoparticle Res.*, 2010.
- [65] S. P. Chandran, M. Chaudhary, R. Pasricha, A. Ahmad, and M. Sastry, "Synthesis of Gold Nanotriangles and Silver Nanoparticles Using Aloe vera Plant Extract," *Biotechnol. Prog.*, vol. 22, no. 2, pp. 577–583, Apr. 2006.
- [66] A. López-Serrano, R. M. Olivas, J. S. Landaluze, and C. Cámara, "Nanoparticles: A global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact," *Anal. Methods*, 2014.
- [67] M. Ahamed, M. A. Majeed Khan, M. K. J. Siddiqui, M. S. Alsulhi, and S. A. Alrokayan, "Green synthesis, characterization and evaluation of biocompatibility of silver nanoparticles," *Phys. E Low-Dimensional Syst. Nanostructures*, 2011.

- [68] X. Liu, P. Lee, C. Ho, V. C. H. Lui, Y. Chen, C. Che, P. K. H. Tam, K. K. Y. Wong, "Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing," *ChemMedChem*, 2010.
- [69] J. Tian, K. K. Wong, C. M. Ho, C. N. Lok, W. Y. Yu, C. M. Che, J. F. Chiu, P. K. Tam, "Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing," *ChemMedChem*, 2007.
- [70] D. M. Caruso, P. Silverstein, J. R. Antimarino, G. Bauer, S. A. Blome-Eberwein, D. N. Herndon, A. Luterman, J. A. Twomey, K.N. Foster, B. Hildebrand, "Randomized Controlled Study of Silver Dressing Effects on Partial-Thickness Burn Outcomes," *J. Burn Care Res.*, 2006.
- [71] A. Adan, Y. Kiraz, and Y. Baran, "Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 17, no. 14, pp. 1213–1221, Nov. 2016.
- [72] C. C. Liang, A. Y. Park, and J. L. Guan, "In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro," *Nat. Protoc.*, 2007.
- [73] T. Sandle, "Antibiotics and preservatives," in *Pharmaceutical Microbiology*, Elsevier, 2016, pp. 171–183.
- [74] K. M. Khawar, E. Sarhin, C. Sevimay, S. Cocu, I. Parmaksiz, S. Uranbey, A. Ipek, "Adventitious shoot and regeneration and micropropagation of *Plantago lanceolata* L.," *Period. Biol.*, 2005.
- [75] "Bitkilerde Büyüme ve Gelişmesini Düzenleyici Maddeler: Bitki Hormonları," *İğdır Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Derg.*, 2011.
- [76] Y. Song, "Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide," *J. Integr. Plant Biol.*, 2014.
- [77] Dr Muhammad Nur Azimi Bin Azizan, "The Effect of BAP and NAA Treatment on Micropropagation of *Cucumis sativus* L.," *Int. J. Sci. Res.*, 2017.
- [78] F. Fons, A. Gargadennec, and S. Rapior, "Culture of *Plantago* species as bioactive components resources: A 20-year review and recent applications," *Acta Bot. Gall.*, 2008.
- [79] P. Mulvaney, "Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles," *Langmuir*, 1996.
- [80] B. Rao and R. C. Tang, "Green synthesis of silver nanoparticles with antibacterial activities using aqueous *Eriobotrya japonica* leaf extract," *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, 2017.
- [81] V. K. Sharma, R. A. Yngard, and Y. Lin, "Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities," *Advances in Colloid and Interface Science*. 2009.
- [82] M. Kaszuba, D. McKnight, M. T. Connah, F. K. McNeil-Watson, and U. Nobbmann, "Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering," *J. Nanoparticle Res.*, 2008.
- [83] F. C. Tenover, "Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria," *Am. J. Med.*, 2006.

- [84] E. Matuschek, D. F. J. Brown, and G. Kahlmeter, "Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories," *Clin. Microbiol. Infect.*, 2014.
- [85] D. Olila, Olwa-Odyek, and J. Opuda-Asibo, "Antibacterial and antifungal activities of extracts of *Zanthoxylum chalybeum* and *Warburgia ugandensis*, Ugandan medicinal plants.," *Afr. Health Sci.*, 2001.
- [86] M. E. S. Tchana, A. G. Fankam, V. Kuete, A. T. Mbaveng, J. A. Seukep, F. K. Tchouani, B. Nyasse, E. T. Nkwengoua, "Activities of selected medicinal plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria in Cameroon," *Afr. Health Sci.*, 2014.
- [87] A. Abera, F. Lemessa, and D. Muleta, "The antifungal activity of some medicinal plants against coffee berry disease caused by *colletotrichum kahawae*," *Int. J. Agric. Res.*, 2011.
- [88] E. Kassaw, T. Yohannes, and E. Bizualem, "In-Vitro Antibacterial Activity of *Plantago Lanceolata* Against Some Selected Standard Pathogenic Bacterial," *Int. J. Biotechnol.*, 2018.
- [89] S. Mazzutti, C. A. S. Riehl, E. Ibañez, and S. R. S. Ferreira, "Green-based methods to obtain bioactive extracts from *Plantago major* and *Plantago lanceolata*," *J. Supercrit. Fluids*, 2017.
- [90] T. Aşkin Çelik and Ö. S. Aslantürk, "Anti-mitotic and anti-genotoxic effects of *Plantago lanceolata* aqueous extract on *Allium cepa* root tip meristem cells," *Biologia (Bratisl.)*, 2006.
- [91] R. J. Krueger, "Drugs of Natural Origin. A Textbook of Pharmacognosy. 5th Edition By Gunnar Samuelson. Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm. 620 pp. 17 × 25 cm. \$70.00. ISBN 91-9743-184-2.," *J. Nat. Prod.*, 2005.
- [92] A. Ždralović, A. Mesic, I. Eminović, and A. Parić, "Cytotoxic and genotoxic activity of *Plantago major* L. Extracts," *Caryologia*, 2019.
- [93] K. M. Alsaraf, M. H. Mohammad, A. M. Al-Shammari, and I. S. Abbas, "Selective cytotoxic effect of *Plantago lanceolata* L. against breast cancer cells," *J. Egypt. Natl. Canc. Inst.*, 2019.
- [94] V. Castro Aceituno, S. Ahn, S. Y. Simu, C. Wang, R. Mathiyalagan, and D. C. Yang, "Silver nanoparticles from *Dendropanax morbifera* Léveillé inhibit cell migration, induce apoptosis, and increase generation of reactive oxygen species in A549 lung cancer cells," *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.*, 2016.
- [95] P. Sathishkumar, K. Vennila, R. Jayakumar, A. R. M. Yusoff, T. Hadibarata, and T. Palvannan, "Phyto-synthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera tenella* leaf extract: An effective inhibitor for the migration of human breast adenocarcinoma (MCF-7) cells," *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2016.
- [96] M. Zubair, A. Ekholm, H. Nybom, S. Renvert, C. Widen, and K. Rumpunen, "Effects of *Plantago major* L. leaf extracts on oral epithelial cells in a scratch assay," *J. Ethnopharmacol.*, 2012.
- [97] E. Ranzato, S. Martinotti, and B. Burlando, "Wound healing properties of jojoba liquid wax: An in vitro study," *J. Ethnopharmacol.*, 2011.

- [98] C. Sevimli-Gür, R. Genç, E. Bedir, İ. Deliloğlu-Gürhan, İ. Onbaşlar, P. Atilla, N. Çakar, “In vitro growth stimulatory and in vivo wound healing studies on cycloartane-type saponins of *Astragalus* genus,” *J. Ethnopharmacol.*, 2011.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

İletişim Bilgisi: sy.sultanyilmaz@gmail.com

Konferans Bildirileri

1. Sultan YILMAZ, Musa TÜRKER. Plantago lanceolata Bitki Ekstraktı Kullanılarak Gümüş Nanoparçacık Sentezi ve Sentezlenen Nanoparçacığın Antibakteriyel ve Yara İyileştirici Etkisinin Belirlenmesi. 2nd International Ankara Conference on Scientific Research. Ankara/TÜRKİYE, 6-8 Mart 2020, Sayfa: 421-422