

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ROSMARINUS OFFICINALIS, MENTHA PIPERITA, SYZGIUM
AROMATICUM* BİTKİ EKSTRAKTLARI ARACILIĞI İLE GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLLERİNİN YEŞİL SENTEZİ VE *STREPTOCOCCUS
SANGUINIS*'E KARŞI ANTİMİKROBİYAL ANTİBİYOFİLM VE
ANTİVİRÜLANS AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Büşra Merve SARITAŞ

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Mikrobiyoloji Programı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ

2024

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ROSMARINUS OFFICINALIS, MENTHA PIPERITA, SYZGIUM
AROMATICUM* BİTKİ EKSTRAKTLARI ARACILIĞI İLE GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLLERİNİN YEŞİL SENTEZİ VE *STREPTOCOCCUS
SANGUINIS*'E KARŞI ANTİMİKROBİYAL ANTİBİYOFİLM VE
ANTİVİRÜLANS AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Büşra Merve SARITAŞ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Mikrobiyoloji Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI

Destekleyen Kurum: KOÜ BAPSIS- 3288

Etik Kurul Onayı: KÜ GOKAEK 2023/62

KOCAELİ

2024

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: *Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita*, *Syzgium aromaticum* Bitki Ekstraktları Aracılığı ile Gümüş Nanopartiküllerinin Yeşil Sentezi ve *Streptococcus sanguinis*'e Karşı Antimikrobiyal Antibiyofilm ve Antivirölans Aktivitelerinin Araştırılması

Tez Yazarı: Büşra Merve SARITAŞ

Tez Savunma Tarihi: 10.06.2024

Tez Danışmanı: Fetiye KOLAYLI

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		
ÜNVANI	ADI SOYADI	İMZA
BAŞKAN (ÜYE)		
DANIŞMAN		
ÜYE		
ÜYE		
ÜYE		
ÜYE		

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.... /.... /20...

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

***Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita*, *Syzygium aromaticum* Bitki Ekstraktları Aracılığı ile Gümüş Nanopartiküllerinin Yeşil Sentezi ve *Streptococcus sanguinis*'e Karşı Antimikrobiyal Antibiyofilm ve Antivirölans Aktivitelerinin Araştırılması**

Amaç: *S. sanguinis*, diş yüzeyine kolonize olan ilk streptokoklardan biridir. Biyofilm oluşumunda öncü kolonizer olarak görev almaktadır. *S. sanguinis* aynı zamanda enfektif endokardit, bakteriyemi, menenjit gibi hastalıklara neden olan fırsatçı bir patojendir. Bu araştırmada *S. sanguinis*'e etkili gargara ve diş macunu gibi malzemelerin içeriğinde kullanılabilecek gümüş nanopartiküllerin sentezlenmesi amaçlanmış olup; oluşturulan gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal, antibiyofilm, sitotoksik ve gen ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

Yöntem: AgNP'ler *R. officinalis*, *M. piperita*, *S. aromaticum* bitki ekstraktları kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle sentezlenmiştir. AgNP'lerin karakterizasyonu için Ultra Viyole Görünür Bölge Spektroskopisi, Geçirimli Elektron Mikroskobu, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi, X-Işını Difraktometresi, SEM-EDS kullanılmıştır. AgNP'lerin *S. sanguinis* üzerine antimikrobiyal etkileri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle, antibiyofilm etkileri kristal viyole yöntemi ve SEM ile belirlenmiştir. AgNP'lerin fare fibroblast L929 hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri MTT hücre canlılığı testi ile değerlendirilmiştir. *S. sanguinis*'in farklı AgNP'ler ile 24 saat boyunca muamele edilmesinin *spxB* gen ekspresyonundaki değişiklikler Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile tespit edilmiş, $\Delta\Delta Ct$ yöntemiyle gen ekspresyon düzeyindeki değişiklikler göreceli olarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular: AgNP'lerin sentezi renk değişikliği ile doğrulanmış ve diğer karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. UV-Vis karakterizasyonu sonucunda *R. officinalis*, *M. piperita*, *S. aromaticum* AgNP'lerin sırasıyla 440, 450 ve 460 nm dalga boyunda spektrum gösterdiği; TEM analizinde ortalama partikül boyutlarının sırasıyla 39 ± 13 , 24 ± 6 , 26 ± 9 nm olduğu ve küresel şekilli AgNP'lerin olduğu görülmüştür. SEM-EDS analizinde AgNP'lerin küresel yapıda ve başlıca elementin Ag olduğu tespit edilmiş, XRD analizinde gümüşe özgü yüzey

merkezli kübik ve kristal yapıda olduğunu gösteren 4 pik gözlenmiştir. FTIR analizinde ekstraktların AgNP'lere indirgenmesi sonucunda çeşitli gruplara ait spektrumlar gözlenmiştir. Bu özelliklerine göre yeşil sentez AgNP'lerin üçünün de nanopartikül olma özelliği taşıdığı belirlenmiştir. Karakterizasyonu tamamlanan AgNP'lerin biyolojik etkileri araştırılmıştır. *R. officinalis* AgNP'lerin MİK değeri 256 µg/mL olarak bulunmuş, antibiyofilm etki gösterdiği belirlenmiştir. SEM görüntülerinde pozitif kontrole kıyasla biyofilm oranında azalma görülmüştür. *R. officinalis* AgNP'lerin 1/4 MİK konsantrasyonunda (64 µg/mL) muamele edilen *S. sanguinis*'in; *spxB* gen ekspresyonunda artış görülmüştür. EC50 değeri 298,2 µg/mL olarak hesaplanmıştır. *M. piperita* AgNP'lerin MİK değeri 128 µg/mL olarak bulunmuş, biyofilmi düşük konsantrasyonlarda dahi inhibe ettiği tespit edilmiştir. *M. piperita* AgNP'lerin 1/4 MİK konsantrasyonunda (32 µg/mL) muamele edilen *S. sanguinis*'in; *spxB* gen ekspresyonunda ise azalma görülmüştür. EC50 değeri 35,32 µg/mL olarak hesaplanmıştır. *S. aromaticum* AgNP'lerin MİK değeri 128 µg/mL olarak bulunmuş biyofilmi düşük konsantrasyonlarda dahi inhibe ettiği tespit edilmiştir. *S. aromaticum* AgNP'lerin 1/4 MİK konsantrasyonunda (32 µg/mL) muamele edilen *S. sanguinis*'in; *spxB* geninin ekspresyonunda azalma görülmüştür. EC50 değeri 50,51 µg/mL olarak hesaplanmıştır.

Sonuç: Kullanılan bitkilerden sentezlenen AgNP'lerin boyut ve şekillerinin biyolojik özelliklerini etkilediği görülmüştür. *R. officinalis* AgNP'lerin boyutlarının büyük olması sitotoksik etkiyi azalttığı gibi antimikrobiyal ve antibiyofilm etkilerini de azalttığı belirlenmiştir. *S. aromaticum* ve *M. piperita* AgNP'lerin daha küçük boyutlarda sentezlendiği ve aynı MİK değerine sahip olduğu görülmüştür. *S. aromaticum* AgNP'lerin ayrıca sub-MİK değerinde biyofilmi güçlü bir şekilde inhibe ettiği ve bu konsantrasyonda sitotoksik etkisinin de *M. piperita* AgNP'lere göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu nedenle *S. aromaticum* AgNP'lerin diş hekimliğinde ağız gargarası, diş macunu veya dolgu materyalleri için antimikrobiyal ve antibiyofilm özellik taşıyan NP'ler olarak geliştirilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: *S. sanguinis*, Gümüş nanopartiküller, Antimikrobiyal aktivite, Antibiyofilm aktivite, Sitotoksiste.

ABSTRACT

Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita*, *Syzgium aromaticum* plant extracts mediated green synthesis of silver nanoparticles and investigation of their antimicrobial, antibiofilm and antivirulence activity against *Streptococcus sanguinis

Objective: *S. sanguinis* is one of the first streptococci to colonize the tooth surface. It acts as a precursor colonizer in biofilm formation. *S. sanguinis* is also an opportunistic pathogen that causes diseases such as infective endocarditis, bacteremia and meningitis. In this study, it was aimed to synthesise silver nanoparticles that can be used in the content of materials such as mouthwash and toothpaste effective against *S. sanguinis*; the effects of the formed silver nanoparticles on antimicrobial, antibiofilm, cytotoxic and gene expression were investigated.

Methods: AgNPs were synthesised by green synthesis method using *R. officinalis*, *M. piperita*, *S. aromaticum* plant extracts. Ultra-Violet Visible Spectroscopy, TEM, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, X-Ray Diffractometer, SEM-EDS were used for the characterization of AgNPs. Antimicrobial effects of AgNPs on *S. sanguinis* were determined by liquid microdilution method and antibiofilm effects were determined by crystal violet method and SEM. The cytotoxic effects of AgNPs on mouse fibroblast L929 cell line were evaluated by MTT cell viability assay. The changes in *spxB* gene expression of *S. sanguinis* treated with different AgNPs for 24 hours were determined by Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction and the relative changes in gene expression level were compared by $\Delta\Delta CT$ method.

Results: Synthesis of AgNPs was confirmed by colour change and further characterization was performed. UV-Vis characterization of *R. officinalis*, *M. piperita*, *S. aromaticum* AgNPs showed spectra at wavelengths of 440, 450 and 460 nm, respectively; TEM analysis showed the formation of spherical shaped AgNPs with average particle sizes of 39 ± 13 , 24 ± 6 , 26 ± 9 nm, respectively. In SEM-EDS analysis, it was determined that AgNPs were spherical in structure and the main element was Ag. 4 peaks were observed in XRD analysis, indicating that AgNPs had a silver-specific surface-centred cubic and crystalline structure. In FTIR analysis, spectra belonging to various groups were observed as a result of the reduction of the extracts to AgNPs. According to these properties, it was determined that all three of the green synthesised AgNPs were characterized as nanoparticles. The biological

effects of the characterized AgNPs were investigated. The MIC value of *R. officinalis* AgNPs was found to be 256 µg/mL and it was determined that they showed antibiofilm effect. SEM images showed a decrease in biofilm ratio compared to the positive control. *S. sanguinis* treated at 1/4 MIC concentration (64) showed an increase in *spxB* gene expression. EC50 value was calculated as 298.2 µg/mL. The MIC value of *M. piperita* AgNPs was found to be 128 µg/mL, and it was found to inhibit biofilm even at low concentrations. *S. sanguinis* treated at 1/4 MIC concentration (32 µg/mL) showed a decrease in *spxB* gene expression. EC50 value was calculated as 35.32 µg/mL. The MIC value of *S. aromaticum* AgNPs was found to be 128 µg/mL and it was determined that it inhibited biofilm even at low concentrations. *S. sanguinis* treated at 1/4 MIC concentration (32 µg/mL) of *S. aromaticum* AgNPs showed a decrease in the expression of *spxB* gene. EC50 value was calculated as 50.51 µg/mL

Conclusion: It was observed that the size and shape of AgNPs synthesised from the plants used affect their biological properties. The large size of *R. officinalis* AgNPs decreased the cytotoxic effect and also decreased the antimicrobial and antibiofilm effects. *S. aromaticum* and *M. piperita* AgNPs were synthesised in smaller sizes and had the same MIC value. It was also found that *S. aromaticum* AgNPs strongly inhibited biofilm at sub-MIC value and its cytotoxic effect at this concentration was lower than *M. piperita* AgNPs. Therefore, it is thought that *S. aromaticum* AgNPs can be developed as NPs with antimicrobial and antibiofilm properties for mouthwash, toothpaste or filling materials in dentistry.

Key words: *S. sanguinis*, Silver nanoparticles, Antimicrobial activity, Antibiofilm activity, Cytotoxicity.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim süresince tecrübeleriyle yanımda olan tezimin planlanması ve yürütülmesinde bilgi ve hoşgörüsünü esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI'ya, saygıdeğer hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zeki YUMUK'a,

Eğitimimde karşılaştığım her zorlukta desteklerini aktaran, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan saygıdeğer hocalarım; Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ, Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ, Prof. Dr. Fatma BUDAK, Prof. Dr. Devrim DÜNDAR, Dr. Öğr. Üyesi Erdener BALIKÇI'ya,

Tezin deney aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Hüseyin UZUNER, Dr. Öğretim Üyesi Aybek YİĞİT, Prof. Dr. Ramazan ERENLER, Dr. Öğretim Üyesi Ayşe KARACALI TUNÇ, Dr. Mehmet SARIHAN ve Dr. Öğretim Üyesi Doğanhan Kadir ER'e,

Tez projemdeki desteği için Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Bu zorlu süreçte destekleri için annem Melek SARITAŞ babam Murat SARITAŞ başta olmak üzere sevgili ailem ve değerli arkadaşlarımdan hepsine çok teşekkür ediyorum.

ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita*, *Syzygium aromaticum* bitki ekstraktları aracılığı ile gümüş nanopartiküllerinin yeşil sentezi ve *Streptococcus sanguinis*'e karşı antimikrobiyal antibiyofilm ve antivirülans aktivitelerinin araştırılması” başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin vb.) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

..... / / 20....

Büşra Merve SARITAŞ

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
ORJİNALLİK BİLDİRİMİ	ix
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xviii
1. GİRİŞ	1
1.1. Streptokoklar	1
1.1.1 Streptokokların Sınıflandırılması	1
1.1.2 Viridans Streptokoklar	2
1.1.3. Viridans Grubu Streptokokların Sınıflandırılması:	2
1.1.4. <i>Streptococcus sanguinis</i>	3
1.1.5. <i>S. sanguinis</i> Biyofilmi	4
1.1.6. <i>S. sanguinis</i> 'in Neden Olduğu Hastalıklar	5
1.1.6.1. Diş Çürüğü	5
1.1.6.2 Enfektif Endokardit	5
1.2. Nanoteknoloji	7
1.2.1. Nanomalzemelerin Sınıflandırılması	8
1.2.2. NP'lerin Sınıflandırılması	8
1.2.2.1. Organik NP'ler	9
1.2.2.2. İnorganik NP'ler	9

1.2.2.3. Karbon temelli NP'ler	10
1.3. Gümüş Nanopartiküller	11
1.4 Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri	11
1.4.1 NP'lerin Bitkiler ile Sentezi	14
1.5. Biyolojik Sentezlenen NP'lerin Karakterizasyonu	16
1.6. AgNP'lerin Antimikrobiyal Etkileri ve Mekanizmaları	17
1.7. AgNP'lerin Antibiyofilm Etkileri ve Mekanizması	19
1.8. <i>Rosmarinus officinalis</i> (Biberiye) Bitkisi	20
1.9 <i>Mentha piperita</i> (Nane) Bitkisi	21
1.10. <i>Syzygium aromaticum</i> (Karanfil) Bitkisi	23
2. AMAÇ	25
3. YÖNTEM	26
3.1. Besiyerlerinin, Ayıraçların ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	26
3.1.1. Brain Heart Infusion Agar (BHIA)	26
3.1.2. Brain Heart Infusion Broth (BHIB)	26
3.1.3. %2'lik Sükrozlu Brain Heart Infusion Broth (BHIBS)	26
3.1.4. Kristal Viyole Solüsyonu	26
3.1.5. Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	26
3.1.6. %1'lik sülfürik asit çözeltisinin hazırlanması	27
3.1.7. BaCl ₂ çözeltisinin hazırlanması	27
3.1.8. 0,5 McFarland standardı hazırlanması	27
3.1.9. Resazurin hazırlanması	27
3.2. Bitki ekstraktlarının hazırlanması	27
3.3. Gümüş nanopartiküllerin yeşil sentezi	27
3.4 Gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu	28
3.4.1. UV-Vis Analizi	28

3.4.2. TEM Analizi	29
3.4.3. SEM-EDS Analizi	29
3.4.4. XRD Analizi	29
3.4.5. FT-IR Analizi	29
3.5. <i>R. officinalis</i> , <i>M.piperita</i> , <i>S. aromaticum</i> AgNP'lerin Antimikrobiyal Etkileri	29
3.5.1 Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması	29
3.5.2. AgNP'lerin Minimum İnhibitör Konsantrasyonu ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyon'larının Belirlenmesi	30
3.5.3. Resazurin Yöntemi	30
3.6. AgNP'lerin Antibiyofilm Etkileri	31
3.6.1. AgNP'lerin biyofilm üzerine etkilerinin SEM ile görüntülenmesi	31
3.7. Sitotoksisite Deneyleri	32
3.8. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile gen ekspresyon analizi	34
3.8.1. RNA İzolasyonu	35
3.8.2. İzole Edilen RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	36
3.8.3. cDNA Sentezi	36
3.8.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR	37
3.9. İstatistiksel Analiz	39
3.10. Etik Kurul Onayı	39
4. BULGULAR	40
4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi	40
4.2. Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	44
4.2.1. TEM Analizi	44
4.2.2. SEM-EDS Analizi	46
4.2.3. FTIR Analizi	49
4.2.4 XRD Analizi	53

4.3. AgNP’lerin Antimikrobiyal Etkinlik Sonuçları	55
4.4. AgNP’lerin Biyofilm Üzerine Etkisi	56
4.4.1. AgNP’lerin biyofilm üzerine etkisinin SEM ile gösterilmesi	56
4.5. AgNP’lerin Sitotoksik Etkileri	57
4.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (kGZ-PZR)	58
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	69
7. KAYNAKLAR	70
8. ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EKLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C : Santigrat Derece

% : Yüzde

Ag : Gümüş

Ag⁺ : Gümüş iyonları

AgNP : Gümüş Nanopartikül

ATCC: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu

CHX : Klorheksidin

cDNA : Komplementer deoksiribonükleik asit

DMEM : Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu

DMSO : Dimetil sülfoksit

Dpbs: Dulbecco'nun Fosfat Tampon Solüsyonu

dk : Dakika

EC50 : Etkin İlaç Konsantrasyonu

FBS : Fetal Sığır Serumı

FT-IR: Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi

FTS : Fizyolojik Tuzlu Su

kGZ-PZR : Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

keV : kilo elektronvolt

MBK : Minimum Bakterisidal Konsantrasyonu

mg : Miligram

MİK : Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

mM : Milimolar

ml : Mililitre

MTT : 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid

nm : Nanometre

OD : Optik dansite

$\mu\text{g/ml}$: Mikrogram/mililitre

μL : Mikrolitre

PBS : Fosfat Tampon Solüsyonu

PZR : Polimeraz zincir reaksiyonu

Rpm : Dakikadaki Devir Sayısı

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

Sn: saniye

SPR : Yüzey Plazmon Rezonansı

TEM : Geçirimli Elektron Mikroskobu

UV-Vis : Ultra viyole-Görünür Bölge

XRD : X-Işını Kırınımı Difraktometresi

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. <i>S. sanguinis</i> biyofilminin oluşmasında genlerin rolü.....	5
Şekil 1.2. Metalik nanopartiküllerin sınıflandırılması	11
Şekil 1.3. NP sentez yöntemleri Cezaroğlu (2022)'den alınmıştır.....	12
Şekil 1.4. NP sentez mekanizmasının şablonu (M+ metal iyon)	14
Şekil 1.5. AgNP'lerin bakteriyel büyümeye ve çoğalmalara karşı tahmin edilen etki mekanizması Rahman ve ark. (2019)'dan alınmıştır.....	19
Şekil 1.6. <i>R. officinalis</i> bitkisinin genel görünümü	20
Şekil 1.7. <i>M. piperita</i> bitkisinin genel görünümü	22
Şekil 1.8. <i>S. aromaticum</i> bitkisinin çiçeği ve kurutulmuş hali.....	23
Şekil 3.1. <i>M. piperita</i> AgNP sentezi ve karakterizasyonu şematik gösterimi	28
Şekil 3. 2. AgNP'ler ile muamele edilmiş hücrelerin 96 kuyucuklu mikropalak görüntüsü	33
Şekil 3. 3. MTT ekledikten sonra 4 saat inkübasyon sonucu	34
Şekil 3. 4. DMSO ekledikten sonra mikropalak görüntüsü	34
Şekil 4.1. <i>R. officinalis</i> ekstraktından (a) <i>R. officinalis</i> AgNP (b) sentezinde renk değişikliği gözlenmiştir.	41
Şekil 4.2. <i>R. officinalis</i> AgNP UV-Vis spektrumu.....	41
Şekil 4.3. <i>M. piperita</i> ekstraktından (a) <i>M. piperita</i> AgNP (b) sentezinde renk değişikliği gözlenmiştir.	42
Şekil 4.4. <i>M. piperita</i> AgNP UV-Vis spektrumu	42
Şekil 4.5. <i>S. aromaticum</i> ekstraktından (a) <i>S. aromaticum</i> AgNP (b) sentezinde renk değişikliği gözlenmiştir	43
Şekil 4.6. <i>S. aromaticum</i> AgNP UV-Vis spektrumu.....	43
Şekil 4.7. <i>R. officinalis</i> AgNP TEM görüntüsü.....	44
Şekil 4.8. <i>R. officinalis</i> AgNP partikül boyutları	44
Şekil 4.9. <i>M. piperita</i> AgNP TEM analizi.....	45
Şekil 4.10. <i>M. piperita</i> AgNP partikül boyutları.....	45
Şekil 4.11. <i>S. aromaticum</i> AgNP TEM analizi	46
Şekil 4.12. <i>S. aromaticum</i> AgNP'lerin partikül boyutları	46
Şekil 4.13. <i>R. officinalis</i> AgNP SEM-EDS analizi.....	47
Şekil 4.14. <i>M. piperita</i> AgNP SEM-EDX analizi	48
Şekil 4.15. <i>S. aromaticum</i> AgNP SEM-EDX analizi.....	49

Şekil 4.16. <i>R.officinalis</i> ekstraktı FTIR analiz sonuçları.....	50
Şekil 4.17. <i>R. Officinalis</i> AgNP FTIR analizi	50
Şekil 4.18. <i>M. piperita</i> ekstraktı FTIR sonuçları.....	51
Şekil 4.19. <i>M. piperita</i> AgNP FTIR sonuçları	51
Şekil 4.20. <i>S. aromaticum</i> ekstraktının FTIR sonuçları	52
Şekil 4.21. <i>S. aromaticum</i> AgNP'lerin FTIR sonuçları	52
Şekil 4.22. <i>R. officinalis</i> AgNP XRD grafiği	53
Şekil 4.23. <i>M. piperita</i> AgNP'nin XRD grafiği	54
Şekil 4.24. <i>S. aromaticum</i> AgNP'nin XRD grafiği.....	54
Şekil 4. 25. Örnek mikropilaka görüntüsü (ÜK; Üreme Kontrolü SK; Sterilite kontrolü) ..	55
Şekil 4.26. AgNO ₃ ve AgNP'lerin <i>S. sanguinis</i> biyofilmine karşı antibiyofilm aktivitesi .	56
Şekil 4.27. <i>S. sanguinis</i> biyofilm oluşumuna AgNP'lerin etkisinin SEM görüntüleri.....	57
Şekil 4.28. AgNP'lerin L929 fare fibroblast hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri	58
Şekil 4.29. <i>R. officinalis</i> AgNP'ler ile 1/4 MİK ile 24 saat boyunca muamele edilen <i>S. sanguinis</i> bakterisinin <i>spxB</i> geni ekspresyon düzeyi	59
Şekil 4.30. <i>M. piperita</i> AgNP'ler ile 1/4 MİK ile 24 saat boyunca muamele edilen <i>S. sanguinis</i> bakterisinin <i>spxB</i> geni ekspresyon düzeyi	59
Şekil 4.31. <i>S. aromaticum</i> AgNP'ler ile 1/4 MİK konsantrasyonunda 24 saat boyunca muamele edilen <i>S. sanguinis</i> bakterisinin <i>spxB</i> geni ekspresyon düzeyi	60

TABLÖLAR

Tablo 1.1. Viridans Grubu streptokokların sınıflandırılması.....	2
Tablo 1.2. NP'lerin Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler	17
Tablo 3.1. cDNA Sentezi için Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri	37
Tablo 3.2. Genius 2XSYBR Green Fast qPCR Mix (No ROX) için Reaksiyon Bileşenleri	38
Tablo 3.3. Kullanılan Primer Dizileri	38
Tablo 3.4. kGZ-PZR Koşulları	38



1. GİRİŞ

1.1. Streptokoklar

Streptokoklar gram pozitif zincir oluşturan koklardır. İki μm 'den küçük, spor oluşturmayan, hareketsiz, çoğunlukla fakültatif anaerob bakterilerdir. Bazı türleri kapnofilik ve mikroaerofiliktir. Üremeleri için genellikle 37°C 24 saat süre idealdir. Katalaz testlerinin negatif olmasıyla stafilokok cinsi bakterilerden ayırt edilirler. Bazı streptokoklarda kapsül bulunmaktadır. Kapsül bulunduran streptokoklarda kapsül yapısı polisakkaritten ya da hyalüronik asitten oluşmaktadır. Enerji ihtiyaçlarını son ürünün laktik asit olduğu glukoz fermantasyonu yolu ile karşılarlar (Topçu, 2008). Doğada yaygın halde bulunurlar. Bazı üyeleri insan mikrobiyotasında bulunurken diğer üyeleri enfeksiyona ya da immunopatolojik hastalıklara neden olabilirler (Procop ve ark., 2017). Streptokoklar ağız mikrobiyolojisinde en önemli türlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Streptokokların sınıflandırılmasıyla ilgili birçok farklı yöntem bulunmaktadır (Topçu, 2008).

1.1.1 Streptokokların Sınıflandırılması

Streptokokların sınıflandırılması üç ana ölçüte dayanmaktadır bunlar: kanlı agarda gözlenen hemolizler, biyokimyasal ve immünolojik özelliklerlerdir. Bu ölçütler üzerine kurulu olan üç farklı sınıflandırma sistemi, belirli araştırmacıların isimleriyle anılmaktadır: Brown sınıflandırması, Sherman sınıflandırması, Lancefield sınıflandırması.

1874'te ilk olarak Biltroth adlı araştırmacı yara enfeksiyonlarından zincir yapan kokları gözlemlemiştir. 1884 yılında Rosenbach bilimsel adlandırma adına "Streptococcus" cins ismini kullanan ilk kişi olmuştur Sınıflandırmaya ait ilk çalışmalar 1903'te Schöttmuller tarafından yapılmış ve kanlı agardaki hemoliz özelliklerine göre bu bakteriler beta hemolitik olanlar ve olmayanlar şeklinde gruplandırılmıştır (Ferretti & Köhler, 2016).

Lancefield ise streptokokların özgül karbonhidrat antijenlerinin varlığını göstererek alfabetik olarak grup adı konulmasını sağlamıştır. Viridans streptokoklar bu grupta yer almamaktadır (Lancefield, 1933).

1.1.2 Viridans Streptokoklar

Sherman sınıflandırılmasında yer alan viridans streptokoklar, 45°C' lik sıcaklıkta ürer %6,5 NaCl varlığında üremezler. Viridans streptokoklar ilk kez Colman ve Williams adlı bilim insanları tarafından 1970'li yıllarda sınıflandırılmıştır. Viridans terimi Latince yeşil anlamına gelen viridis teriminden türetilmiştir. Viridans grubu streptokokların (VGS) çoğu alfa hemoliz yaptığı için kanlı agarda yeşil renkli hemoliz oluştururlar. Colman ve William sınıflandırmasına göre oral *Streptococcus viridans* türleri; *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus milleri* ve *Streptococcus mutans*'dır (Lancefield, 1933; Sinner & Tunkel, 2015; Topçu, 2008).

1.1.3. Viridans Grubu Streptokokların Sınıflandırılması:

VGS'ler sınıflandırılması ve tür isimlerinin değişkenlik göstermesi nedeniyle tanısı güç mikroorganizmalardır. Biyokimyasal reaksiyonları ve 16S rDNA dizilerine göre VGS'ler 5 gruba ayrılmışlardır. Bu gruplar Mitis, Sanguinis, Salivarius ve Anginosus, Mutans gruplarıdır. VGS'lerin sınıflandırılması Tablo 1.1.'de görülmektedir (Ergin, 2010; Facklam, 2002).

Tablo 1.1. Viridans Grubu streptokokların sınıflandırılması

Sanguinis grubu	Mitis grubu grubu	Anginosus grubu	Mutans grubu	Salivarius grubu
<i>S.sanguinis</i>	<i>S.mitis</i>	<i>S.anginosus</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.salivarius</i>
<i>S.parasanguinis</i>	<i>S.oralis</i>	<i>S.constellatus</i>	<i>S.sobrinus</i>	<i>S.vestibularis</i>
<i>S.gordonii</i>	<i>S.pneumoniae</i>	<i>S.intermedius</i>	<i>S.cricetus</i>	<i>S.thermophilus</i>
<i>S.sinensis</i>	<i>S.infantis</i>		<i>S.downei</i>	<i>S.infantarius</i>

VGS'lerin neden olduğu endokardit ve bakteriyeminin tedavisinde sıklıkla penisilinin kullanılmasına karşın, son yıllarda çeşitli antibiyotiklere karşı direnç ortaya çıkmaktadır. Antibiyotik duyarlılık testleri; akılcı antibiyotik kullanımına rehberlik ederek, ampirik tedavi stratejilerinin belirlenmesine yardımcı olmaktadır. VGS'ler genellikle penisiline duyarlıdır, ancak son dönemlerde penisiline karşı direnç gelişmesi tedavi süreçlerini zorlaştırmaktadır. Beta-laktam sınıfı antibiyotiklerin yaygın kullanımı, bu ilaçlara karşı ciddi direnç gelişimine yol açmıştır. Beta-laktam antibiyotikler, bakteri hücrelerinde penisilin bağlayan proteinleri (PBP) hedef alır. Bu proteinlerin inhibisyonu, bakteriyel hücre duvarının sentezini engeller.

VGS'lerde gözlenen beta-laktam direnci, *Streptococcus pneumoniae*'deki penisilin direncine benzer şekilde, PBP'lerde meydana gelen değişiklikler nedeniyle antibiyotığın hedefine bağlanamamasından kaynaklanmaktadır. Bu reseptörlerin her birinin aynı ilaca olan afinitesi farklıdır ve her biri farklı bir tepkiye neden olur. PBP'lerin üretimi genetik olarak kontrol edilip, oluşan mutasyonlar sonucu bu proteinlerin sayısı veya beta-laktam ilaçlara olan afiniteleri değişebilir. Penisilin direnci, özellikle PBP 1a, 2b, ve 2x genlerindeki nokta mutasyonlarıyla ilişkilidir. *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* ve *Streptococcus pneumoniae* arasında transformasyon ve lizis aracılığıyla genetik materyal alışverişi gerçekleşebilmektedir. Bu alışveriş, antibiyotik direnç genlerinin yayılmasında önemli bir rol oynamaktadır. VGS'lerin tedavisinde beta laktam grubu antibiyotiklerin yanı sıra makrolidler ve linkozamidler de tercih edilen antibiyotikler arasındadır. Ancak, bu ilaçlara karşı da direnç giderek artmaktadır. Penisiline dirençli bakteriyel enfeksiyonlarda tercih edilen tedavi yöntemi genellikle glikopeptidlerdir (Dowson ve ark., 1990; Quinn ve ark., 1988). Ülkemizde yapılan bir çalışmada VGS'lerin penisilin, klindamisin, sefazolin, sefotaksim ve vankomisin direnç oranları sırası ile %52, %22,9, %33, %18, %0 bulunmuştur (Özden, 2016).

1.1.4. *Streptococcus sanguinis*

Sanguinis grubunun bir üyesi olan ve daha önce *S. sanguis* olarak tanımlanan *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*) diğer streptokoklar gibi hücre bölünmesinin tek bir eksen boyunca olması nedeniyle zincirler veya kok çiftleri şeklinde görülmektedir (Nobbs & Kreth, 2019). *S. sanguinis*'in hareketsiz olduğu bilinmekle beraber *S. sanguinis* 2908 suşunun, geri çekilebilir tip IV pili ile kolaylaştırılmış yüzeye ilişkili seğirme hareketine sahip olduğu gösterilmiştir (Gurung, Berry, Hall, & Pelicic, 2017).

S. sanguinis, genellikle sağlıklı plak biyofilmiyle ilişkilendirilmiştir. Diş yüzeylerinde kolonize olan ve diş çürüklerine, periodontal hastalıklara ve diş restorasyonlarında başarısızlıklara yol açan diş plağının oluşumunda öncül bir bakteridir (Caufield ve ark., 2000). Ağızda plak kütleindeki benzerliklere rağmen farklı lokasyonlardaki plak kütlesi içerisinde *S. sanguinis*'in biyokütlesi önemli ölçüde farklılık gösterebilmektedir. Alt anterior dişlerde yüksek oranlarda bulunurken, üst molar bölgede düşük oranlarda bulunur (Haffajee ve ark., 2009). *S. sanguinis*'in farklı dişler ve implant yüzeyleri üzerinde biyofilm oluşturduğu da gösterilmiştir (Drake, Paul, & Keller, 1999). *S. sanguinis* dişler üzerinde sert

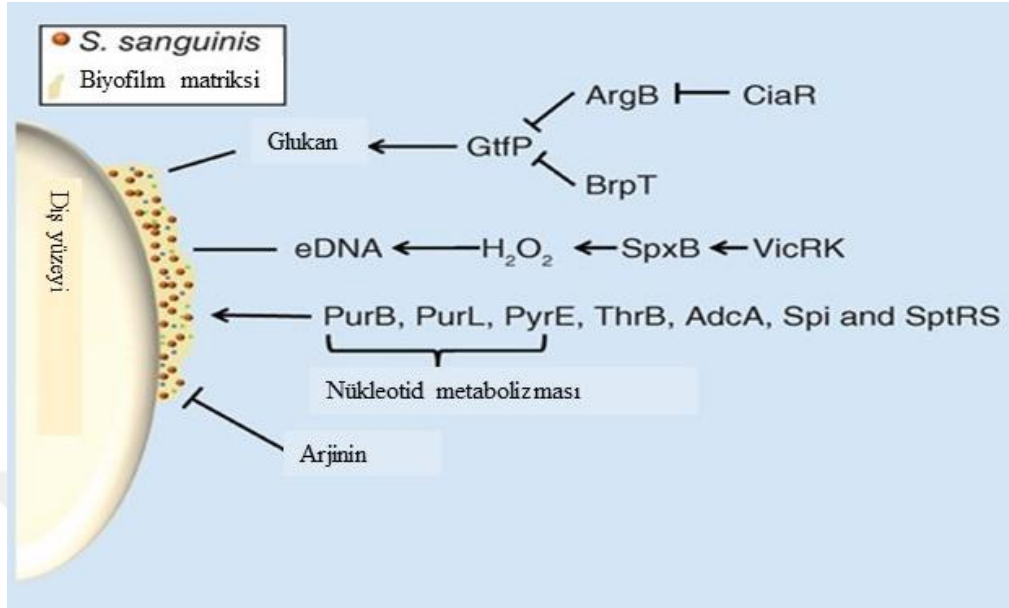
dokuda kolonize olmasının yanı sıra yumuşak dokuda da kolonize olabilmektedir (Aas, Paster, Stokes, Olsen, & Dewhirst, 2005).

S. sanguinis'in virülansında H_2O_2 üretimi oldukça önem taşımaktadır. Bakteri kendi ürettiği ve *S. gordonii* tarafından üretilen H_2O_2 'ye dayanıklı olmasına rağmen diğer oral mikroorganizmalar üretilen H_2O_2 'ye duyarlıdır. Bu durum H_2O_2 'nin biyofilm dengesini korumak için duyarlı bakterilere karşı rekabetçi bir önlem olarak üretildiği fikrini desteklemektedir (Zheng, Itzek, Chen, & Kreth, 2011). *S. sanguinis*'in sıklıkla travma sonrasında kan dolaşımına giren oral bakterilerin neden olduğu enfektif endokardit ile yakından ilişkili olduğu rapor edilmiştir (DeSimone ve ark., 2015).

1.1.5. *S. sanguinis* Biyofilmi

Erken kolonize olan VGS'ler, konakçı molekülleri aracılığı ile dış yüzeyine bağlanmakta ve yüzeylerindeki adezyon molekülleriyle dış çürüğünde rol oynayabilen diğer erken kolonizerlerin biyofilm kütesine çekilmesine aracılık etmektedir (Kolenbrander ve ark., 2002). *S. sanguinis*, dış biyofilmindeki ilk kolonize edicilerin ortak bir üyesidir ve çürüksüz çocuklarda ve yetişkinlerde anlamlı oranda daha fazla görülmektedir (Ge, Caufield, Fisch, & Li, 2008; Giacaman, Torres, Gómez, Muñoz-Sandoval, & Kreth, 2015). Streptokokal piruvat oksidaz (spxB), hidrojen peroksit üreten bir enzimdir ve *S. sanguinis*'in türler arası etkileşimlerinde kritik bir rol oynar, ancak biyokimyası hakkında az şey bilinmektedir. *S. sanguinis*'in, oksijen mevcudiyetinde spxB ekspresyonuna ve spxB üretimine izin verdiği biyofilm oluşumu sırasında *Streptococcus mutans* gibi hassas niş rakip türleri inhibe etmek için antimikrobiyal madde olarak H_2O_2 ürettiği bilinmektedir (Zheng ve ark., 2011). İki bileşenli sistem VicRK, piruvat oksidaz spxB'nin ifadesini düzenler. spxB'nin ekspresyonunun artması H_2O_2 'yi artıracaktır (Zhu, Macleod, Kitten, & Xu, 2018). İnsan kanında *S. sanguinis*'in hayatta kalmasında rol oynadığı bilinen spxB geni piruvat oksidazı kodlar. spxB geninin ekspresyonunun artmasıyla H_2O_2 üretilir bu da nötrofillerin hücre ölümünü tetikler ve bakterinin kan dolaşımında hayatta kalmasına yardımcı olur. *S. sanguinis* spxB geni taşıyan vahşi suş ve spxB mutantı olan suşlarla yapılan karşılaştırmalı çalışmada; spxB vahşi tipinin nötrofil hücre dışı tuzaklarının (Nötrofil NETosis) indüksiyonunu yansıtan kromatin yoğunlaşması ve ağ benzeri hücre dışı DNA'nın salınması ile hücre ölümüne maruz kaldığı ve bakterinin bu şekilde kanda hayatta kalmasına yardımcı olduğu bilinmektedir. Yapılan bu çalışmada bakteriyel hayatta kalma, spxB geninin

silinmesiyle büyük ölçüde azalmıştır (Sumioka ve ark., 2017). Şekil 1.1.'de *spxB* geni ve diğer genlerin biyofilm oluşumunda oynadığı roller gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2018).



Şekil 1.1. *S. sanguinis* biyofilminin oluşmasında genlerin rolü

1.1.6. *S. sanguinis*'in Neden Olduğu Hastalıklar

VGS'lerin komensal bakteriler olduğu ancak aynı zamanda bakteriyemi nedeniyle enfektif endokardit gibi enfeksiyonlara da neden olabileceği bilinmektedir. VGS'ler diş çürüğü ve periodontal hastalıklara neden olabilmektedir. *S. sanguinis* nadiren de olsa bakteriyel menenjitte yol açabilmektedir (Fukushima, Noda, Saito, & Ikeda, 2012; Liu, Lin, & Lee, 2013).

1.1.6.1. Diş Çürüğü

Diş çürükleri ve periodontal hastalıkların ağız mikrobiyotasında dengesizlik olarak tanımlanan mikrobiyal disbiyoz ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Sanz ve ark., 2017). *S. mutans* diş çürüğü ile her ne kadar daha çok ilişkilendirilse de oral streptokoklardan *S. sanguinis*'in de mine çüğürüne çocukluk çağı çürüğüne neden olduğu yapılan araştırmalarda gözlenmiştir (Becker ve ark., 2002).

1.1.6.2 Enfektif Endokardit

Enfektif endokardit (EE) kalbin endokardiyal yüzeylerinin ve mevcutsa kalpteki protez materyallerin enfeksiyonu olarak tanımlanmaktadır. EE'de çok farklı klinik

semptomlar ortaya çıkabilmektedir. Tüm organ sistemlerine ait patolojik değişiklikler görülebilir. EE'nin akut ve subakut seyir göstermesi bazı farklı bulgulara neden olmaktadır. Ancak kesin bir şekilde sınıflamanın önemi günümüzde azalmıştır (Topçu, 2008). Hastalığın etiyojisi incelendiğinde streptokoklar, enterokoklar ve stafilokoklar ön plana çıkmaktadır. Altta yatan hastalığa göre etkenin dağılımı değişebilmektedir. EE tanı ve tedavideki tüm güncel gelişmelere karşın halen mortalitesi ve morbiditesi çok yüksek bir hastalık olarak görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalara göre yıllık görülme sıklığı 2-4 olgu/100,000'dir. Ülkemizdeki EE sıklığı konusunda sağlıklı rakamlar bulunmamakla birlikte, gelişmiş ülkelerdeki rakamlar dikkate alınarak değerlendirildiğinde, yıllık olgu sayısı yaklaşık 5000 olmalıdır. Bu durumda, yaklaşık %25'lik mortalite hızı nedeniyle, ortalama yaşı 47 olan 1250 kişinin ölümüne neden olması söz konusudur (Yavuz ve ark., 2020). Amerikan Kalp Derneği'nin 2021 yılında yayınlanan kılavuzunda daha önceki kılavuzlarda da belirtildiği gibi, herkes için iyi ağız sağlığının ve diş bakımının düzenli yapılmasının EE için kritik rolünün olduğu risk grubundaki hastalar için VGS EE profilaksisi uygulanması önerilmektedir. Bununla birlikte profilaktik antibiyotik kullanımının VGS EE'e karşı etkili olup olmadığını belirlemek için randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (Wilson ve ark., 2021). İngiltere Galler'de Ulusal Sağlık ve Bakım Mükemmelliği Enstitüsü (NICE) ise EE riski olan hastalar için diş tedavileri sırasında antibiyotik profilaksisini rutin olarak önermemektedir. Fakat dünyadaki birçok ülke, özellikle yüksek risk taşıyan bireylerde invaziv diş prosedürleri öncesinde profilaktik antibiyotik kullanımını desteklemektedir; bu nedenle İngiltere ve Galler'deki uygulamadan farklılık göstermektedir. NICE'in yaklaşımı, gereksiz antibiyotik kullanımını azaltmayı ve antimikrobiyal direnç gelişimini önlemeyi amaçlamaktadır (Centre for Clinical Practice at, 2008; Rutherford, Glenney, Roberts, Hooper, & Worthington, 2022).

Oral streptokoklar Küresel EE yükünün %20'sinden sorumludur. *S. sanguinis*, vakaların %18 ila %30'unu oluşturan, EE'ye en sık neden olan ajanlardan biri olduğundan özellikle önemlidir. Kötü ağız hijyeni ile EE arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır (Vogkou, Vlachogiannis, Palaiodimos, & Kousoulis, 2016; Yew & Murdoch, 2012). Diş fırçalamadan sonra gerçekleşen kanamayla dahi bakteriyemi riski çok yüksektir (Lockhart ve ark., 2009). Diş ipi kullanımının (%40-41) diş fırçalamayla (%0-8) karşılaştırıldığında bakteriyemi oluşumundaki etkisinin anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir (Crasta ve ark., 2009; Vriesema, Dankert, & Zaat, 2000). EE oluşmasında önemli bir adımın, *S.*

sanguinis'in kan dolaşımında trombositlere yapışması veya endotelial bozulmaya bağılı hasar bölgelerinde kollajen gibi submukozal proteinlere bağlanması sonucu oluştuğı bilinmektedir (Holland ve ark., 2016; Keynan & Rubinstein, 2013).

1.2. Nanoteknoloji

Sözlük tanımı olarak nanoteknoloji; nano ölçekte şekil ve ebatları kontrol edilen malzeme, cihaz ve sistemlerin tasarım, karakterizasyon, üretim ve uygulamalarıdır. Nano" ön eki Yunanca "cüce" sözcüğünden türemiştir (Whitesides, 2003). Nanoteknoloji kavramı ilk defa ünlü fizikçi Richard Feynman tarafından Amerikan Teknoloji Enstitüsü'nde "There's a plenty of room at the bottom" "Altta çok yer var" başlıklı ünlü konferansı aracılığıyla sunulmuştur (Feynman, 1960). Nanoteknoloji sözcüğü ise Tokyo Bilim Üniversitesi'nden Prof. Norio Taniguchi tarafından ilk defa kullanılmıştır. Nanoteknoloji; fizik, kimya, biyoloji, malzeme bilimi ve tıp gibi birçok akademik disiplini kapsayan ileri bir teknoloji olarak karşımıza çıkmaktadır (Sahoo, Parveen, & Panda, 2007). Nanoteknoloji, nanomalzemeler olarak bilinen, boyutları 1 ila 100 nm arasında değişen malzemelerin sentezini, mühendisliğini ve kullanımını kapsamaktadır. Nanobilim, maddenin özelliklerinin nano ölçekte incelenmesini içeren ve özellikle katı hal malzemelerinin benzersiz, boyuta bağılı özelliklerine odaklanan bir bilim dalıdır (Mulvaney, 2015).

Nanopartikül (NP) ya da diğeri ifadeyle nanoparçacıklar, 1 metrenin milyarda biri olan uzunluk birimi olan nanometre boyutlarına sahip nanomateriyallerdir. Doğada var olan canlıların birçoğundan daha küçüktür. Bir nanometre (nm), yaklaşık olarak 6 karbon atomunun veya 10 su molekülünün genişliğine sahiptir. Bir insan saçı hemen hemen 80.000 nm çapındadır ve bir alyuvar hücresi yaklaşık 7000 nm çapındadır. Atomlar 1 nm'den küçüktür, oysa bazı proteinler dahil birçok molekül 1 nm'den daha büyüktür.

NP'lerin geniş çapta kullanımının ana nedenleri arasında, kuantum boyut etkilerinin belirginliği, elektronik yapılarının boyutlarına bağılı değişiklikler ve yüzey atomlarının özgün karakteristik özelliklere sahip olması gibi faktörler yer alır. Ayrıca, yüksek yüzey/hacim oranı sayesinde, bu partiküller birçok uygulamada etkinlik ve verimlilik sağlar. Bu özellikler, NP'lerin çeşitli endüstriyel ve teknolojik alanlarda tercih edilmesinin temel sebeplerindendir (Sangeetha, Rajeshwari, & Venckatesh, 2011).

Nanoteknoloji nano boyutta malzemelerin sentezlenmesi ve bu malzemelerin kimya, biyoloji, mühendislik, tıp, diş hekimliği gibi birçok disiplinde kullanılmasına aracılık etmektedir (Kiarashi ve ark., 2024; Sahoo ve ark., 2007).

1.2.1. Nanomalzemelerin Sınıflandırılması

Nanomalzemeler, boyutlarından en az birinin nano ölçekte, yani 100 nm'den küçük olan malzemeler olarak tanımlanır. Boyutlarına bağlı olarak nanomateryaller, dört farklı sınıfa ayrılır.

Sıfır boyutlu nanomalzemeler (0-D): Nanomalzemelerin üç boyutu da nano ölçek aralığındadır. Örnekler kuantum noktaları, fullerenler ve nanopartiküllerdir.

Tek boyutlu nanomalzemeler (1-D): Nano ölçeğin dışında bir boyuta sahiptir. Örnekler nanotüpler, nanofiberler, nanoçubuklar, nanotellerdir.

İki boyutlu nanomalzemeler (2-D): Nano ölçeğin dışında iki boyuta sahiptir. Örnekler nano tabakalar, nanofilmler ve nano katmanlardır.

Üç boyutlu nanomalzemeler (3-D) veya toplu nanomalzemeler: Herhangi bir boyutta nanoölçekle sınırlı değildir. Bu sınıf nano toz, nanotel ve nanotüp dizilerini içerir (Joudeh & Linke, 2022).

1.2.2. NP'lerin Sınıflandırılması

NP'ler, aynı malzemelerin daha büyük boyutlu muadillerinde bulunmayan benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) nanomalzemelerin dış boyutundaki en uzun ve en kısa eksenlerinin uzunluklarının göz ardı edilebilir farklılığa sahip ölçekte olanlarını nanopartiküller olarak tanımlamaktadır. Eğer boyutlardaki farklılık önemli ölçüdeyse bunları da nano lifler veya nano plakalar olarak adlandırmıştır (Joudeh & Linke, 2022).

NP'ler farklı şekil, boyut ve yapılarda olabilmektedirler. Küresel, silindirik, konik, boru şeklinde, içi boş çekirdek, spiral veya düzensiz olabilirler. Ayrıca tek veya çok katlı kristalli katılar veya amorf olabildiği gibi gevşek veya toplanmış da olabilirler. NP'ler

bileşimlerine göre organik, inorganik ve karbon bazlı olarak üç ayrı grupta sınıflandırılmıştır (Ealia & Saravanakumar, 2017).

1.2.2.1. Organik NP'ler

Organik NP'ler protein, karbonhidrat gibi polimerlerden veya diğer organik bileşiklerden oluşturulur (Pan & Zhong, 2016). Bu grubun en bilinen üyeleri lipozomlar, miseller ve ferritin gibi protein komplekslerdir. Biyolojik olarak parçalanabilirler büyük ölçüde toksik değildir ve lipozomlarda bazen içi boş bir çekirdek yapısı bulunabilir. Isı ve ışık gibi termal ve elektromanyetik radyasyondan etkilenirler (Ealia & Saravanakumar, 2017). Genellikle moleküller arası etkileşimleri kovalent bağ ile oluşturmazlar böylelikle daha kararsız bir yapı haline gelirler ve vücuttan temizlenmesi daha kolay olur (Ng & Zheng, 2015). Uygulama alanlarında belirleyici faktörler olarak yüzey morfolojisi, stabilite, taşıma kapasitesi gibi çeşitli parametreler mevcuttur. Güncel olarak hedef spesifik ilaç tedavilerinde ve kanser terapilerinde tercih edilmektedir (Gujrati ve ark., 2014).

1.2.2.2. İnorganik NP'ler

Tipik olarak karbon veya organik maddeleri içermeyen bu sınıfa metal, seramik ve yarı iletken NP'ler örnek olarak verilebilir (Joudeh & Linke, 2022). Metal olarak oluşturulan NP'ler, monometalik, bimetalik (Toshima & Yonezawa, 1998) veya polimetalik gibi metal öncüllerinden oluşturulmaktadır (Nascimento, Cruz, Rodrigues, de Oliveira, & Lopes, 2018). Bimetalik NP'ler alaşımlardan yapılabilir veya farklı katmanlardan (çekirdek-kabuk) oluşturulabilir (Toshima & Yonezawa, 1998). Bu NP'ler lokalize yüzey plazmon rezonans (SPR) özelliklerinden dolayı optik ve elektriksel özelliklere sahiptir (Khan, Saeed, & Khan, 2019). Ayrıca bazı metal NP'ler, termal, manyetik ve biyolojik özelliklere de sahiptir (Ealia & Saravanakumar, 2017). Bu özellikleri sayesinde çok sayıda fiziksel, kimyasal, biyolojik, biyomedikal ve farmasötik uygulamalarda kullanılabilecek nanocihazların geliştirilmesinde önemli malzemeler haline gelmiştir (Mody, Siwale, Singh, & Mody, 2010). Metal NP'lerin boyut, şekil ve yüzey kontrollü sentezi, ileri teknoloji malzemeleri oluşturmak için önemlidir (Dreaden, Alkilany, Huang, Murphy, & El-Sayed, 2012).

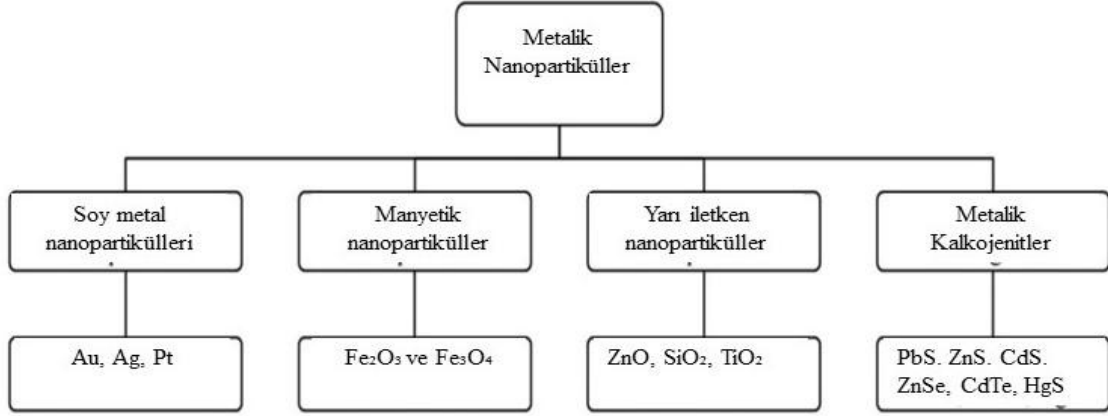
Yarı iletken NP'ler, metaller ve metal olmayanlar arasında özelliklere sahip yarı iletken malzemelerden yapılıdır. Fotokatalizde, optik ve elektronik cihazlarda önemli malzemelerdir (Gupta & Tripathi, 2012).

Seramik NP'ler ise karbonatlar, fosfatlar ve titanyum gibi metal ve metaloidlerin oksitlerinden oluşur (C Thomas, Kumar Mishra, & Talegaonkar, 2015). Çoğunlukla ısıtma-soğutma yoluyla sentezlenirler ve amorf, polikristal, yoğun, gözenekli veya içi boş formlarda bulunabilirler (Khan ve ark., 2019). Genellikle biyomedikal uygulamalarda kullanılan bu NP'ler yüksek stabiliteye ve yük kapasitesine sahiptirler (Moreno-Vega, Gomez-Quintero, Nunez-Anita, Acosta-Torres, & Castaño, 2012). Ek olarak kataliz, boyaların bozunması, fotonik gibi diğer uygulamalarda da kullanılırlar (C Thomas ve ark., 2015).

1.2.2.3. Karbon temelli NP'ler

Karbon atomlarından üretilen NP'leri içerir (Ealia & Saravanakumar, 2017). En sık tercih edilen üyeleri fullerenerler, karbon siyahı NP'ler ve karbon kuantum noktalarıdır. Fullerenerler, simetrik kapalı kafes yapısıyla karakterize edilen karbon molekülleridir. Karbon siyahı NP'ler, yüksek oranda kaynaşmış küresel parçacıkların üzüm benzeri agregatlarıdır (Moreno-Vega ve ark., 2012). Karbon kuantum noktaları ise boyutları 10 nm'nin altında olan ayırık, yarı küresel karbon NP'leridir (Lu, Quan, Zhang, & Xu, 2016). Karbon bazlı NP'ler, hibridize karbon bağlarının ayırt edici özelliklerini nano ölçekte fizikokimyasal özelliklerle birleştirir. İletken ve dayanıklıdır. Ayrıca elektron ilgisi, optik, termal özellikleri ile de (Khan ve ark., 2019), enerji depolamada, biyogörüntülemelerde kullanılırlar. Düşük toksisiteye sahip olduklarından ilaçların vücutta dağıtımlarında ve doku mühendisliğinde kullanılırlar (Mochalin, Shenderova, Ho, & Gogotsi, 2020; Oh, Yoon, & Jang, 2010).

NP'ler, şekil/boyut, faz bileşimi ve malzemenin içeriğine göre farklı sınıflara ayrılmaktadır. Metalik NP'lerin sınıflandırılması Şekil 1.2.'de özetlenmiştir (Khanna, Kaur, & Goyal, 2019).



Şekil 1.2. Metalik nanopartiküllerin sınıflandırılması

1.3. Gümüş Nanopartiküller

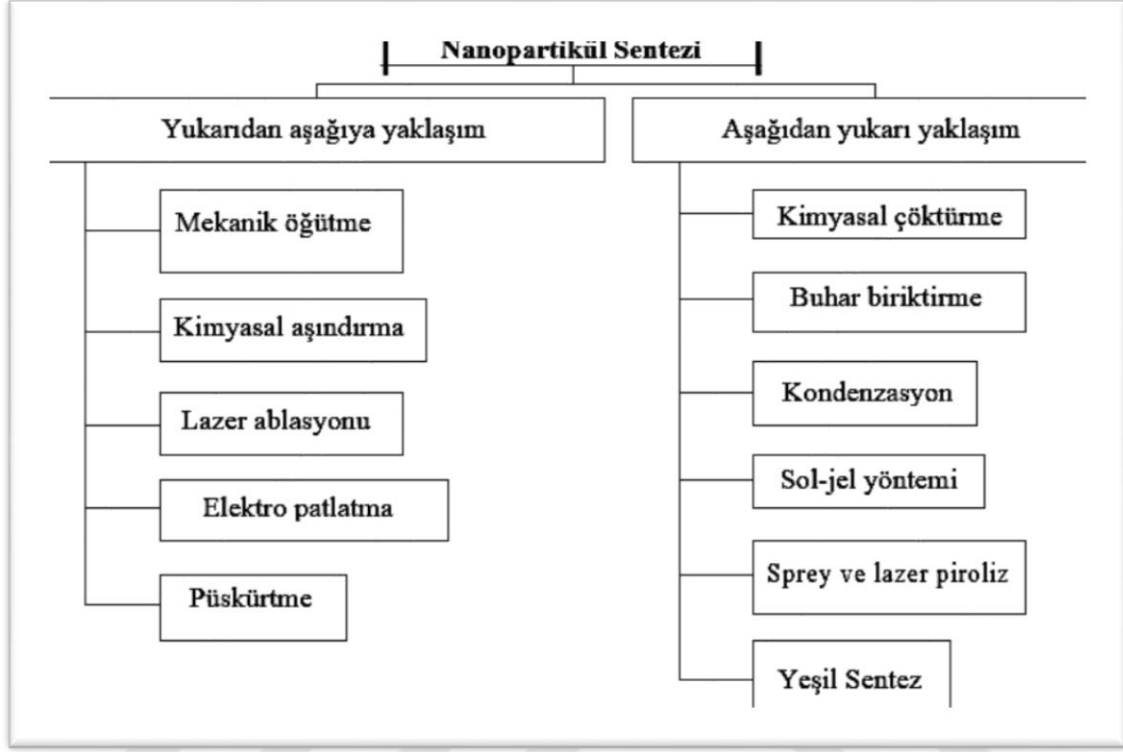
Yıllar boyunca manyetik nanopartiküller (demir oksit), gümüş ve altın nanopartiküller, nanokabuklar ve nanokafeslerin aynı zamanda teşhis ve tedavi edici bir ajan olarak kullanımını sağlamak için araştırmalar yapılmıştır (Mody ve ark., 2010).

Gümüş, bilinen en yüksek elektrik, termal iletkenlik ve antimikrobiyal özelliklere sahip element olması nedeniyle yaygın kullanılan nanomateryallerden biridir (White, 2001). Yenidoğan bebeklerde gonokokkal konjunktivite karşı gümüş nitrat (AgNO_3) damlatılması geçmişte uygulanan profilaktik yöntemlerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Bell, Grayston, Krohn, & Kronmal, 1993). Gümüş nanopartiküller (AgNP'ler), çok geniş uygulama yelpazesinden dolayı önemli soy metal nanopartiküllerden biridir (Hamedî & Shojaosadati, 2019).

1.4 Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri

NP'ler fiziksel kimyasal ve biyolojik tekniklerle sentezlenebilmektedir. NP sentezi genel olarak iki ana başlık altında incelenmektedir. Bunlardan biri yukarıdan aşağı "Top Down" diğeri ise aşağıdan yukarı "Bottom Up" olarak karşımıza çıkmaktadır. Aşağıdan yukarı yöntemde atomlar ya da moleküllerden nanometre aralığında yapıların oluşması beklenmektedir. NP sentezinde aşağıdan yukarıya yaklaşım tercih edilen yöntemdir. Yukarıdan aşağı yöntemde mekanik veya kimyasal teknikler kullanılıp enerji aracılığıyla malzemelerin küçültülmesi hedeflenmektedir. Bu yöntemde NP'lerin yüzeylerinde bazı

kusurlar ortaya çıkmakta olup istenilen boyut ve şekilde NP sentezi gerçekleştirilememektedir (Thakkar, Mhatre, & Parikh, 2010). Farklı teknikler kullanılarak yapılan NP sentezi Şekil 1.3.'de özetlenmiştir (Alsaiari ve ark., 2023).



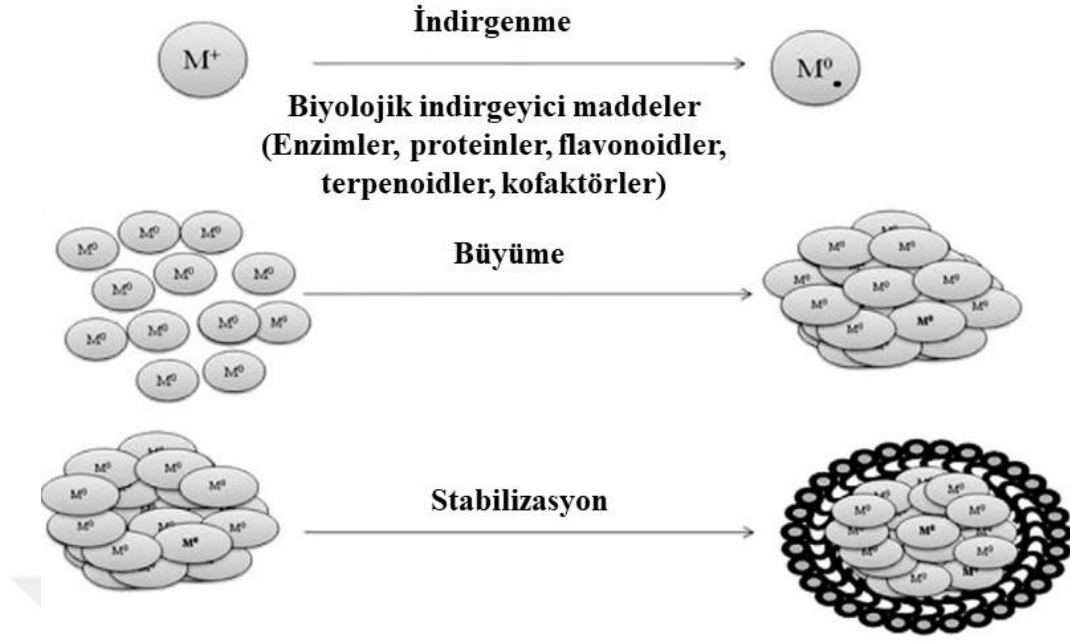
Şekil 1.3. NP sentez yöntemleri Cezaroğlu (2022)'den alınmıştır.

Biyoteknoloji ve nanoteknoloji, 21. yüzyılın önde gelen ve en çok umut vadeden iki teknolojisidir. Nanobiyoteknoloji, ileri biyoteknoloji için nano ölçekli yapıların üretilmesi, iyileştirilmesi ve kullanılması ile ilgili bir alan olup nanoteknoloji ve biyoteknolojinin kesişimini temsil eder (Akhtar, Panwar, & Yun, 2013).

Son yıllarda, fizikokimyasal yöntemlere kıyasla daha az toksik, daha düşük maliyetli ve çevre dostu olan biyolojik yöntemlerle NP sentezi (yeşil sentez) büyük ilgi çekmektedir. Yeşil sentez, çevre dostu indirgeyici ve stabilize edici maddeler ile çevreye uyumlu çözücüler kullanılarak tamamen "yeşil" prensipler altında gerçekleştirilebilmektedir. NP'lerin biyolojik sentezi için çeşitli yöntemler, metal tuzlarından geliştirilmiştir. Bu süreçlerde mikroorganizmalar, bitkiler, bitki dokuları ve meyveleri, bitki ekstraktları ve

algler NP sentezi için kullanılmaktadır (Chaudhary ve ark., 2020; Hano & Abbasi, 2021; Jain, Bhargava, Majumdar, Tarafdar, & Panwar, 2011; C. G. Kumar & Mamidyala, 2011)

NP'lerin biyolojik sentezi esnasında, organizmalarda bulunan enzimler, proteinler, amino asitler, polisakkaritler ve vitaminler gibi çeşitli biyomoleküller metal iyonlarını indirgeyerek önemli rol oynamaktadır. Ayrıca çevreye zararlı etkiyi azaltmanın yanı sıra, büyüklük ve morfoloji olarak iyi tanımlanmış yüksek miktarlarda NP üretimini de mümkün kılar. Metal iyonlarını indirmek için bitki ekstraktlarının kullanımı 1900'lerden beri bilinmektedir, ancak kullanılan indirgeyici ajanların doğası hala tam olarak anlaşılmamıştır. Son 30 yılda, metal iyonlarını nanopartiküllere indirmek için bitkinin kendisi, bitki ekstraktları veya dokularının kullanılması giderek daha fazla ilgi çekmiştir (A. K. Mittal, Chisti, & Banerjee, 2013). Mikroorganizmalarla NP sentezi, bitkiler aracılığıyla sentezle karşılaştırıldığında bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bunlar mikrobiyal izolasyon, kültürleme, bakım gibi karmaşık tekniklerdir. Bitkiler aracılığıyla sentez nispeten kolay, ucuz ve zahmetsiz bir sentez yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır (Akhtar ve ark., 2013). Biyolojik olarak yönlendirilen NP sentezinin olası mekanizması Şekil 1.4.'de gösterilmektedir (A. K. Mittal ve ark., 2013).



Şekil 1.4. NP sentez mekanizmasının şablonu (M^+ metal iyon)

1.4.1 NP'lerin Bitkiler ile Sentezi

NP'lerin biyolojik sentezinde kullanılan yöntemlerden biri bitkiler aracılığıyla sentezdir. Doğada kolaylıkla karşılaşılabilen bitki materyallerinden üretilen bitki kaynaklı nanopartiküller ve toksik olmayan doğası; biyomedikal ve çevresel alan uygulamalarında nanopartiküllere yönelik yüksek talebi karşılamaya elverişlidir (P. Singh, Kim, Zhang, & Yang, 2016).

Metal nanopartiküllerin sentezinde tohum, yapraklar, meyveler, saplar ve bunların ekstraktları dahil olmak üzere çeşitli bitki bölümleri kullanılmıştır (Ankamwar, Damle, Ahmad, & Sastry, 2005; Bar ve ark., 2009; Chandran, Chaudhary, Pasricha, Ahmad, & Sastry, 2006; V. Kumar, Yadav, & Yadav, 2010). Bitki ekstraktının kaynağının nanopartikül özelliklerini etkilediği bilinmektedir. Bunun nedeni, çeşitli ekstraktların farklı organik indirgeyici madde konsantrasyonlarını içermesidir. İndirgeyici ve suda çözünebilen bitki metabolitleri (örn. alkaloidler, terpenoidler ve fenolik bileşikler) NP sentezi için indirgeyici ve stabilize edici ajanlar olarak kullanılır. İlgili farklı kimyasalların sayısı nedeniyle indirgeme süreci görece karmaşıktır. Fenolik bileşikler hidroksil ve keton gruplarına sahiptir metallere bağlanabilen ve şelasyon gösterebilen maddelerdir. Bu yaklaşımları kullanan

NP'ler çevre dostudur ve daha iyi tanımlanmış boyutlara, morfolojilere ve kararlılığa sahip NP oluşumunu sağlar (Nasrollahzadeh, Atarod, Sajjadi, Sajadi, & Issaabadi, 2019).

Sıcaklık, pH, bitki ekstraktının konsantrasyonu, metal çözeltinin konsantrasyonu, inkübasyon/sentez süresi vb. gibi çeşitli değişkenler sentezlenen NP'lerin boyut ve şekillerine etki etmektedir. Ortamın pH'ı nanopartiküllerin boyutunu değiştirmektedir. NP sentezinde pH'ın önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir (J. Mittal, Batra, Singh, & Sharma, 2014). *Tragopogon collinus* ekstraktı kullanılarak yapılan NP sentezinde en iyi koşullar 0,0025 M gümüş nitrat, 40 °C sıcaklık, pH 10 olarak bildirilmiştir (Seifipour, Nozari, & Pishkar, 2020). Farklı bitki türleri kullanarak AgNP'lerin sentezini incelerken, türden türe optimum sentez sürelerinin değiştiği gözlemlenmektedir. Farklı bitki türleri kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin türden türe optimum sentez sürecinin değiştiği bildirilmektedir. Bu değişkenlik, laboratuvar koşullarındaki çeşitli faktörlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle, NP'leri içeren çözeltinin renk değişiklikleri, yüzey plazmon rezonansındaki değişimi yansıtmaları nedeniyle NP'lerin özelliklerinin anlaşılmasında kritik bir gösterge olarak değerlendirilmektedir. Çözeltinin renk aralığının uzun süre sabit kalması, nanopartiküllerin homojen şekilde dağıldığını ve herhangi bir agregasyonun meydana gelmediğini göstermektedir. Bu durum, sentezlenen nanopartiküllerin istenilen özelliklere uygun olduğunu ve sentez sürecinin başarılı bir şekilde yönetildiğini ifade etmektedir. Bu gözlemlerden yola çıkarak nanopartikül üretimini daha da optimize etme yolları araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalar, nanopartiküllerin sentezi ve karakterizasyonu sürecinde önemli rol oynamakta ve değerli bilgiler sunmaktadır (Ahmad ve ark., 2010; Amendola, Bakr, & Stellacci, 2010; Noguez, 2007).

Sıcaklık, AgNP'lerin sentezinde kritik bir parametre olarak kabul edilmektedir. Bitki metabolitlerinin stabilitesini korumak amacıyla, çalışmalar genellikle oda sıcaklığında yürütülmektedir. Ancak, sentez sürecinin hızlandırılması ve gümüş iyonlarının etkin bir şekilde AgNP'lere dönüşümünü sağlamak için bazı araştırmacılar daha yüksek sıcaklıkların kullanılmasını önermektedir. Sıcaklığın artırılması, gümüş iyonlarının hızla azalmasına ve homojen gümüş çekirdeklerinin oluşumuna neden olarak, küçük boyutlu AgNP'lerin üretilmesine imkân tanımaktadır. Yüksek sıcaklık, aynı zamanda gümüş iyonlarının indirgenme hızını arttırarak Yüzey Plazmon Rezonansı pikinin daha da yükselmesine neden olabileceği bildirilmektedir (Seifipour ve ark., 2020). Ayrıca, yüksek sıcaklıklarda oda

sıcaklığına göre daha fazla kristal parçacıklar oluşur, sıcaklığın yükseltilmesinin çekirdeklenme oranını arttırdığı varsayılmaktadır (Makarov ve ark., 2014).

AgNP sentezinde bitki ekstraktı ve gümüş nitrat konsantrasyonlarının partikül üzerine olan etkisi araştırıldığında konsantrasyona bağlı olarak NP'nin hem şekil hem de boyutlarında değişiklik olduğu bildirilmiştir. *Garcinia mangostana* (GM) meyve kabuğu ekstraktı kullanılarak AgNP'lerin biyosenteziyle ilgili çalışmada en iyi sentez koşullarının 45 °C sıcaklıkta, yaklaşık pH 4'te ve 16 saat süresince 0,5 g kabuk ekstraktı ile 7,5 mM gümüş nitrat kullanılarak gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Bu koşullar altında, NP'lerin küresel yapıda ve $32,7 \pm 5,7$ nm boyutlarında oluştuğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, NP sentezinde kullanılan gümüş nitrat ve kabuk ekstraktının konsantrasyonları, NP'lerin boyutu ve morfolojisi üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlar, NP'lerin daha hızlı ve daha yoğun bir şekilde oluşumuna yol açarken, daha düşük konsantrasyonlar NP oluşumunu yavaşlatmış ve potansiyel olarak daha büyük veya düzensiz şekillerde NP'lerin üretilmesine neden olduğu belirlenmiştir (Lee ve ark., 2019).

1.5. Biyolojik Sentezlenen NP'lerin Karakterizasyonu

Sentezlenen NP'ler; boyutları, boyut dağılımı, yüzey alanı, şekil, çözünürlük ve kümelenme gibi özelliklerin tespiti amacıyla detaylı karakterizasyon çalışmalarına tabi tutulmaktadır. Kimyasal ve biyolojik yöntemlerle sentezlenen NP'ler, metal iyon öncüllerinin indirgenmesiyle reaksiyon çözeltisinde renk değişiminin görülmesi NP'lerin oluşumunun ilk olarak gözle görülür hale gelmesini sağlar. Biyolojik sentez yöntemleriyle elde edilen NP'lerin doğrulanması için karakterizasyonu, bu nanoyapıların içsel özelliklerini derinlemesine anlamakta kritik bir süreçtir. Solüsyonun renginin sarıdan kahverengiye değişimini gözlemlemek AgNP üretimini doğrulamanın en temel yöntemlerinden biridir. Karakterizasyon farklı spektroskopik ve mikroskopik teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ve Zeta potansiyeli ölçümleri, NP'lerin boyut dağılımı ve yüzey yükünü belirlemek için kullanılırken, Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) teknikleri, morfolojik detaylarını görselleştirmek için kullanılmaktadır. X-ışını Kırınımı Difraktometresi (XRD), NP'lerin kristalin yapılarını analiz ederken, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve Raman Spektroskopisi, yüzey kimyası ve moleküler bağlar hakkında bilgi

sağlamaktadır. Bu karakterizasyon yöntemleri, NP'lerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini tam olarak tanımlayarak, onların potansiyel uygulamalarını ve çevresel etkileşimlerini keşfetme imkânı sunmaktadır (Lee ve ark., 2019). NP'lerin karakterizasyonunda kullanılan yöntemlerle ilgili tablo 1.2. Teimouri ve ark'dan alınmıştır (Teimouri ve ark., 2018).

Tablo 1.2. NP'lerin Karakterizasyonunda Kullanılan Yöntemler

Teknik	Teori	Uygulama
Ultraviyole-Görünür Bölge (UV-Vis) Spektrofotometre	300–800 nm dalga boylarında ışık Emilimi	Çeşitli metal NP'leri 2-100 nm boyut aralığında karakterize etmek için kullanılır.
Dinamik ışık saçılımı (DLS)	Gelen fotonların saçılma analizi	NP'lerin yüzey yükünü ve hidrodinamik yarıçapını belirlemek için kullanılır.
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	Elektron ışınına dayalı bir mikroskopi tekniği	NP'nin morfolojik karakterizasyonu için kullanılır.
Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)	Elektron ışınına dayalı bir mikroskopi tekniği	NP'lerin çapını belirlemek için kullanılır.
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	Kızılötesi emilim ve emisyon spektrumlarını ölçme yöntemi	NP yüzeyindeki fonksiyonel grupları tespit etmek için kullanılır.
X-Işını Difraktometresi (XRD)	Monokromatik X-ışınları ve kristalin NP arasındaki yapıcı girişimlere dayanır.	NP'lerin faz tanımlaması ve kristal yapısının karakterizasyonu için kullanılır
Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDS)	Farklı elementlerin karakteristik X-ışınlarını bir enerji spektrumunda ayırmak için kullanılır.	NP'lerin elementsel bileşiminin tespiti için kullanılır.

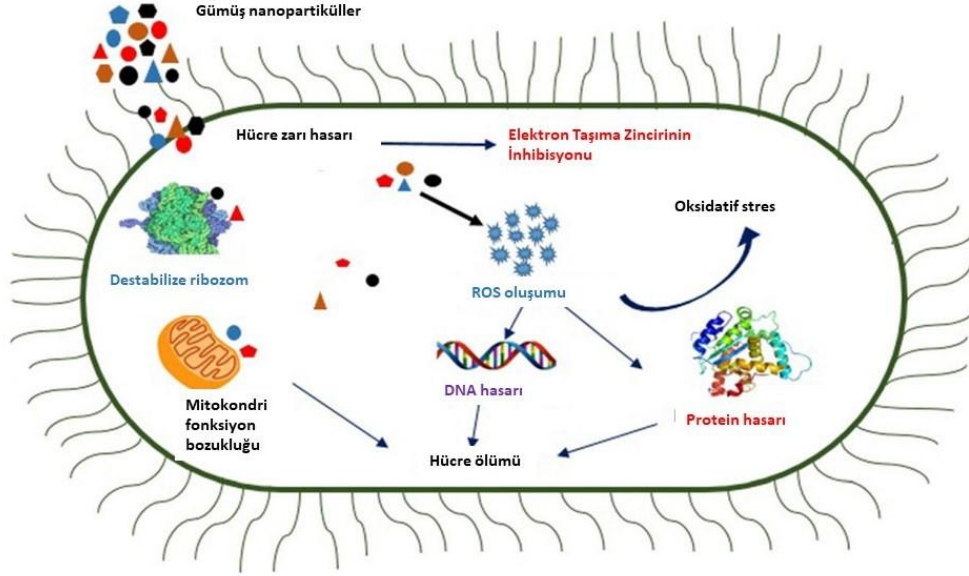
1.6. AgNP'lerin Antimikrobiyal Etkileri ve Mekanizmaları

AgNP'ler antibiyotiklere alternatif antibakteriyel maddelere aday olarak gösterilmektedir. Gelecek vaat eden birkaç nanomalzeme arasında AgNP'ler, geniş yüzey-hacim oranları ve kristalografik yüzey yapıları nedeniyle potansiyel antibakteriyel ajanlar gibi görünmekte olup bu konu ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. AgNP'ler, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı yüksek antimikrobiyal aktivite göstermektedir. AgNP'lerin *Escherichia coli*'ye (*E. coli*) karşı antimikrobiyal etkinliği, Gram-negatif bakterilere karşı bir

model olarak incelenmiştir. NP'lerin *E. coli* üzerine bakterisidal etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, SEM ve TEM analizlerinde, hücre duvarında hasar ve bakteri zarında NP birikimi olduğu gösterilmiş, bunun sonucu olarak hücre zarının geçirgenliğinin bozulduğu ve hücre ölümünün gerçekleştiği bildirilmiştir. AgNP'lerin gram pozitif bir bakteri olan *S. aureus* suşu üzerine antimikrobiyal etkisi sıvı mikrodilüsyon yoluyla araştırılmış ve antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Hussain ve ark., 2019). Toksik olmayan ve uygun maliyetli bu NP'ler, yeni bakterisidal ajanları geliştirilmesi için önemli malzemeler olarak karşımıza çıkmaktadır (Sondi & Salopek-Sondi, 2004). AgNP'lerin sunduğu antibakteriyel mekanizmalardan biri de hücre duvarı ve hücre zarı fonksiyonlarında bozulmalara neden olmaktır; bakterinin negatif yüklü zarları ile pozitif yüklü NP'ler arasındaki zıt yükler tarafından üretilen elektrostatik bir kuvvet nedeniyle hücresel bütünlüğün yok edilmesi ortaya çıkabilmektedir. Sonuç olarak bu yapılara zarar verebilir ve sonunda bakterilerin ölümüne neden olabilir (Lok ve ark., 2007).

AgNP'lerin bakterisidal etkilerinin mekanizması henüz anlaşılmamıştır. Birçok çalışma, AgNP'lerin hücre zarının yüzeyine bağlanarak hücrenin geçirgenliğini ve solunum fonksiyonlarını bozabileceğini öne sürmektedir (Kvítek ve ark., 2008). Etkileşim için geniş yüzey alanına sahip olan daha küçük AgNP'lerin büyük AgNP'lerden daha fazla bakteriye etki etmesi beklenmektedir.

AgNP'lerin sadece membran yüzeyi ile etkileşimi değil aynı zamanda bakterilerin içine de nüfuz etmesi mümkündür (Sharma, Yngard, & Lin, 2009). Hücre içindeki hasar, AgNP'lerin DNA gibi fosfor ve kükürt içeren bileşiklerle etkileşiminden kaynaklanabilir. Gümüşün bu tür bileşiklere karşı yüksek afinitesi vardır (Basu, Jana, Pande, & Pal, 2008; Feng ve ark., 2000). Ag^+ iyonları, bakterileri etkisiz hale getirmek için biyomolekülün mevcut -SH gruplarıyla güçlü bir şekilde etkileşime girer. Ayrıca Ag^+ iyonunun anaerobik koşullar altında antibakteriyel aktivitesinin, oksijen açısından zengin ortama göre daha az etkili olduğu bulunmuştur. Hücredeki bu tür etkileşimler DNA replikasyonunu önlemektedir bu da bakteriyel ölüme yol açmaktadır (Matsumura, Yoshikata, Kunisaki, & Tsuchido, 2003; Rahman ve ark., 2019; Sharma ve ark., 2009).



Şekil 1.5. AgNP'lerin bakteriyel büyümeye ve çoğalmalara karşı tahmin edilen etki mekanizması Rahman ve ark. (2019)'dan alınmıştır.

1.7. AgNP'lerin Antibiyofilm Etkileri ve Mekanizması

AgNP'lerin anti-biyofilm aktiviteleriyle ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Bakteri biyofilmleriyle AgNP'ler arasındaki etkileşimi konu alan ilk çalışmada, 24 saatlik *P. putida* biyofilmlerinin kütleindeki düşüşler araştırılmıştır. Bu çalışmada kullanılan AgNP'lerin ortalama çapı 65 ± 30 nm olduğu bildirilmiştir (Fabrega, Renshaw, & Lead, 2009). Başka bir çalışmada da, 100 nM konsantrasyondaki AgNP'lerin (ortalama çap 50 nm), biyofilm oluşumunun ilk basamağı olan yüzeyel adezyonu engelleyerek *P. aeruginosa* ve *S. epidermidis*'in biyofilm oluşumunu neredeyse tamamen önlediği belirlenmiştir (Kalishwaralal, BarathManiKanth, Pandian, Deepak, & Gurunathan, 2010). Biyofilm oluşumunu önlemek için geniş bir antimikrobiyal etkiye sahip NP'ler tıbbi cihazlar ve kataterin yüzeylerinde kaplama olarak kullanılmış biyofilm inhibisyonundaki değişiklikler gözlenmiştir (Lethongkam ve ark., 2022; Roe, Karandikar, Bonn-Savage, Gibbins, & Rouillet, 2008). Anti-biyofilm aktivitesi önemli ölçüde yüzey kimyası, yük, hidrofobisite, boyut dağılımı vb. gibi bazı parametrelere bağlıdır. Literatüre göre AgNP'ler biyofilme yakın olduklarında biyofilm bölgeleri ile etkileşime girererek biyofilmin içine nüfuz etmektedirler (Joshi, Singh, & Mijakovic, 2020).

1.8. *Rosmarinus officinalis* (Biberiye) Bitkisi

Türkçe’de hasalbal, kuşdili ve akpüren gibi farklı isimlerle anılmakla beraber yaygın olarak biberiye olarak tanınan *Rosmarinus officinalis* (*R. officinalis*) birçok farklı biyoaktif bileşik içermekte olup lezzet verici bir baharat olarak kullanılmaktadır. Biberiye bitkisi 50-100 cm yükseklikte, çalı görünüşte, yaprak dökmeyen, çiçekleri soluk mavi renkli çok yıllık bir bitkidir. Yabani olarak Akdeniz ikliminin hakim olduğu yerlerde yetişebilen *R. officinalis*; antiinflamatuvar, antioksidan, antimikrobiyal, antiproliferatif, antitümör ve koruyucu aktiviteler gibi çeşitli farmakolojik aktivitelerin uygulanmasından sorumlu biyoaktif moleküllerden oluşmaktadır. Halk hekimliğinde antispazmodik, hafif bir analjezik olarak interkostal nevraljiyi, baş ağrılarını, migreni, uykusuzluğu, duygusal rahatsızlığı ve depresyonu tedavi etmek için kullanılmıştır. Aromatik ve süs bitkisi olarak da geniş kullanım alanına sahiptir (de Oliveira, Camargo, & de Oliveira, 2019; Ghasemzadeh Rahbardar & Hosseinzadeh, 2020).



Şekil 1.6. *R. officinalis* bitkisinin genel görünümü

Birçok çalışmada *R. officinalis* yaprak ekstraktının sulu Ag⁺ iyonları ile indirgenmesi yoluyla AgNP sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen AgNP’ler çeşitli analitik ve mikroskopik teknikler kullanılarak detaylı bir şekilde karakterize edilmiş, antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri, mevcut ticari antibiyotiklerle karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. *R. officinalis* yaprak ekstraktında bulunan polifenollerin, AgNP’lerin boyutunu kontrol etmede indirgeyici ve stabilize edici ajanlar olarak işlev gördüğü belirlenmiştir (Ghaedi, Yousefinejad, Safarpour, Khafri, & Purkait, 2015). *R. officinalis* ekstraktının, 30 dakika içerisinde AgNP’lerin çekirdeklenmesini başlattığı, SPR’nin 450 nm dalga boyundaki pik oluşturma ile doğrulanmıştır. Ayrıca, FT-IR analizi sonucu yaprak ekstraktlarında, gümüş

iyonlarının AgNP'lere indirgenmesinde rol oynayan fenolik fonksiyonel grupların varlığını ortaya koymuştur. SEM ve TEM kullanılarak yapılan gözlemler, AgNP'lerin 10-33 nm boyut aralığında ve küresel morfolojiye sahip olduğunu, XRD analizi ile de, dört belirgin pik oluşumu AgNP'lerin sentezlendiğini göstermektedir. Ayrıca, yeşil sentez yöntemiyle elde edilen nanopartiküllerin antimikrobiyal aktiviteleri de değerlendirilmiş ve bu nanopartiküllerin etkili antibakteriyel ve antifungal özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir (Ayanoğlu, Başkaya, & Bahadırılı, 2016). *R. officinalis* ekstraktı aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerin antimikrobiyal ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır (Daghestani ve ark., 2020; Ghaedi ve ark., 2015).

R. officinalis yaprak ekstraktının kullanımıyla AgNP'lerin yeşil sentezi gerçekleştirilmiş, sentez süreci yalnızca 15 dakika gibi kısa bir sürede tamamlanmıştır. Elde edilen AgNP'ler, UV-Vis, FTIR, XRD, FE-SEM ile birlikte EDX, TEM ve AFM teknikleri kullanılarak kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir. Karakterizasyon sonuçları, nanopartiküllerin kübik yapıda olduğunu ve boyutlarının 14,20-42,42 nm aralığında değiştiğini ortaya koymuştur. FTIR analizi, flavonoidlerin ve terpenoidlerin, nanopartiküllerin sentezi ve stabilizasyonunda kritik roller oynadığını göstermiştir. Ayrıca, biyolojik olarak sentezlenen AgNP'lerin antibakteriyel etkinliği, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) gibi klinik patojenlere karşı disk difüzyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu testler, *R. officinalis* yaprak ekstraktı aracılığıyla sentezlenen AgNP'lerin, söz konusu patojenlere karşı etkili bir antibakteriyel ajan olduğunu doğrulamıştır. Bu bulgular, AgNP'lerin klinik uygulamalarda potansiyel kullanımları açısından önemli bir temel oluşturmaktadır (Das & Velusamy, 2013).

1.9 *Mentha piperita* (Nane) Bitkisi

Lamiaceae ailesinin bir üyesi olan *Mentha piperita* (nane), ticari değeri ve kendine özgü aroması nedeniyle Avrupa, Asya, Amerika Birleşik Devletleri, Hindistan ve Akdeniz ülkelerinde ılıman bölgelerde yetiştirilmekte olup dünya çapında en yaygın kullanılan bitkilerden biridir. Nane bitkisi çok yıllık, otsu, 30-100 cm boyunda, çiçekleri yaprak koltuklarında ve salkım şeklindedir. Yaprığı soğuk algınlığı, ağız enfeksiyonları, farenks ve karaciğerin yanı sıra mide bulantısı, kusma, ishal, kramplar, hazımsızlık ve şişkinlik gibi gastrointestinal sistem bozukluklarında tedavi edici olarak kullanılması yanında antimikrobiyal, antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar ve anti-kanserojen etkileri de

bilinmektedir. Bitkinin, oldukça etkili antioksidanlar olan ve sentetik olanlardan daha az toksik olan polifenoller dahil olmak üzere çeşitli fitokimyasallara sahiptir. Farmakolojide antiseptik, anestezik, serinletici, yatıştırıcı, gaz söktürücü, bulantı kesici ve önleyici ilaçların yapımında kullanılmaktadır (Anwar, Abbas, Mehmood, Gilani, & Rehman, 2019; Baydar, 2005; Mahendran & Rahman, 2020; McKay & Blumberg, 2006).



Şekil 1.7. *M. piperita* bitkisinin genel görünümü

M. piperita bitkisi kullanılarak gümüş nitrat (AgNO_3) biyoredüksiyonu yoluyla gümüş nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Bitki ekstraktı, bu kimyasallarla karıştırıldıktan sonra inkübe edilmiş ve NP'lerin oluşumu UV-Vis spektrofotometre kullanılarak izlenmiştir. Elde edilen nanopartiküller, EDS- SEM ve FTIR teknikleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Araştırmalar, sentezlenen AgNP'lerin genellikle 90 nm çapında ve küresel şekilli olduğunu, ortaya koymuştur. Ayrıca, *M. piperita* yaprak ekstraktının AgNP'lerin sentezi için etkili bir biyo-indirgeyici madde olarak işlev gördüğü bildirmişlerdir. AgNP'lerin klinik olarak izole edilen insan patojenleri olan *S. aureus* ve *E. coli*'ye karşı etkili antimikrobiyal özellikler sergilediği de belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar *M. piperita* ekstraktının nanopartikül sentezi için doğal ve güçlü bir indirgeyici ajan olarak kullanılabilme potansiyelini göstermektedir (MubarakAli, Thajuddin, Jeganathan, & Gunasekaran, 2011).

1.10. *Syzygium aromaticum* (Karanfil) Bitkisi

Myrtaceae familyasına ait olan *Syzygium aromaticum* (*S. aromaticum*); dünyanın farklı yerlerinde yetiştirilen kurutulmuş bir çiçek tomurcuğudur. *S. aromaticum*, 8-12 m boylarında, demetler halinde pembe çiçekleri olan ve yaz-kış yeşil olan yaprak dökmeyen, ağaç türüdür. Ağacın pembe olan çiçeklerinin kurutulularak elde edilen tomurcuklarına karanfil adı verilmektedir (Kamatou, Vermaak, & Viljoen, 2012).



Şekil 1.8. *S. aromaticum* bitkisinin çiçeği ve kurutulmuş hali

S. aromaticum, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle gıda sektöründe, özellikle et işlemede, kimyasal koruyuculara alternatif olarak kullanılmaktadır. Ayrıca parfüm endüstrisinde de yaygın olarak tercih edilmektedir (El-Saber Batiha ve ark., 2020). *S. aromaticum*, yüksek konsantrasyonda bulunan çeşitli kimyasal bileşenler sayesinde, farklı dejeneratif hastalıkların inhibisyonunda etkili rol oynadığı bilinmektedir. Karanfilin esansiyel yağı olan öjenol; geleneksel tıpta yanık ve yara tedavisinde, diş ağrısı ve enfeksiyonlarında ağrı kesici olarak kullanılmaktadır. Hindistan ve Çin geleneksel tıbbında ısıtıcı ve uyarıcı bir madde olarak kullanılan karanfil, mide bulantısı, karaciğer ve bağırsak bozuklukları gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde yüzyıllardır kullanılmaktadır. Ayrıca, Amerika'da gıda kaynaklı patojenlerin (virüs, parazit ve farklı bakteriyel ajanlar) enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Öjenolün diş pulpası dokusuna nüfuz edebilmesi ve kan dolaşımına geçebilme özelliğiyle diş hekimliğinde kullanımı yaygındır. Anti-karsinojenik aktivite gösteren seskiterpenler içermesi, *S. aromaticum* sağlık alanında kullanımını daha da değerli kılmaktadır (Batiha ve ark., 2020; Kamatou ve ark., 2012).

S. aromaticum metalik nanopartiküllerin oluşumunda indirgeyici ve kaplayıcı ajan olarak kullanılmaktadır. *S. aromaticum* sulu ekstraktı ile oluşturulan AgNP'ler oral

mikroorganizmalardaki antimikrobiyal etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada AgNP'lerin UV-Vis spektrumunda 400-500 nm'de pik oluşturduğu TEM'de 4-16 nm boyuta sahip ve küresel formda kristal yapılar oluşturduğu gözlenmiştir. *S.aromaticum* ile sentezlenen AgNP'lerin Gram-pozitif ve Gram-negatif mikroorganizmaların yanı sıra ağız boşluğunda yaygın olarak bulunan mayalara karşı da antimikrobiyal etkinliğinin olduğu belirlenmiştir (Jardon-Romero ve ark., 2022).



2. AMAÇ

S. sanguinis diş yüzeyinde biyofilm oluşumunda öncül kolonizer olarak yer almaktadır ve diğer öncül ve patojen bakterilerin bağlanmasına aracılık etmektedir. *S. sanguinis* oral florada bulunan diş çürüğüne neden olabilen kommensal bir bakteridir. Ancak bakterinin dental işlemler veya diş fırçalamayla dahi kan dolaşımına geçerek bakteriyemiye neden olduğu bilinmektedir. *S. sanguinis* özellikle kalp rahatsızlıklarından birine sahip ve kötü ağız hijyeni olan kişilerde endokardite sıklıkla neden olduğu bilinen bakteriler arasında yer almaktadır. Bu çalışmada ağız gargarası veya diş macunu içeriğinde kullanılabilecek, AgNP'lerin sentezlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla çevre dostu, ucuz maliyetli ve toksik etkilerinin daha düşük olduğu bilinen yeşil sentez yöntemi ile *R. officinalis*, *M. piperita*, *S. aromaticum* bitkileri kullanılarak AgNP'ler sentezlenecek olup, bu AgNP'lerin *S. sanguinis*'e karşı antimikrobiyal, antibiyofilm etkilerinin varlığı ve bakterinin virülansında rol oynayan *spxB* geni üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir. Sentezlenen AgNP'lerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi için sitotoksikite testlerinin yapılması da planlanmıştır.

Bu çalışmada diş yüzeyinde öncül biyofilm oluşturan *S. sanguinis*'e karşı yüksek antimikrobiyal, antibiyofilm ve antivirülans etkili aynı zamanda düşük sitotoksik etkiye sahip AgNP'lerin yeşil sentez yoluyla sentezlenmesi amaçlanmıştır.

3. YÖNTEM

3.1. Besiyerlerinin, Ayıraçların ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

3.1.1. Brain Heart Infusion Agar (BHIA)

Brain Heart Infusion agar (Merck, Almanya), ticari olarak toz halinde temin edilmiş ve üretici firmanın önerisi doğrultusunda hazırlanmış, 121°C’de 15 dakika steril edilerek 45–50°C’ye kadar soğutulmuş, aseptik şartlarda 20 ml besiyeri, plastik petri kaplarına dökülmüş tamamen soğuması beklenmiştir. Kullanım zamanına kadar +4 °C’de saklanmıştır.

3.1.2. Brain Heart Infusion Broth (BHIB)

37 g toz BHIB (Merck, Almanya) besiyeri 1 litre distile suda süspanse edilmiştir. Besiyeri ısı ile tamamen çözünmüş 121°C’de 15 dakika otoklavda (Nüve, Türkiye) steril edilmiştir. Burgu kapaklı şişelerde +4°C’de saklanmıştır.

3.1.3. %2’lik Sükrozlu Brain Heart Infusion Broth (BHIBS)

Sükroz 4 g tartılarak 100 ml distile suda çözünüp filtreden (0,22 µm) geçirilerek steril edilmiştir. BHIB besiyeri 3,7 g tartılmış 100 ml distile suda çözünmüştür. Steril edilen besiyerine, hazırlanan sükroz çözeltisinin tamamı eklenmiş ve son konsantrasyonu %2 olan besiyeri elde edilmiştir. Biyofilm deneylerinde kullanılabileceği kadar +4°C’de saklanmıştır.

3.1.4. Kristal Viyole Solüsyonu

0,1 gram toz kristal viyole tartılmış 100 ml distile suda çözündükten sonra filtreden (0,22 µm) geçirilip biyofilm deneyleri için kullanılabileceği kadar karanlık ortamda +4 ° C’de saklanmıştır.

3.1.5. Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)

Yıkama tamponu olarak kullanılan PBS (Sigma -Aldrich, Almanya) ticari olarak tablet formunda satın alınmıştır. Fosfat tampon çözeltisi (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl ve 10 mM (25 ° C’de pH (7,4)) elde etmek için 1 tablet 200 ml steril distile su içinde çözülerek

hazırlanmıştır. 121°C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Hazırlanan solüsyon burğu kapaklı steril cam şişelerde saklanmıştır.

3.1.6. %1’lik sülfürik asit çözeltisinin hazırlanması

Deiyonize su 90 mL hazırlanmış ve üzerine 1 mL H₂SO₄ eklenip, karıştırıldıktan sonra deiyonize su ile hacmi 100 mL’ye tamamlanmıştır.

3.1.7. BaCl₂ çözeltisinin hazırlanması

1175 mg BaCl₂.2H₂O tartılıp ve 50 mL deiyonize su ile karıştırılarak BaCl₂.2H₂O’nin çözünmesi sağlanmış ve deiyonize su ile hacmi 100 mL’ye tamamlanmıştır.

3.1.8. 0,5 McFarland standardı hazırlanması

Baryum klorür BaCl₂ çözeltisinden 0,5 ml, %1’lik sülfürik asit çözeltisinden 99,5 ml alınarak cam bir tüp içerisinde karıştırılarak 0,5 McFarland standardı hazırlanmıştır.

3.1.9. Resazurin hazırlanması

Resazurin (Sigma-Aldrich, Almanya), 0,01 g çözdürülmüş %0,01’lik rezasurin hazırlanmıştır. Filtreden geçirilmiş ve 4 °C’de saklanmıştır.

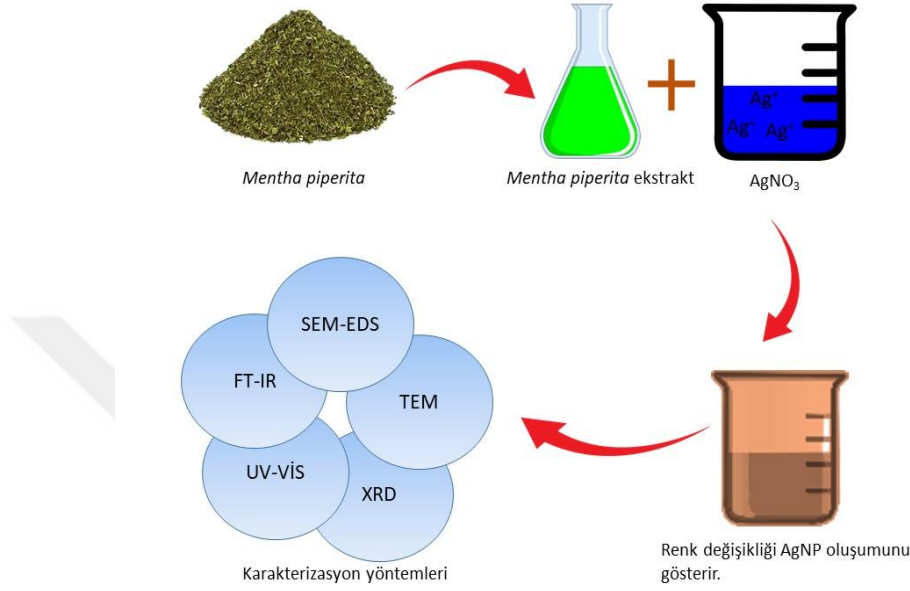
3.2. Bitki ekstraktlarının hazırlanması

Ticari olarak yerel bir marketten alınan *R. officinalis*, *M. piperita*, *S. aromaticum* distile su ile iki kez yıkanıp kurutulmuştur. Öğütücü cihazla (IKA-Universalmühle M20, Almanya) küçük parçalar haline getirilmiştir. Kurutulmuş ve öğütülmüş olan bitkiler (*R. officinalis*, *M. piperita*, *S. aromaticum*) 1, 5 ve 10 g olarak tartılıp 100 ml ultra saf su içerisine ilave edilerek 50° C’de ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda (Stuart, İngiltere) iki saat boyunca bekletilip filtre kâğıdından (Whatman filtre kâğıdı No. 1) süzülerek üç farklı konsantrasyonda ekstrakt elde edilmiştir.

3.3. Gümüş nanopartiküllerin yeşil sentezi

Gümüş nitrat (AgNO₃) (Sigma Aldrich Chemical, ABD) ticari olarak satın alınmıştır. Gümüş nitrat (AgNO₃) çözeltisi ultra saf su ile 30 mM hazırlanmıştır. Bitki ekstraktına

gümüş nitrat çözeltisi damla damla eklenmiştir. 2 saat 50° C de bekledikten sonra 5000g’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılırken pelet iki kez ultra saf su ile yıkanmıştır. Nanopartiküller etüvde 50°C kurutulup karanlık alanda 4° C’de saklanmıştır.



Şekil 3.1. *M. piperita* AgNP sentezi ve karakterizasyonu şematik gösterimi

3.4 Gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu

3.4.1. UV-Vis Analizi

Polarize ışığın, metal bir yüzeye çarpıp yansıması esnasında metal yüzeyinde meydana gelen titreşim hareketlerine bağlı olarak gelişen fiziksel yapıya SPR denmektedir ve bu kantitatif olarak da tespit edilebilmektedir. Çözelti içerisinde zamanla konsantrasyonu artan AgNP’nin, titreşim hareketlerinin yani SPR’lerinin de artmasıyla çözeltilerinde sarı-kahverengi bir renk aldıkları bilinmektedir (Sinner & Tunkel, 2015). UV-Vis spektrofotometrenin dalga boyu 300 ile 700 nm arasında (Merck Spectroquant Prove 600 UV/VIS, Almanya) kullanılarak ölçüm gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. TEM Analizi

NP'lerin morfolojisi ve boyutları TEM kullanılarak değerlendirilmiştir. TEM analizi için NP solüsyonları karbon kaplı bakır ızgaralarına damlatılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında kurumaya bırakılarak Hitachi HT7800 marka TEM ile görüntü alınmıştır. Boyutları ImageJ yazılım paketi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.4.3. SEM-EDS Analizi

Sentezlenen AgNP'lerin morfolojisi ve boyut dağılımı, Leica EM ACE600 cihazı ile altın kaplandıktan sonra FE-SEM (Hitachi Regulus 8230 kullanılarak analiz edilmiştir. EDS analizinde ise birleşik olarak çalışmakta olan EDS dedektörü vasıtasıyla elementlerin miktarının tespit edilip haritalandırmaları yapılmıştır.

3.4.4. XRD Analizi

NP'lerin karakterizasyon yöntemlerinden biri olan XRD yönteminde AgNP'lerin kristal yapı ve boyutları araştırılmıştır. Panalytical Empyrean XRD ile 2 θ düzlemde 0,1 saniyede 0,02° aralıklarla, 10° ile 80° açılar arasında analiz yapılmıştır.

TEM, SEM ve XRD analizleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır.

3.4.5. FT-IR Analizi

FT-IR spektroskopisi, örneklerdeki bağ yapılarını tespit etmek için kullanılan bir analiz yöntemidir. Perkin Elmer Spectrum Two cihazıyla potasyum bromür (KBr) ile kaplanan katı haldeki maddelerin azaltılmış toplam yansıma (Attenuated Total Reflectance) tekniğiyle (PIKE Gladi ATR) ile analizi gerçekleştirilmiştir.

3.5. *R. officinalis*, *M.piperita*, *S. aromaticum* AgNP'lerin Antimikrobiyal Etkileri

3.5.1 Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

Çalışmada *S. sanguinis* ATCC 10556 suşu kullanılmıştır. Antimikrobiyal etkisi test edilecek suş saklandıkları -80°C ortam koşullarından çıkarılıp oda ısısına gelmesi sağlanmış sonra BHIA ekim yapılarak 37°C'de 24 saat mumlu jarda inkübasyona bırakılmıştır. Üreyen

saf kolonilerden aynı şekilde ikinci kez tek koloni düşürme yöntemiyle ekimi yapılmış ve 37°C’de 24 saat inkübasyon sonrası üreyen saf bakteri kolonilerinden 2-4 koloni kadar steril öze ile alınıp 5 ml steril serum fizyolojik (SF) içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğer bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyon 1/20 oranında dilüe edildikten sonra besiyeri kontrol kuyucuğu dışında üreme kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere her bir kuyucuğa son bakteri inokulum konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL olacak şekilde 10 µL eklenmiştir (Cezaroğlu, 2022).

3.5.2. AgNP’lerin Minimum İnhibitör Konsantrasyonu ve Minimum Bakterisidal Konsantrasyon’larının Belirlenmesi

AgNP’lerin stok solüsyonu için gerekli miktarda nanopartikül steril kaplar içerisinde hassas terazide tartılmış ve konsantrasyonu 2048 µg/mL olacak şekilde steril distile su içerisinde çözdürülmüştür. Çözeltinin homojen hale gelmesi için yarım saat ultrasonik banyoda (Branson, ABD) oda sıcaklığında bekletilmiştir. Çözeltiler her işlem öncesi taze olarak hazırlanmıştır. NP’lerin Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri 96 kuyucuklu plakalarda sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Kuyucuklara 100 µL BHIB eklenmiştir. Her bir AgNP için 2048 µg/ml konsantrasyonda hazırlanan stoktan 100 µL kuyucuklara eklenerek ikişer kat azalan seri dilüsyonlar gerçekleştirilmiştir. Böylece 1024-2 µg/ml’lik seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak AgNO₃ kullanılmıştır. Mumlu jar içinde 37° C’de 24 saat inkübasyondan sonra mikropalaklar incelenip üremenin inhibe olduğu ilk konsantrasyon MİK olarak değerlendirilmiştir. MİK değerlerinin belirlenmesinden sonra üremenin görülmediği kuyucuklardan 10 µL alınıp BHIA besiyeri üzerine ekilmiş inkübasyon sonrası bakteri üremeleri değerlendirilmiş ve plakta üremenin görülmediği ilk konsantrasyon MBK olarak belirlenmiştir (Cezaroğlu, 2022).

3.5.3. Resazurin Yöntemi

MİK değerini kolorimetrik olarak belirlemek amacıyla rezasurin yöntemi kullanılmıştır. MİK belirlemek amacıyla yapılan inkübasyon tamamlandıktan sonra canlılık indikatörü olarak hazırlanan %0,01’lik rezazurin sodyum solüsyonundan her kuyucuğa 20 µL eklenerek 1 saat 37°C’de etüvde inkübasyona bırakılmış, İnkübasyon sonrası üreme ve renk değişikliği açısından değerlendirilen plaklarda üreme olan kuyucuklar pembe, üreme

olmayan kuyucuklar mavi-mor renkte gözlenmiştir. Mavi renkte gözlenen en düşük NP konsantrasyonu *S. sanguinis* için MİK değeri olarak belirlenmiştir (Elshikh ve ark., 2016).

3.6. AgNP'lerin Antibiyofilm Etkileri

Çalışmada biyofilm kültür ortamı oluşturmak amacıyla kullanılan *S. sanguinis* ATCC 10556 suşu BHIA besiyerine ekilmiş 37°C'de mumlu jar içerisinde bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tek koloniler BHI broth bulunan tüpe ekilerek 37°C'de mumlu jarda, 24 saat inkübe edilerek alt kültürleri yapılmıştır. Alt kültürü yapılan tüpler 3000 g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Pelet steril PBS ile 2 kez yıkanmış, üzerine BHIBS besiyeri ilave edilmiş, 1:10 oranında dilüe edilerek biyofilm oluşturmak üzere bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. MİK deneylerinde anlatıldığı gibi AgNP'lerin 1024-2µg/mL arasında olacak şekilde düz tabanlı mikropklarda seri dilüsyonları yapılmıştır. Hazırlanmış bakteri süspansiyonları 20 µL 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropklara ilave edilmiştir. Daha sonra 36 saat 37 °C de 100 rpm'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. AgNP içermeyen kuyucuklar pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra, kuyucuklar 3 kez 200 µL PBS ile yıkanmıştır. Kuyucuklarda kalan biyofilmler metil alkol (Merck, Almanya) ile sabitlenip %0,1'lik kristal viyole ile boyanmıştır. Fazla kalan boya deiyonize suyla yıkanmış ve kuyucuklar kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutma işleminden sonra 200 µL % 95 (v/v) etanol (Merck, Almanya) ilave edilip 590 nm de çoklu plaka okuyucuda ölçülmüştür deneyler 3 kez yapılmış ve ortalama Optik Dansite (OD) değerleri % biyofilm inhibisyon etkinliği hesaplamasında aşağıdaki formül temel alınarak değerlendirilmiştir (Öcal, Tekeli, & Dolapçı, 2022; Wypij ve ark., 2022).

$$\% \text{Biyofilm inhibisyon} = \left[1 - \left(\frac{OD_{590 \text{ AgNP'ler ile işlem görmüş hücreler}}}{OD_{590 \text{ pozitif kontrol}}} \right) \times 100 \right]$$

3.6.1. AgNP'lerin biyofilm üzerine etkilerinin SEM ile görüntülenmesi

Biyofilmin elektron mikroskopunda görüntülenmesi amacı ile polilizin kaplı lamalar (Epredia, USA) üzerinde biyofilm oluşturulmuştur. Polilizin kaplı lamalar cam kesme makasıyla kesilmiş ve önce %70'lik etil alkol ile temizlenmiş sonra UV ile steril edilmiştir. Polilizin kaplı lamalar 24 kuyucuklu hücre kültür plaklarının içine yerleştirilmiştir. *R. officinalis*, *M. piperita*, *S. aromaticum* AgNP'ler sub-MİK konsantrasyonları sırasıyla 128,

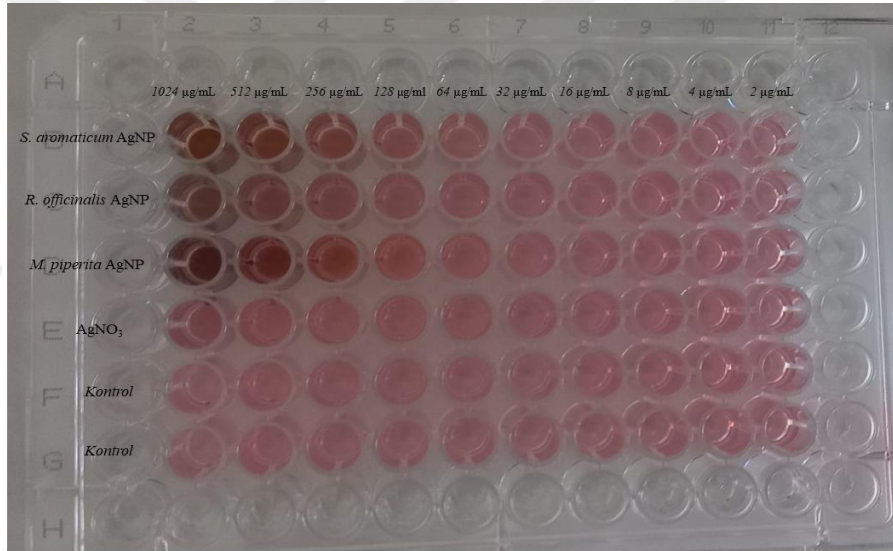
64, 64 µg/ml olacak şekilde BHIBS besiyeri içerisinde hazırlanmış ve 720 µL olarak 24 kuyucuklu plakların içerisine ilave edilmiştir. Biyofilm oluşturmak için daha önce anlatıldığı şekilde hazırlanan *S. sanguinis* kültürü sub-MİK konsantrasyonda AgNP içeren plaklara 80 µL olarak inoküle edilmiştir. Mumlu jar içerisinde 36 saat 37 °C de 100 rpm’de çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda PBS ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Gluteraldehit %2,5 (Merck, Almanya) hazırlanıp lamaların üstünü tamamen kaplayacak şekilde 2 ml eklenmiştir. Fiksasyon işlemi +4°C’de 24 saat sürede gerçekleştirilmiştir. Ertesi gün gluteraldehit yerine aynı oranda PBS ilave edilmiş 15 dakika +4°C’de bekletilmiştir. İşlem 3 kez tekrar edilmiştir. Örnekler alkolle dehidratasyon işlemi uygulanmıştır. Örnekler ayrı kasetler içerisine yerleştirilip %100, %96, %70, %50 ve %25’lik alkol konsantrasyonlarında her bir solüsyonda 30 dakika olacak şekilde bekletildikten sonra, 24 saat boyunca açık havada kalacak şekilde kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan örneklerin SEM görüntüleri Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde yapılmıştır.

3.7. Sitotoksikite Deneyleri

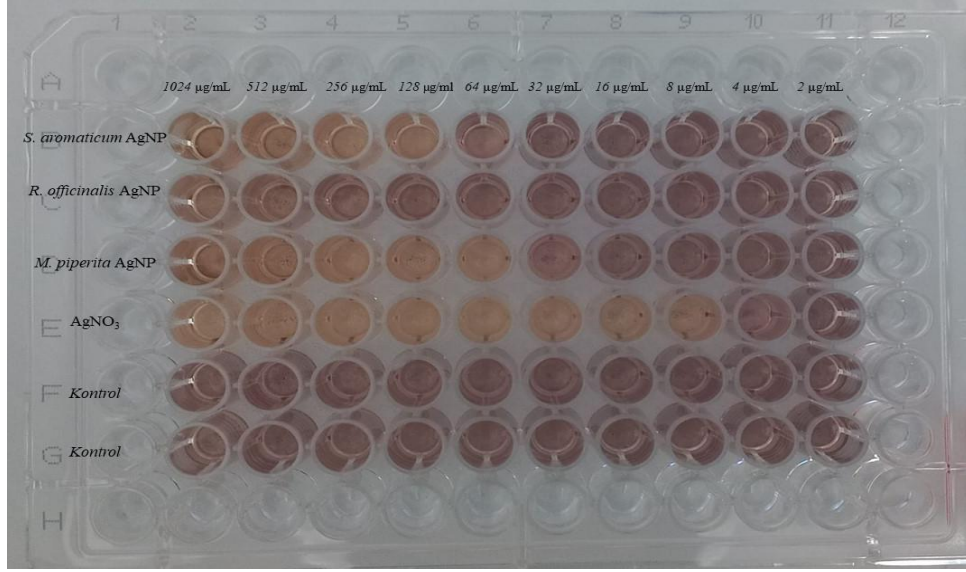
Sentezlenen üç farklı AgNP’nin L929 fare fibroblast hücre hattı üzerindeki etkileri, MTT hücre canlılığı testi kullanılarak değerlendirilmiştir. -196°C’de stoktan çıkarılan hücre hattı 25 °C oda sıcaklığına getirilmiştir. Damla damla üzerinde Dulbecco’nun Modifiye Eagle Medyumu (DMEM) eklenmiştir. Santrifüj işlemi 1800 rpm ve 4 dakikada gerçekleştirilmiştir. L929 hücrelerinin DMEM-F12’de (%10 fetal sığır serumu, Penicillium-Streptomisin ile desteklenmiş) flasklara ekimi gerçekleştirilmiştir. 37 °C’de %5 CO₂’li etüvde inkübe edilmiştir. 24 saat sonra Dulbecco’nun Fosfat Tampon Solüsyonu (dPBS) ile yıkandıktan sonra tripsinize edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra hücrelerin üzerine DMEM-F12 eklenerek %5 CO₂’li etüvde inkübasyona bırakılmış, %80 konfluent hücre kültürü oluştuğunda tripsinize edilmiştir. Tripsinizasyondan sonra hücreler dPBS ile yıkanıp 1800 rpm’de 4 dakika santrifüjlenmiştir. Pelet üzerine 1 ml besiyeri eklendikten sonra 1/2 dilüsyon faktörü ile Neubauer Lamında hücreler sayılmıştır. Her kuyucukta 10⁴ h/ml olacak şekilde 96 kuyucuklu plaka içerisine hücre süspansiyonu eklenmiş ve 37 °C’de %5 CO₂’li etüvde inkübe edilmiştir. Hücre ekiminden sonra besiyeri buharlaşma ihtimali düşünüldükçe A satırı ve 1 sütündeki kuyucuklara buharlaşmayı önlemek için PBS eklenmiştir. İnkübasyondan sonra 100 µL, AgNP’ler DMEM içerisinde çözülürerek

hazırlanmıştır. AgNO₃ ve *R. officinalis*, *M.piperita*, *S.aromaticum* AgNP'lerin 1024-2 µg/mL konsantrasyonlarında seri dilüsyonlar hazırlanarak kuyucuklara ayrı ayrı eklenmiştir (Şekil 3.2.). Üzerine AgNP eklenmemiş hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Deney 3 kez tekrar edilmiştir. 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra AgNP içeren ortam aspire edilmiş, kuyucuklar PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Kuyucuklara 100 µL 5 mg/ml MTT (Merck, Almanya) çözeltisi eklenmiştir (Şekil 3.3.). Plaklar 4 saat daha 37°C'de karanlık ortamda inkübe edilmiş inkübasyon sonrası 100 µL DMSO eklenip pipetaj ve çalkalama yapılmıştır (Şekil 3.4.). Çoklu plaka okuyucuda 590 nm'de OD ölçülmüştür. Hücrelerdeki % canlılık, kontrol grubunun absorbansı %100'e ayarlanarak, % cinsinden aşağıda belirtilen formül yardımı ile hesaplanmıştır.

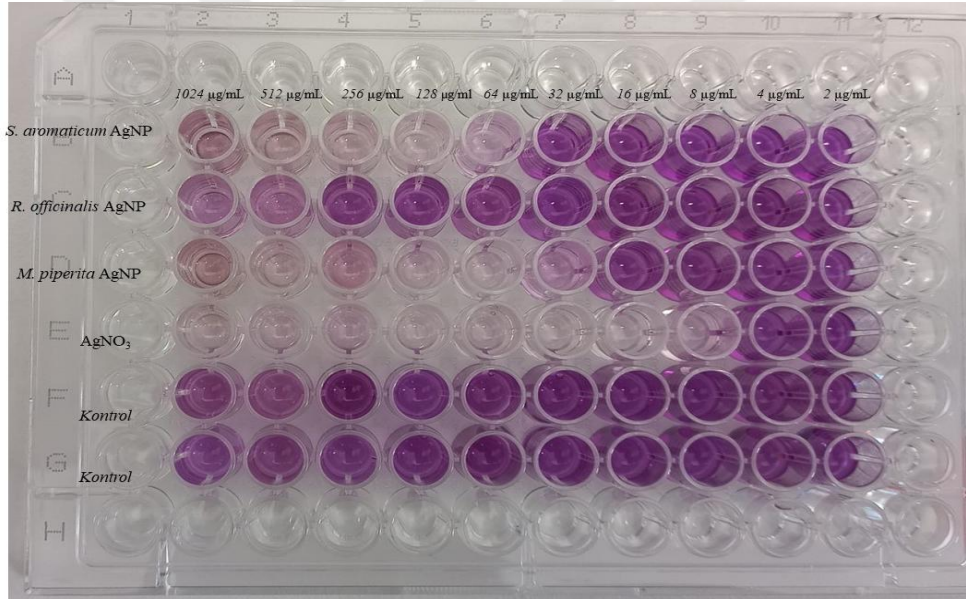
$$\% \text{Canlılık} = \left[\left(\frac{\text{OD AgNP'lerle muamele edilen hücre}}{\text{OD kontrol hücre}} \right) \times 100 \right]$$



Şekil 3. 2. AgNP'ler ile muamele edilmiş hücrelerin 96 kuyucuklu mikropalak görüntüsü



Şekil 3. 3. MTT ekledikten sonra 4 saat inkübasyon sonucu



Şekil 3. 4. DMSO ekledikten sonra mikropalak görüntüsü

3.8. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR ile gen ekspresyon analizi

BHIB besiyeri 100 µL 96 kuyucuklu mikropalaklara koyulmuştur. AgNP'lerin konsantrasyonu MİK değerlerinin 1/4'ü sırasıyla 64, 32, 32 µg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Bir gecelik taze kültürden hazırlanan *S. sanguinis* süspansiyonu 0,5 McFarland bulanıklığında dilüe edilmiştir. Her bir kuyucukta son konsantrasyon 5×10^5 olacak şekilde bakteri inokülasyonu yapılmıştır. AgNP eklenmemiş kuyucuk pozitif kontrol

olarak belirlenmiştir. Mikroplak 37°C’de mumlu jarda, çalkalamalı inkübatörde 100 rpm’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda kültürler toplanarak santrifüj gerçekleştirilmiş ve PBS ile tüm süspansiyonlar 1×10^9 bakteri/ml yoğunluğuna ayarlanmıştır.

3.8.1. RNA İzolasyonu

AgNP’lerle muamele edilen bakteriler ve kontrol grubunun total RNA izolasyonunda High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche, Almanya) kullanılmıştır. İzolasyon işlemleri aşağıda verilen sırayla protokole göre DNA/RNA UV (Biosan, Letonya) çalışma kabininde gerçekleştirilmiştir.

1. Örnekler santrifüjde 5000 x g’de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir
2. Pelet 200 µl 10 mM Tris HCl, pH 8 içinde süspanse edilmiştir.
3. Lizozim (50 mg/ml) 4 µl eklenip, 10 dakika boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. Hücre duvarını parçalamak için ek olarak 30 saniye vortekslenmiştir.
4. Lysis/-Binding Buffer 400 µl eklenip iyice karıştırılmıştır.
5. Filtreli tüp ile toplama tüpünü birleştirip sıvı üstteki tüpe etkenmiştir.
6. Santrifüjde 15 saniye boyunca 8.000 x g’de santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiş toplama tüpleri atılmış yeni toplama tüpü takılmıştır.
7. DNaz İnkübasyon Tamponunu 90 µl steril bir reaksiyon tüpüne pipetlenmiş, 10 µl DNaz I ekleyip, karıştırdıktan sonra hazırlanan çözeltiyi filtre tüpünün üst rezervuarına pipetlenmiştir. Oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edilmiştir.
8. Filtreli tüpün üst rezervuarına 500 µl Yıkama Tamponu I eklenmiş ve 8.000 x g’de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpleri atılmış yeni toplama tüpü takılmıştır.
9. Filtreli tüpün üst rezervuarına 500 µl Yıkama Tamponu II eklenmiş ve 8.000 x g’de 15 saniye santrifüjlenmiştir. Toplama tüpleri atılmış yeni toplama tüpü takılmıştır

10. Filtreli tüpün üst rezervuarına 200  l Yıkama Tamponu II eklenmiş ve kalan Yıkama Tamponunu çıkarmak için maksimum hızda yaklaşık 13.000 x g'de 2 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.

11. Alttaki toplama tüpü atılmış ve filtreli t p temiz, steril 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.

12. RNA'yı ayırılmak için: Filtreli tüpün üst rezervuarına 50  l Elüsyon Tamponu eklenmiştir. T p 8.000 x g'de 1 dakika boyunca santrifüjlenmiştir.

İşlemin sonunda mikrosantrifüj tüpünde   z nen RNA bulunmaktadır.

3.8.2. İzole Edilen RNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İzole edilen RNA  rnekler Nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) ile  l lm ştir. Cihaza RNA süspansiyonundan 2  l pipetlenerek ölüm yapılmıştır. Örneklerin spektrofotometre ile  l ld ğ nde RNA konsantrasyonları 35-100 ng/ l aralığında saptanmıştır. Elde edilen RNA'nın saflığı için 260/280 oranı değerlendirilmiştir. Tüm örneklerin 260/280 değerinin 1,80-2,00 aralığında olduğu tespit edilmiştir. Yeterli ve uygun saflıkta RNA hızlı bir şekilde cDNA'ya çevrilmiştir. Kalan RNA -80 C'de saklanmıştır.

3.8.3. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden, üretici firmanın  nerileri doğrultusunda, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit protokolüne göre:

1. Tablo 3.1.'de verilen içeriğe göre her bir RNA izolatu için ayrı ayrı cDNA sentez karışımı hazırlanmıştır.

2. Karışımlar, termal döngü cihazında sırasıyla 25 C'de 5 dakika ve 42 C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.

3. Son olarak 70 C'de 5 dakikalık inkübasyonla sentez tamamlanmıştır.

Sentezlenen cDNA'lar seyreltilerek gerçek zamanlı kGZ-PZR deneylerinde kullanılmıştır.

Tablo 3.1. cDNA Sentezi için Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri

Bileşen	Miktar (µl)
Steril nükleaz-free saf su	6
5X reaksiyon tamponu	4
RNase inhibitörü (RiboLock)	1
dNTP karışımı (10 mM)	2
Primer (Random Hexamer)	1
Ters transkriptaz (RevertAid M-MuLV)	1
Kalıp RNA	5
Toplam	20 µl

3.8.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR

Bu çalışmada, çift iplikli DNA'ya bağlanarak ışıma yapan SYBR Green boyası kullanılmıştır. Serbest halde sulu çözelti içerisinde zayıf bir floresanlık gösteren boya çift sarmallı DNA ile bağlandığında floresan özelliği artmaktadır. Bu çalışmada, gen ekspresyonu tayini için göreceli kantifikasyon (relative quantification) yapılmıştır. kGZ-PZR, gen ekspresyon seviyesini ölçmek için göreceli miktar tayini olarak kullanılır. Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix Karışımı (ROX Yok) (ABclonal, ABD) deney prosedürü buz üstünde aşağıda verilen Tablo 3.2.'deki firma talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Tablo 3.3.'de verilen gen ve primer dizileri kullanılmıştır. Tablo 3.4.'de verilen koşullarda kGZ-PZR (Bioneer, Japonya) cihazında deney gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.2. Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (No ROX) için Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	Miktar (µl)
Genious 2X SYBR Green Fast qPCR Mix (No ROX)	10
Forward Primer (10 µM)	0,4
Reverse Primer (10 µM)	0,4
cDNA	2
Steril nükleaz-free saf su	7,2

Tablo 3.3. Kullanılan Primer Dizileri

Gen	Primer	Primer dizileri (5' – 3' yönünde)	Referanslar
<i>spxB</i>	<i>spxBF</i>	GCGTACATCTCCACTCTTTG	(Zheng ve ark., 2011)
	<i>spxBR</i>	CACCCATGATGTTCCATACTT	
16S	16SF	AAGCAACGCGAAGAACCTTA	(Zheng ve ark., 2011)
	16SR	GTCTCGCTAGAGTGCCCAAC	

Tablo 3.4. kGZ-PZR Koşulları

PZR koşulları			
	Sıcaklık (°C)	Tekrar	Süre
İlk denatürasyon	95	1	3 dk
Denatürasyon	95	40	5 sn
Primer bağlanması	60	40	30 sn
Uzama	72	40	30 sn

Real-time PZR ile elde edilen amplifikasyon sonuçlarının kantifikasyonu için “ $\Delta\Delta C_t$ ” yöntemi kullanılmıştır. Gen ifadesinin kat değişimi Livak ve Schmittgen'in modeli kullanılarak hesaplanmıştır (Livak & Schmittgen, 2001). Normalizasyon için referans genden ve karşılaştırma yapabilmek için kontrol grubundan yararlanılmıştır. Hedef genin bir referans gene göre relatif ekspresyonuna bakılmıştır. Bu yöntem düşük yoğunlukta

sentezlenen genlerin ekspresyon çalışmaları için idealdir. Hesaplama yaparken aşağıda verilen denklemler kullanılmıştır (Rao, Huang, Zhou, & Lin, 2013).

$$\text{Kontrol } \Delta\text{Ct} = \text{Kontrol Ct}(\text{spxB gen}) - \text{Kontrol Ct}(16\text{S rRNA})$$

$$\text{Örnek } \Delta\text{Ct} = \text{Örnek Ct}(\text{spxB gen}) - \text{Örnek Ct}(16\text{S rRNA})$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = [(\text{Örnek } \Delta\text{Ct})_{\text{ort.}} - (\text{Kontrol } \Delta\text{Ct})_{\text{ort.}}]$$

$$\text{Kat değişimi} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

3.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel karşılaştırmaları GraphPad Prism 10.00 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotlarla (ortalama, standart sapma) birlikte niceliksel verilerin karşılaştırılmasında Tek yönlü varyans analiz testi (ANOVA) kullanılmıştır. İstatistiksel olarak fark bulunan gruplara ise Post Hoc Sidak testleri düzenlemesi uygulamıştır. Tüm değerlerin istatistiksel analizlerinde ve $p < 0,05$ 'in altındaki farklılıklar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu(GOKAEK)'nun 09.03.2023 tarihli 62 sayılı onayı ile yapılmıştır

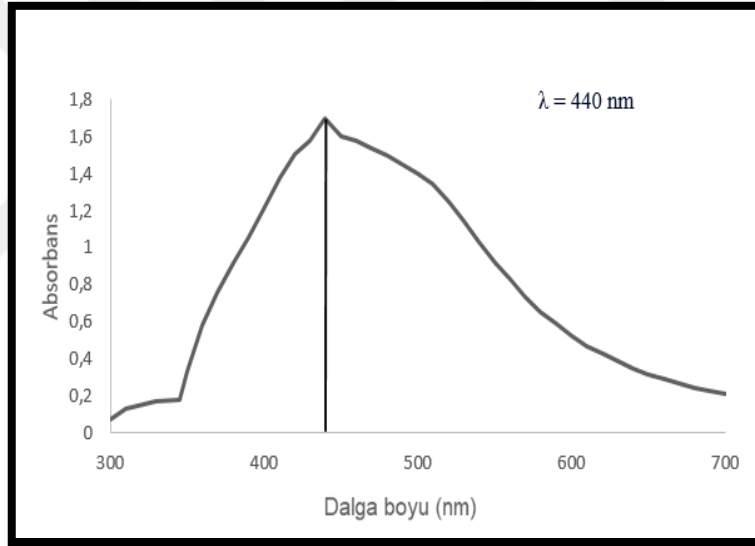
4. BULGULAR

4.1. Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi

Bitki ekstraktları kullanılarak AgNP'lerin sentezi literatür bilgileri dikkate alınarak hazırlanmış ve çeşitli optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Sentez çalışmalarında %1 ve %10'luk olmak üzere iki farklı ekstrakt konsantrasyonu ve 10 mM ve 30 mM olmak üzere iki farklı AgNO₃ konsantrasyonu kullanılmıştır. Çalışmalarda, AgNO₃ çözeltileri tüm özütlerle damla damla 3/1 oranında eklenmiştir. Spektrum ölçümleri 30 dk sonra UV-Vis spektrofotometresi (Merck Spectroquant Prove 600 UV/VIS, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve spektrumlar elde edilmiştir. Çözeltiler dilüe edildikten sonra ölçüm işlemi gerçekleştirilmiştir. Ölçüm esnasında kör çözelti olarak sentezde kullanılan bitki ekstraktı çözeltisi kullanılmıştır. Nanopartikül oluşumu renk değişikliği açısından gözlemlendiğinde başlangıçta *R. officinalis* bitki ekstraktı sarı renkli iken AgNO₃ çözeltisinin ilavesiyle birlikte renk değişiminin gerçekleştiği gözlenmiştir. 15 dakika içinde rengin sarıdan kahverengiye dönüştüğü gözlenmiştir. Bu renk değişikliği AgNP sentezinin gerçekleştiğini göstermektedir Şekil 4.1.'de renk değişikliği gösterilmiştir. Görünür bölgede oluşan pikler AgNP'lerin karakteristik yüzey plazmonuna aittir ve AgNP'lerin varlığını net bir şekilde göstermektedir. *R. officinalis* AgNP literatüre uyumlu şekilde 440 nm'de pik göstermiştir. Şekli 4.2'de *R. officinalis* AgNP UV-Vis analizi görülmektedir.

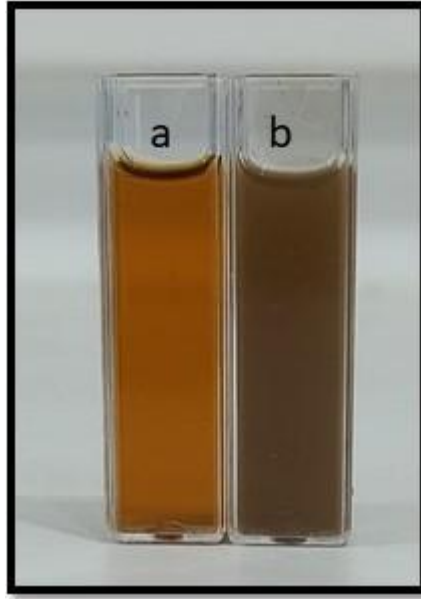


Şekil 4.1. *R. officinalis* ekstraktından (a) *R. officinalis* AgNP (b) sentezinde renk değişikliği gözlenmiştir.

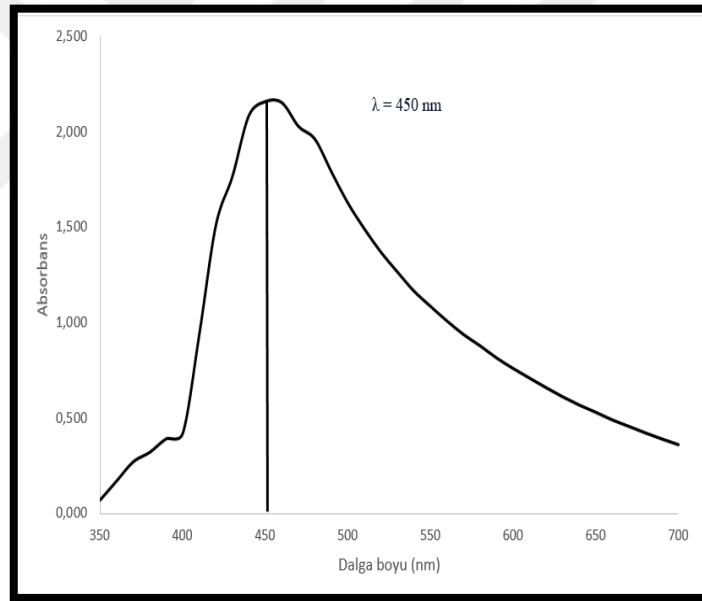


Şekil 4.2. *R. officinalis* AgNP UV-Vis spektrumu

M. piperita AgNP'nin renk değişikliği sentezin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.3.). Görünür bölgede oluşan pikler AgNP'lerin karakteristik yüzey plazmonuna aittir ve AgNP'lerin varlığını net bir şekilde göstermektedir. *M. piperita* AgNP literatüre uyumlu şekilde 450 nm'de pik göstermiştir (Şekil 4.4.).

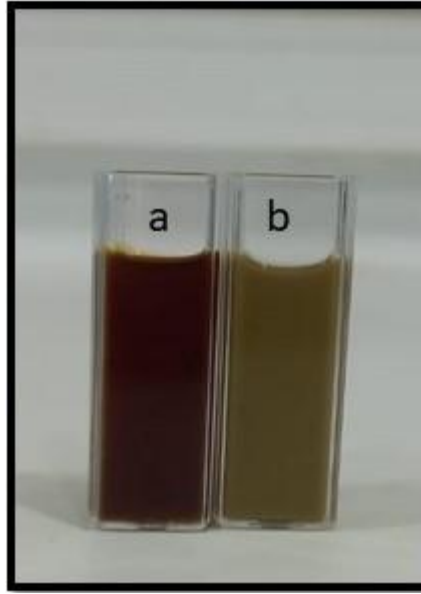


Şekil 4.3. *M. piperita* ekstraktından (a) *M. piperita* AgNP (b) sentezinde renk değişikliği gözlenmiştir.

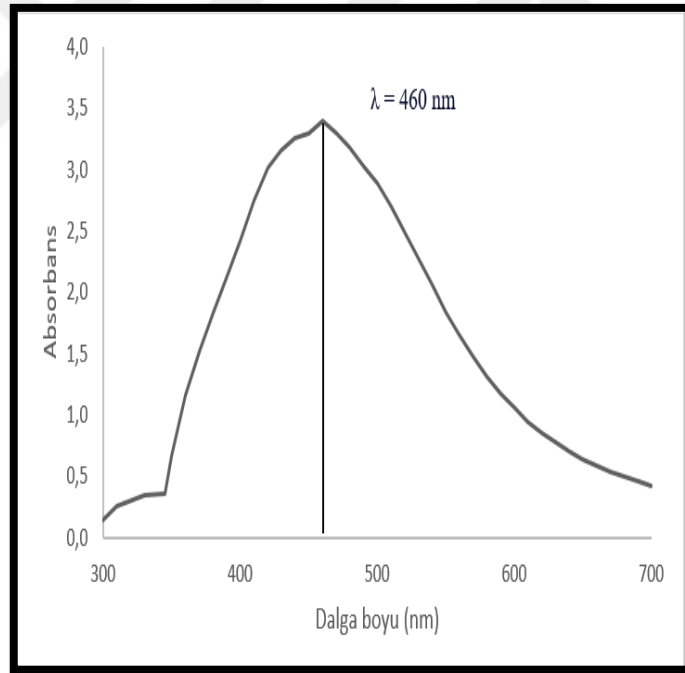


Şekil 4.4. *M. piperita* AgNP UV-Vis spektrumu

S. aromaticum AgNP'lerin kahverengi bitki ekstraktına gümüş nitratin eklenmesiyle gözlenen renk değişikliği sentezin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.5.). Görünür bölgede oluşan pikler AgNP'lerin karakteristik yüzey plazmonuna aittir ve AgNP'lerin varlığını net bir şekilde göstermektedir. *S. aromaticum* AgNP literatürle uyumlu olarak 460 nm'de göstermiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.5. *S. aromaticum* ekstraktından (a) *S. aromaticum* AgNP (b) sentezinde renk değişikliği gözlenmiştir

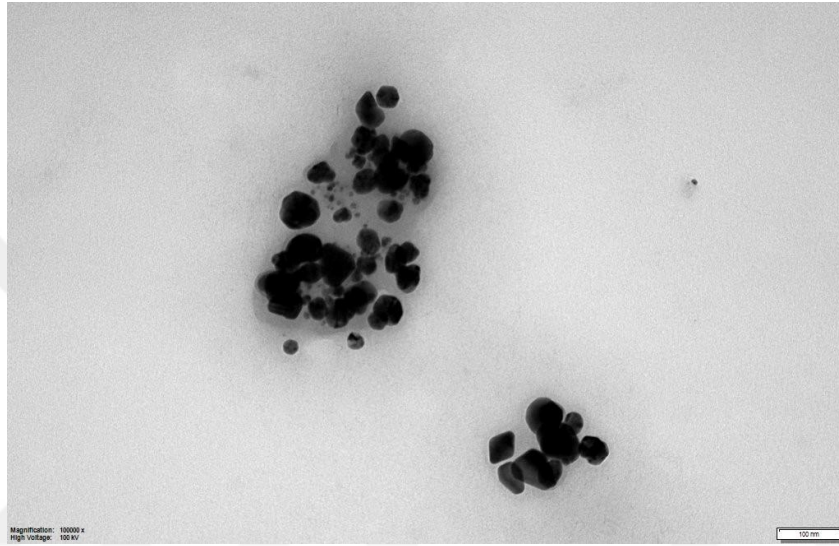


Şekil 4.6. *S. aromaticum* AgNP UV-Vis spektrumu

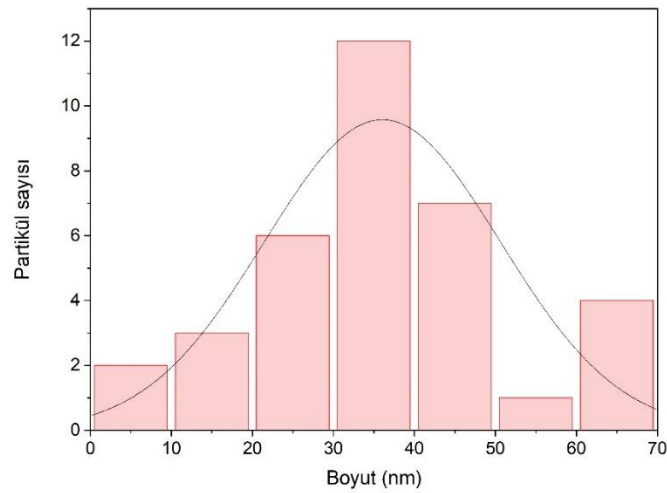
4.2. Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.2.1. TEM Analizi

R. officinalis AgNP TEM görüntüleri ve partikül boyut dağılım histogramları sırasıyla Şekil 4.7.'de ve 4.8.'de gösterilmiştir. AgNP'lerin küresel yapıda olduğu görülmektedir. Boyutlarının 8 ile 63 nm arasında değişkenlik gösterdiği ve ortalama olarak 39 ± 13 nm olduğu belirlenmiştir.



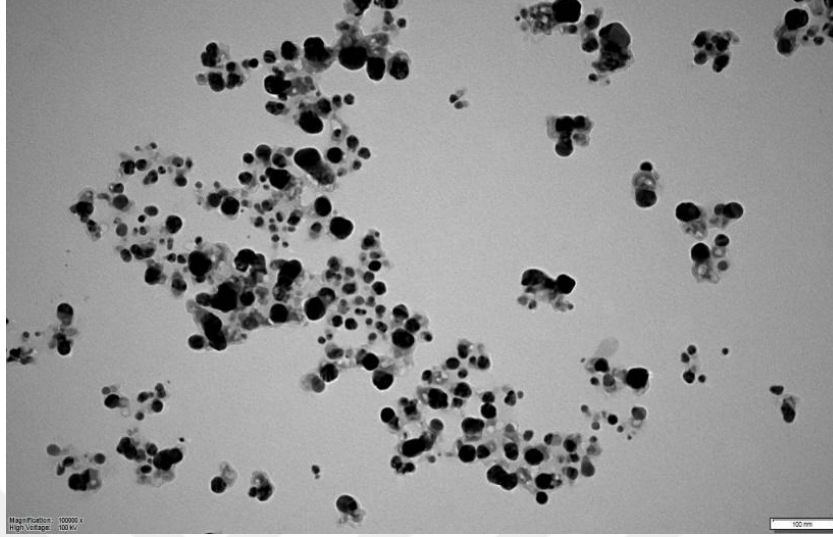
Şekil 4.7. *R. officinalis* AgNP TEM görüntüsü



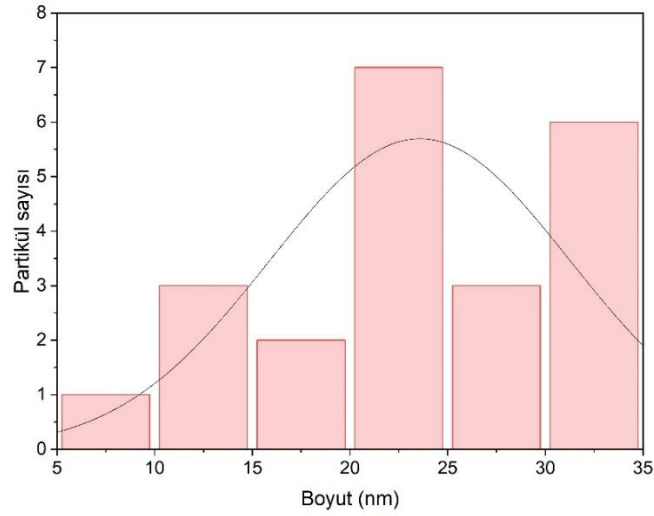
Şekil 4.8. *R. officinalis* AgNP partikül boyutları

M. piperita AgNP TEM görüntüleri ve partikül boyut dağılım histogramları sırasıyla Şekil 4.9.'da ve 4.10'da gösterilmiştir. AgNP'lerin küresel yapıda olduğu görülmektedir.

Boyutlarının 13 ile 34 nm arasında değişiklik gösterdiği ve ortalama 24 ± 6 nm olduğu belirlenmiştir.

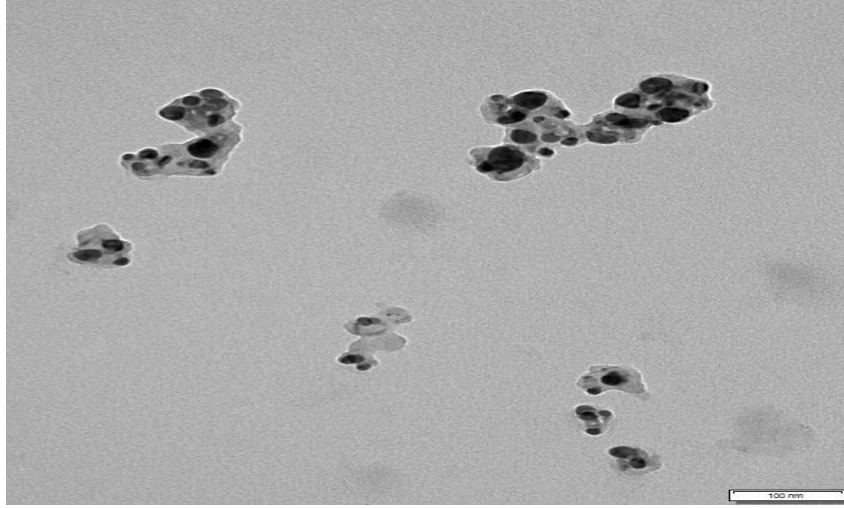


Şekil 4.9. *M. piperita* AgNP TEM analizi

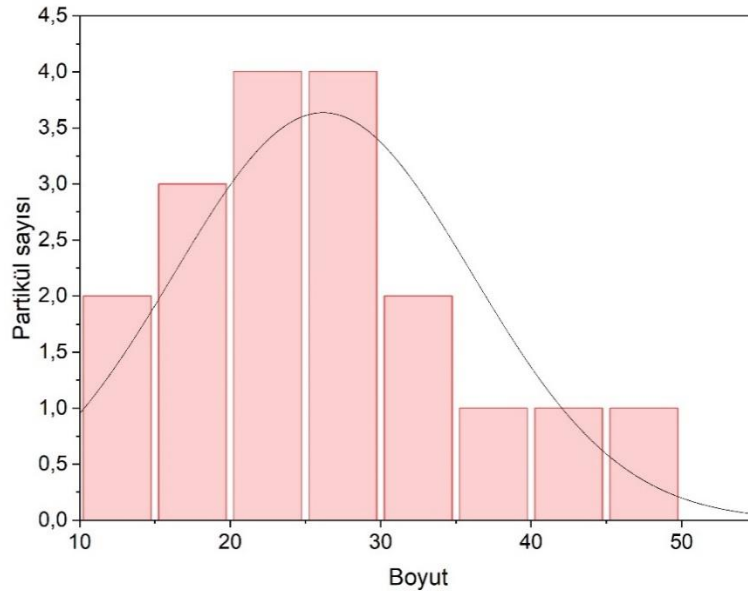


Şekil 4.10. *M. piperita* AgNP partikül boyutları

S. aromaticum AgNP'lerin görüntüleri ve partikül boyut dağılım histogramları sırasıyla Şekil 4.11'de ve Şekil 4.12.'de gösterilmiştir. AgNP'lerin küresel yapıda olduğu görülmektedir. *S. aromaticum* AgNP'lerin boyutlarının 50 ile 13 nm arasında farklılık gösterdiği ve ortalama boyut dağılımının 26 ± 9 nm belirlenmiştir.



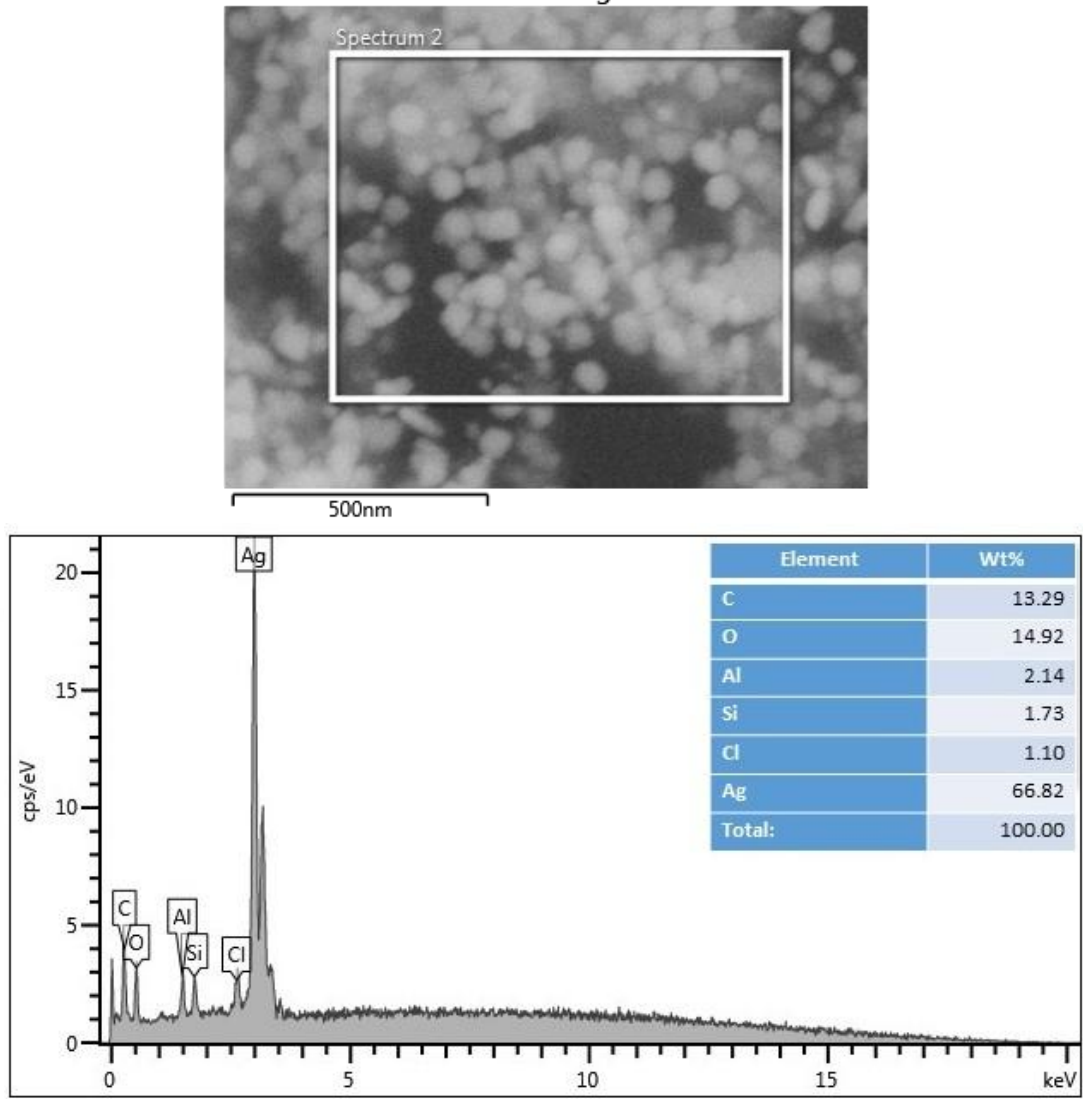
Şekil 4.11. *S. aromaticum* AgNP TEM analizi



Şekil 4.12. *S. aromaticum* AgNP'lerin partikül boyutları

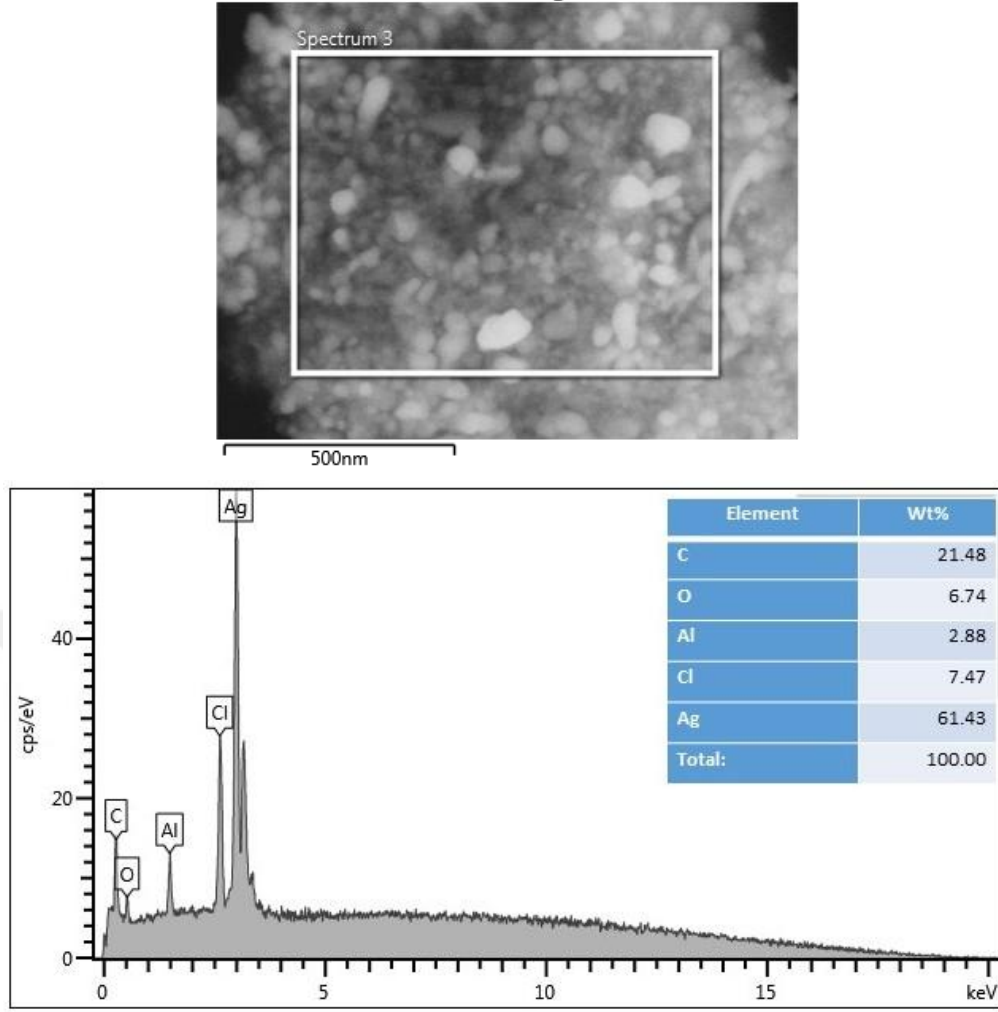
4.2.2. SEM-EDS Analizi

SEM-EDS analizine göre küresel formda görülen *R.officinalis* AgNP'lerin temel bileşeninin Ag olduğu, aynı zamanda C, O, Si elementlerinin de nanopartiküllerde bulunduğu belirlenmiştir. Bu elementlerin tespiti gümüş nanopartiküllerde *R. officinalis* kaynaklı biyomoleküllerin varlığını göstermektedir. Sonuçlar *R. officinalis* ekstraktlarının AgNP'lerin üretiminde indirgeyici ve stabilize edici bir ajan olarak hareket edebileceğini gösterir. SEM-EDS sonuçlarına göre elementlerin bulunma yüzdeleri Ag (%66,82), O (%14,92), Cl (% 1,10) ve Al (% 2,14), Si (%1,73) (Şekil 4.13.).



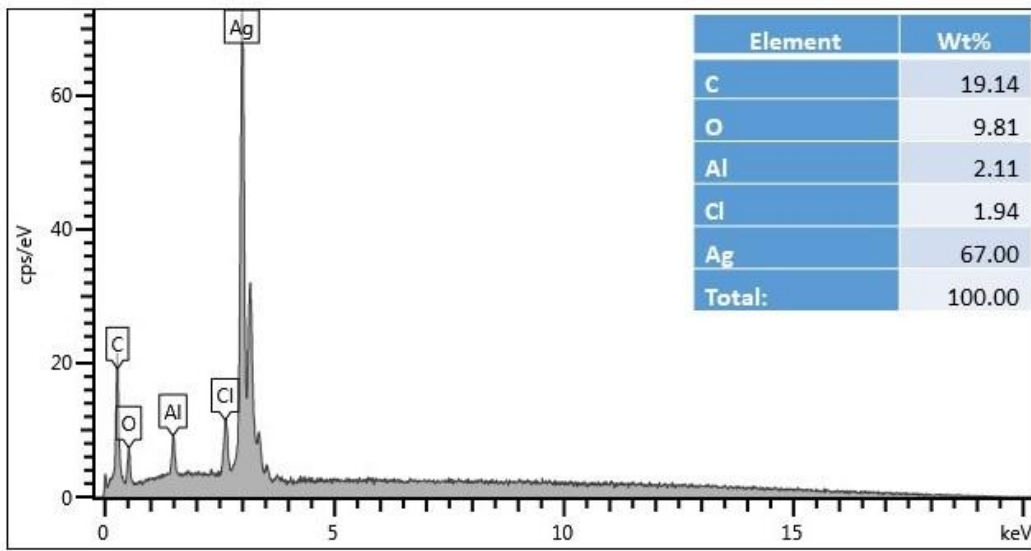
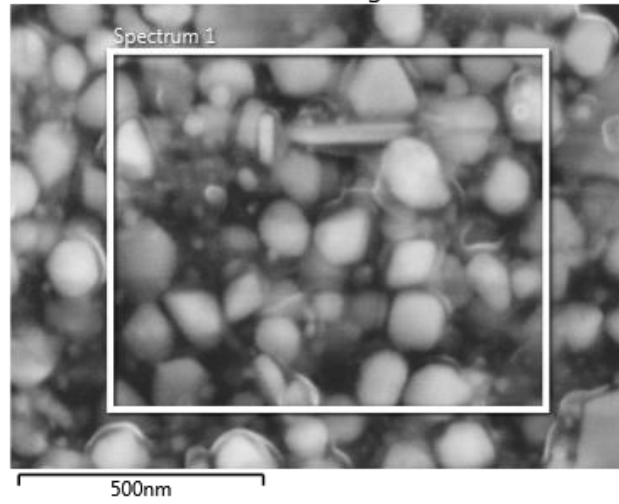
Şekil 4.13. *R. officinalis* AgNP SEM-EDS analizi

SEM-EDS analizine göre küresel formda görülen *M. piperita* ekstraktı ile sentezlenen AgNP'lerin temel bileşeninin Ag olduğu, aynı zamanda C, O, Cl elementlerinin de nanopartiküllerde bulunduğu gözlenmiştir. Bu elementlerin tespiti gümüş nanopartiküllerde *M. piperita* kaynaklı biyomoleküllerin varlığına bağlanmıştır. Sonuçlar *M. piperita* ekstraktlarının AgNP'lerin üretiminde indirgeyici ve stabilize edici bir ajan olarak hareket edebileceğini gösterir. SEM-EDS sonuçlarına göre elementlerin bulunma yüzdeleri Ag (%61,43), O (%6,74), Cl (% 7,47) ve Al (% 2,88) (Şekil 4.14.).



Şekil 4.14. *M. piperita* AgNP SEM-EDX analizi

EDS analizine göre *S. aromaticum* ekstraktı ile sentezlenen AgNP'lerin temel bileşeninin Ag olduğu, aynı zamanda C, O, Cl elementlerinin de nanopartiküllerde bulunduğu gözlenmiştir. Bu elementlerin tespiti gümüş nanopartiküllerde *S. aromaticum* kaynaklı biyomoleküllerin varlığına bağlanmıştır. Sonuçlar *S. aromaticum* ekstraktlarının AgNP'lerin üretiminde indirgeyici ve stabilize edici bir ajan olarak hareket edebileceğini gösterir. SEM-EDS sonuçlarına göre elementlerin bulunma yüzdeleri Ag (%67), O (%9,81), Al (% 2,11) Cl (% 1,94) (Şekil 4.15.).



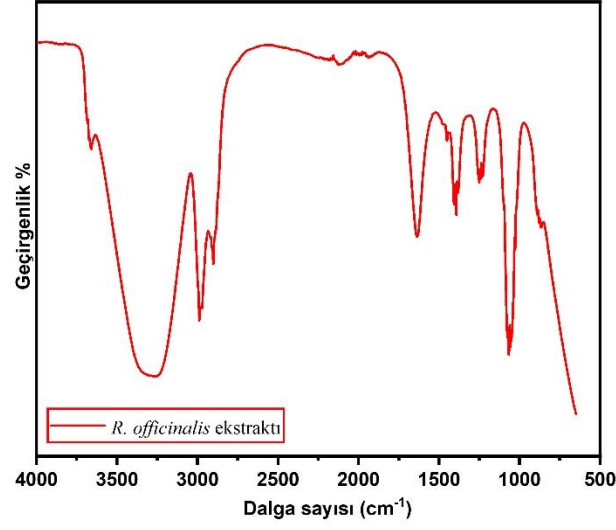
Şekil 4.15. *S. aromaticum* AgNP SEM-EDX analizi

4.2.3. FTIR Analizi

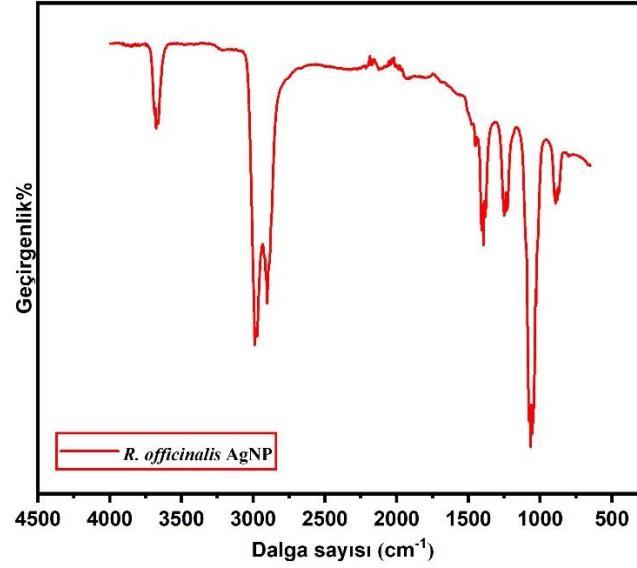
R. officinalis ekstraktı 3660 ve 3271 cm^{-1} civarında geniş bir pik göstermiştir. Bu pik –OH(hidroksil) gruplarıyla ve NH_2 (amin) varlığıyla eşleştirilmiştir (Şekil 4.16.).

R. officinalis AgNP’lerin FTIR spektrumlarına göre 3676 cm^{-1} ’de görülen pik -OH varlığıyla ilişkilendirilmiştir (Şekil 4.17.). -OH gerilme titreşimlerinin bitki ekstraktından kaynaklanan hidroksil gruplarından veya su moleküllerinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. *R. officinalis* AgNP’lerin 2112 cm^{-1} ’deki zayıf bantı, $\text{C}\equiv\text{N}$ gerilmesinden kaynaklanmaktadır. Ekstraktta 1637 cm^{-1} ’de gözlenen $\text{C}=\text{C}$ (alken) grubunun titreşim hareketinden kaynaklanan pik, AgNP oluşumunda kaybolmuştur. AgNP’de genellikle C-O

gerilme titreşimleriyle ilgili olan 892 cm^{-1} 'de ekstraktta görülmeyen bir pik ortaya çıkmıştır (Balavandy, Shameli, & Abidin, 2015; Cezaroğlu, 2022).



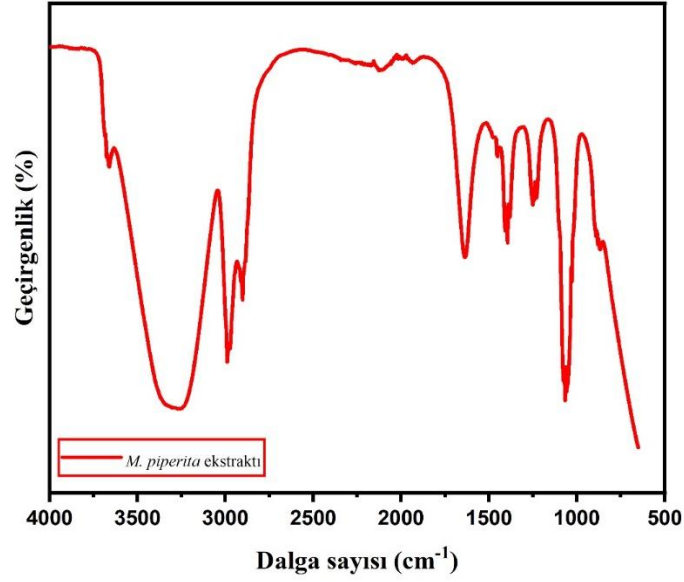
Şekil 4.16. *R.officinalis* ekstraktı FTIR analiz sonuçları



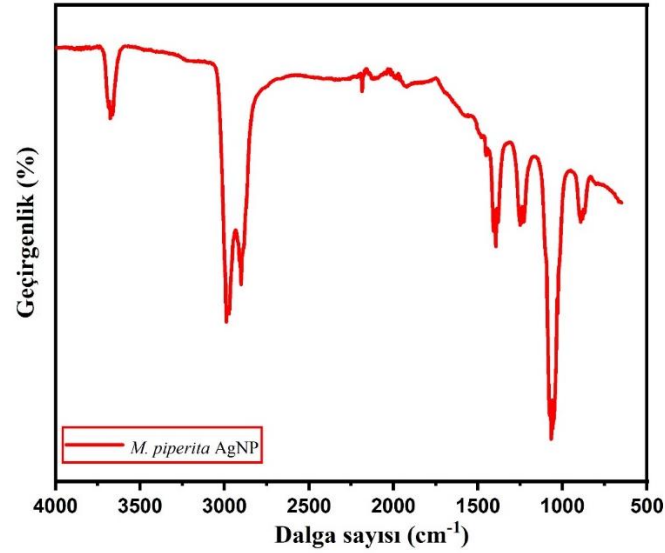
Şekil 4.17. *R. Officinalis* AgNP FTIR analizi

M. piperita AgNP'lerin FTIR spektrumlarına göre 3676 cm^{-1} 'de görülen pik -OH varlığıyla ilişkilendirilmiştir (Şekil 4.19.). -OH gerilme titreşimleri bitki ekstraktından kaynaklanan hidroksil gruplarından veya su moleküllerinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. *M. piperita* ekstraktının 2124 cm^{-1} 'deki zayıf bantı, $\text{C}\equiv\text{N}$ gerilmesinden kaynaklanmaktadır (Şekil 4.18.). Ekstraktta 1636 cm^{-1} 'de gözlenen $\text{C}=\text{C}$ (alken) grubunun titreşim hareketinden kaynaklanan pik, AgNP oluşumunda kaybolmuştur. *M. piperita*

AgNP'lerde genellikle C-O gerilme titreşimleriyle ilgili olan 892 cm^{-1} 'de ekstraktta görülmeyen bir pik ortaya çıkmıştır. Ekstraktta =C-O-C grubunun piki 1075 cm^{-1} 'de gözlemlenirken, AgNP'lerde ise 1066 cm^{-1} 'de gözlenmiştir (Balavandy ve ark., 2015; Cezaroğlu, 2022; Erci, Cakir-Koc, & Isildak, 2018) .



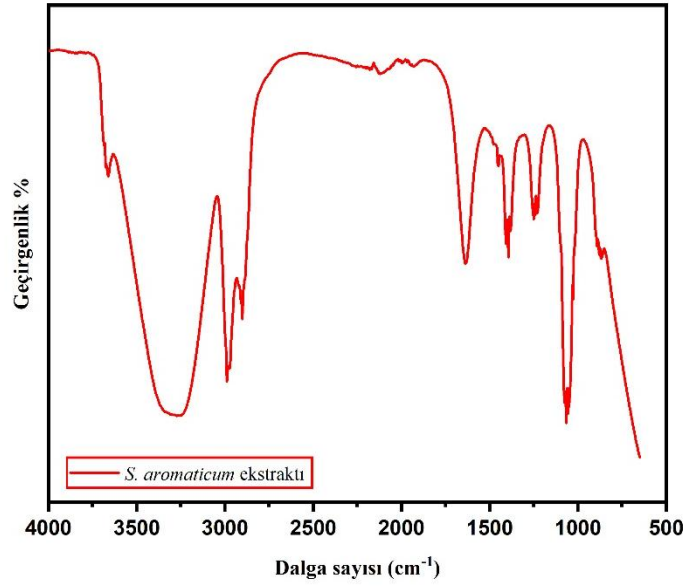
Şekil 4.18. *M. piperita* ekstraktı FTIR sonuçları



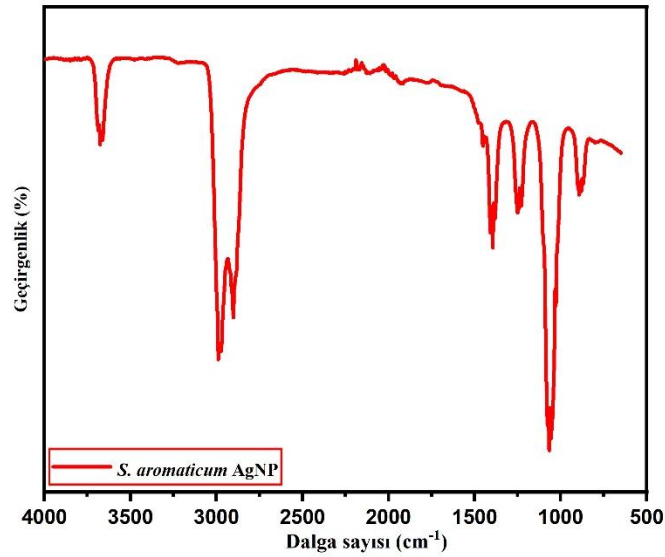
Şekil 4.19. *M. piperita* AgNP FTIR sonuçları

S. aromaticum ekstraktı 3660 ve 3271 cm^{-1} 'de pik göstermiştir. Bu pik -OH gruplarıyla ve NH_2 (amin) varlığıyla eşleştirilmiştir (Şekil 4.20). *S. aromaticum* AgNP'lerin ise $3676,30$

cm^{-1} 'de görülen pik -O-H varlığıyla ilişkilendirilmiştir. AgNP'de $2988,91 \text{ cm}^{-1}$ ve $2901,89 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen C-H ve C=O grupların piki ise ekstrakta görülen $2988,82 \text{ cm}^{-1}$ ve $2901,81 \text{ cm}^{-1}$ 'den kaymıştır. Ekstrakta C-O grubuna titreşim pikleri $1382,66 \text{ cm}^{-1}$ 'de gözlemlenirken, AgNP'de bu pik 1382 cm^{-1} 'de kaymıştır. Ekstrakta =C-O-C (karbonil) grubunun piki 1075 cm^{-1} 'de gözlemlenirken, AgNP'de ise 1066 cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. Ekstrakta 867 cm^{-1} 'de görülen titreşim piki 892 cm^{-1} 'e kaymıştır (Balavandy ve ark., 2015; Cezaroğlu, 2022).



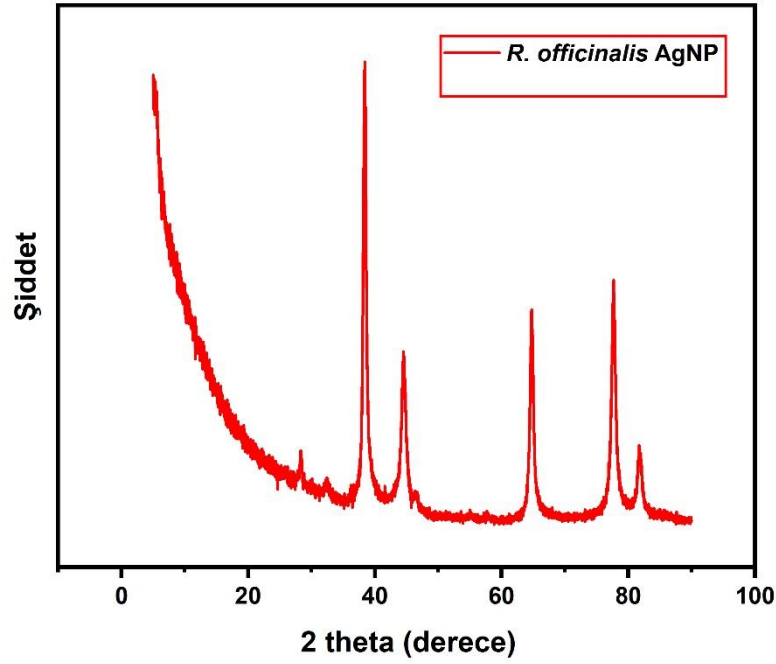
Şekil 4.20. *S. aromaticum* ekstraktının FTIR sonuçları



Şekil 4.21. *S. aromaticum* AgNP'lerin FTIR sonuçları

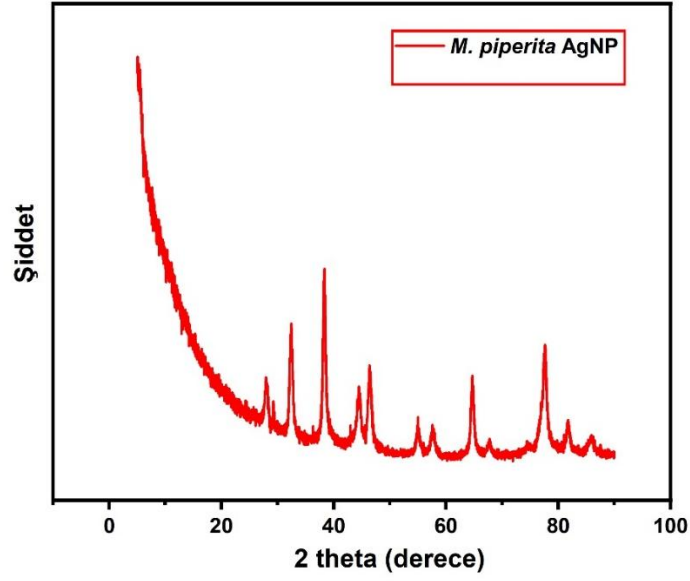
4.2.4 XRD Analizi

R. officinalis AgNP'nin XRD spektrum modelinin sonuçlarına göre, küresel yapıdaki AgNP'ler gümüşün yüzey merkezli kübik karakteristik Bragg kırınım planları (111), (200), (220) ve (311) olan $2\theta = 38.45^\circ$, 46.68° , 64.68° ve 77.66° 'te dört kırınım bandı göstermiştir (Şekil 4.22.).



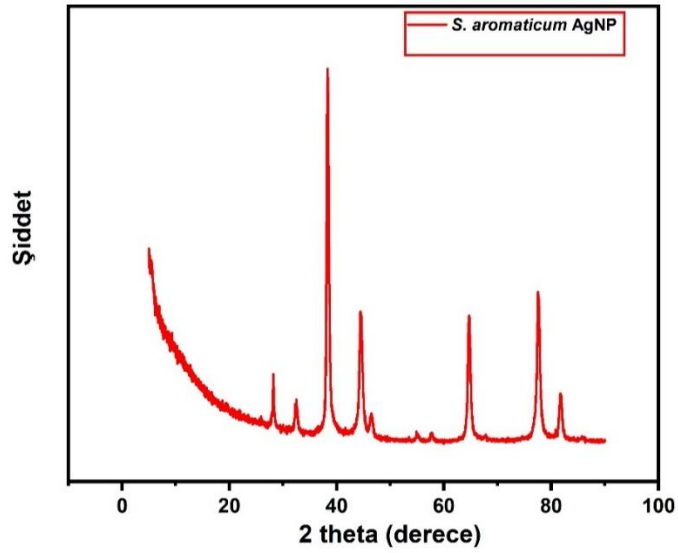
Şekil 4.22. *R. officinalis* AgNP XRD grafiği

AgNP'nin XRD spektrum modelinin sonuçlarına göre, küresel yapıdaki AgNP'ler gümüşün yüzey merkezli kübik karakteristik Bragg kırınım planları (111), (200), (220) ve (311) olan $2\theta = 38,36^\circ$, $44,49^\circ$, $64,65^\circ$ ve $77,68^\circ$ 'te dört kırınım bandı göstermiştir (Şekil 4.23.). Keskin tepe noktalarının varlığı, yüksek derecede kristallliği gösterir.



Şekil 4.23. *M. piperita* AgNP'nin XRD grafiği

S. aromaticum AgNP'nin XRD spektrum modelinin sonuçlarına göre, küresel yapıdaki AgNP'ler gümüşün yüzey merkezli kübik karakteristik Bragg kırınım planları (111), (200), (220) ve (311) olan $2\theta = 38.28^\circ$, 44.61° , 64.60° ve 77.53° 'te dört kırınım bandı göstermiştir (Şekil 4.24.).



Şekil 4.24. *S. aromaticum* AgNP'nin XRD grafiği

4.3. AgNP'lerin Antimikrobiyal Etkinlik Sonuçları

AgNP'lerin antimikrobiyal duyarlılıkları sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle değerlendirilmiştir. Üç farklı AgNP'nin antimikrobiyal duyarlılıkları 1024-2 µg/mL konsantrasyon aralığında test edilmiştir. Aşağıda verilen tabloda *S. sanguinis*'in MİK ve MBK değerleri verilmiştir. Mavi renkte gözlenen en düşük konsantrasyonu bakteri için MİK değeri olarak belirlenmiştir (Şekil 4.25.). *R.officinalis* AgNP MİK değeri 256 µg/mL *M. piperita* AgNP MİK değeri 128 µg/ml *S. aromaticum* AgNP 128 µg/ml AgNO₃ MİK değeri 32 µg/mL olarak bulunmuştur (Tablo 4.1.). Bitki ekstraktları antimikrobiyal etki göstermemiştir.



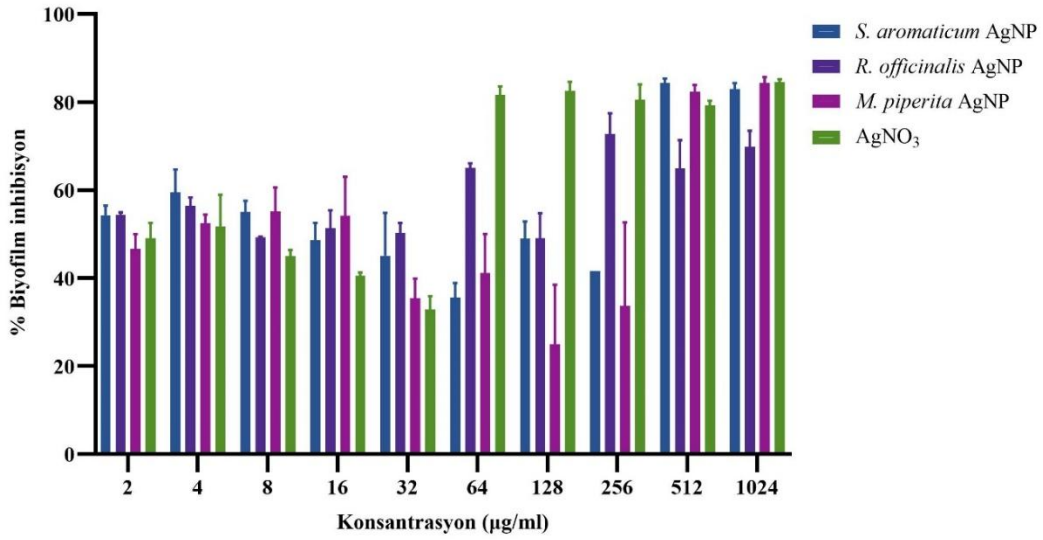
Şekil 4. 25. Örnek mikropılaka görüntüsü (ÜK; Üreme Kontrolü SK; Sterilite kontrolü)

Tablo 4.1. *S. sanguinis* MİK ve MBK değerleri

	MİK (µg/mL)	MBK (µg/mL)	MBK/MİK
<i>R. officinalis</i> AgNP	256	256	1
<i>M. piperita</i> AgNP	128	128	1
<i>S. aromaticum</i> AgNP	128	256	2
AgNO ₃	32	32	1

4.4. AgNP'lerin Biyofilm Üzerine Etkisi

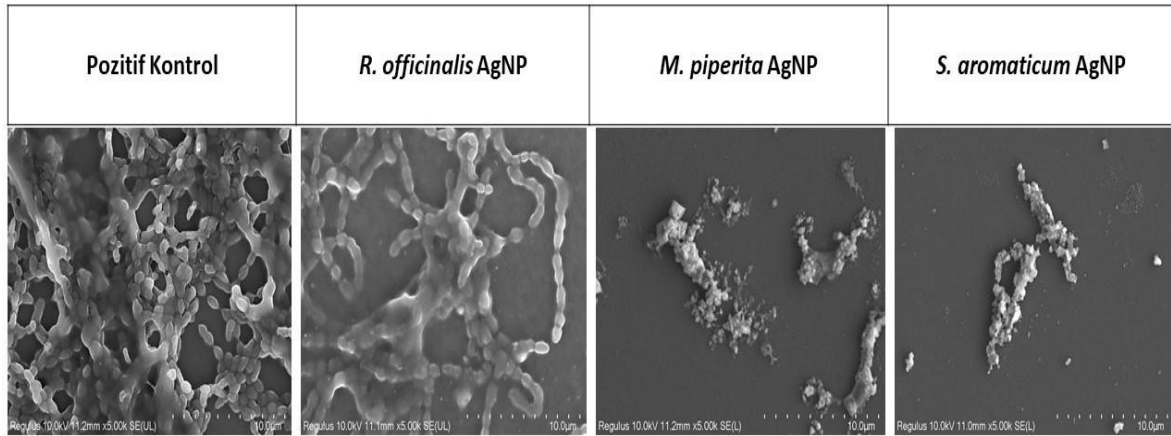
AgNP'lerin biyofilm oluşumuna etkilerini incelemek için 10 farklı konsantrasyonda 3 kez deney tekrarlanmıştır. Şekil 4.26.'daki sonuçlar AgNP'ler ve AgNO₃ için değişen konsantrasyonlarda % biyofilm inhibisyonunu göstermektedir. En düşük konsantrasyon olan 2 µg/ml' de *S. aromaticum* AgNP'lerin %54,2 *M. piperita* AgNP'lerin %46,6 *R.officinalis* AgNP'lerin % 54,4 biyofilm inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.26. AgNO₃ ve AgNP'lerin *S. sanguinis* biyofilmine karşı antibiyofilm aktivitesi

4.4.1. AgNP'lerin biyofilm üzerine etkisinin SEM ile gösterilmesi

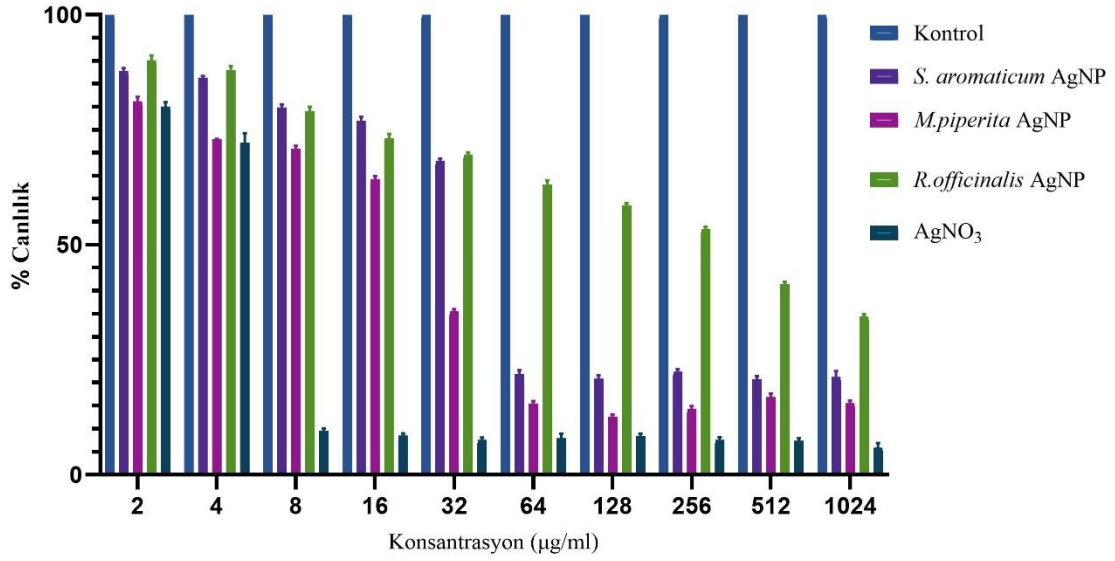
Antibiyofilm etkinliğin gösterilmesi amacıyla polilizin kaplı lamalar üzerinde biyofilm oluşturulmuş ve farklı AgNP'lerin etkisi SEM ile değerlendirilmiştir. *S. sanguinis*'in biyofilm oluşturabilmesi için AgNP'ler MİK konsantrasyonlarının bir alt değeri olan sub-MİK konsantrasyonunda muamele edilmiştir. Pozitif kontrol olarak oluşturulan *S. sanguinis* biyofilminin; *R. officinalis* AgNP tarafından kısmi olarak inhibe edilmesine rağmen, *M. piperita* ve *S.aromaticum* AgNP tarafından biyofilmin tamamen inhibe edildiği bakteri hücre yapılarının da bozulduğu görülmüştür (Şekil 4.27.).



Şekil 4.27. *S. sanguinis* biyofilm oluşumuna AgNP'lerin etkisinin SEM görüntüleri

4.5. AgNP'lerin Sitotoksik Etkileri

MTT yöntemiyle tespit edilen sitotoksosite deneyleri sonucunda AgNP'lerin % canlılık değerleri hesaplanmıştır. AgNP'lerin konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığında azalma görülmüştür. AgNO₃ ve AgNP'ler kontrole göre karşılaştırıldığında % canlılık değerlerinde istatistiksel anlamlı düzeyde toksik oldukları ($p < 0.0001$) görülmekle beraber AgNP'lerin AgNO₃'e göre toksisitelerinin daha düşük olduğu görülmektedir (Şekil 4.31.). AgNO₃ ile karşılaştırıldığında *R.officinalis* AgNP'lerin anlamlı düzeyde toksik etkisinin az olduğu belirlenmiştir ($p=0,0009$). *M. piperita* AgNP ve *S.aromaticum* AgNP, AgNO₃'e göre % canlılık değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir fark belirlenememiştir. AgNP'ler birbirleriyle karşılaştırıldığında *M. piperita* AgNP *R.officinalis* AgNP'lere göre anlamlı düzeyde toksik olarak belirlenmesine rağmen *S.aromaticum* *R.officinalis* AgNP'ler arasında da istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamıştır ($p=0,4146$).



Şekil 4.28. AgNP’lerin L929 fare fibroblast hücre hattı üzerine sitotoksik etkileri

Hücre canlılığında %50 azalma gösteren AgNP konsantrasyonu, EC50 değeri GraphPad Prism 10.00 yazılımı kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmamızda AgNP’lerin EC50 sonuçları değerlendirildiğinde; *R. officinalis* AgNP en yüksek EC50 değerine sahipken AgNO₃’ün en düşük EC50 değerine sahip olduğu görülmüştür. AgNP’lerin ve AgNO₃’ün EC50 değerleri Tablo 4.2.’de verilmiştir.

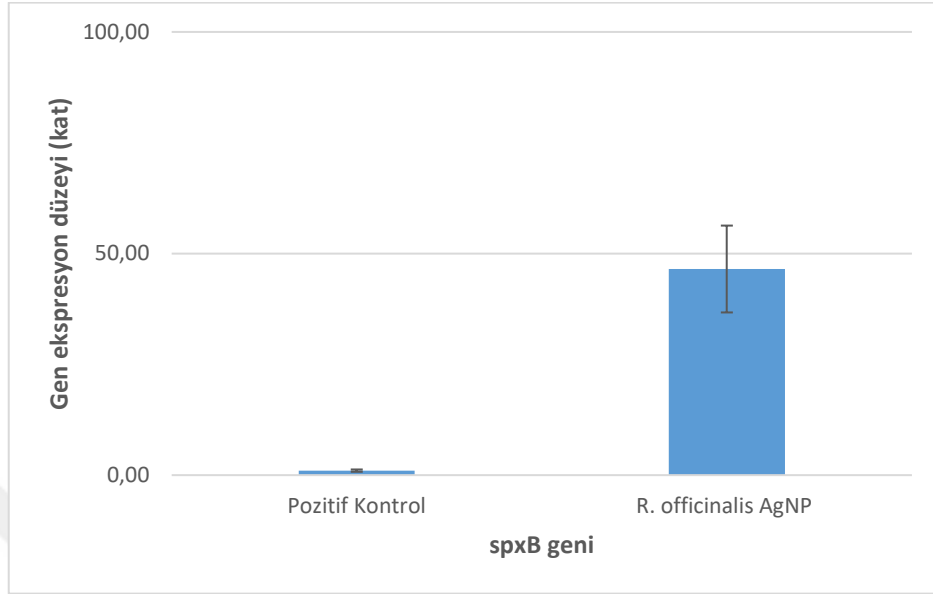
Tablo 4.2. AgNP’lerin EC50 değerleri

	EC50 (µg/mL)
<i>R. officinalis</i> AgNP	298,2
<i>S. aromaticum</i> AgNP	50,51
<i>M. piperita</i> AgNP	35,32
AgNO ₃	4,363

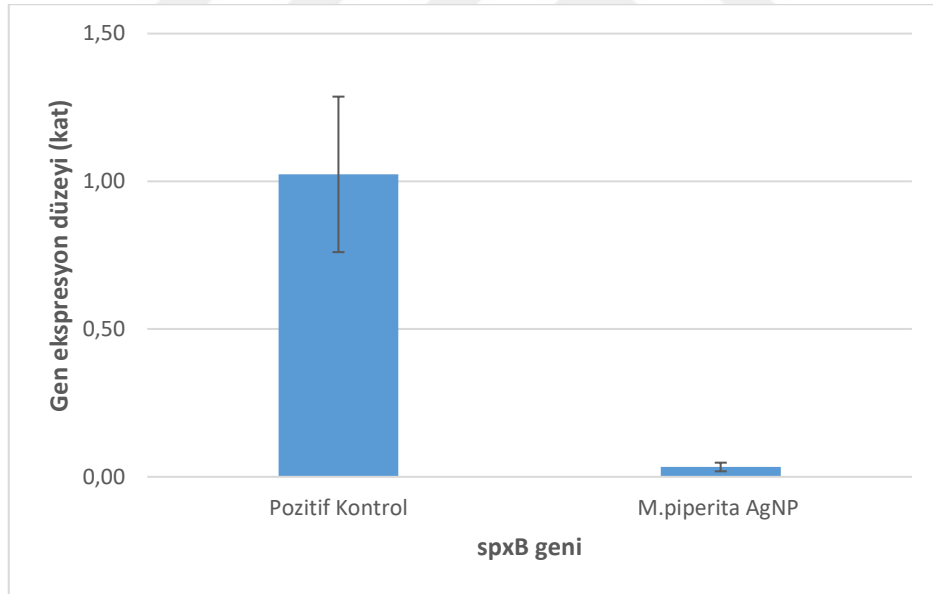
4.6. Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (kGZ-PZR)

S. sanguinis sentezlenen farklı AgNP’lerle 1/4 MİK konsantrasyonda muamele edilmiş ve daha sonra kültürden alınan bakterilerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA’larda *spxB* geninin mRNA seviyesindeki ekspresyon oranları kGZ-PZR ile belirlenmiştir. *R. officinalis* AgNP’lerle muamele edilen *S. sanguinis* *spxB* gen ekspresyonunda 46 kat artış görülmüştür (Şekil 4.29.). Bununla birlikte *M. piperita* ve *S. aromaticum* AgNP’lerle muamele edilmiş bakteride *spxB* gen ekspresyon düzeylerinde

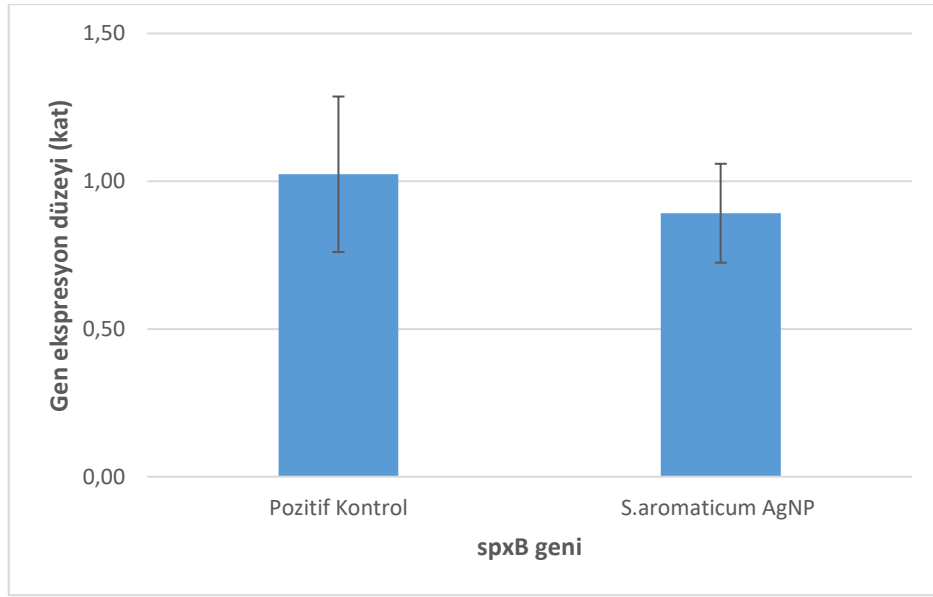
pozitif kontrole göre sırasıyla 0,03 ve 0,89 kat azalma olduğu görülmüştür(Şekil 4.30.) (Şekil 4.31.).



Şekil 4.29. *R. officinalis* AgNP'ler ile 1/4 MİK ile 24 saat boyunca muamele edilen *S. sanguinis* bakterisinin *spxB* geni ekspresyon düzeyi



Şekil 4.30. *M. piperita* AgNP'ler ile 1/4 MİK ile 24 saat boyunca muamele edilen *S. sanguinis* bakterisinin *spxB* geni ekspresyon düzeyi



Şekil 4.31. *S. aromaticum* AgNP'ler ile 1/4 MİK konsantrasyonunda 24 saat boyunca muamele edilen *S. sanguinis* bakterisinin *spxB* geni ekspresyon düzeyi

5. TARTIŞMA

S. sanguinis, diş plağı oluşumunda kritik rol oynayan, diş çürüğüne neden olabilen öncü kolonizerdir. Kan dolaşımına geçtiğinde ise fırsatçı bir patojen olarak karşımıza çıkmaktadır (Chamat-Hedemand ve ark., 2020). *S. sanguinis*, özellikle altta yatan kalp rahatsızlığı olan veya bağışıklık sistemi zayıf olan hastalarda, EE'nin en yaygın nedenlerinden biridir Amerikan Kalp Derneği (AHA) dental işlemleri takiben EE görülme riskinden dolayı özellikle risk grubundaki bireylere bakteriyemiye yol açabilecek işlemler öncesinde profilaktik antibiyotik kullanımını önermektedir. Uzun süreli antibiyotik kullanımının pratik olmaması, profilaktik anitibiyotik kullanımının antibiyotik direnci gibi yan etkilere neden olması sebebiyle farklı tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Oral florada *S. sanguinis* kolonizasyonunu azaltacak profilaktik gargara kullanımı yan etkilerinin daha az olması daha ucuz olması nedeniyle efektif bir yol olarak görülmektedir. Bu çalışmada özellikle riskli grupta yer alan kişilere invaziv dental işlem öncesi gargara olarak kullanılabilecek, *S. sanguinis*'in biyofilm oluşumunu ve kolonizasyonunu azaltacak AgNP'lerin sentezlenmesi amaçlanmıştır. Ağızdaki patojen mikroorganizmaların sayısını ve plak oluşumunu azaltmak için kullanılan birçok ajan bulunmaktadır. Bunlardan biri %0,2'lik CHX solüsyonudur. CHX ağızda tat alma bozukluğu, renk değişikliği (Frank, Gent, & Hettinger, 2001; Slot, Berchier, Addy, Van der Velden, & Van der Weijden, 2014) gibi yan etkiler yaptığından yeni antimikrobiyal etkili ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda antibiyotik içeren ve antiseptik özellikli gargaraların istenmeyen yan etkilerinden uzaklaşılması amacıyla yeşil sentezle sentezlenmiş AgNP'lerin kullanılabileceği düşünülmektedir.

AgNP'lerin sentezinde kimyasal sentez kapsamında sıklıkla sodyum borhidrür, askorbat, sodyum sitrat, etilen glikol ve elementel hidrojen gibi organik ve inorganik indirgeyici kimyasallar kullanılmaktadır. Bu ajanlar, Ag^{+1} iyonlarını metalik Ag^0 formuna indirgenmesi için kullanılır fakat toksik özellik göstermektedirler (Iravani, Korbekandi, Mirmohammadi, & Zolfaghari, 2014). Toksik olmayan kimyasalların, çevre dostu solventlerin ve yenilenebilir malzemelerin kullanımını teşvik eden geleneksel kimyasal sentez yöntemlerine göre birçok avantajı bulunan yeşil sentez yöntemi 2000'li yılların başlarında kullanılmaya başlamış ve giderek önem kazanmıştır. Bu yaklaşımla çevre ve

sağlık üzerindeki olumsuz etkiler azalmakta, atık yönetimi iyileştirilmekte, enerji verimliliği arttırılmakta ve ekonomik fayda sağlanmaktadır (Raveendran, Fu, & Wallen, 2003).

Bu çalışmada yeşil sentez yöntemiyle *R. officinalis*, *M. piperita*, *S. aromaticum* bitki ekstraktları aracılığıyla AgNP sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşım, hem çevre dostu hem de maliyet açısından daha uygun bir sentez yöntemi olduğu için tercih edilmiştir. Üç farklı bitki ekstraktı, nanopartiküllerin sentezinde hem indirgeyici hem de stabilizatör olarak kullanılmıştır. Bu araştırmada bakteriyemi, enfektif endokardit, diş çürüğü, menenjit gibi hastalıklara neden olduğu bilinen fırsatçı patojen *S. sanguinis*'e farklı bitkilerden sentezlenen AgNP'lerin biyolojik etkileri araştırılmıştır.

Araştırmanın ilk bölümünde üç farklı bitki ekstraktından AgNP sentezi gerçekleştirilmiş ve karakterizasyonları yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada *R. officinalis* ekstraktı kullanılarak oda sıcaklığında gerçekleştirilen yeşil sentez yöntemi ile AgNP'ler başarılı bir şekilde sentezlenmiş ve karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. SPR maksimum absorbans piki 450 nm'de gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada SEM ve TEM analizlerinde, *R. officinalis* AgNP'lerin küresel morfolojiye sahip olduğunu ve boyutlarının yaklaşık 10–33 nm aralığında değiştiğini bildirmişler ve XRD analizleri kristal yapıda metalik AgNP'lerin varlığını dört belirgin zirve ile doğrulamışlardır (Ghaedi ve ark., 2015). Bu tez çalışmasında da *R. officinalis* AgNP'lerin SPR maksimum absorbans piki 440 nm olarak belirlenmiştir. Bu bulgu, yaprak ekstraktının polifenolik bileşenlerinin, gümüş iyonlarını AgNP'lere indirgediğini göstermekte olup FTIR spektrumları, bu fenolik fonksiyonel grupların gümüş iyonlarının indirgenmesinde rol oynadığını desteklemektedir. Ghaedi ve ark. çalışmasına benzer şekilde AgNP'lerin küresel morfolojide olmakla beraber sentezlenen AgNP'lerin ortalama boyutları daha büyüktür. Başka bir çalışmada *R. officinalis* AgNP'lerin oluşumu UV-Vis spektrumunda 460 nm'de SPR piki göstermesiyle doğrulanmıştır. XRD analizinde gözlemlenen karakteristik Bragg kırınım planları AgNP'lerin yapısının yüzey merkezli kübik olduğu bildirilmiştir (Sulaiman, Mohammad, Abdul-Wahed, & Ismail, 2013). Bu çalışmada da XRD analizi sonucunda yüzey merkezli kübik AgNP'ler sentezlenmiştir. Yapılan bir çalışmada *R. officinalis* AgNP'lerin oluşumu 400 nm'de pik varlığı ile UV-Vis analizi ile doğrulanmış, gümüş iyonunun indirgenmesi için karboksilik veya amid gruplarının varlığı FTIR ile doğrulanmıştır. Araştırmacıların elde ettiği bu sonuç bu çalışmayı desteklemekte olmakla beraber, çalışmadaki elde edilen partikül büyüklüğü bakımından

farklılık görülmektedir. Araştırmacılar SEM analizinde parçacık boyutlarının 12-22 nm olduğunu bildirmişlerdir (Daghestani ve ark., 2020).

Literatürde *M. piperita* aracılığıyla AgNP sentezine dair çeşitli çalışmalar yer almaktadır. Erci ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada *M. piperita* bitkileri aracılığıyla AgNP sentezi gerçekleştirilmiş ve AgNP'lerin karakterizasyonları ve biyolojik etkinlikleri araştırılmıştır. *M. piperita* AgNP'lerin karakterizasyonu için UV-Vis analizi gerçekleştirilmiş ve literatüre uygun bir şekilde 452 nm'de spektrum izlenmiştir. Bu çalışmada da görünür bölgede 450 nm'de spektrum izlenmiştir. TEM analizi sonucunda *M. piperita* AgNP'lerin küresel yapıda ve ortalama çap büyüklüğünün 24,2 nm olduğu bildirilmiş olup mevcut çalışmada *M.piperita* AgNP'lerin küresel yapıda ve ortalama 24±6 nm boyutunda olması ile Erci ve ark. çalışmasına oldukça benzerlik göstermektedir. Aynı çalışmada *M. piperita* AgNP'lerin EDS sonuçlarına göre elementlerin ağırlıkça yüzdesininin Ag (%45,17), O (% 50,08), Cl (% 1,65) ve Cd (% 3,10) olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda SEM-EDS sonuçlarına göre elementlerin bulunma yüzdeleri Ag (%61,43), O (%6,74), Cl (% 7,47) ve Al (% 2,88) belirlenmiştir. Elementlerin benzer olması fakat yüzdelерinin farklı olması yeşil sentez sırasındaki farklılıklardan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Aynı çalışmada *M.piperita* AgNP için FTIR analizinde ise 3334,16, 2359,20, 1635,46, 650,10 ve 600,13 cm⁻¹'de keskin bantlar görülmektedir (Erci ve ark., 2018). FTIR spektrumları *M.piperita* AgNP için bu çalışmada 3676, 2901, 1406, 892 cm⁻¹ keskin bantlar olarak görülmüştür. *M. piperita* bitkisinden AgNP'lerin sentezini içeren bir diğer çalışma incelendiğinde, UV-Vis analizinde 433 nm'de gözlenen pik, AgNP'lerin varlığını göstermiş olup *M. piperita* AgNP'lerinin FTIR spektrumunda bu çalışmayla uygun bir şekilde (C=O grubuna atfedilen) 2400 cm⁻¹'de C=O gruplarının dâhil olduğu görülmektedir (Abdellatif ve ark., 2022). Başka bir çalışmada *M. piperita* kullanılarak sentezlenen AgNP'ler, UV-Vis analizi, SEM ve TEM ile karakterizasyonuna tabi tutulmuş, AgNP'lerin; karakteristik absorpsiyon piklerinin 420 nm'de görüldüğü, küresel şekilli 35 nm boyutlarında olduğu bulunmuştur (Khatoon ve ark., 2018).

Muruganandham ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada *S. aromaticum* AgNP'lerin UV-Vis analizinde 440 nm'de pik gösterdiği, bu pikin AgNP'lerin karakteristik SPR aralığında olduğu bildirilmiştir. TEM analizinde, *S. aromaticum* AgNP'lerin boyut dağılımının 10-100 nm aralığında tespit edilmiştir. EDS analizinde 3 keV'de gümüş pikinin

varlığı, FTIR analizinde fenolik bileşiklerin ve karboksilik asitlerin O-H, N-O ve C=O bağlarının gerilmesiyle, *S. aromaticum* AgNP'leri oluşturduğu belirlenmiştir (Muruganandham ve ark., 2023). SEM-EDS analizinde gümüş elementinin piki bu çalışmada da 3 keV civarında gözlenmiştir. Başka bir çalışmada *S. aromaticum* AgNP'lerin UV-Vis sonuçları, 450 nm'de pik göstermiştir. AgNP'lerin FTIR spektrumları 3436, 1632 ve 1031 cm^{-1} 'de farklı pikler gösterdiği bildirilmiştir. Hem 3436 cm^{-1} hem de 1632 cm^{-1} 'de ortaya çıkan pikler, sırasıyla OH grubunun C=O fonksiyonel gruplarına 1031 cm^{-1} 'deki pik, C-O veya C-C gerilme titreşimine karşılık geldiği düşünülmektedir. EDS analizi, AgNP'lerin yüksek saflıkta olduğunu doğrulayan 2.983 kV'de karakteristik bir absorpsiyon piki göstermiştir. Analiz sonuçları, %90 oranında gümüş varlığı ve %10 oranında, *S. aromaticum* ekstraktı ile AgNP oluşumu sırasında ortaya çıkmış olabilecek karbon ve oksijenin eşit olarak paylaşıldığını belirtmiştir (Makky ve ark., 2023). Bu çalışmada UV-Vis analizi 460 nm'de pik gözlenmiştir. Literatürde yer alan SPR pikinin 400-500 dalga boyu aralığında olmasıyla AgNP sentezinin gerçekleştiği tespit edilmiştir (Cezaroğlu, 2022).

Literatüre göre başarılı bir şekilde sentezlenen AgNP'ler, geniş patojen yelpazesine karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve yalnızca biyofilm oluşumunu engellemekle kalmaz, aynı zamanda mevcut biyofilmlerdeki bakterileri de öldürür. Gümüş iyonlarının antimikrobiyal aktivitesini, boyutu ve kökeni de dâhil olmak üzere birçok faktör etkileyebilir (Martinez-Gutierrez ve ark., 2013). Literatürde AgNP'lerin biyolojik etkileriyle ilgili birçok araştırma bulunmaktadır.

Ghaedi ve ark. tarafından yapılan çalışmada bazı mikroorganizmalara karşı *R. officinalis* AgNP'lerin antimikrobiyal etkisi sıvı mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* için MİK değerleri sırasıyla 1546,4, 773,24, 193,31 ve 386,62 $\mu\text{g/mL}$ olarak bildirmiş olup gram pozitif bakterilere yüksek konsantrasyonda etkili olmasına rağmen gram negatif bakterilerde daha düşük konsantrasyonda etkili olduğunu bildirmişlerdir (Ghaedi ve ark., 2015). Bu çalışmada gram pozitif bir bakteri olan *S. sanguinis* kullanılmış olup *R. officinalis* AgNP MİK değeri 256 $\mu\text{g/mL}$ bu çalışmaya göre daha düşük konsantrasyonda etkili olduğu görülmektedir. Bununla birlikte sub-MİK konsantrasyondaki biyofilme etkisinin *M. piperita* ve *S. aromaticum* AgNP'leri ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğu görülmüştür.

S. aromaticum sulu özütünden sentezlenen AgNP'lerin; *S. mutans*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. feacalis* üzerine antimikrobiyal etkileri değerlendirilmiş, sırasıyla MBK değerleri 0,212, 0,013, 0,106, 0,053 mg/ml olarak belirlenmiştir (Jardon-Romero ve ark., 2022). Yapılan bu çalışmada da *S. aromaticum* AgNP MBK 256 µg/mL olarak belirlenmiş olup *Streptococcus* cinsine ait olan *S. mutans*'a karşı antimikrobiyal etki benzer olarak bulunmuştur.

Başka bir çalışmada *S. aromaticum* AgNP'lerin *S. aureus* karşı MİK değeri 40 µg/mL olarak bulunmuştur. *Bacillus cereus* (*B. cereus*) ve *E. coli* *S. aromaticum* AgNP'lerin araştırılan konsantrasyonda MİK değerleri bulunamamıştır (Maciel ve ark., 2020).

M. piperita AgNP'lerin bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliği sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmış; *B.cereus* için MİK ve MBK değerleri 100 µg/mL, *S.aureus* için ise MİK değeri 50 µg/mL, MBK değeri 100 µg/mL olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada AgNP'lerin konsantrasyona bağlı olarak biyofilm oluşum inhibisyonu yaptığı gözlenmiştir. Konsantrasyon 6.25 ve 100 µg/mL'de aralığında çalışılmıştır. Biyofilm inhibisyon yüzdeleri 6.25 µg/mL'de %48±1,3 100 µg/mL' de ise % 62±2,5 bulunmuştur (Erci ve ark., 2018). Başka bir çalışmada sentezlenen *M. piperita* AgNP'lerin *S.aureus*'a karşı antimikrobiyal etkinliği sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile araştırılmıştır. *M. piperita* AgNP'lerin 0,565 mg/ml MİK değeri 2,260 mg/ml MBK değeri belirlenmiştir. MBK/MİK oranı 4 olarak hesaplanmıştır. AgNP'lerin antimikrobiyal etkileri araştırılmış, umut verici bir antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir. *M. piperita* AgNP'lerin boyutları 99-134 nm arasında belirlenmiş olup antimikrobiyal etkinliğinin daha düşük olduğu görülmektedir (Abdellatif ve ark., 2022). Bu çalışmada *M. piperita* AgNP'lerin *S. sanguinis*'e karşı MİK ve MBK değeri 128 µg/mL olarak bulunmuştur. MBK/MİK'in 1'e yakın bakterisidal etkisinin yüksek olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda sub-MİK değerindeki biyofilm oluşumunun tamamen engellendiği ve bakterinin hasara uğratıldığı SEM ile gösterilmiştir. Küçük boyutlu gümüş nanopartiküllerin, daha kolay iyon salınımına neden olabileceği ve bu yüzden daha güçlü antibakteriyel etki gösterdiği çalışmalarda bildirilmektedir (Paul & Robeson, 2008). Bu da çalışmamızda Abdellatif ve ark.'larının çalışmasına göre *M. piperita* AgNP'lerin daha düşük MİK değeri göstermesini açıklamaktadır.

Parvekar ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada AgNP'lerin potansiyel bakterisidal etki gösterdiği ve *S. aureus* için MİK değerinin 0,625 mg/ml olduğu belirlenmiştir. Çalışmada 5 nm boyutunda kimyasal yöntemlerle sentezlenen AgNP'ler kullanılmıştır.

Gram pozitif bir bakteri olan *S.aureus* için yüksek bir MİK değeri verdiğini görülmektedir (Parvekar, Palaskar, Metgud, Maria, & Dutta, 2020). Bu çalışmada ise *S. sanguinis* için yeşil sentez AgNP'lerin antimikrobiyal etkisinin daha güçlü olduğu görülmektedir. Parvekar ve ark.'nın çalışmasında sentezlenen partikül büyüklüğü 5 nm olmasına rağmen bu çalışmada 24 nm büyüklüğündeki partiküllerin daha etkin olduğu gösterilmiştir. Bu durumdan antimikrobiyal etkinliğin tek başına partikül büyüklüğüyle değerlendirilemeyeceği sonucu çıkarılmaktadır. Literatür bilgisi olan “metalik nanopartiküllerin antimikrobiyal etkinliği iki önemli parametre olan nanopartiküllerin sentezi için kullanılan malzeme ve partikül boyutlarına bağlıdır” yorumuyla tezat oluşturmaktadır (J. Singh ve ark., 2018).

Ticari olarak satılan, kimyasal olarak sentezlenmiş, boyutu 30-50 nm olan AgNP'lerin oral patojenler üzerine antimikrobiyal etkinliğiyle ilgili yapılan bir çalışmada *S. mutans* MİK değeri 250 µg/ml *S. oralis* MİK değeri 125 µg/ml olarak tespit edilmiştir. AgNP'lerin klorheksidine kıyasla beş kattan daha düşük konsantrasyonda daha iyi bakteriyostatik ve bakterisidal etki gösterdiği tespit edilmiştir. AgNP'ler, uygun konsantrasyonda kullanıldığında, mevcut olarak kimyasal yollarla üretilmiş diğer antimikrobiyal ajanlara güvenli bir alternatif olabileceği bildirilmiştir (Panpaliya ve ark., 2019). Bu çalışmada kullanılan diğer bir streptokok türü olan *S. sanguinis* için MİK değerleri literatürle benzer şekilde *S. aromaticum* AgNP için 128 *M. piperita* AgNP için 128 ve *R.officinalis* AgNP için 256 µg/ml bulunmuştur.

Literatürle karşılaştırıldığında (Abdellatif ve ark., 2022; Daghestani ve ark., 2020) bu tez çalışmasında farklı MİK ve MBK değerlerinin belirlenmiş olması, çalışılan farklı bakterilerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Literatür taramasında yeşil sentezle elde edilen AgNP'lerin *S. sanguinis* üzerine etkisinin araştırılmadığı görülmektedir. Bu nedenle karşılaştırma yapılabilecek bir veri olmadığı için antimikrobiyal etki diğer bakterilerle karşılaştırılmıştır. Yeşil sentezlenen AgNP'lerin sentezinde kullanılan ekstrakt miktarı, metal iyonu konsantrasyonu, pH ve partikül büyüklüğü gibi faktörlerin antimikrobiyal duyarlılık üzerine etkili olabileceği düşünülmekte olup bu faktörlerden hangisinin kesin ilişkili olduğu ile ilgili net bir bilgiye rastlanılmamıştır.

M. piperita AgNP'lerin hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada L929 fare fibroblast hücreleri ile çalışılmıştır. Araştırmacılar XTT hücre canlılığı yöntemi ile *M. piperita* AgNP'lerin toksik etkilerini çalışmadaki diğer nanopartiküllerle

karşılaştırmışlardır. Hücre canlılığının AgNP konsantrasyonunun artışına bağlı olarak büyük oranda azaldığını bildirmişlerdir. Çalışmada EC50 değeri 150 µg/mL bulunmuştur. (Erci ve ark., 2018). Bu çalışmada *M. piperita* AgNP'nin EC50 değeri 35 µg/mL bulunmuştur. Bunun birçok nedeni olabilir. Her iki çalışma karşılaştırıldığında partikül büyüklükleri aynı olmasına rağmen EDS analizinde gümüş miktarının daha düşük oksijen miktarının ise çok yüksek olduğu buna bağlı olarak toksik etkisinin az olabileceği düşünülmektedir.

R. officinalis AgNP'lerin sitotoksik etkileri MCF-7 meme kanseri hücreleri üzerinde incelenmiştir. AgNP'lerin 5µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarının %100 sitotoksik olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda, hücre ölümüne yol açan AgNP konsantrasyonlarını bitki özütleri ile karşılaştırılmış ve bitki özütlerine göre AgNP'lerin düşük konsantrasyonlarda dahi sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmada kontrol grubu olarak bitki özütü kullanılmış olup *R. officinalis* AgNP'lerin EC50 değeri çok düşük olarak belirlenmiştir. (3,3 µg/ml) (Aydın & Pehlivanoglu, 2019). Bu çalışmada ise *R. officinalis* AgNP'lerin L929 fare fibroblast hücre hattında EC50 değeri 298,2 µg/ml olarak belirlenmiş olup çalışmadaki diğer AgNP'lerle karşılaştırıldığında en düşük toksik etkiye sahip AgNP olduğu belirlenmiştir.

Cezaroğlu'nun Isparta gül posası kullanılarak sentezlediği AgNP ile yaptığı çalışmada, AgNP'lerin insan periferik kan mononükleer hücrelerine EC50 değeri 134,5 µg/ml bulunmuştur (Cezaroğlu, 2022).

Sentezlenen AgNP'lerin biyofilmi büyük oranda inhibe ettiği kristal viyole yöntemi ile belirlenmiş, sub-MİK, konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunun inhibe olduğu da SEM görüntülerinde tespit edilmiştir. Wypij ve arkadaşları yaptığı çalışmada mevcut çalışmaya benzer şekilde *P. aeruginosa* ve *E. coli*'nin biyofilm oluşumunun 1/4 MİK konsantrasyonlarda önemli ölçüde inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Wypij ve ark., 2022). Biyofilm oluşumunun, bakteri hücrelerinde gen ekspresyonunu değiştiren veya biyofilmdeki çekirdek algılamayı bozan AgNP'lerden Ag⁺ salınımıyla önlendiği ileri sürülmektedir (Mikhailova, 2020).

Hanafiah ve ark.'ları yeşil sentez yöntemiyle AgNP sentezi gerçekleştirmiş karakterizasyonları ve biyolojik özelliklerini inceledikleri çalışmada *Strobilanthes crispus* AgNP (*S. crispus* AgNP) sentezi gerçekleştirilmiş ve *S. mutans*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* 'ya

karşı antimikrobiyal etkileri değerlendirildiğinde *S. mutans* MİK değerinin 2,5 mg/ml olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada bakterilerin virülanslarında önemli rol oynayan bazı genlerin AgNP'lerle muamele sonucunda ekspresyon düzeylerindeki değişiklik de araştırılmıştır. *S. mutans*'ın gtfB geninin ifade düzeyindeki değişim, *S. crispus* AgNP'lerle tedavi edilmesi sonucunda kGZ-PZR yöntemiyle gösterilmiştir. Konsantrasyona bağlı olarak gen ekspresyonunda daha fazla azalma gözlenmiştir (Mohamad Hanafiah ve ark., 2023).

S. sanguinis'e ait virülans geni olan *spxB* hidrojen peroksit üreterek eDNA birikimine sebep olarak diş minesinde biyofilm oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Aynı zamanda hidrojen peroksit bakterinin konak savunmasından kaçmasında da rol oynayan virülans faktörüdür. Bu çalışmada yeşil sentez ile üretilen AgNP'lerin *spxB* geni üzerine etkileri araştırıldığında *M. piperita* ve *S. aromaticum* AgNP'lerin sırasıyla 0,03 ve 0,89 kat azalma gösterdiği belirlenmiştir. Bu iki AgNP'nin bakterinin biyofilm oluşumunda rol oynayan *spxB* gen ekspresyonunda düşüşe neden olması SEM görüntüleri ile doğrulanmaktadır. *R. officinalis* AgNP'de gözlenen *spxB* ekspresyonundaki artış SEM-EDS analizindeki verilere göre Oksijen elementinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. *spxB* geni nötrofil içeriğinin dışarı atılması olan NETosis'e neden olarak nötrofil hasarına ve bakterinin kan dolaşımında kalmasına dolayısıyla EE yol açmasına aracılık edebilecek bir virülans faktörü olduğu düşünülmektedir (Sumioka ve ark., 2017). Yapılan literatür taramalarında AgNP'lerin *spxB* genine ekspresyonunun araştırıldığı çalışmalara rastlanmamıştır. İlk defa bu çalışmada *spxB* genine AgNP'lerin etkisi araştırılmıştır.

Hem antimikrobiyal etki hem de sitotoksosite sonuçları göz önüne alındığında, şekil, boyut ve farklı bitki ekstraktları kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin biyolojik aktivitelerinin kontrolünde önemli değişkenler olduğu ortaya çıkmaktadır. NP'ler insan vücudunun maruz kaldığı uygulamalarda kullanıldığında, biyouyumluluk çalışmaları gereklidir. Bununla birlikte, yapılan bu çalışmada kullanılan *M. piperita* *S. aromaticum* AgNP'lerin antimikrobiyal antibiyofilm ve antivirülans özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *R. officinalis* (biberiye), *M. piperita* (nane), ve *S. aromaticum* (karanfil) bitkilerinden AgNP sentezi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada AgNP'lerin sentezi hızlı, maliyet açısından uygun ve çevre dostu olan yeşil sentez yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen AgNP'lerin, ağız boşluğunda bulunan ve diş biyofilminde öncü kolonizer bakteri olan aynı zamanda EE etkenleri arasında yer alan *S. sanguinis*'e karşı etkili antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu etkinlikler, özellikle ağız gargaraları, diş macunları formülasyonunda kullanılmak üzere değerlendirilebilir. Bu çalışmada, elde edilen AgNP'lerin sitotoksitesi, gümüş nitrat ile karşılaştırıldığında çok daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Doza bağımlı olarak toksik etkininde arttığı görülmüştür. AgNP'lerin hem biyofilm oluşumunda rol oynayan hem de kanda konak savunmasından kaçmasında rol oynayan *spxB* geni ekspresyonu üzerine de etkili olduğu bulunmuştur.

Çalışmanın hastalardan izole edilen *S. sanguinis* suşlarında ve ağız boşluğunda bulunan, biyofilmi oluşturan, diş çürüğü, periodontal hastalıklara neden olabilen diğer patojenler üzerine olan etkilerinin araştırılması önerilmektedir. Deney hayvanlarında yapılacak olan in vivo çalışmalar, sentezlenen bu AgNP'lerin daha geniş bir yelpazede güvenilir bir şekilde değerlendirilmesine olanak tanıyacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5721-5732. doi:doi:10.1128/jcm.43.11.5721-5732.2005
- Abdellatif, A. A. H., Alhathloul, S. S., Aljohani, A. S. M., Maswadeh, H., Abdallah, E. M., Hamid Musa, K., & El Hamd, M. A. (2022). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Incorporated Aromatherapies Utilized for Their Antioxidant and Antimicrobial Activities against Some Clinical Bacterial Isolates. *Bioinorg Chem Appl*, 2022, 2432758. doi:10.1155/2022/2432758
- Ahmad, N., Sharma, S., Alam, M. K., Singh, V., Shamsi, S., Mehta, B., & Fatma, A. (2010). Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81(1), 81-86.
- Akhtar, M. S., Panwar, J., & Yun, Y.-S. (2013). Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(6), 591-602.
- Alsaiani, N. S., Alzahrani, F. M., Amari, A., Osman, H., Harharah, H. N., Elboughdiri, N., & Tahooun, M. A. (2023). Plant and microbial approaches as green methods for the synthesis of nanomaterials: synthesis, applications, and future perspectives. *Molecules*, 28(1), 463.
- Amendola, V., Bakr, O. M., & Stellacci, F. (2010). A study of the surface plasmon resonance of silver nanoparticles by the discrete dipole approximation method: effect of shape, size, structure, and assembly. *Plasmonics*, 5, 85-97.
- Ankamwar, B., Damle, C., Ahmad, A., & Sastry, M. (2005). Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using *Embllica Officinalis* fruit extract, their phase transfer and transmetallation in an organic solution. *J Nanosci Nanotechnol*, 5(10), 1665-1671. doi:10.1166/jnn.2005.184
- Anwar, F., Abbas, A., Mehmood, T., Gilani, A. H., & Rehman, N. U. (2019). *Mentha*: A genus rich in vital nutra-pharmaceuticals-A review. *Phytother Res*, 33(10), 2548-2570. doi:10.1002/ptr.6423
- Ayanoğlu, F., Başkaya, Ş., & Bahadırılı, N. P. (2016). Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisinin uçucu yağ oranı, uçucu yağ bileşenleri ve antioksidan içeriğinde morfogenetik ve ontogenetik varyabilite. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21(1).
- Aydın, Ç., & Pehlivanoglu, S. (2019). Gümüş nanopartiküllerin biberiye özütü ile biyosentezi ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde sitotoksik etkisi. *SDU Sağlık Bilimleri Dergisi*, 10(2).
- Balavandy, S. K., Shameli, K., & Abidin, Z. Z. (2015). Rapid and green synthesis of silver nanoparticles via sodium alginate media. *International Journal of Electrochemical Science*, 10(1), 486-497.
- Bar, H., Bhui, D. K., Sahoo, G. P., Sarkar, P., Pyne, S., & Misra, A. (2009). Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Jatropha curcas*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 348(1-3), 212-216.
- Basu, S., Jana, S., Pande, S., & Pal, T. (2008). Interaction of DNA bases with silver nanoparticles: assembly quantified through SPRS and SERS. *J Colloid Interface Sci*, 321(2), 288-293. doi:10.1016/j.jcis.2008.02.015
- Batiha, G. E.-S., Alkazmi, L. M., Wasef, L. G., Beshbishy, A. M., Nadwa, E. H., & Rashwan, E. K. (2020). *Syzygium aromaticum* L.(Myrtaceae): Traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. *Biomolecules*, 10(2).
- Baydar, H. (2005). *Tıbbi, aromatik ve keyf bitkileri: bilimi ve teknolojisi*: Süleyman Demirel Üniversitesi.

- Becker, M. R., Paster, B. J., Leys, E. J., Moeschberger, M. L., Kenyon, S. G., Galvin, J. L., . . . Griffen, A. L. (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol*, 40(3), 1001-1009. doi:10.1128/jcm.40.3.1001-1009.2002
- Bell, T. A., Grayston, J. T., Krohn, M. A., & Kronmal, R. A. (1993). Randomized trial of silver nitrate, erythromycin, and no eye prophylaxis for the prevention of conjunctivitis among newborns not at risk for gonococcal ophthalmitis. Eye Prophylaxis Study Group. *Pediatrics*, 92(6), 755-760.
- C Thomas, S., Kumar Mishra, P., & Talegaonkar, S. (2015). Ceramic nanoparticles: fabrication methods and applications in drug delivery. *Current pharmaceutical design*, 21(42), 6165-6188.
- Caufield, P. W., Dasanayake, A. P., Li, Y., Pan, Y., Hsu, J., & Hardin, J. M. (2000). Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun*, 68(7), 4018-4023. doi:10.1128/iai.68.7.4018-4023.2000
- Centre for Clinical Practice at, N. (2008). National Institute for Health and Clinical Excellence: Guidance. In *Prophylaxis Against Infective Endocarditis: Antimicrobial Prophylaxis Against Infective Endocarditis in Adults and Children Undergoing Interventional Procedures*. London: National Institute for Health and Clinical Excellence (UK).
- Cezaroğlu, Y. (2022). *Isparta Güllü Posası Kullanılarak Yeşil Sentez Yoluyla Elde Edilen Kolistin Ve Sefotazidim-Avibaktam Konjuge Gümüş Nanopartiküllerinin Çok İlaça Dirençli Gram Negatif Bakterilere Karşı Antibakteriyel Ve Antibiyofilm Etkinliğinin Araştırılması*. (Uzmanlık Tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta.
- Chamat-Hedemand, S., Dahl, A., Østergaard, L., Arpi, M., Fosbøl, E., Boel, J., . . . Bruun, N. E. (2020). Prevalence of Infective Endocarditis in Streptococcal Bloodstream Infections Is Dependent on Streptococcal Species. *Circulation*, 142(8), 720-730. doi:10.1161/circulationaha.120.046723
- Chandran, S. P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., & Sastry, M. (2006). Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera plant extract. *Biotechnol Prog*, 22(2), 577-583. doi:10.1021/bp0501423
- Chaudhary, R., Nawaz, K., Khan, A. K., Hano, C., Abbasi, B. H., & Anjum, S. (2020). An overview of the algae-mediated biosynthesis of nanoparticles and their biomedical applications. *Biomolecules*, 10(11), 1498.
- Crasta, K., Daly, C. G., Mitchell, D., Curtis, B., Stewart, D., & Heitz-Mayfield, L. J. (2009). Bacteraemia due to dental flossing. *J Clin Periodontol*, 36(4), 323-332. doi:10.1111/j.1600-051X.2008.01372.x
- Daghestani, M., Rashed, S. A. A., Bukhari, W., Al-Ojayan, B., Ibrahim, E. M., Al-Qahtani, A. M., . . . Bhat, R. S. (2020). Bactericidal and cytotoxic properties of green synthesized nanosilver using *Rosmarinus officinalis* leaves. *Green Processing and Synthesis*, 9(1), 230-236. doi:doi:10.1515/gps-2020-0025
- Das, J., & Velusamy, P. (2013). Antibacterial effects of biosynthesized silver nanoparticles using aqueous leaf extract of *Rosmarinus officinalis* L. *Materials Research Bulletin*, 48(11), 4531-4537. doi:<https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2013.07.049>
- de Oliveira, J. R., Camargo, S. E. A., & de Oliveira, L. D. (2019). *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. *J Biomed Sci*, 26(1), 5. doi:10.1186/s12929-019-0499-8
- DeSimone, D. C., DeSimone, C. V., Tleyjeh, I. M., Correa de Sa, D. D., Anavekar, N. S., Lahr, B. D., . . . Baddour, L. M. (2015). Association of Mitral Valve Prolapse With Infective Endocarditis Due to Viridans Group Streptococci. *Clin Infect Dis*, 61(4), 623-625. doi:10.1093/cid/civ375
- Dowson, C. G., Hutchison, A., Woodford, N., Johnson, A. P., George, R. C., & Spratt, B. G. (1990). Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-

- resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(15), 5858-5862. doi:10.1073/pnas.87.15.5858
- Drake, D. R., Paul, J., & Keller, J. C. (1999). Primary bacterial colonization of implant surfaces. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 14(2), 226-232.
- Dreaden, E. C., Alkilany, A. M., Huang, X., Murphy, C. J., & El-Sayed, M. A. (2012). The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2740-2779.
- Ealia, S. A. M., & Saravanakumar, M. P. (2017). *A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application*. Paper presented at the IOP conference series: materials science and engineering.
- El-Saber Batiha, G., Alkazmi, L. M., Wasef, L. G., Beshbishy, A. M., Nadwa, E. H., & Rashwan, E. K. (2020). *Syzygium aromaticum* L.(Myrtaceae): traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities. *Biomolecules*, 10(2), 202.
- Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett*, 38(6), 1015-1019. doi:10.1007/s10529-016-2079-2
- Erci, F., Cakir-Koc, R., & Isildak, I. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using *Thymbra spicata* L. var. *spicata* (zahter) aqueous leaf extract and evaluation of their morphology-dependent antibacterial and cytotoxic activity. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup1), 150-158.
- Ergin, A. (2010). Viridans Streptokokların Laboratuvar Tanısında Klasik Ve Yeni Yaklaşımlar. *Mikrobiyol Bul*, 44, 495-503.
- Fabrega, J., Renshaw, J. C., & Lead, J. R. (2009). Interactions of Silver Nanoparticles with *Pseudomonas putida* Biofilms. *Environmental Science & Technology*, 43(23), 9004-9009. doi:10.1021/es901706j
- Facklam, R. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev*, 15(4), 613-630. doi:10.1128/cmr.15.4.613-630.2002
- Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., & Kim, J. O. (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*, 52(4), 662-668. doi:10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::aid-jbm10>3.0.co;2-3
- Ferretti, J., & Köhler, W. (2016). History of streptococcal research.
- Feynman, R. P. (1960). There's plenty of room at the bottom—An invitation to enter a new field of physics. *Caltech Engineering and Science*, 23, 5.
- Frank, M. E., Gent, J. F., & Hettinger, T. P. (2001). Effects of chlorhexidine on human taste perception. *Physiol Behav*, 74(1-2), 85-99. doi:10.1016/s0031-9384(01)00558-3
- Fukushima, K., Noda, M., Saito, Y., & Ikeda, T. (2012). *Streptococcus sanguis* meningitis: report of a case and review of the literature. *Intern Med*, 51(21), 3073-3076. doi:10.2169/internalmedicine.51.7962
- Ge, Y., Caufield, P. W., Fisch, G. S., & Li, Y. (2008). *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization correlated with caries experience in children. *Caries Res*, 42(6), 444-448. doi:10.1159/000159608
- Ghaedi, M., Yousefinejad, M., Safarpour, M., Khafri, H. Z., & Purkait, M. K. (2015). Rosmarinus officinalis leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles and investigation of its antimicrobial properties. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 31, 167-172. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.06.020>

- Ghasemzadeh Rahbardar, M., & Hosseinzadeh, H. (2020). Therapeutic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its active constituents on nervous system disorders. *Iran J Basic Med Sci*, 23(9), 1100-1112. doi:10.22038/ijbms.2020.45269.10541
- Giacaman, R. A., Torres, S., Gómez, Y., Muñoz-Sandoval, C., & Kreth, J. (2015). Correlation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* colonization and ex vivo hydrogen peroxide production in carious lesion-free and high caries adults. *Arch Oral Biol*, 60(1), 154-159. doi:10.1016/j.archoralbio.2014.09.007
- Gujrati, M., Malamas, A., Shin, T., Jin, E., Sun, Y., & Lu, Z.-R. (2014). Multifunctional Cationic Lipid-Based Nanoparticles Facilitate Endosomal Escape and Reduction-Triggered Cytosolic siRNA Release. *Molecular Pharmaceutics*, 11(8), 2734-2744. doi:10.1021/mp400787s
- Gupta, S. M., & Tripathi, M. (2012). An overview of commonly used semiconductor nanoparticles in photocatalysis. *High Energy Chemistry*, 46, 1-9.
- Gurung, I., Berry, J. L., Hall, A. M. J., & Pelicic, V. (2017). Cloning-independent markerless gene editing in *Streptococcus sanguinis*: novel insights in type IV pilus biology. *Nucleic Acids Res*, 45(6), e40. doi:10.1093/nar/gkw1177
- Haffajee, A. D., Teles, R. P., Patel, M. R., Song, X., Yaskell, T., & Socransky, S. S. (2009). Factors affecting human supragingival biofilm composition. II. Tooth position. *J Periodontal Res*, 44(4), 520-528. doi:10.1111/j.1600-0765.2008.01155.x
- Hamed, S., & Shojaosadati, S. A. (2019). Rapid and green synthesis of silver nanoparticles using *Diospyros lotus* extract: Evaluation of their biological and catalytic activities. *Polyhedron*, 171, 172-180.
- Hano, C., & Abbasi, B. H. (2021). Plant-Based Green Synthesis of Nanoparticles: Production, Characterization and Applications. *Biomolecules*, 12(1). doi:10.3390/biom12010031
- Holland, T. L., Baddour, L. M., Bayer, A. S., Hoen, B., Miro, J. M., & Fowler, V. G., Jr. (2016). Infective endocarditis. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16059. doi:10.1038/nrdp.2016.59
- Hussain, A., Alajmi, M. F., Khan, M. A., Pervez, S. A., Ahmed, F., Amir, S., . . . Hassan, I. (2019). Biosynthesized silver nanoparticle (AgNP) from *Pandanus odorifer* leaf extract exhibits anti-metastasis and anti-biofilm potentials. *Frontiers in microbiology*, 10, 8.
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Res Pharm Sci*, 9(6), 385-406.
- Jain, N., Bhargava, A., Majumdar, S., Tarafdar, J., & Panwar, J. (2011). Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: a mechanism perspective. *Nanoscale*, 3(2), 635-641.
- Jardon-Romero, E. A., Lara-Carrillo, E., Gonzalez-Pedroza, M. G., Sanchez-Mendieta, V., Salmeron-Valdes, E. N., Toral-Rizo, V. H., . . . Morales-Luckie, R. A. (2022). Antimicrobial Activity of Biogenic Silver Nanoparticles from *Syzygium aromaticum* against the Five Most Common Microorganisms in the Oral Cavity. *Antibiotics (Basel)*, 11(7). doi:10.3390/antibiotics11070834
- Joshi, A. S., Singh, P., & Mijakovic, I. (2020). Interactions of gold and silver nanoparticles with bacterial biofilms: Molecular interactions behind inhibition and resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7658.
- Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1), 262. doi:10.1186/s12951-022-01477-8

- Kalishwaralal, K., BarathManiKanth, S., Pandian, S. R., Deepak, V., & Gurunathan, S. (2010). Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 79(2), 340-344. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.04.014
- Kamatou, G. P., Vermaak, I., & Viljoen, A. M. (2012). Eugenol--from the remote Maluku Islands to the international market place: a review of a remarkable and versatile molecule. *Molecules*, 17(6), 6953-6981. doi:10.3390/molecules17066953
- Keynan, Y., & Rubinstein, E. (2013). Pathophysiology of infective endocarditis. *Curr Infect Dis Rep*, 15(4), 342-346. doi:10.1007/s11908-013-0346-0
- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 908-931.
- Khanna, P., Kaur, A., & Goyal, D. (2019). Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications. *J Microbiol Methods*, 163, 105656. doi:10.1016/j.mimet.2019.105656
- Khatoun, A., Khan, F., Ahmad, N., Shaikh, S., Rizvi, S. M. D., Shakil, S., . . . Dutta, R. (2018). Silver nanoparticles from leaf extract of *Mentha piperita*: Eco-friendly synthesis and effect on acetylcholinesterase activity. *Life Sci*, 209, 430-434. doi:10.1016/j.lfs.2018.08.046
- Kiarashi, M., Mahamed, P., Ghotbi, N., Tadayonfard, A., Nasiri, K., Kazemi, P., . . . Joudaki, A. (2024). Spotlight on therapeutic efficiency of green synthesis metals and their oxide nanoparticles in periodontitis. *Journal of Nanobiotechnology*, 22(1), 21. doi:10.1186/s12951-023-02284-5
- Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Blehert, D. S., Eglund, P. G., Foster, J. S., & Palmer, R. J., Jr. (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(3), 486-505, table of contents. doi:10.1128/mmbr.66.3.486-505.2002
- Kumar, C. G., & Mamidyala, S. K. (2011). Extracellular synthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(2), 462-466.
- Kumar, V., Yadav, S. C., & Yadav, S. K. (2010). *Syzygium cumini* leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(10), 1301-1309.
- Kvítek, L., Panáček, A., Soukupová, J., Kolář, M., Večeřová, R., Pucek, R., . . . Zbořil, R. (2008). Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *The Journal of Physical Chemistry C*, 112(15), 5825-5834. doi:10.1021/jp711616v
- Lancefield, R. C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *The Journal of experimental medicine*, 57(4), 571-595. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2132252/pdf/571.pdf>
- Lee, K. X., Shameli, K., Mohamad, S. E., Yew, Y. P., Mohamed Isa, E. D., Yap, H. Y., . . . Teow, S. Y. (2019). Bio-Mediated Synthesis and Characterisation of Silver Nanocarrier, and Its Potent Anticancer Action. *Nanomaterials (Basel)*, 9(10). doi:10.3390/nano9101423
- Lethongkam, S., Paosen, S., Billman, S., Dumjun, K., Wunnoo, S., Choojit, S., . . . Bejrananda, T. (2022). Eucalyptus-Mediated Synthesized Silver Nanoparticles-Coated Urinary Catheter Inhibits Microbial Migration and Biofilm Formation. *Nanomaterials (Basel)*, 12(22). doi:10.3390/nano12224059
- Liu, Y. T., Lin, C. F., & Lee, Y. L. (2013). *Streptococcus sanguinis* meningitis following endoscopic ligation for oesophageal variceal haemorrhage. *J Med Microbiol*, 62(Pt 5), 794-796. doi:10.1099/jmm.0.054213-0
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.

- Lockhart, P. B., Brennan, M. T., Thornhill, M., Michalowicz, B. S., Noll, J., Bahrani-Mougeot, F. K., & Sasser, H. C. (2009). Poor oral hygiene as a risk factor for infective endocarditis-related bacteremia. *J Am Dent Assoc*, 140(10), 1238-1244. doi:10.14219/jada.archive.2009.0046
- Lok, C.-N., Ho, C.-M., Chen, R., He, Q.-Y., Yu, W.-Y., Sun, H., . . . Che, C.-M. (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(4), 527-534. doi:10.1007/s00775-007-0208-z
- Lu, K.-Q., Quan, Q., Zhang, N., & Xu, Y.-J. (2016). Multifarious roles of carbon quantum dots in heterogeneous photocatalysis. *Journal of energy chemistry*, 25(6), 927-935.
- Maciel, M. V. d. O. B., da Rosa Almeida, A., Machado, M. H., Elias, W. C., da Rosa, C. G., Teixeira, G. L., . . . de Armas, R. D. (2020). Green synthesis, characteristics and antimicrobial activity of silver nanoparticles mediated by essential oils as reducing agents. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 28, 101746.
- Mahendran, G., & Rahman, L. U. (2020). Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha× piperita* L.)—A review. *Phytotherapy Research*, 34(9), 2088-2139.
- Makarov, V. V., Love, A. J., Sinitsyna, O. V., Makarova, S. S., Yaminsky, I. V., Taliansky, M. E., & Kalinina, N. O. (2014). "Green" nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae*, 6(1), 35-44.
- Makky, S., Rezk, N., Abdelsattar, A. S., Hussein, A. H., Eid, A., Essam, K., . . . Agwa, M. M. (2023). Characterization of the biosynthesized *Syzygium aromaticum*-mediated silver nanoparticles and its antibacterial and antibiofilm activity in combination with bacteriophage. *Results in Chemistry*, 5, 100686.
- Martinez-Gutierrez, F., Boegli, L., Agostinho, A., Sánchez, E. M., Bach, H., Ruiz, F., & James, G. (2013). Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Biofouling*, 29(6), 651-660.
- Matsumura, Y., Yoshikata, K., Kunisaki, S., & Tsuchido, T. (2003). Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl Environ Microbiol*, 69(7), 4278-4281. doi:10.1128/aem.69.7.4278-4281.2003
- McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytother Res*, 20(8), 619-633. doi:10.1002/ptr.1936
- Mikhailova, E. O. (2020). Silver Nanoparticles: Mechanism of Action and Probable Bio-Application. *J Funct Biomater*, 11(4). doi:10.3390/jfb11040084
- Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2), 346-356. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
- Mittal, J., Batra, A., Singh, A., & Sharma, M. M. (2014). Phytofabrication of nanoparticles through plant as nanofactories. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 5(4), 043002.
- Mochalin, V., Shenderova, O., Ho, D., & Gogotsi, Y. (2020). The properties and applications of nanodiamonds. *Nano-enabled medical applications*, 313-350.
- Mody, V. V., Siwale, R., Singh, A., & Mody, H. R. (2010). Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm Bioallied Sci*, 2(4), 282-289. doi:10.4103/0975-7406.72127
- Mohamad Hanafiah, R., Abd Ghafar, S. A., Lim, V., Musa, S. N. A., Yakop, F., & Hairil Anuar, A. H. (2023). Green synthesis, characterisation and antibacterial activities of *strobilanthes crispus*-mediated silver nanoparticles (SC-AGNPS) against selected bacteria. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 51(1), 549-559.

- Moreno-Vega, A.-I., Gomez-Quintero, T., Nunez-Anita, R.-E., Acosta-Torres, L.-S., & Castaño, V. (2012). Polymeric and ceramic nanoparticles in biomedical applications. *Journal of Nanotechnology*, 2012.
- MubarakAli, D., Thajuddin, N., Jeganathan, K., & Gunasekaran, M. (2011). Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 85(2), 360-365. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.03.009
- Mulvaney, P. (2015). Nanoscience vs Nanotechnology ▪ Defining the Field. In (Vol. 9, pp. 2215-2217): ACS Publications.
- Muruganandham, M., Al-Otibi, F. O., Alharbi, R. I., Sivasubramanian, K., Raja, R. K., Velmurugan, P., & Basavegowda, N. (2023). Antibacterial, antifungal, antioxidant, and cytotoxicity activities of the aqueous extract of *Syzygium aromaticum*-mediated synthesized novel silver nanoparticles. *Green Processing and Synthesis*, 12(1), 20230188.
- Nascimento, M. A., Cruz, J. C., Rodrigues, G. D., de Oliveira, A. F., & Lopes, R. P. (2018). Synthesis of polymetallic nanoparticles from spent lithium-ion batteries and application in the removal of reactive blue 4 dye. *Journal of cleaner production*, 202, 264-272.
- Nasrollahzadeh, M., Atarod, M., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., & Issaabadi, Z. (2019). Plant-mediated green synthesis of nanostructures: mechanisms, characterization, and applications. In *Interface science and technology* (Vol. 28, pp. 199-322): Elsevier.
- Ng, K. K., & Zheng, G. (2015). Molecular interactions in organic nanoparticles for phototheranostic applications. *Chemical reviews*, 115(19), 11012-11042.
- Nobbs, A., & Kreth, J. (2019). Genetics of sanguinis-Group Streptococci in Health and Disease. *Microbiol Spectr*, 7(1). doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0052-2018
- Noguez, C. (2007). Surface plasmons on metal nanoparticles: the influence of shape and physical environment. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(10), 3806-3819.
- Oh, W.-K., Yoon, H., & Jang, J. (2010). Size control of magnetic carbon nanoparticles for drug delivery. *Biomaterials*, 31(6), 1342-1348.
- Öcal, D., Tekeli, A., & Dolapçı, İ. (2022). Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Biyofilm Oluşumunun Çeşitli Kongo Kırmızısı Besiyerlerinde Değerlendirmesi. *Journal of Ankara University Faculty of Medicine/Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 75(1).
- Özden, Ö. (2016). *Viridans Grubu Streptokokların Tanısında Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması ve Antibiyotik Direncinin Araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Pan, K., & Zhong, Q. (2016). Organic nanoparticles in foods: fabrication, characterization, and utilization. *Annual Review of Food Science and Technology*, 7, 245-266.
- Panpaliya, N. P., Dahake, P. T., Kale, Y. J., Dadpe, M. V., Kendre, S. B., Siddiqi, A. G., & Maggavi, U. R. (2019). In vitro evaluation of antimicrobial property of silver nanoparticles and chlorhexidine against five different oral pathogenic bacteria. *The Saudi dental journal*, 31(1), 76-83.
- Parvekar, P., Palaskar, J., Metgud, S., Maria, R., & Dutta, S. (2020). The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Biomaterial investigations in dentistry*, 7(1), 105-109.
- Paul, D. R., & Robeson, L. M. (2008). Polymer nanotechnology: nanocomposites. *Polymer*, 49(15), 3187-3204.

- Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., Janda, W. M., Koneman, E. W., Schreckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2017). *Koneman's Color Atlas And Textbook of Diagnostic Microbiology* (7 ed.): Edition Lippincot Williams and Wilkins.
- Quinn, J. P., DiVincenzo, C. A., Lucks, D. A., Luskin, R. L., Shatzer, K. L., & Lerner, S. A. (1988). Serious infections due to penicillin-resistant strains of viridans streptococci with altered penicillin-binding proteins. *Journal of Infectious Diseases*, 157(4), 764-769.
- Rahman, S., Rahman, L., Khalil, A. T., Ali, N., Zia, D., Ali, M., & Shinwari, Z. K. (2019). Endophyte-mediated synthesis of silver nanoparticles and their biological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(6), 2551-2569. doi:10.1007/s00253-019-09661-x
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostat Bioinforma Biomath*, 3(3), 71-85.
- Raveendran, P., Fu, J., & Wallen, S. L. (2003). Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 125(46), 13940-13941.
- Roe, D., Karandikar, B., Bonn-Savage, N., Gibbins, B., & Rouillet, J. B. (2008). Antimicrobial surface functionalization of plastic catheters by silver nanoparticles. *J Antimicrob Chemother*, 61(4), 869-876. doi:10.1093/jac/dkn034
- Rutherford, S. J., Glenney, A. M., Roberts, G., Hooper, L., & Worthington, H. V. (2022). Antibiotic prophylaxis for preventing bacterial endocarditis following dental procedures. *Cochrane Database Syst Rev*, 5(5), Cd003813. doi:10.1002/14651858.CD003813.pub5
- Sahoo, S. K., Parveen, S., & Panda, J. J. (2007). The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 20-31. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.11.008>
- Sangeetha, G., Rajeshwari, S., & Venkatesh, R. (2011). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by aloe barbadensis miller leaf extract: Structure and optical properties. *Materials Research Bulletin*, 46(12), 2560-2566. doi:<https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2011.07.046>
- Sanz, M., Beighton, D., Curtis, M. A., Cury, J. A., Dige, I., Dommisch, H., . . . Zaura, E. (2017). Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 44 Suppl 18, S5-s11. doi:10.1111/jcpe.12682
- Seifipour, R., Nozari, M., & Pishkar, L. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using Tragopogon collinus leaf extract and study of their antibacterial effects. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 30(8), 2926-2936.
- Sharma, V. K., Yngard, R. A., & Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in colloid and interface science*, 145(1-2), 83-96.
- Singh, J., Dutta, T., Kim, K.-H., Rawat, M., Samddar, P., & Kumar, P. (2018). ‘Green’ synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. *Journal of Nanobiotechnology*, 16, 1-24.
- Singh, P., Kim, Y.-J., Zhang, D., & Yang, D.-C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in biotechnology*, 34(7), 588-599.
- Sinner, S. W., & Tunkel, A. R. (2015). Viridans streptococci, nutritionally variant streptococci, groups C and G streptococci, and other related organisms. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (pp. 2349-2361. e2342): Elsevier.

- Slot, D., Berchier, C., Addy, M., Van der Velden, U., & Van der Weijden, G. (2014). The efficacy of chlorhexidine dentifrice or gel on plaque, clinical parameters of gingival inflammation and tooth discoloration: a systematic review. *International Journal of dental hygiene*, 12(1), 25-35.
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*, 275(1), 177-182. doi:10.1016/j.jcis.2004.02.012
- Sulaiman, G. M., Mohammad, A. A., Abdul-Wahed, H. E., & Ismail, M. M. (2013). Biosynthesis, antimicrobial and cytotoxic effects of silver nanoparticles using *Rosmarinus officinalis* extract. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 8(1), 273-280.
- Sumioka, R., Nakata, M., Okahashi, N., Li, Y., Wada, S., Yamaguchi, M., . . . Kawabata, S. (2017). *Streptococcus sanguinis* induces neutrophil cell death by production of hydrogen peroxide. *PLoS One*, 12(2), e0172223. doi:10.1371/journal.pone.0172223
- Teimouri, M., Khosravi-Nejad, F., Attar, F., Saboury, A. A., Kostova, I., Benelli, G., & Falahati, M. (2018). Gold nanoparticles fabrication by plant extracts: synthesis, characterization, degradation of 4-nitrophenol from industrial wastewater, and insecticidal activity—a review. *Journal of cleaner production*, 184, 740-753.
- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 257-262.
- Topçu, A. W., Söyletir, G., & Doğanay, M (Ed.). (2008). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Cilt 1*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Toshima, N., & Yonezawa, T. (1998). Bimetallic nanoparticles—novel materials for chemical and physical applications. *New Journal of Chemistry*, 22, 1179-1201.
- Vogkou, C. T., Vlachogiannis, N. I., Palaiodimos, L., & Kousoulis, A. A. (2016). The causative agents in infective endocarditis: a systematic review comprising 33,214 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 35(8), 1227-1245. doi:10.1007/s10096-016-2660-6
- Vriesema, A. J., Dankert, J., & Zaat, S. A. (2000). A shift from oral to blood pH is a stimulus for adaptive gene expression of *Streptococcus gordonii* CH1 and induces protection against oxidative stress and enhanced bacterial growth by expression of *msrA*. *Infect Immun*, 68(3), 1061-1068. doi:10.1128/iai.68.3.1061-1068.2000
- White, R. J. (2001). An historical overview of the use of silver in wound management. *British Journal of Community Nursing*, 6(Sup1), 3-8.
- Whitesides, G. M. (2003). The 'right' size in nanobiotechnology. *Nature Biotechnology*, 21(10), 1161-1165. doi:10.1038/nbt872
- Wilson, W., Gewitz, M., Lockhart, P. B., Bolger, A. F., DeSimone, D. C., Kazi, D. S., . . . Baddour, L. M. (2021). Prevention of Viridans Group Streptococcal Infective Endocarditis: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, 143(20), e963-e978. doi:10.1161/cir.0000000000000969
- Wypij, M., Ostrowski, M., Piska, K., Wójcik-Pszczola, K., Pękala, E., Rai, M., & Golińska, P. (2022). Novel antibacterial, cytotoxic and catalytic activities of silver nanoparticles synthesized from acidophilic actinobacterial SL19 with evidence for protein as coating biomolecule. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(9), 1195.
- Yavuz, S. S., Akar, A. R., Aydogdu, S., Deniz, D. B., Demir, H., HAZIROLAN, T., . . . Topcuoglu, E. N. (2020). Diagnosis, treatment and prevention of infective endocarditis: Turkish consensus report-2019.

- Yew, H. S., & Murdoch, D. R. (2012). Global trends in infective endocarditis epidemiology. *Curr Infect Dis Rep*, 14(4), 367-372. doi:10.1007/s11908-012-0265-5
- Zheng, L. Y., Itzek, A., Chen, Z. Y., & Kreth, J. (2011). Oxygen dependent pyruvate oxidase expression and production in *Streptococcus sanguinis*. *International Journal of Oral Science*, 3(2), 82-89. doi:10.4248/ijos11030
- Zhu, B., Macleod, L. C., Kitten, T., & Xu, P. (2018). *Streptococcus sanguinis* biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future Microbiology*, 13(08), 915-932.

