



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOTEKNOLOJİ VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM
DALI**

***Eriobotrya japonica* Lindl ÇEKİRDEK VE YAPRAKLARINDAN
GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL (AgNPs) SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU VE KOLOREKTAL KANSER
HÜCRESİ (HT-29) ÜZERİNE ANTİKANSER ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Beyzanur ENGEZ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Fulya DOĞANER

AKSARAY, 2024

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 212330409 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Beyzanur ENGEZ tarafından hazırlanan “*Eriobotrya japonica* Lindl. ÇEKİRDEK VE YAPRAKLARINDAN GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL (AgNPs) SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE KOLOREKTAL KANSER HÜCRESİ (HT-29) ÜZERİNE ANTİKANSER ETKİSİNİN BELİRLENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Dr. Öğr. Fulya DOĞANER

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Doç. Dr. Lalehan AKYÜZ

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Doç. Dr. Demet ERDÖNMEZ

Düzce Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 26/09/2024

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Mehmet Ali HINIS

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdür

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinalliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Beyzanur ENGEZ

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasını gerçekleştirirken, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, akademik anlamda her zaman bana yol gösteren, gerektiğinde danışmanlık zamanı haricinde de bana zaman ayıran, danışmanlık görevini hakkıyla yerine getiren Sayın Dr. Öğr. Üyesi Fulya DOĞANER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bitki tür teşhisinde yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Nihal KENAR'a, hücre kültür hattının teminini sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe KARADUMAN YEŞİLDAL'a, FT-IR analizlerini yorumlamamda bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan Doç. Dr. Lalehan AKYÜZ'e ve bilimsel çalışmalarımı geliştirmemde büyük bir laboratuvar olanağı sunan Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi (ASÜBTAM) yöneticilerine teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve hiçbir zaman yürüdüğüm yolda maddi manevi desteklerini esirgemeyen canım babam Yusuf ENGEZ'e, her zaman başarılarımda yanımda olan biricik annem Nurben ENGEZ'e ve yaşça küçük olsa da büyük bir olgunlukla her koşulda yanımda olan kardeşim Beyazıt ENGEZ'e teşekkür ederim. Ekip arkadaşım Elif Dilan ULUĞTEKİN'e tez süresince verdiği destek için teşekkürlerimi sunarım.

Beyzanur ENGEZ
AKSARAY, 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Nanoteknoloji	5
2.1.1 Gümüş nanopartiküller (AgNPs)	6
2.1.2 Bitki aracılı (yeşil sentez) gümüş nanopartiküller	7
2.1.3 Bitki ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin antimikrobiyal özelliği	10
2.1.4 Bitki ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin antioksidan özelliği	10
2.1.5 Bitki ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin antikanser özelliği	10
2.2 <i>Eriobotrya japonica</i> Lindl. (Malta Eriği, Yenidünya).....	11
2.2.1 <i>E. japonica</i> L.'nin fitokimyasal içeriği ve antikanser aktivitesi.....	12
2.3 Kanser	13
2.3.1 Kolorektal kanser	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1 Bitkilerin Toplanması ve Kurutulması	16
3.2 <i>E. japonica</i> L. Bitkisinin Ekstraksiyonu	17
3.3 Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini	17
3.3.1 Folin-Ciocalteu fenol reaktifi hazırlanması	18
3.3.2 Sodyum karbonat hazırlanması	18
3.3.3 Gallik Asit stok çözeltisinin hazırlanması	18
3.3.4 Gallik Asit standart eğrisinin hazırlanması.....	19
3.4 Toplam Flavonoid Madde Miktar Tayini	19
3.4.1 Quercetin stok çözeltisinin hazırlanması	19
3.4.2 %5'lik Sodyum nitrit hazırlanması	20
3.4.3 %10 Alüminyum klorür (AlCl ₃) hazırlanması	20
3.4.4 1M Sodyum hidroksit (NaOH) hazırlanması.....	20
3.4.5 Flavonoid madde miktar tayini.....	20
3.4.6 Quercetin standart eğrisinin hazırlanması.....	21
3.5 Gümüş Nanopartiküllerinin Eldesi	21
3.5.1 Gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu	22
3.5.1.1 Renk Analizi	22
3.5.1.2 UV-VIS (ultravioletole-visible spektroskopisi) analizi	23
3.5.1.3 SEM (scanning electron microscope) analizi.....	23
3.5.1.4 FT-IR (fourier transform infrared spectroscopy) analizi	23
3.5.1.5 Zeta Potansiyel analizi	23
3.5.1.6 X-ışını kırınım (XRD) analizi	24
3.6 Antikanser Aktivite Çalışmaları	24
3.6.1 HT-29 hücre hattı	24
3.6.2 Hücrelerin çözündürülmesi	24
3.6.3 Hücrelerin çoğaltılması (Pasajlama).....	25
3.6.4 Hücrelerin dondurulması.....	26
3.6.5 Hücre canlılığı ve hücre sayımı (Tripın Blue Yöntemi).....	27

3.6.6 AgNP stok çözeltilerin hazırlanması	27
3.6.7 Sitotoksosite testi (MTT yöntemi)	28
3.6.8 MTT reaktifinin hazırlanması.....	28
3.6.9 MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi	28
3.6.10 Migrasyon (Wound Healing Assay, Yara İyileştirme Deneyi).....	30
3.7 İstatistiksel Analiz	30
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	31
4.1 Toplam Fenolik Madde Miktar Sonuçları	31
4.1.1 <i>E. japonica</i> L. yaprak ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarı	31
4.1.2 <i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarı.....	33
4.2 Toplam Flavonoid Madde Miktar Tayini	35
4.2.1 <i>E. japonica</i> L. yaprak ekstrelerinin toplam flavonoid madde miktarı sonuçları	35
4.2.2 <i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstrelerinin toplam flavonoid madde miktarı sonuçları	36
4.3 Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	38
4.3.1 Renk değişim analizi.....	38
4.3.2 UV-VIS spektroskopisi analizi.....	38
4.3.3 Taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscope, SEM) ...	41
4.3.4 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR).....	45
4.3.5 Zeta potansiyeli (Elektriksel yükü).....	49
4.3.6 X-ışını kırınım (XRD) analizi.....	53
4.4 Antikanser Aktivite Sonuçları.....	58
4.4.1 MTT sonuçları	58
4.4.2. <i>E. japonica</i> L. yaprak ekstresi ve yaprak ekstresinden elde edilen AgNP'lerin MTT testi sonuçları	58
4.4.3 <i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstresi ve çekirdek ekstresi ile elde edilen AgNP'lerin MTT testi sonuçları	61
4.4.4 Migrasyon (yara iyileşme deneyi) sonuçları.....	64
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	71
KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	93

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Eriobotrya japonica* Lindl. ÇEKİRDEK VE YAPRAKLARINDAN GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL (AgNPs) SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE KOLOREKTAL KANSER HÜCRESİ (HT-29) ÜZERİNE ANTİKANSER ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

Beyzanur ENGEZ

**Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Fulya DOĞANER

ÖZET

Eriobotrya japonica Lindl. (*E. japonica* L.) (Yenidünya, Malta eriği) bitkisinin çeşitli ekstrelerinin pek çok farmakolojik etkileri olduğu bilinmektedir. Özellikle meyvedeki zengin içeriklerin kolorektal kanser üzerine etkili olduğu belirlenmiştir. Yeşil sentez olarak da bilinen bitki ekstrelerinden elde edilen gümüş nanopartiküllerin (AgNPs) bitkilerin biyolojik aktivitelerini artırdığı bilinmektedir. Çalışmamız *E. japonica* L. bitkisinin yaprak ve çekirdek gibi tüketilmeyen organlarından elde edilen ekstrelerin kolorektal kanser hücre hattı (HT-29) üzerine etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır. *E. japonica* L. bitkisinin yaprak ve çekirdeklerinden farklı çözücülerle (%75 metanol, %75 etanol ve distile su) bitki ekstreleri elde edilip, toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri analiz edilmiştir. En uygun içeriğe sahip olan ekstreten farklı konsantrasyonlarda (1 mM, 5 mM ve 10 mM) AgNP sentezi gerçekleştirilmiştir. AgNP sentezi, renk değişimi, UV-VIS, FTIR, SEM, XRD ve Zeta potansiyeli ve boyutu yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan AgNP'lerin ve ekstrelerin 24, 48 ve 72 saat sürelerde HT-29 hücrelerine karşı sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile ve migrasyon üzerine etkileri yara iyileşme yöntemi ile belirlenmiştir. Çekirdek ve yaprak ekstrelerinde en yüksek fenolik ve flavonoid içerik %75 etanol ile elde edilmiştir. Çekirdekte ve yapraktaki toplam fenolik içerik sırasıyla $367,24 \pm 0,038$ ve $1487,05 \pm 0,017$ mgGAE/100g iken toplam flavonoid madde miktarları ise sırasıyla $18,96$ ve $30,93 \pm 0,001$ mg/mL (QE)'dir. Bu AgNP'lerin UV-VIS spektroskopi grafiğinde 430-450 nm aralığında pikler elde edilirken, SEM görüntülerinde küresel ve kübik yapıda olduğu, FTIR, XRD ve zeta potansiyel sonuçlarının ise literatüre uygun değerlerde olduğu belirlenmiştir. AgNP'lerin HT-29 hücre hattındaki en iyi sitotoksik etkileri çekirdekte IC_{50} : 8,339 ug/L iken yaprakta AgNP IC_{50} : 0,05805 ug/mL'dir. Yaprak iyileşmesinde ise 10 mM çekirdek (%19) ve 5 mM yaprak AgNP'sinin (%50) hücre göçü üzerinde inhibe edici etkisi olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: AgNP, *Eriobotrya japonica* Lindl., Kolorektal kanser, Antikanser aktivite.

Eylül, 2024; 93 sayfa

M.Sc. THESIS

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION OF SILVER NANOPARTICLE (AgNPs) FROM *Eriobotrya japonica* Lindl. SEEDS AND LEAVES AND DETERMINATION OF ITS ANTI-CANCER EFFECT ON COLORECTAL CANCER CELL (HT-29)

Beyzanur ENGEZ

Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Biotechnology

Supervisor: Assistant Prof. Fulya DOĞANER

ABSTRACT

It is known that various extracts of *Eriobotrya japonica* Lindl. (*E. japonica* L.) (Loquat, Maltese plum) plant have many pharmacological effects. It has been determined that especially the rich contents in the fruit are effective on colorectal cancer. It is known that silver nanoparticles (AgNPs) obtained from plant extracts, also known as green synthesis, increase the biological activities of plants. Our study is the first study investigating the effects of extracts obtained from inconsumable organs such as leaves and seeds of *E. japonica* L. plant on colorectal cancer cell line (HT-29). Plant extracts were obtained from the leaves and seeds of *E. japonica* L. plant with different solvents (75% methanol, 75% ethanol and distilled water) and their total phenolic and total flavonoid contents were analyzed. AgNPs were synthesized at different concentrations (1 mM, 5 mM and 10 mM) from the extract with the most suitable content. AgNP synthesis was characterized by color change, UV-VIS, FTIR, SEM, XRD and Zeta potential methods. These extracts and AgNPs at different concentrations were applied to HT-29 cells for 24, 48 and 72 hours. Their cytotoxic effects on these cells were determined by MTT method and their migration effects by wound healing method. The highest phenolic and flavonoid contents in seed and leaf extracts were obtained with 75% ethanol. While the total phenolic contents in seed and leaf were 367.24 ± 0.038 and 1487.05 ± 0.017 mgGAE/100g, respectively, the total flavonoid amounts were 18.96 and 30.93 ± 0.001 mg/mL (QE), respectively. While peaks were obtained in the range of 430-450 nm in the UV-VIS spectroscopy graph of these AgNPs, it was determined that they were spherical and cubic in SEM images, and FTIR, XRD and zeta potential results were in accordance with the literature. The best cytotoxic effects of AgNPs in the HT-29 cell line were determined as IC₅₀: 8.339 ug/L in the seed, while IC₅₀: 0.05805 ug/mL in the leaf. According to the migration results, it was observed that 10 mM seed (19%) and 5 mM leaf AgNP (50%) had an inhibitory effect on wound healing.

Keywords: AgNP, *Eriobotrya japonica* Lindl., Colorectal cancer, Anticancer effect.

September, 2024; 93 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bitki aracılı AgNP'lerin biyolojik aktiviteleri.....	9
Şekil 2.2. <i>E. japonica</i> L. bitkisinin meyve ve yaprakları.....	12
Şekil 2.3. Kolorektal kanser gelişim yolları.....	15
Şekil 3.1. <i>E. japonica</i> L. yaprak ve çekirdeğin kurutulması ve öğütülmesi.	16
Şekil 3.2. Fenolik madde miktar tayini yöntemi.....	18
Şekil 3.3. Flavonoid madde miktar tayin yöntemi.....	21
Şekil 3.4. AgNP sentezi.	22
Şekil 3.5. HT -29 hücre hattı mikroskop görüntüsü (10X).....	25
Şekil 3.6. MTT yöntemi.....	29
Şekil 4.1. Gallik asit standart eğrileri.....	31
Şekil 4.2. <i>E. japonica</i> L. yaprağından elde edilen toplam fenolik madde miktarı.....	32
Şekil 4.3. <i>E. japonica</i> L. çekirdeğinden elde edilen toplam fenolik madde miktarı..	33
Şekil 4.4. Quersetin kalibrasyon eğrisi.	35
Şekil 4.5. <i>E. japonica</i> L. yaprak ekstresinden elde edilen toplam flavonoid madde miktarı.	36
Şekil 4.6. <i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstresinden elde edilen toplam flavonoid madde miktarı	37
Şekil 4.7. <i>E. japonica</i> L. yaprak ekstresi ile AgNP sentezi.	38
Şekil 4.8. <i>E. japonica</i> L. yaprak ekstresi 1 mM, 5 mM ve 10 mM AgNO ₃ ile elde edilen AgNP'lerin UV-VIS spektroskopisi.	39
Şekil 4.9. <i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstresi 1 mM, 5 mM ve 10 mM AgNO ₃ ile elde edilen AgNP lerin UV-VIS spektroskopisi.....	40
Şekil 4.10. <i>E. japonica</i> L. yaprağa ait SEM görüntüleri.....	42
Şekil 4.11. <i>E. japonica</i> L. çekirdeğe ait SEM görüntüleri.	44
Şekil 4.12. <i>E. japonica</i> L. yaprak ekstresi ve yaprak ekstresi ile elde edilen AgNP'lerin FTIR sonuçları.....	46
Şekil 4.13. <i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstresi ve çekirdek ekstresi ile elde edilen AgNP'lerin FTIR sonuçları.....	48
Şekil 4.14. <i>E. japonica</i> L. yaprak ekstresinden elde edilen AgNP'lerin zeta analiz spektrumları.	51
Şekil 4.15. <i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstresinden elde edilen AgNP'lerin zeta analiz spektrumları.	52
Şekil 4.16. <i>E. japonica</i> L. yaprak 1 mM AgNP XRD grafiği.....	53
Şekil 4.17. <i>E. japonica</i> L. yaprak 5 mM AgNP XRD grafiği.....	54
Şekil 4.18. <i>E. japonica</i> L. yaprak 10 mM AgNP XRD grafiği.....	54
Şekil 4.19. <i>E. japonica</i> L. çekirdek 1 mM AgNP XRD grafiği.....	56
Şekil 4.20. <i>E. japonica</i> L. çekirdek 5 mM AgNP XRD grafiği.....	56
Şekil 4.21. <i>E. japonica</i> L. çekirdek 10 mM AgNP XRD grafiği.....	57
Şekil 4.22. <i>E. japonica</i> L. yaprak ekstresi ile elde edilen 1 mM AgNP'lerin MTT sonuçları.....	59
Şekil 4.23. <i>E. japonica</i> L. yaprak ekstresi ile elde edilen 5 mM AgNP'lerin MTT sonuçları.....	60
Şekil 4.24. <i>E. japonica</i> L. yaprak ekstresi ile elde edilen 10 mM AgNP'lerin MTT sonuçları.....	60
Şekil 4.25. <i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstresi ile elde edilen 1 mM AgNP'lerin MTT sonuçları.....	62
Şekil 4.26. <i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstresi ile elde edilen 5 mM AgNP'lerin MTT sonuçları.....	63

Şekil 4.27. <i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstresi ile elde edilen 10 mM AgNP'lerin MTT sonuçları.....	63
Şekil 4.28. <i>E. japonica</i> L. yaprak ekstresinin ve AgNP'lerinin HT -29 kanser hücreleri üzerindeki migrasyon (yara iyileşme testi) sonucu.....	67
Şekil 4.29. <i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstresinin ve AgNP'lerinin HT-29 kanser hücreleri üzerindeki migrasyon (yara iyileşme testi) sonucu.....	69
Şekil 4.30. HT -29 hücrelerine uygulama yapıldıktan 24 saat sonraki mikroskop görüntüleri (10X).....	70



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. <i>E. Japonica</i> L. yaprağı ve çekirdeğinden elde edilen ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları.....	34
Çizelge 4.2. <i>E. japonica</i> L. yaprağı ve çekirdeğinden elde edilen ekstrelerin toplam flavonoid madde miktarları.....	37
Çizelge 4.3. Nanopartiküllerin zeta potansiyel değeri ile kararlılığı arasındaki ilişki.....	50
Çizelge 4.4. <i>E. japonica</i> L. yaprak ekstresi ile elde edilen AgNP'lerin zeta potansiyeli sonuçları.	50
Çizelge 4.5. <i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstresi ile elde edilen AgNP'lerin zeta potansiyeli sonuçları.	51
Çizelge 4.6. <i>E. japonica</i> L. etanol yaprak ve çekirdek ekstreleri ve AgNP konsantrasyonlarına ait IC ₅₀ değerleri.....	64
Çizelge 4.7. <i>E. japonica</i> L. etanol yaprak ekstresi ve yaprak 1 mM, 5 mM ve 10 mM AgNP'lerin migrasyon (yara iyileşme) yüzde sonuçları.....	65
Çizelge 4.8. <i>E. japonica</i> L. etanol çekirdek ekstresi ve bu ekstreten elde edilen 1mM, 5 mM ve 10 mM AgNP'lerin migrasyon sonuçları.....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ag⁺	Gümüş İyonları
Ag⁰	Gümüş Nanoparçacıkları
AgNP	Gümüş Nanopartikül
AgNPs	Gümüş Nanopartiküller
AlCl₃	Alüminyum Klorür
ASÜBTAM	Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi
BHA	Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BİTAM	Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi
CO₂	Karbondioksit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DPPH	2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
g	Gram
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HT-29	Kolorektal Kansere Hücre Hattı
IC₅₀	%50 inhibisyon
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
Na₂CO₃	Sodyum Karbonat
NaNO₂	Sodyum Nitrit
NaOH	Sodyum Hidroksit
nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
QE	Quercetin
ROS	Serbest Oksijen Radikali
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu Analizi
UV-VIS	Ultraviyole ve Görünür Işık Spektroskopisi
XRD	X-Işını Kırınım
%	Yüzde
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
°C	Derece Santigrat

1. GİRİŞ

Kanser bulaşıcı olmayan, bireyin yaşam standartlarını bozabilen, genetik, fizyolojik, çevresel ve davranışsal gibi pek çok faktöre bağlı gelişen bir hastalıktır. Pek çok ülkede temel sağlık problemleri arasında yer alan kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile karakterize, tedavi edilmediğinde ölümcül etki gösteren bir hastalıktır (Siegel vd., 2017). Tek bir mutasyondan değil, çoklu mutasyonlardan kaynaklanan benzersiz bir hastalık türüdür. Her mutasyon, tümörün boyutunda kademeli bir artış, düzensizlik ve malignite ile ilişkili hücrelerin çoğalmasına yol açar (Mao, 1998). Global Cancer Statistics (GLOBOCAN) 2020 verilerinde dünya çapında 19,3 milyon yeni kanser vakası gözlenirken, 10 milyona yakın kişinin de kanserden öldüğü bildirilmiştir (Sung vd., 2021). 2020 yılında dünya çapında kolorektal kanser, 1,9 milyon yeni vakayla en çok teşhis edilen üçüncü kanser olurken, kanserden ölümler arasında akciğer kanserinden sonra 930.000 ölümle ikinci sırada yer almıştır (Morgan vd., 2023)

Bildirilen kanser tedavi yöntemleri arasında cerrahi tedavi, radyasyon tedavisi, kemoterapi, hedefe yönelik tedavi, hormonal tedavi ve immünoterapi de dahil sistemik tedaviler sayılabilir (Miller vd., 2019). Kolon kanserinin tedavisinde ise, cerrahi operasyon, kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel yöntemler kullanılmaktadır. Kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavi yöntemlerinin kanserli hücrelere seçici olmadığı sağlıklı hücreler üzerine de sitotoksitesi olduğu bilinmektedir. Kullanılan tedavi yaklaşımlarının kolon kanseri tedavisi üzerine başarı oranlarının artırılması için yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi esastır (Scolaro vd., 2006; Takahara vd., 1995).

Nanoteknoloji alanı, nano ölçekli yeni malzemeler üreterek bilim ve teknolojiye pek çok yeni gelişmeye katkı sağlamaktadır. Günümüzde özellikle biyomedikal alanda, nanoteknolojik yöntemlerle kanserli dokuyu hedef alan kemoterapi uygulama çalışmaları yapılmaktadır. Bu sayede halihazırda kullanılan kemoterapi ilaçlarının yan etkileri büyük ölçüde ortadan kalkarken, kanserli dokulara etkili dozların ulaştırılması sonucu iyileşme süresi de kısaltılabilmektedir (Albrecht vd., 2006). Birçok materyal, farklı yöntemler kullanılarak nano ölçekte üretilir ve nanopartikül (NP) adını alırlar. NP'ler daha küçük partikül boyutu, çeşitli şekilleri ve artan yüzey alanı nedeniyle ana malzemelerden daha farklı özellikler gösterirler (Iravani, 2011). Fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerle NP'lerin sentezlenmesi mümkündür (Rajan vd., 2015). NP'lerin

biyolojik sentezinde bitki özleri, bakteriler, mantarlar, aktinomisetler ve algler gibi birçok organizma kullanılmaktadır (Mittal vd., 2013; Narayanan ve Sakthivel, 2010, 2011).

Bitki özleriyle yapılan ve yeşil sentez olarak da adlandırılan NP sentezindeki en büyük avantaj bitkilerin çeşitliliği ve kolay bulunabilirliğidir (Narayan ve Sakthiyel, 2011). Ayrıca daha az toksik ve çevreye zarar vermeyen maddeler olan bitkilerin yeşil sentezi; hızlı, kolay, ucuz, daha az enerji gerektiren ve orta düzeyde çalışma koşulları ile çalışılabilen örnekler olması gibi pek çok avantaja sahiptir (Raveendran vd., 2003). NP'lerin sentezinde birçok metal kullanılabilir. Bunlardan biri olan gümüş, dünyada en ticarileştirilmiş nano materyaldir (Alsharif vd., 2024; Wang vd., 2024). Gümüş NP'lerinin (AgNP) bitki aracılı yeşil sentezi, nanoteknolojinin yeni ve önemli bir dalı haline gelmiştir (Choudhury vd., 2016). Çevre dostu ve uygun maliyetli olması, kimyasal tehlikelerle ilişkilendirildiğinde daha az toksik olması nedeniyle önem kazanmıştır (Raveendran vd., 2003). Bitki ekstreleriyle gümüş NP sentezinde hem bitkinin hem de gümüşün etkileri birleştiği için, bitki aracılı yapılan NP'lerin kimyasal yöntemlerle sentezlenen NP'lere göre daha yüksek biyolojik fonksiyonlara sahip olduğunu gösterir (Choudhury vd., 2016).

Bitkilerde bulunan biyoaktif doğal bileşikler, daha ucuz, daha güvenli ve daha etkili anti-inflamatuar ve antikanser ilaçları geliştirmek için kullanılmaktadır (Wangchuk, 2018). Bu tür doğal kimyasal bileşikler, uçucu yağlar, fenolik ve flavonoid bileşenler, antioksidanlar, antitümör ve antikanser ajanlarıdır (Roleira vd., 2015). Bu bileşikler, DNA hasarı ve serbest oksijen radikali (ROS) oluşumunu engelleyebilen, kaspaz ve p53 genleri ile apoptoza yönlendiren çeşitli farmakolojik özellikler içerir (Roleira vd., 2015). Epidemiyolojik çalışmalar ile bitkilerdeki fenolik bileşiklerin, anti-inflamatuar, antiaterosklerotik, antitümör, antimitojenik, antikanserojenik, antibakteriyel veya antiviral aktivitelere az veya çok ölçüde sahip olduğunu göstermiştir (Halliwell, 1994; Mitscher vd., 1996; Owen vd., 2000; Sala vd., 2002). *Eriobotrya japonica* Lindl (Malta Eriği, Yenidünya), Rosaceae familyasına ait bir meyve ağacıdır. Meyve ekstrelerinde yer alan birçok antioksidan bileşen, iltihaplanma, diyabet, kanser, bakteriyel ve paraziter enfeksiyonlar, ağrı ve alerjiler dahil olmak üzere sağlık sorununa karşı koyabilecek biyoaktivite sergilemektedir. Meyve ve kabuk ekstraktlarının yapısında fenolik ve terpenoid varlığı tespit edilmiştir (Zhang, vd.,

2015), fakat bunun yanında zayıf çözünürlük ve biyoyararlanım nedeniyle kullanımları ciddi şekilde kısıtlanmaktadır (Wen vd., 2015). Biyoyararlanımı artırmak ve optimum yanıt için gerekli olan yüksek dozlarla ilgili toksisiteyi azaltmak için NP sentez tekniğinin kullanılabileceği gözlenmiştir (Wen vd., 2015).

Jabir vd. (2021) *Eriobotrya japonica* Lindl (*E. japonica* L.) yapraklarından yeşil sentez yöntemiyle AgNP sentezledikleri bir çalışmada, bu NP'nin potansiyel antikanser aktivitesini araştırmışlardır. Bunun için meme kanseri hücre hattı (MCF-7) ve rahim ağzı kanseri hücre hattı (HeLa) üzerine sentezlenen NP'lerin kanser hücre hatlarının poliferasyonunu inhibe ettiğini ve apoptozu indüklediğini belirlemişlerdir. Ayrıca farklı kanser türevlerinin tedavisinde ve bağışıklık sistemi fonksiyonlarını desteklemede etkilerinin olabileceğini ve *E. japonica*'nın tıbbi bir ilaç olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Abdel Raouf vd. (2021), *E. japonica* L. meyvelerinin %70 metanol ekstraktıyla yaptıkları bir çalışmada PC-3 (Prostat kanseri hücre hattı), HepG2 (Karaciğer kanseri hücre hattı) ve SKOV -3(Yumurtalık kanseri hücre hattı) üzerinde *E. japonica* L. meyve ekstresinin önemli sitotoksik aktivitelerinin olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca ekstrenin antikanser ajanı (Doksorubisin) ile karşılaştırıldığında doza bağımlı bir şekilde test edilen kanser hücre hatlarında canlılık oranında daha fazla azalmayı teşvik ettiğini saptamışlardır.

Kim vd. (2011), *E. japonica* L. yaprağının hem etanol hem de su ekstratlarının sıçanlarda, 7,12-dimetilbenz [α]antrasen (DMBA) ile indüklenen meme kanserini inhibe ettiğini ve su ekstresinin daha yüksek inhibitör aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Her iki ekstrenin de tümör hücrelerinin oluşmasında ve çoğalmasında engelleyici etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Kim vd. (2009) yaptıkları bir başka çalışmada *E. japonica* L. yaprak ve çekirdek ekstratlarının MDA-MB-231 (insan meme adenorsinom hücre hattı) hücrelerinde MMP-2 ve MMP-9 enzim aktivitelerine, çoğalmaya, invazyona ve migrasyona olan etkilerini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda her iki ekstrenin de test edilen MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını engellediğini, doza bağlı olarak invazyonu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ekstrelerin yara iyileşme testi (wound healing assay) ile migrasyona olan etkileri araştırıldığında ise, ekstre uygulanmayan hücrelerde yara kapanırken, ekstre uygulanan hücrelerde migrasyonun olmadığını belirlemişlerdir. MDA-MB-231 hücrelerinde

özellikle *E. japonica* L. yaprak ekstresinin MMP-9 aktivitesi üzerinde doza bağılı olarak, MMP-2 aktivitesi üzerinde ise sadece 50 µg/mL konsantrasyonda inhibe edici bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Bu tez çalışmasının amacı, *Eriobotrya japonica* Lindl bitkisinin çekirdek ve yaprak ekstraktlarındaki fenolik ve flavonoid bileşikler içeriklerini belirlemek, çevre dostu bir yöntemle AgNP'lerinin (AgNPs) sentezlenmesidir. Sentezlenen NP'lerin yapısal ve morfolojik karakterizasyonu XRD, SEM, TEM, UV-Vis ve zeta potansiyeli gibi ileri karakterizasyon teknikleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Ayrıca bu NP'lerin insan kolorektal kanser hücre hattı (HT-29) üzerindeki antikanser etkisi, MTT testi ve yara iyileşme testi (Wound Healing Assay) yapılarak incelenmiştir. Çalışma *E. japonica* L.'nin fenolik ve flavonoid bileşenlerinin biyolojik etkinliğini ortaya koyarak, bu bitkiden elde edilen gümüş NP'lerin kanser tedavisinde potansiyel kullanımını araştırmayı hedeflemektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Nanoteknoloji

Günümüzdeki bilimsel araştırmalar, teknoloji gerektiren çeşitli sorunlara ve zorluklara karşı yenilikçi stratejiler ile çözüm oluşturma odaklıdır. Bu çalışmaların sağlık, enerji, iklim gibi dünyadaki yaşamın çeşitli sorunlarına doğrudan veya dolaylı olumlu etkileri bulunmaktadır (Pokrajac vd., 2021). Sürdürülebilir bir çevre için nanoteknolojideki uygulamalar dikkate değer bir hızla artmaktadır. Nanoteknoloji ve nano- mühendislik malzemeleri gezegenimizdeki yaşamın sürdürebilir olabilmesi için umut vaat edecek şekilde ilerleme kaydetmektedir (Misra vd., 2023).

Pek çok farklı özelliğe sahip olan ve moleküllerin yüzey alanını artıran NP'ler her geçen gün daha fazla uygulama alanı bulunmakta ve çalışma alanlarında daha fazla ilgi görmektedir (Wennersten vd., 2008). Nanoteknolojinin ilerlemesi ile önemli bir yapı taşı haline gelen NP'ler, 1 ila 100 nm arasında boyutlara sahip partiküllerdir (Nagarajan vd., 2021). NP'ler kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının benzersiz karakterleri ve yüksek yüzey/hacim oranı sayesinde benzersiz fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler sergilemektedirler (Liveri, 2006). Bu sayede başta sağlık, kimya, giyim, boya ve biyoteknoloji gibi pek çok önemli endüstriyel alanda kullanım imkânı bulmaktadır (Mody vd., 2010). Morfoloji, boyut ve şekillerine göre sınıflandırıldıklarında özellikle metalik NP'ler, karbon bazlı NP'ler, seramik NP'ler, yarı iletken NP'ler, lipid bazlı NP'ler, polimerik NP'ler ve nanokompozitler pek çok bilimsel çalışmada ve endüstride en çok kullanılan NP çeşitleri olmuştur (Bhatai, 2016).

Ferritin, misel, dendrimer ve lipozomları içeren organik NP'ler polimerik NP'ler olarak da adlandırılır. Karbon bazlı NP'lerin haricinde, karbon içermeyen, metal ve metal oksit olarak iki alt grubu bulunan inorganik NP'ler de bulunmaktadır (Ijaz vd., 2020). Metal NP'leri sınıfında bulunan altın (Au), gümüş (Ag), bakır (Cu) ve platin (Pt) NP'leri sıklıkla araştırmalarda kullanılmaktadır (Arroyo vd., 2020).

Son zamanlarda metal NP'ler, başta biyomedikal araştırmaların yanı sıra çevresel, tarımsal ve fizikokimyasal araştırmalarda da kullanılmaktadırlar. Sağlık alanında, kimyasal sensörler, antimikrobiyal aktivite, tıbbi görüntüleme, kanser tanı ve tedavisi,

kozmetik uygulamalar, spesifik ilaç salınımı ve yara iyileşmesi gibi çeşitli uygulamalar için kullanılmaktadırlar (Singh vd. 2016).

2.1.1 Gümüş nanopartiküller (AgNPs)

Antik Yunan ve Roma İmparatorluğundan beri gümüş, yanıkların ve kronik yaraların tedavisinde antimikrobiyal ve antibakteriyel madde olarak kullanılmaktadır (Alexander, 2009).

Zamanla gümüş nitrat halinde zührevi hastalıkların, göz hastalıklarının, apselerin ve taze yanıkların tedavisinde de kullanıldı (Castellano vd., 2002). Özellikle son yıllarda insanların hijyen ve tıbbi konularda doğal içeriklere yönelmesi yanında çoklu ilaca dirençli patojenik bakterilerin ortaya çıkması ve antibiyotik kullanımının sınırlandırılması nedeniyle klinisyenler değişen seviyelerde gümüş içeren yara pansumanlarına geri döndüler (Chopra, 2007; Gemmell vd., 2006). Gümüş ROS'lara maruz kaldığında kendiliğinden oksitlenebildiği için nanobilim ve nanoteknoloji uygulamalarında, nanomalzemelerin üretim aşamasında önemli bir ilerlemeye yol açmıştır (Salleh vd., 2020). Gümüşün farklı kimyasal reaksiyonlarının anlaşılması AgNP'lerin sentezi çalışmalarını hızlandırmıştır.

AgNP'lerin boyutları, yapıları, fiziksel ve biyolojik özellikleri sentez yöntemlerine bağlı olarak değişmektedir (Nair ve Laurencin, 2007). Kimyasal, fiziksel ve biyolojik sentez yöntemleri olmak üzere temelde 3 farklı şekilde AgNP sentezi gerçekleştirilir.

Kimyasal yöntemler genellikle toksik maddeler kullanılarak yapılan sentez yöntemidir. En yaygın ve geniş çapta rapor edilen sentez yöntemi, trisodyum sitrat ve askorbat gibi indirgeyici ajanlar kullanılarak Ag^+ iyonlarının Ag^0 'ye indirgenmesidir (Dong vd., 2009; Fabrega vd., 2011; Kim vd., 2007; Marin vd., 2015; Panáček vd., 2006; Turkevich vd., 1951; Wan vd., 2010). Turkevich'e göre sitrat, yalnızca Ag^+ türlerini azaltmakla kalmaz, NP'lerin yüzeyinde oluşan elektrik katmanının topaklaşmalarını önleyerek ikiye katlayabilen bir stabilize edici madde (elektrostatik stabilizasyon) olarak da hareket eder (Henglein ve Giersig, 1999).

Fiziksel yöntemler ise genellikle hızlıdır ve toksik kimyasallar içermezler. Fiziksel yöntemlerin dezavantajı, sentez sırasında yüksek enerjiye duyulan ihtiyaçtır. Bilyalı öğütme (Jayaramudu vd., 2016; Kumar vd., 2016), ark boşaltma (Zhang vd., 2017),

fiziksel olarak buhar yoğunlaştırma (Al-Warthan vd., 2010) ve lazer ablasyonu fiziksel yöntemler arasında yer alır (Mafuné vd., 2000).

Biyolojik yöntemlerde ise gümüş tuzlarının AgNP'lere indirgenmesi söz konusudur. Yeşil sentez olarak da bilinen biyolojik yöntemlerde sıklıkla bitkilerin çeşitli bölgelerine ait ekstraktlar, funguslar ve bakteriler kullanılmaktadır (Gudikandula ve Mariganti, 2016). Kimyasal ve fiziksel yöntemlerle NP sentezinde, toksik etki gösteren kimyasalların kullanılması, tehlikeli yan ürünlerin oluşması, partikül kararlılıklarının iyi olmaması ve pahalı bir işlem olması nedeniyle bazı dezavantajlar içermektedir (Patra vd., 2015). Tehlikeli veya toksik ürün kullanılmayan biyolojik yöntemler ise, çevreci, ekonomik, verimi yüksek ve tek adımlı bir işlem olduğu için daha çok tercih edilmektedir (Nabikhan vd., 2010; Yousaf, vd., 2020). Bitkilerin sahip olduğu fenolik, terpenoid, polisakkarit ve flavonoid içeriklerinden dolayı bitki ekstraktlarından elde edilen AgNP'ler, fungus ve bakteriler ile karşılaştırıldığında daha fazla NP üretim oranına sahip olduğu gözlenmiştir (Gudikandula ve Mariganti, 2016; Hano ve Abbaasi, 2021; Prasad, 2014).

2.1.2 Bitki aracılı (yeşil sentez) gümüş nanopartiküller

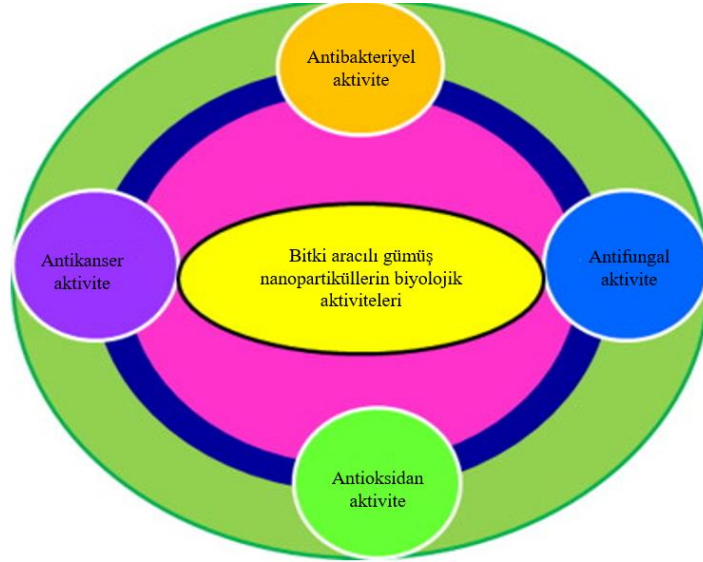
Son yıllarda NP üretiminde istenilen boyutta ve değişik görünüme (morfoloji) sahip NP'lerin üretiminde doğal ajanların belirlenmesi ve bu ajanları geliştirmeye yönelik yöntemlerin araştırılması için pek çok çalışma yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucu yeşil sentezde dengeleme ve kaplama amacı ile kullanılan bitkilerin ve mikroorganizmaların kullanımı sıklıkla artmaktadır (Kharissova vd., 2019).

Bitkiler ile sentezlenen NP'lerin en önemli avantajı kolay elde edilebilir olmalarıdır. AgNP'ler bitkinin tamamı veya bir parçasından elde edilen ekstreler ya da toz halleri kullanılarak üretilirler. Birçok çalışmada bitkilerin fenolik ve flavonoid içeriğinden dolayı, bitki ekstraktlarının biyolojik indirgeme potansiyelinin mikrobiyal kültür filtratlarından nispeten daha yüksek olduğu hipotezini desteklemiştir (Iravani, 2011; Kannan vd., 2011; Narayanan ve Sakthivel, 2010). Bitki aracılı NP üretiminden kaynaklanan atık ürünler, doğal bitki ekstrelerinden elde edildiği için çevreye uyumludur ve toksik değildir. Buna karşın mikrobiyal sentez yöntemlerinin atık ürünleri, sentezde kullanılan mikroorganizma türüne bağlı olarak çevre için tehlikeli olma olasılığını oldukça artırmaktadır.

Güvenli bir biyoloji sentez prosedürü olan bitkiler ile sentez yöntemi daha az hatta neredeyse sıfır kontaminasyona sahip olduğu için çevre dostu bir prosedür olarak değerlendirilir (Dahl vd., 2007). Bitki ekstraktlarında bulunan fitokimyasalların, biyolojik senteze (fitosenteze) aracılık etmesinin veya metal iyonlarını azaltmasının yanı sıra sentezlenen NP'leri de stabilize ettiği bilinmektedir (Iravani, 2011; Kumar ve Yadav, 2009). Ayrıca tekrarlanabilir ve üretilen partiküllerin oldukça stabil olduğu da görülmektedir (Iravani, 2011; Kalaierasi vd., 2010).

Nanoteknolojide bitki özleri ile elde edilen gümüş ve altın NP'leri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu sentezin kesin mekanizması hâlâ tam olarak bilinmemesine rağmen mekanik yönleri hakkında bazı bilgiler bulunmaktadır. Kimyasal olarak farklı içeriklere sahip bitkiler yapılarındaki vitaminler, enzim/proteinler, sitrat gibi organik asitler, amino asitler ve polisakkaritler gibi bir dizi bitki bileşikleri sayesinde indirgeme ve kaplamada farklı etkiler göstermektedir (Ahmad vd., 2009). Bitki ekstraktlarındaki ikincil metabolitlerden terpenoidler, flavonoidler, fenoller, alkaloidler, proteinler ve karbonhidratların varlığı da bu işlemlerde büyük önem taşımaktadır. Bu bitki metabolitleri hidroksil, karbonil ve amin fonksiyonel gruplarına sahiptir. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopi sonuçlarına göre, bu çeşitlilikteki metabolitlerin fonksiyonel gruplarının metal iyonlarıyla reaksiyona girmesiyle boyutlarını nano aralığa düşürdüğü bilinmektedir. Ayrıca sentezlenen NP'lerin etrafını kapatarak hem stabilize hem de biyoyumluluk sağlamaktadır. Son çalışmalar bitki ekstraktlarında bulunan fitokimyasalların (Arulkumar ve Sabesan, 2010; Bankar vd., 2010; Das vd., 2013; Gopinath vd., 2012; Loo vd., 2012; Marimuthu vd., 2012; Pasupuleti vd., 2013; Prabakar vd., 2013; Prakash vd., 2013; Santhoshkumar vd., 2011), flavonoidlerin (Elavazhagan ve Arunachalam, 2011; Philip, 2011; Raghunandan vd., 2011a; Subba Rao vd., 2013), polifenollerin (Antony vd., 2011; Jeyaraj vd., 2013a; Kumar vd., 2010; Mohan Kumar vd., 2012; Njagi vd., 2011; Raghunandan vd., 2011b; Rodríguez-León vd., 2013; Roni vd., 2013; Sahu vd., 2013; Suganya vd., 2013), alkaloidlerin (Vijayaraghavan vd., 2012), saponinlerin (Geethalakshmi vd., 2012), fenollerin (Lukman vd., 2011; Sathishkumar vd., 2012), uçucu yağların (Vijayaraghavan vd., 2012) ve poliollerin (Ghosh vd., 2012; Veerasamy vd., 2011) gümüş iyonlarının biyolojik olarak indirgenmesinde ve sentezlenen NP'lerin kaplanması önemli roller oynadığı bildirilmiştir.

NP'lerin spesifik yüzey alanı arttıkça biyolojik etkinlikleri de artabileceğinden tıbbi açıdan kullanım alanları da artmaktadır. Sentezlenen NP'lerin biyolojik özelliklerini artırmak için boyut, şekil ve stabilite gibi fiziksel özellikler önemlidir. Bugüne kadar yapılan araştırmalar bitki ekstraktı ile sentezlenen NP'lerin biyolojik yeterliliğinin, eko-güvenlik ve benzersiz sentez mekanizmaları nedeniyle oldukça arttığını göstermektedir. Bitki ekstraktından sentezlenen AgNP'lerin özellikleri ve uygulamaları mikrobiyal muadillerinden oldukça farklıdır. Belirlenen indirgeme ve kaplama ajanları çoğunlukla bitkilerin fenolik içerikleridir. Bu sayede sentezlenen AgNP'ler antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser özellikler göstermektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, sentezlenen bitki aracılı AgNP'lerin çoklu ilaca dirençli insan patojenlerine, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Das vd., 2013; Gopinath vd., 2012; Prakash vd., 2013; Sathishkumar vd., 2009; Saxena vd., 2010). Üstelik bu NP'lerin mantar ve maya patojenlerine karşı da etkili olduğu gösterilmiştir (Singh vd., 2013). Ayrıca antioksidan ve antitümör aktivite göstermelerinden dolayı nanobiyoteknoloji alanında kanser tedavisinde kullanılabilirliği araştırılmaktadır (Jacob vd., 2012; Jeyaraj vd., 2013). Bitki aracılı NP'lerin bu özellikleri Şekil 2.1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Bitki aracılı AgNP'lerin biyolojik aktiviteleri (Rajan vd., 2015).

Kısaca bitki aracılı sentezlenen AgNP'ler üretimi kolay, düşük maliyetli, çevre dostu ve insan terapötik kullanımına uygun olması bakımından büyük ölçekli üretime de uygundur (Gan ve Li, 2012; Iravani, 2011; Kumar ve Yadav, 2009; Mittal vd., 2013).

2.1.3 Bitki ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin antimikrobiyal özelliği

Literatürde bitki ekstraktından sentezlenen gümüş NP'lerle ilgili biyolojik çalışmaların çoğu, antibakteriyel aktiviteyi değerlendirmeyi amaçlamaktadır. AgNP'ler hem Gram-pozitif hem Gram-negatif bakterilere karşı hem de mayalara karşı antibakteriyel aktivite göstermektedir (Ahmad vd., 2011; Bindhu ve Umadevi, 2013; Ghosh vd., 2012; Kora vd., 2012; Nabikhan vd., 2010; Sankar vd., 2013; Sathishkumar vd., 2009; Saxena vd., 2010; Veerasamy vd., 2011). Çoklu ilaca dirençli patojenlere (Das vd., 2013; Gopinath vd., 2012; Prakash vd., 2013), Gram negatif nozokomiyal patojenlere (Prabakar vd., 2013), *Candida albicans* dahil mantar patojenlerine (Singh vd., 2013), spor oluşturan bakterilere (Patil vd., 2012b) ve su kaynaklı patojenlere (Krishnaraj vd., 2010) karşı etkili bir inhibitör aktivite göstermiştir. Aynı zamanda literatürde suda yaşayan patojenlere karşı da AgNP'lerin antibakteriyel etkisi olduğu bildirilmiştir (Umashankari vd., 2012).

2.1.4 Bitki ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin antioksidan özelliği

Bitki aracılı sentezlenen NP'lerin antioksidan özelliklerini araştıran bir çalışmada, *Trachyspermum copticum* tohumu kullanılarak hazırlanan AgNP'lerin, maksimum 10 µg/mL konsantrasyonda 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikalini bütillenmiş hidroksi anisolden (BHA) beş kat daha etkili bir şekilde temizlediğini belirlemiştir (Subramanian ve Suja, 2012). Bu sonuçlara benzer şekilde pek çok çalışmada bitki aracılı NP'lerin antioksidan etkilerinin kontrollere göre daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Dipankar ve Murugan, 2012; Mittal vd., 2012; Raghunandan vd., 2011).

2.1.5 Bitki ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin antikanser özelliği

Son yıllarda terapötik amaçlı etkileri araştırılan bitki aracılı AgNP'lerin daha çok tümör hücreleri üzerine etkileri araştırılmaktadır. Normal hücrelere göre hafif asidik olan tümör hücrelerinin olduğu ortamda AgNP'ler çözünürler. Tümör hücrelerinde Ag^+ iyonlarının salınımı normal hücrelere göre daha yüksektir. Ag^+ iyonlarının bu daha yüksek salınımı, normal hücrelerde gözlenmeyen ROS oluşmasına ve dolayısıyla tümör hücrelerinin ölümüne neden olur (Foldbjerg vd., 2009; Mukherjee vd., 2014). Jeyaraj vd. (2013) yaptığı bir çalışmada *P. hexandrum*'dan türetilen AgNP'lerin hücre çoğalmasını azaltarak hücre içi ROS, DNA hasarını ve apoptozu artırdığını ve hücre

ölümünü başlattığını gözlemişlerdir HeLa (insan serviks kanseri) hücre dizisinde bu AgNP'nin hücre ölümünü mitokondri aracılı kaspaz yolağıyla Bcl-2 ekspresyonunun azalması, Bax ekspresyonunun artmasıyla indüklendiğini belirlemişlerdir. Daha da önemlisi AgNP'lerin, standart antikanser ilacı olan sisplatine göre önemli ölçüde gelişmiş antikanser aktivitesi gösterdiğini bildirmişlerdir.

2.2 *Eriobotrya japonica* Lindl. (Malta Eriği, Yenidünya)

E. japonica Lindl (*Malta eriği, Yenidünya*), Rosaceae familyasına ait, Çin ve güneydoğu menşeli, yaprak dökmeyen subtropikal bir meyve ağacıdır (Şekil 2.2). Çin'de 2000 yıldan fazladır yetiştirilmekte olan *E. japonica* L. günümüzde Japonya, Türkiye, Brezilya, Hindistan, İtalya, İspanya ve İsrail dahil olmak üzere dünyada 30'dan fazla ülkede ticari olarak yetiştirilmektedir. *E. japonica* L. binlerce yıldır halk ilacı olarak kullanılan ve tıbbi değeri yüksek bir ağaç olan *E. japonica* L. bitkisinin çeşitli ekstreleri öksürük, kronik bronşit, diyabet, enfeksiyon ve kanser tedavilerinde kullanılmıştır. Farmakoloji alanının en eski kitaplarından biri olan “De Materia Medica” da *E. japonica* L. ağacının kökeni, sınıflandırılması, yetiştirme yöntemleri ve tıbbi değeri tanımlanmış böylece yenedünyanın geliştirilmesi ve yetiştirilmesinin temeli atılmıştır. Yapılan farmakolojik çalışmalarla *E. japonica* L. yapraklarının anti-obezite (Oh vd., 2011), anti-tümör (Ito vd., 2002) ve anti-inflamatuar (Cha vd., 2011) olarak etkinliği doğrulanmıştır. Geleneksel Çin tıbbında kullanılan *E. japonica* L. ekstreleriyle yapılan deneylerde, içeriğindeki aktif bileşiklerle, bunların yapı-aktivite ilişkileri bilimsel kanıtlarla desteklenmiştir. Bu bitkinin farklı organ (meyve, çiçek, yaprak ve tohum) ekstrelerinin fito-besleyici bileşimi önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Yaprığı ve çiçeği fenolikler ve triterpenler açısından zengin, meyveleri şekerler, organik asitler, karotenoidler, flavonoidler, fenolik asitler ve vitaminler açısından zengindir. Ayrıca çekirdek iyi bir protein, nişasta, tanen ve mineral kaynağıdır (Fu vd., 2012; Zhang vd., 2015; Zhou vd., 2007). Yaprak, çiçek ve çekirdeğinden elde edilen *E. japonica* L. ekstreleri ile yapılan farklı deneylerde anti-inflamatuar (Cha vd, 2011; Takuma vd., 2008), antioksidan (Hong vd., 2008a; Hong vd., 2008b; Koba vd., 2007; Zhou vd., 2012), anti-diyabetik (Lü vd., 2009), antikanser (Ito vd., 2002) ve mide koruyucu (Yokota vd., 2008) gibi çeşitli tıbbi değeri olan önemli etkiler gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 2.2. *E. japonica* L. bitkisinin meyve ve yaprakları.

2.2.1 *E. japonica* L.'nın fitokimyasal içeriği ve antikanser aktivitesi

E. japonica L. ekstraktları farklı kanser hücre dizilerine karşı kemoprotektif (kemoterapi ve radyoterapinin beraber uygulanması) ajan olarak etki göstermiştir. Modern bilim çalışmaları, protein ve gen düzeyinde *E. japonica* L. ekstraktlarının, kanserin başlaması, çoğalması ve metastaz gibi aşamalarında hücre karsinogenezini baskılayabildiğini göstermiştir (Alshaker vd., 2011; Ito vd., 2000; Kim vd., 2011; Komiya vd., 1998). *E. japonica* L. özütü rahim ağzı kanseri (HeLa), akciğer kanseri (A549) ve ER-negatif meme kanseri (MDA-MB-231) hücre hatlarında güçlü sitotoksikite göstermiştir (Kang vd., 2006). Kim ve arkadaşları ise *E. japonica* L. ekstresinin insan meme kanseri hücrelerinin göçünü, istilasını ve yapışmasını engellediğini gözlemlemişlerdir (Kim vd., 2009).

E. japonica L. 'nın fitokimyasal araştırmaları yapıldığında içeriklerindeki triterpenleri tıbbi değerlerinin yüksek olduğu bulunmuştur. *E. japonica* L. 'nın başlıca triterpenleri; ursolik asit (UA) ve korosolik asit (CA) gibi maslinik asit (MA), ursane türleri ve oleanolik asit (OA) gibi türleri rapor edilmiştir (Ho vd., 2008; Taniguchi vd., 2002). Bu majör triterpenler kolorektal kanser (HCT15) (HT-29), mide kanseri (NCI-N87), rahim ağzı kanseri (HeLa) ve glioblastoma (U291, U373 ve T98G) hücre dizilerine

karşı anti-proliferatif özellikleri bulunmaktadır (Fujiwara vd., 2011; Juan vd., 2008; Reyes-Zurita vd., 2009; Wang vd., 2012).

2.3 Kanser

Klasik kanser modeli, normal bir hücrenin atipik veya displastik bir hücreye dönüşmesi ve bunun da invaziv veya malign bir hücreye ilerlemesi şeklindedir (Idikio, 2011). Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması ve bölünmesi olarak tanımlanabilir. Kanser hücreleri kan ve lenfatik dolaşım yoluyla vücudun diğer bölgelerine yayılabilir ve istila ederler (Hanahan ve Weinberg 2000). Hücresel düzeyde kanser klasik olarak tanımlanmış üç aşamadan geçerek gelişir: Başlangıç (inisiasyon), gelişme (promosyon) ve ilerleme (progresyon).

İlk aşama olan başlangıç aşaması, genetik, metabolik ve karsinojenik faktörlerin DNA molekülüne zarar vermesiyle ortaya çıkar (Doll ve Peto 1981). Radyasyon, kimyasallar ve virüsler de dahil olmak üzere karsinojenlerin hem deney hayvanlarında hem de insanlarda kansere neden olduğu bulunmuştur (Blackadar, 2016). Onkogenlerin aktivasyonunu ve tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonunu gerçekleştiren karsinojenler sayesinde kontrolsüz hücre döngüsü ve apoptoz inaktivasyonuna gerçekleşir (Sarkar vd., 2013). Karsinogenez olarak da bilinen bu süreçte DNA zarar görür ve pek çok mutasyon indüklenir.

Kanserin ikinci aşaması olan gelişme (promosyon) süreci, başlangıç süreci sırasında kusurlu hale gelen hücrelerin çoğalmasıyla (proliferasyon) başlayan uzun bir aşamadır.

İlerleme (progresyon) süreci ise, proliferasyon basamağı sırasında gelişen tümör hücrelerinin metastazı olarak tanımlanan üçüncü ve son aşamadır (Doll ve Peto 1981). Ancak basit bir genetik mutasyon kanser gelişimini tetiklemek için yeterli değildir; bu nedenle çift vuruş hipotezi ortaya atılmıştır.

Bu hipoteze göre, bir hücrenin DNA'sında biriken genetik mutasyonların sonucu kanser geliştiği bildirilmektedir. Önerilen bu hipotez ilk olarak Nordling ve daha sonra Knudson (Centelles, 2012; Nordling, 1953) tarafından rapor edilmiştir.

2.3.1 Kolorektal kanser

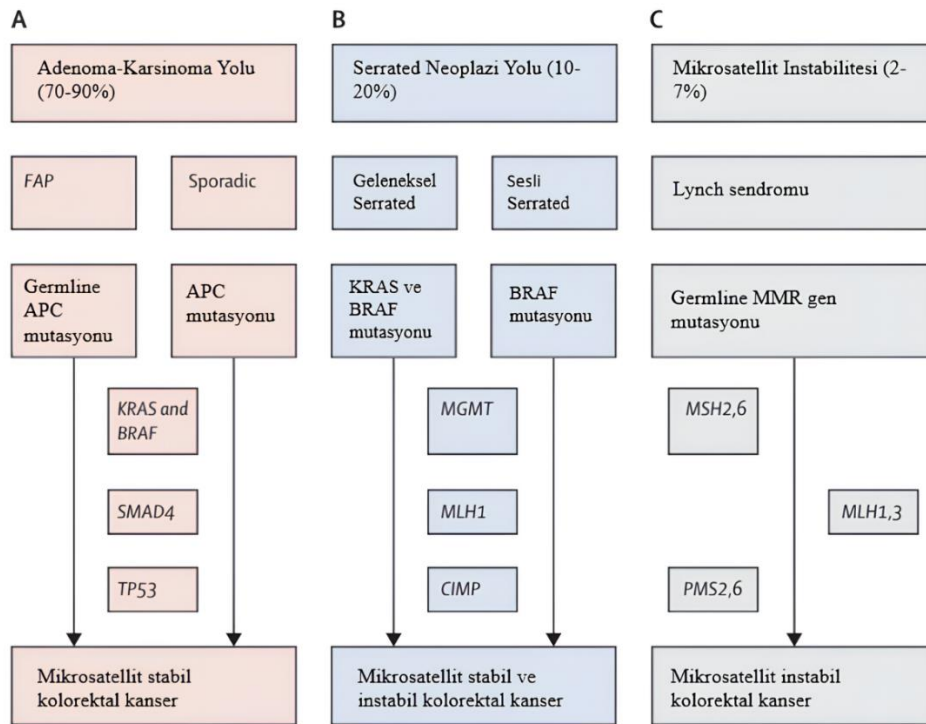
Dünya çapında en sık görülen kanser tipleri arasında olan kolorektal kanser önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir (Siegel vd., 2014). Kolorektal kanser, kolon ve rektumun iç duvarlarında polip şeklinde malign tümörlerin gelişimi ile ilerleyen heterojen bir hastalıktır (Fanelli vd., 2020). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı'na (IARC) göre, kolorektal kanser en yaygın üçüncü kanserdir ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) (2018) kolorektal kanseri dünya çapında ölümcül ve ikinci en yüksek ölüm nedeni olarak belirtilmiştir (Cubiella vd., 2018; Lauby-Secretan vd., 2018).

Kolorektal kanser, kansere bağlı ölümlerin neredeyse %10'unu kapsamaktadır (Bray vd., 2018). Erkeklerde görülme ve ölüm oranı kadınlara oranla %25 daha yüksektir. Erkeklerde görülme sıklığı üçüncü sıradayken kadınlarda ikinci sırada görülen kanser türüdür. Bu oranlar coğrafi şartlara göre de değişiklik gösterir fakat en yüksek oranlar gelişmiş ülkelerde gözlemlenmektedir (Dekker vd., 2019). Dünya çapındaki son verilere göre, kolorektal kanserin 2035 yılında görülme sıklığının 2,5 milyon vakaya kadar ulaşacağı tahmin edilmektedir (Arnold vd., 2017; Bray vd., 2018).

Genellikle polipten kaynaklanan kolorektal kanserin çoğu, adenomatöz poliplerin kademeli olarak kansere dönüşmesi ile başlar. Bu süreçte ilk olarak sağlıklı bağırsak hücreleri anormal bir şekilde çoğalır ve neoplastik öncü lezyona (polip) dönüşür. Tahmini 10-15 yıllık bir süre içinde, bu polipler büyür ve malign (kötü huylu) hale gelebilir. Kolorektal kanserlerin çoğunun kökeninin bir kök hücre veya kök hücre benzeri hücre olduğu varsayılmaktadır (Medema, 2013; Nassar ve Blanpain 2016).

Bu kanser kök hücreleri, tümör baskılayıcı genleri etkisiz hale getiren genetik ve epigenetik değişikliklerin ilerleyici birikimiyle gelişir ve onkogenleri aktive eder. Bağırsak duvarının iç yüzeyinde yer alan, küçük ve tüp şeklindeki girintiler olan kolonik kriptler, bağırsak yüzeyini kaplayan hücrelerin yenilenmesi ve fonksiyonlarını sürdürmesi için önemli rol oynar. Kök hücreler genellikle bu kriptlerin tabanında bulunur ve düzenli olarak yeni hücreler üretilip bağırsak epitelinin kendini yenilemesine katkıda bulunurlar. Ayrıca kolonik kriptler bir tümörün başlatılması ve devam etmesi için gereklidir (Nassar ve Blanpain 2016). Bu kanser kök hücrelerinin büyümesini kontrol eden düzenleyici mekanizmaların araştırılması, olası terapötik ajanlar ve tedaviler için umut verici bir araştırma alanıdır (De Sousa vd., 2017; Shimokawa vd.,

2017). Kolorektal kanserin, iki ana farklı öncü lezyon yolu vardır. Bunlar kolorektal kanserlerin %70-90'ına yol açan geleneksel adenom-karsinom yolu (kromozomal instabilite dizisi olarak da anılır) ve kolorektal kanserlerin %10-20'sini oluşturan tırtıklı (serrated) neoplazi yoludur. Bu iki farklı yol önemli ölçüde bir düzende farklı, çoklu genetik ve epigenetik olayları temsil eder. Kromozomal instabilite fenotipleri tipik olarak bir APC mutasyonu tarafından başlatılan genomik olayların ardından Retiküler Aktivasyon Sistemi (RAS) aktivasyonu veya TP53'ün fonksiyon kaybının ardından gelişir. Tırtıklı neoplazi yolu ise RAS ve RAF (Ras İlişkili Faktör) mutasyonları ve epigenetik ile ilişkilidir (Şekil 2.3) (Dekker vd., 2019).



Şekil 2.3. Kolorektal kanser gelişim yolları (Dekker vd., 2019).

Geleneksel adenomlar, genetik mutasyonların ve kromozomal instabilitenin sıralı birikimiyle ilerler ve mikrosatellit stabil tümörlere neden olurlar (A). Sesil tırtıklı (serrated) neoplazi yolu her zaman olmasa da genelde KRAS veya BRAF genlerinin genetik mutasyonu ile başlar ancak daha sonra tümör baskılayan genlerin (CpG adası metilatör fenotipi [CIMP]; metilasyonu ile ilerler (B). Lezyonlar ilerledikçe epigenetik olarak susturulan genlere bağlı olarak hem mikrosatellit stabil hem de stabil olmayan tümörler ortaya çıkabilir. Mikrosatellit kararsızlığı, uyumsuzluk onarım genlerinin etkisizleştirilmesi yoluyla hatalı DNA onarımının sonucudur ve Lynch sendromunda da görülen (C) uyumsuzluk onarım genlerinin germline mutasyonu ile örneklenir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Bitkilerin Toplanması ve Kurutulması

Bu çalışmada kullanılan *E. japonica* L. yaprakları Haziran 2022’de Adana-Seyhan bölgesinde 36°59'29.8"N 35°16'11.2"E GPS koordinatlarından şahsımıza ait evin bahçesinden toplanmıştır. Bitki örnekleri, Aksaray Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı öğretim elemanı Arş. Gör. Dr. Nihal KENAR tarafından Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası’ndan (Davis, 1985; Davis vd., 1988; Duman vd., 2000) yararlanılarak teşhis edilmiştir. Tespit edilen bitki isimleri “Türkiye Bitkileri Listesi, Damarlı Bitkiler” kitabından kontrol edilmiştir (Ertekin, 2012).

Toplanan yapraklar ilk olarak musluk suyu ile daha sonra distile su ile temizlendi. Çekirdekler ise kurutulmadan önce meyvelerinden ayıklanıp ilk olarak musluk suyu ile daha sonra distile su ile yıkanarak temizlendi. Oda ısısında ve ışık almayan bir alanda *E. japonica* L. yaprakları ve çekirdekleri kurutulup Waring blender ile öğütüldü. Toz haline getirildikten sonra da oda ısısında, kuru ve güneş almayan kavanozlarda saklandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *E. japonica* L. yaprak ve çekirdeğin kurutulması ve öğütülmesi.

Şekil 3.1’de; A: yaprak ve çekirdeklerinin öğütülmesinde kullanılan Waring blender, B: *E. japonica* L. kurutulmuş yaprak ve C: *E. japonica* L. öğütülmüş çekirdek görüntüsü verilmiştir.

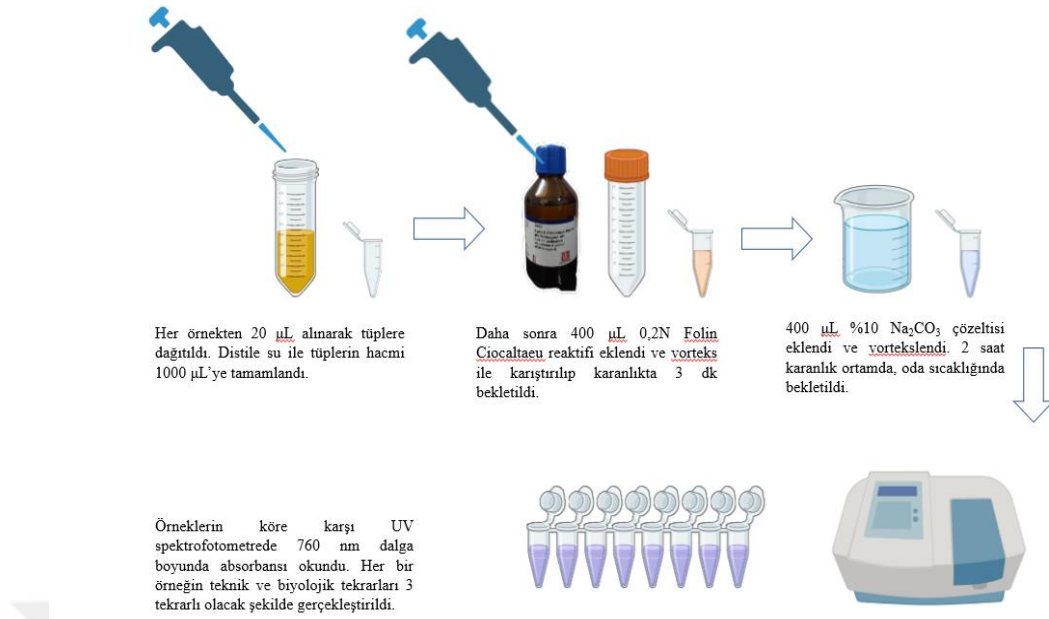
3.2 *E. japonica* L. Bitkisinin Ekstraksiyonu

Kurutulan örneklerden (yaprak ve çekirdek) 5 gram tartılarak wattman kağıdına sarıldı. Ekstraksiyon işlemi için soxhlet cihazına yerleştirildi. Çözücü ve madde oranı 1:50 olacak şekilde 250 mL %75 metanol, 250 mL %75 etanol ve 250 mL distile su ile 60°C'de 5 saat boyunca ekstre edildi. Soxhlet cihazından çıkarılan ekstre soğutuldu. Etanol ve metanol içeren ekstrelerden alkolü uzaklaştırmak için rotary evaporatörü kullanıldı. Ekstre kullanım sonrası +4°C de muhafaza edildi. Uzun süre bekleyen örnekler deneye alınmadı ve yeniden taze hazırlandı.

3.3 Toplam Fenolik Madde Miktar Tayini

E. japonica L. yaprak ve çekirdeklerindeki toplam fenolik madde miktarı için Singleton ve Rossi (1965) tarafından bildirilen Folin-ciocalteau yöntemi ile Gallik Asit standart eğrisine karşılık toplam fenolik madde miktarları tayin edilmiştir. Folin-Ciocalteu reaktifi, heteropolifosfotungstik asit ile fosfomolibdik asitten oluşan bir çözeltidir (Nurhayati vd., 2012). Bitki ekstrelerindeki polifenoller Folin-Ciocalteu reaktifi ile reaksiyona girerek görünür ışık spektrofotometrisi ile ölçülebilen mavi bir kompleks oluşturur (Schofield vd., 2001). Örneklerdeki fenolik bileşiklerin konsantrasyonu ne kadar yüksek ise reaksiyon sonunda örneğin renginin koyu mavi olması beklenmektedir.

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi sadece bazik ortamda etkileşim gösterdiği için ortamın sodyum karbonat (%5-10) ile bazikleştirilmesi gerekir. Spektrofotometre cihazında okumayı kolaylaştırmak için yaprak ve çekirdek ekstreleri 2, 5, 10, 50 ve 100 kat seyreltildi. Her örnekten 20 µL alınarak tüplere dağıtıldı. Tüplerin hacmi 1000 µL'ye tamamlandı. Daha sonra 400 µL Folin Ciocaltaeu reaktifi eklendi ve vorteks ile karıştırılıp karanlıkta 3 dk bekletildi. 400 µL %10 Na₂CO₃ çözeltisi eklendi ve vortekslendi. 2 saat karanlık ortamda, oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda örnek yerine distile su içeren köre karşı UV spektrofotometrede 760 nm dalga boyunda absorbansı okundu (Şekil 3.2). Her bir örneğin teknik ve biyolojik tekrarları 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 3.2. Fenolik madde miktar tayini yöntemi.

Absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri ise x-ekseninde gösterilerek bir standart çalışma grafiği hazırlandı. Elde edilen standart doğru denklemi ile toplam fenolik madde miktarı tespit edildi. Standart grafiğe göre yaprak ve çekirdek ekstraktlarındaki toplam fenolik madde mg Gallik Asit eşdeğeri GAE/ g kullanılarak hesaplandı.

3.3.1 Folin-Ciocalteu fenol reaktifi hazırlanması

0,2 N Folin-Ciocalteu fenol reaktifi için 2N'lik stok şişeden 5 mL alınarak 50 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. Çözelti her deney için günlük olarak taze hazırlanmıştır.

3.3.2 Sodyum karbonat hazırlanması

%10'luk sodyum karbonat hazırlamak için hassas terazide 1 gram Na_2CO_3 tartılarak distile su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır.

3.3.3 Gallik Asit stok çözeltisinin hazırlanması

Gallik Asit, stabil bir fenolik birleşiktir ve hidroksibenzoik asidin bir türevi olarak geçtiği için ölçüm standardı olarak bitkilerin fenolik madde miktar tayininde fenolik içeriğin eşdeğeri olarak kullanılır (Kate, 2014; Septiani vd., 2018). Gallik Asit stok çözeltisi hazırlanırken bitkilerin ekstraksiyonunda 3 farklı (%75 metanol, %75 etanol

ve distile su) çözücü kullanıldığı için 3 farklı çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan gallik asit çözeltileri buzdolabında +4°C’de saklanmıştır.

500 µg/mL konsantrasyonunda Gallik Asit stok çözeltisi hazırlamak için;

- 0,005 gr Gallik Asit tartılarak %75 etanol ile 10 mL tamamlanmıştır
- 0,005 gr Gallik Asit tartılarak %75 metanol ile 10 mL tamamlanmıştır.
- 0,005 gr Gallik Asit tartılarak distile su ile 10 mL ye tamamlanmıştır.

3.3.4 Gallik Asit standart eğrisinin hazırlanması

- Gallik Asit standart eğrisi hazırlamak için 500 µg/mL olan stok çözelti, 400 µg/mL, 350 µg/mL, 300 µg/mL, 250 µg/mL, 200 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda seyreltildi. Belirtilen konsantrasyonlardaki Gallik Asit çözeltilerinden 20µl alınarak tüplere dağıtıldı.
- Tüplerin hacmi distile su ile 1000µl ye tamamlandı.
- Tüplere 400µl Folin reaktifi eklenerek vorteks işlemi ile karıştırılıp karanlıkta 3 dk bekletildi.
- Örnekler bazik ortam oluşturmak amacıyla 400µl %10’luk Na₂CO₃ eklendi ve örnekler karanlık ortamda 2 saat bekletildi.
- Süre sonunda örnek yerine distile su içeren köre karşı UV spektrofotometrede 760 nm dalga boyunda absorbansı okundu. Her bir örneğin teknik ve biyolojik tekrarları 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.4 Toplam Flavonoid Madde Miktar Tayini

E. japonica L. yaprak ve çekirdek ekstraktlarının içerisindeki toplam flavonoid madde miktar tayininde Salatino (1998)’nın geliştirdiği alüminyum klorür (AlCl₃) kolorimetrik yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. Standart olarak Quercetin (QE) kullanıldı ve eşdeğer olarak hesaplandı.

3.4.1 Quercetin stok çözeltisinin hazırlanması

Quercetin, bitkilerde bulunan flavonoid türüdür. 0,005 gram Quercetin tartılarak son hacim 10 mL olacak şekilde absöü etanol (%99,9) ile tamamlanmıştır.

3.4.2 %5'lik Sodyum nitrit hazırlanması

%5 NaNO₂ elde etmek için 1,25 gram sodyum nitrit (NaNO₂) tartıldıktan sonra toplam hacmi 25 mL olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır.

3.4.3 %10 Alüminyum klorür (AlCl₃) hazırlanması

2,5 gram alüminyum klorür (AlCl₃) tartıldıktan sonra hızlı bir şekilde %99,9 saflıkta olan 25 mL metanol eklendi ve çözelti saf rengi verene kadar vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Çalışmanın yapılacağı gün %10'luk AlCl₃ taze olarak kullanılmıştır.

3.4.4 1M Sodyum hidroksit (NaOH) hazırlanması

1 gram sodyum hidroksit (NaOH) tartılmıştır. Daha sonra 25 mL'ye distile su ile tamamlanmıştır.

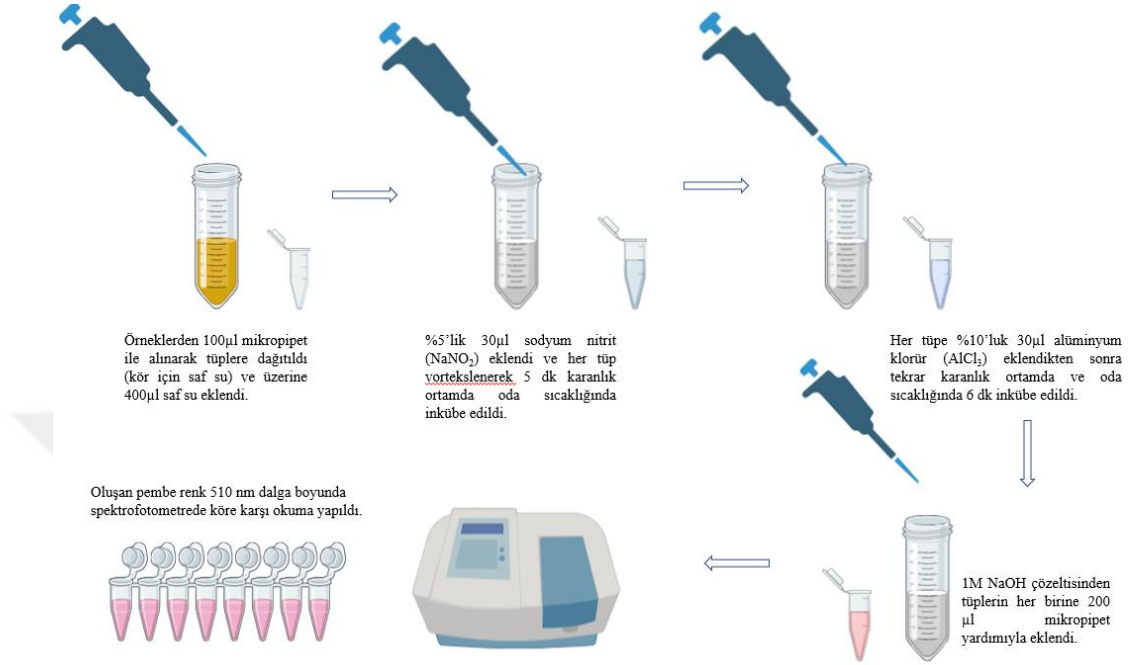
3.4.5 Flavonoid madde miktar tayini

Flavonoid madde miktar tayini yapılacak ekstreler 2, 5, 10, 50 ve 100 kat seyreltilmiştir. Her örnek için teknik ve biyolojik tekrarlar 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

Flavonoid madde miktar tayini için tüp hazırlığı;

- Örneklerden 100µl mikropipet ile alınarak tüplere dağıtıldı (kör için distile su).
- Her tüpe 400µl mikropipet yardımı ile distile su eklendi
- %5'lik 30µl NaNO₂ eklendi ve her tüp vortekslenerek 5 dk karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Her tüpe %10'luk 30µl AlCl₃ eklendikten sonra tekrar karanlık ortamda ve oda sıcaklığında 6 dk inkübe edildi.
- 1M NaOH çözeltisinden tüplerin her birine 200 µl mikropipet yardımıyla eklendikten sonra tüplerin son hacmi 1mL olacak şekilde distile su ile tamamlandı ve oluşan pembe renk 510 nm dalga boyunda spektrofotometrede köre karşı okuma yapıldı.
- Toplam flavonoid madde içeriği mg Quersetin eşdeğeri (QE)/gram kuru madde olarak ifade edilmiştir. Absorbans değerleri y-ekseninde ve konsantrasyon değerleri ise x-ekseninde gösterilerek bir standart çalışma denklemi oluşturuldu ve

bu standart grafiğe göre toplam flavonoid miktarı tespit edildi (Şekil 3.3). Standart grafiğe göre tüm bitki ekstratlarındaki toplam flavonoid mg Quersetin eşdeğeri (QE)/gram kuru madde olarak hesaplandı.



Şekil 3.3. Flavonoid madde miktar tayin yöntemi.

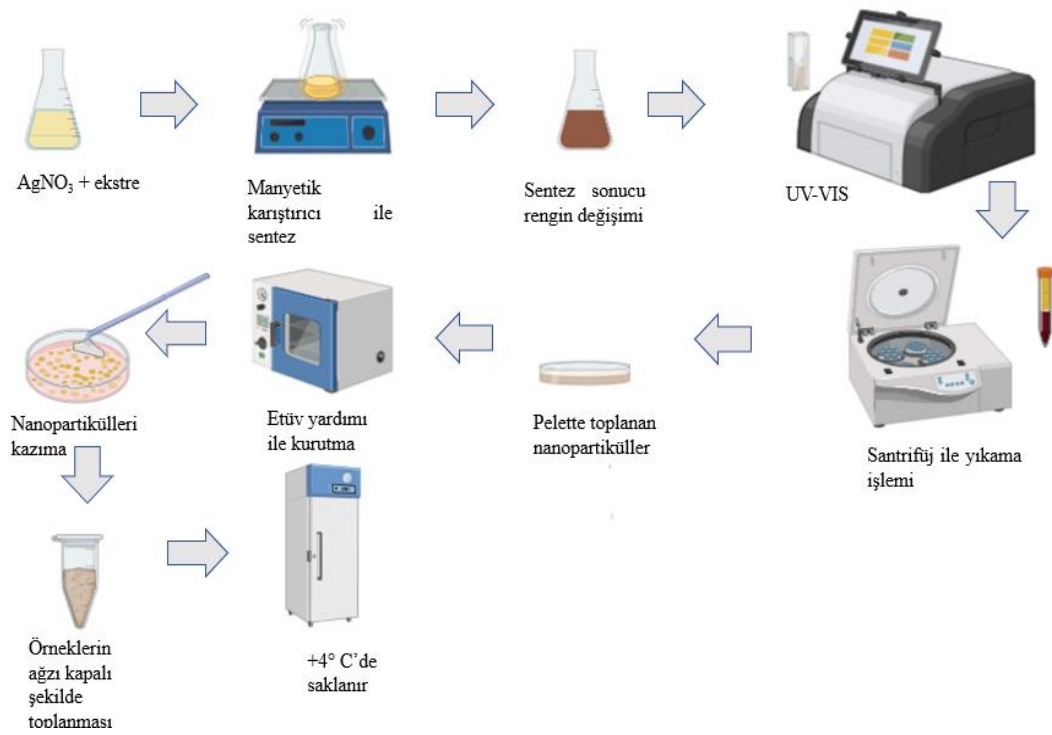
3.4.6 Quercetin standart eğrisinin hazırlanması

Quercetin standart eğrisi hazırlamak için stok çözelti 400 µg/mL, 350 µg/mL, 300 µg/mL, 250 µg/mL, 200 µg/mL, 150 µg/mL, 100 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda seyreltilmiştir. Hazırlanan örnek tüpler yukarıdaki Flavonoid Madde Miktar Tayini metoduyla ölçümleri yapılmıştır.

3.5 Gümüş Nanopartiküllerinin Eldesi

AgNP'lerin eldesi için 0,1 M konsantrasyonunda stok gümüş nitrat (AgNO_3) çözeltisi kullanıldı. AgNP üretiminde kullanılacak olan ekstre/ AgNO_3 oranının optimum aralığı belirlendi. Bu karışım için gerekli yaprak ve çekirdek ekstre miktarı ve AgNO_3 miktarını belirlemek için öncelikle bitki ekstre miktarı sabit tutulup değişik konsantrasyonlarda AgNO_3 denendi. Daha sonra bitki ekstre miktarı değiştirilerek AgNO_3 miktarı sabit tutuldu. En uygun ekstre / AgNO_3 oranının 5 mL/95 mL olduğu belirlendi.

Yaprak ve çekirdek ekstrelerinden AgNP oluşturmak için 1 mM, 5 mM ve 10 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyon seçildi. Erlenler ışık almaması için alüminyum folyo ile kaplandı ve ekstre eklendikten sonra her örneğin UV-VIS spektroskopisi ile ölçümü yapıldı. Daha sonra bu çözelti, ısıtıcılı manyetik karıştırıcı yardımıyla 500 rpm 50°C’de 6 saat boyunca karıştırıldı. Sentez sonrası her örneğin UV-VIS spektroskopisi ile karakterizasyonu yapıldı. Erlenler soğuduktan sonra oluşan AgNP’lerin yıkama işlemi için 10.000 rpm’de +4°C’de 15 dk santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant kısmı atılarak 10 mL distile su eklendi ve vortex ile karıştırıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra dipte kalan pellet kısmı petri kabına aktarıldı. Petri kabındaki AgNP’ler 50°C inkübatörde 18 saat kurumaya bırakıldı. Daha sonra kuruyan örnekler kazındı ve eppendorf tüplere aktarılarak alüminyum folyo ile kaplandıktan sonra buzdolabında +4°C’de saklandı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. AgNP sentezi.

3.5.1 Gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu

3.5.1.1 Renk analizi

Bitki aracılı yeşil sentez ile AgNP’lerin üretiminde terpenoidler, flavonlar, ketonlar, aldehitler, aminler ve karboksilik asitler gibi fitokimyasalların aracılık AgNO_3 ’ün

indirgenmesi prensibine dayanmaktadır (Prabhu ve Poullose, 2012). AgNP sentezinde Ag^+ 'nın $Ag(0)$ 'a indirgenmesi sırasında yüzey plazmon rezonansı (SPR) uyarılır. Bu uyarılma sayesinde, bitki ekstre/ $AgNO_3$ karışımında renk değişiminin gerçekleştiği rapor edilmiştir (Narayanan ve Sakthivel, 2010). Bu sebeple *E. japonica* L. yaprak ve çekirdek ekstresi kullanılarak yeşil sentez yolu ile sentezlenen AgNP'lerin ilk karakterizasyonu olan renk değişimi incelendi.

3.5.1.2 UV-VIS (ultraviolet-visible spektroskopisi) analizi

Sentez boyunca ve sentez sonunda UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu UV-1800) kullanılarak spektrum grafikleri izlendi. UV-VIS spektrumlarının 300-700 nm aralığında verdikleri pikler değerlendirildi.

3.5.1.3 SEM (scanning electron microscope) analizi

Yeşil sentez yolu ile elde edilen AgNP'lerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (FEI, Quanta FEG 250) ile morfolojileri belirlendi. Bu karakterizasyon işlemi Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (ASÜBTAM) hizmet alımı ile yapılmıştır.

3.5.1.4 FT-IR (fourier transform infrared spectroscopy) analizi

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), yeşil sentez yolu ile üretilmiş AgNP'ler için stabilize edici/kaplayıcı olarak işlev gören biyomoleküllerin varlığını gösterir (Ceylan vd., 2020). Elde edilen AgNP'lerin yapısında bulunan fonksiyonel gruplar (aminoasit, flavonoid, keton vs.) FT-IR analizi ile (Bruker/Vertex70 cihazı) saptandı. Bu karakterizasyon işlemi Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (ASÜBTAM) hizmet alımı ile yapılmıştır.

3.5.1.5 Zeta Potansiyel analizi

Yeşil sentez metodu ile üretilen AgNP'lerin boyut ve zeta potansiyeli ve boyut analizi Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİTAM)'nden hizmet alımı ile yapılmıştır.

3.5.1.6 X-ışını kırınım (XRD) analizi

XRD analizi, bir materyalin kristalografik yapısını belirlemek için malzeme biliminde kullanılan bir tekniktir. Yaptığımız tez çalışmasında XRD analizi Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİTAM)'nden hizmet alımı ile yapılmıştır.

3.6 Antikanser Aktivite Çalışmaları

3.6.1 HT-29 hücre hattı

HT-29, insan kolorektal adenokarsinomundan türetilmiş bir hücre hattıdır ve bu hücreler kolorektal kanser araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. 1964 yılında ilk kez Jorgen Fogh ve ekibi tarafından bir kadın hastadan alınan primer (birincil) tümör dokusundan izole edilmiştir. İzole edilen HT-29 hücre hattı, adenokarsinom hücrelerinin özelliklerini yansıtan epitelyal yapıya sahip hücrelerdir (Fogh ve Trempe, 1975). HT-29 hücre hattı kolorektal kanser biyolojisini incelemek, ilaç testi ve toksisite analizleri yapmak amacıyla tercih edilir.

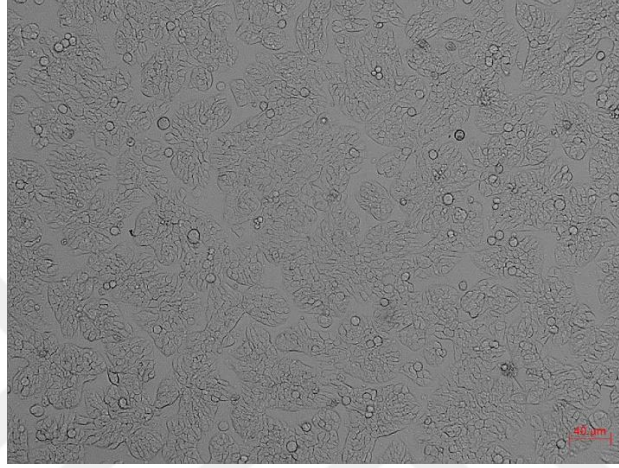
HT-29 hücreleri, özellikle diferansiye olmayan, yüksek proliferasyon kapasitesine sahip hücrelerdir ve kolonda yer alan kanserli hücrelerin özelliklerini modellemek için kullanılırlar. Normal şartlarda diferansiye olmamış bir fenotip sergileyen bu hücreler, belirli koşullar altında (örn. serumdan mahrum bırakıldıklarında) farklılaşarak goblet hücrelerine benzeyen hücreler haline gelebilirler. Bu özellik, hücrelerin *in vitro* ortamda farklılaşma süreçlerini incelemek için uygun bir model oluşturur (Pinto vd., 1983).

3.6.2 Hücrelerin çözündürülmesi

HT-29 hücreleri sıvı azot tankından (-196°C) çıkarılarak, su banyosunda 37°C'de çözündürüldü. Bir falkon tüpe 3-4 mL besiyeri konularak çözünen hücreler besiyeri içeren falkona aktarıldıktan sonra pipetaj işlemi ile iyice karışması sağlandı. Hücreler ve besiyeri iyice karıştırıldıktan sonra 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Dondurma işleminde kullanılan dimetilsülfoksit (DMSO)'in hücrelere toksik etkisini azaltmak için bu işlem iki kez tekrarlandı. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı atılarak peletin üzerine 1mL besiyeri eklendi ve pipetaj yapıldı. Bir adet 25 cm²'lik kültür kabına

(flask) 4 mL besiyeri eklendi ve falkonda bulunan hücreler flaska aktarıldı. Flask üzerine hücrenin açılma tarihi, hücrenin ve besiyerin adı not edilerek %5 CO₂ içeren 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi.

Bir sonraki gün HT-29 kolorektal kanser hücrelerinin (Şekil 3.5) morfolojileri İnverted mikroskop'ta incelendi. Hücre canlılığı kontrol edilerek besiyeri değişimi gerçekleştirildi.



Şekil 3.5. HT-29 hücre hattı mikroskop görüntüsü (10X).

3.6.3 Hücrelerin çoğaltılması (Pasajlama)

Hücre hattının çoğaltılması için, HT-29 hücreleri 25 cm²'lik flasklarda (Greiner Bio One, Germany) %10 fetal bovine serum (FBS) (Biowest, USA), %1 penisilin/streptomisin (Biological Industries, USA) ve Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Biowest, USA) karışımından oluşan besiyeri ile %5 CO₂, 37°C ve %95 nem varlığında CO₂'li inkübatörde (ShelLAB, USA) kültüre edildi. Kontaminasyon varlığı ve hücrelerin çoğalması her gün düzenli olarak İnverted mikroskop (Olympus, USA) ile takip edildi. Hücrelerde sayı artışı oldukça besiyeri değişikliği ve Flask tabanının %80'ini dolduran hücrelerin ve deneyde gerekli hücre flask sayısına ulaşana kadar çoğaltma (pasajlama) işlemi yapıldı.

Pasaj işlemi için aşağıdaki adımlar takip edildi;

- Flasklardan steril serolojik pipet yardımı ile besiyeri çekildi
- Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (Biowest, USA) ile yıkama işlemi yapıldı, bu aşamada flasklar hafifçe çalkalandı

- Yıkama işleminden hemen sonra 1 mL 1X Tripsin-EDTA (Biowest, USA) çözeltisi eklendi (Tripsinizasyon).
- Tripsinizasyon işleminden hemen sonra %5 CO₂'li inkübatörde 1-2 dakika tripsinin aktivite göstermesi için bekletildi.
- İnkübatörden çıkarılan flaskın tabanında kalan hücreler serolojik pipet yardımı ile toplandı ve içerisinde besiyeri bulunan bir falkona aktarıldı.
- Hücrelerin bulunduğu falkon tüp santrifüj cihazında 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.
- Daha sonra 2 flask içerisine 5'er mL besiyeri konulduktan sonra dipte kalan pellet kısım eşit miktarda flasklara dağıtıldı.
- Flasklar %5 CO₂'li inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Pasajlanan yeni hücrelerin canlılığı ve yoğunluğu her gün kontrol edildi.

3.6.4 Hücrelerin dondurulması

Hücre hatları *in vitro* ortamda çoğaltılırken morfolojik ve biyolojik özelliklerinde bazı değişimler oluşabileceği için kültür ortamında hücrelerin sonsuza kadar üretimine devam etmek mümkün değildir. Bu dezavantajla karşılaşmak oldukça risklidir. Geri dönüşü olmayan bu değişikliklerle karşılaşmamak ve kontaminasyon durumunda deney sıkıntısı yaşamamak için hücrelerin uzun ve kısa ömürlü stoklanması gerekir. Hücreler yeterli bir sayıya ulaştığında kriyoprotektan bir madde ile dondurulur. Hücreler dondurulurken aşağıdaki aşamalar izlenmiştir;

- Kontaminasyonun olmadığından emin olunan flasklardan besiyeri çekildi.
- Flaskda kalan hücreler PBS ile yıkanarak pasajlamada yapılan tripsinizasyon işlemi uygulandı.
- Daha sonra flaskdan hücreler serolojik pipetle çekildi ve bir falkona aktarıldı.
- Falkon içerisine 3 mL besiyeri eklendikten sonra 5 dk 1000 rpm'de santrifüj işlemi yapıldı.
- Süpernatant kısmı atılarak pellet üzerine %20 besiyeri, %10 DMSO ve %70 FBS içeren stok solüsyonu eklendi.
- Karışım bir cryo tüp içerisine alındı ve önce -20°C'ye ardından -80°C'ye ve son olarak -196°C sıvı nitrojen tankının içerisine yerleştirildi.

3.6.5 Hücre canlılığı ve hücre sayımı (Tripın Blue Yöntemi)

- Tripın Blue Yöntemi ile ölü hücreler mavi renge boyanarak hücre canlılığı ve hücre sayıları hesaplanır. Bu yöntemde inverted mikroskopta Neubauer lamında sayım gerçekleştirildi.
- İlk olarak hücrelerin çoğaltılmasında kullanılan tripsinizasyon işlemi tekrarlanarak hücreler kaldırılarak toplandı.
- Toplanan hücreler 500 rpm’de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atılarak hücrelerin üzerine 1 mL besiyeri eklendi.
- Hazır satılan tripın blue boyasından 20 µl ve hücre karışımından 20 µl çekilerek bir eppendorf içerisinde pipetaj yapıldı.
- Boyanın etki gösterebilmesi için 2 dk bekletildikten sonra Neubauer lamına aktarıldı.
- Neubauer laminın ortasında 1 mm³ alandaki 16 karelik 9 alan bulunmaktadır. En az 5 alandaki boyanmış (mavi, ölü) ve boyanmamış (canlı) hücre sayıları ile hücre canlılığı hesaplandı.
- Hücre canlılığı için aşağıdaki denklem (3.1) kullanıldı.

$$\% \text{ canlılık} = \frac{\text{Canlı hücre}}{\text{Total hücre}} \times 100 \quad (3.1)$$

- Canlılık yüzdesi özel şartlarda %75 kabul edilse de %90 ve üzeri olan flasklar deneylerde kullanıldı.
- Deneylerde kullanılacak platelere ekilecek canlı hücre sayısı aşağıdaki denklem (3.2) ile belirlendi.

$$\text{Hücre sayısı/mL} = \text{Ort. hücre sayısı} \times 10.000 \times \text{Seyreltme faktörü} \quad (3.2)$$

3.6.6 AgNP stok çözeltilerin hazırlanması

Yaprak ve çekirdek ile sentezlenen 1mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlardaki AgNP’lerden 0,002 gram tartılarak 1mL distile su ile çözündürüldü. Elde edilen 2000 µg/mL konsantrasyon dilüe edilerek 500, 250, 125, 62.5, 32.25, 15.63 ve 7.81 µg/mL konsantrasyonlar hazırlandı. Hazırlanan AgNP’ler antikanser deneylerinde kullanılmak üzere 0.22 µm filtreden geçirilerek steril edilmiştir. HT-29 hücre hattında

belirtilen konsantrasyonların 24, 48 ve 72 saatlik sürelerdeki sitotoksik etkileri incelendi.

3.6.7 Sitotoksisite testi (MTT yöntemi)

MTT yöntemi, hücre metabolik aktivitesini, hücre canlılığını ve proliferasyonunu değerlendirmek için kullanılan kolorimetrik bir tahlildir. MTT kimyasal olarak 3-(4,5-di metil tiyazol -2-il)-2,5-di fenil tetrazolyum bromür olan tetrazolyum boyasıdır. MTT yöntemindeki genel prensip, hücre ölümünden kısa bir süre sonra mitokondride bulunan enzimlerin inaktive olma etkinliği üzerinedir. Tetrazolyum sayesinde NADH ve NADPH aktif hücreler tarafından formazana indirgenir. Bu esnada oluşan rengin kolorimetrik olarak ölçümü yapılır. Oluşan formazan miktarı ile canlı hücre sayısı belirlenir. HT-29 hücreleri tarafından optimum hücre sayısının belirlenmesi, standart eğrinin oluşturulması ve AgNP uygulanan hücrelerin sitotoksitesinin belirlenmesi için MTT yöntemi kullanılmıştır.

3.6.8 MTT reaktifinin hazırlanması

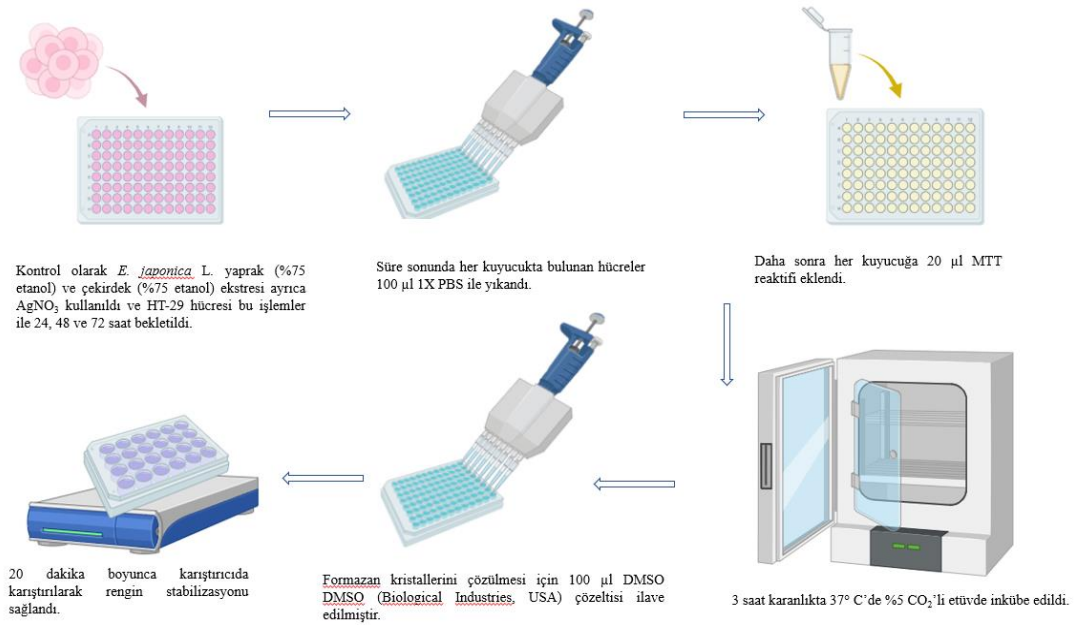
10 mL 1X PBS içerisinde 50 mg Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (Sigma Aldrich, USA) katısı çözündürülür. Vorteks işleminden sonra 0.22 µm'lik bir şırınga filtresi (Merck, Gillingham, UK) ile filtrelenmiştir. Daha sonra 1,5 mL'lik eppendorf tüpüne konularak alüminyum folyo ile kaplanarak -20°C'de saklanmıştır.

3.6.9 MTT yöntemi ile sitotoksitenin belirlenmesi

MTT yöntemi ile HT-29 hücrelerinde *E. japonica* L. yaprak ve çekirdek ekstraktlarının (etanol), 3 farklı konsantrasyonda sentezlenen AgNP'lerin ve bu sentezin gerçekleşmesi için kullanılan AgNO₃'ün sitotoksik etkileri incelendi. Flasklarda bulunan hücreler yeterli sayıya ulaştıktan sonra hücre sayımında kullanılan tripan blue yöntemi ile hücreler sayıldı.

Ölçüm için her kuyucukta 200 µl 10.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plate kullanıldı. Hücreler sayılıp ekildi ve plate 37° C'de %5 CO₂'li etüvde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında plate'de bulunan besiyeri cam pastör pipet ile çekildi. MTT yöntemi için *E. japonica* L. yaprak ve çekirdek AgNP lerin 500, 250, 125, 62.5, 32.25, 15.63 ve 7.81 µg/mL konsantrasyonları 4 tekrarlı olacak şekilde uygulandı.

Sentezlenen 3 farklı AgNO₃ (1 mM, 5 mM ve 10 mM) konsantrasyonundaki AgNP'ler için ayrı ayrı plate'lerde işlem yapıldı. Kontrol olarak herhangi bir uygulama yapılmayan hücreler kullanılırken, *E. japonica* L. yaprak (%75 etanol) ve çekirdek (%75 etanol) ekstresi ile AgNO₃ sitotoksosite değerleri de belirlendi. HT-29 hücresi bu işlemler ile 24, 48 ve 72 saat bekletildi. Süre sonunda her kuyucukta bulunan hücreler 100 µl 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra her kuyucuğa 20 µl MTT reaktifi eklendi. 3 saat karanlıkta 37° C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonra kuyucuktaki reaksiyon karışımları kuyucuklardan uzaklaştırılarak, formazan kristallerini çözülmesi için 100µl DMSO (Biological Industries, USA) çözeltisi ilave edildi. 20 dakika boyunca karıştırıcıda karıştırılarak rengin stabilizasyonu sağlandı. Oluşan mor renk ELISA Okuyucu Cihazında (Chromate, Awareness Technology Inc.) 560 nm'de ölçüldü (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. MTT yöntemi.

Her bir deneyin 6 biyolojik ve 3 teknik tekrarı yapıldı. Elde edilen AgNP'lerin HT-29 hücresine karşı %50 inhibisyonuna (IC₅₀) neden olduğu konsantrasyon aralığı belirlendi. Sentezlenen AgNP'lerin anti-poliferatif etkisi ve uygulama yapılmayan hücreler ile canlılıkları karşılaştırılmıştır.

% inhibisyon değerleri ise aşağıdaki denklem (3.3) kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - \frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Kontrol Absorbansı}} \times 100 \quad (3.3)$$

3.6. 10 Migrasyon (Wound Healing Assay, Yara İyileşme Deneyi)

E. japonica L. bitkisinin yaprak ve çekirdeğinden elde edilen AgNP'lerin HT-29 hücre hattındaki migrasyon yeteneği üzerine etkisini gözlemlemek için yara iyileşmesi testi yapıldı. 6 kuyucuklu plate'lere her kuyucukta 2 mL tam besiyeri içeren ortamda hücre süspansiyonu 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde ekildi. 37 °C ve %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat bekletilerek hücrelerin plate içerisinde tek katmanlı olmaları beklendi. Daha sonra steril bir mikropipet ucuyla kuyucukların ortasında yarık oluşturularak hücrelere sekonder ve ilerleyici hasarın başlangıcı oluşturuldu. Bu işlemin hemen sonrasında hücre artıkları ve plakanın yüzeyinden kalkan hücreleri uzaklaştırmak için kuyucuklar PBS ile tekrar yıkandı. Gruplar (kontrol, yaprak ekstre, çekirdek ekstre, 1 mM yaprak AgNP, 5 mM yaprak AgNP, 10 mM yaprak AgNP, 1 mM çekirdek AgNP, 1 mM çekirdek AgNP ve 1 mM çekirdek AgNP) oluşturuldu. Kontrollere tam besiyeri uygulanırken, diğer gruplara ise IC₅₀ değerlerinin 1/8'ini içeren 2 mL besiyeri ortamı uygulanarak 37 °C ve %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Yarık oluşturulan hücrelerin belirli zaman aralıklarında (0, 24, 48 ve 72 saat) yara kapanma durumları inverted mikroskop (Leica DMi1, Wetzlar, Almanya) ile fotoğraflandı. Kontrol örnekleri ve deneysel örneklerin yara genişliğini değerlendirmek için Image J programı ve Wound healing size tool yazılımı kullanılarak hücresiz alanın yüzdesi belirlendi. Üç bağımsız deney yürütüldü ve her tekrar için yaralı alanın dört noktası analiz edildi.

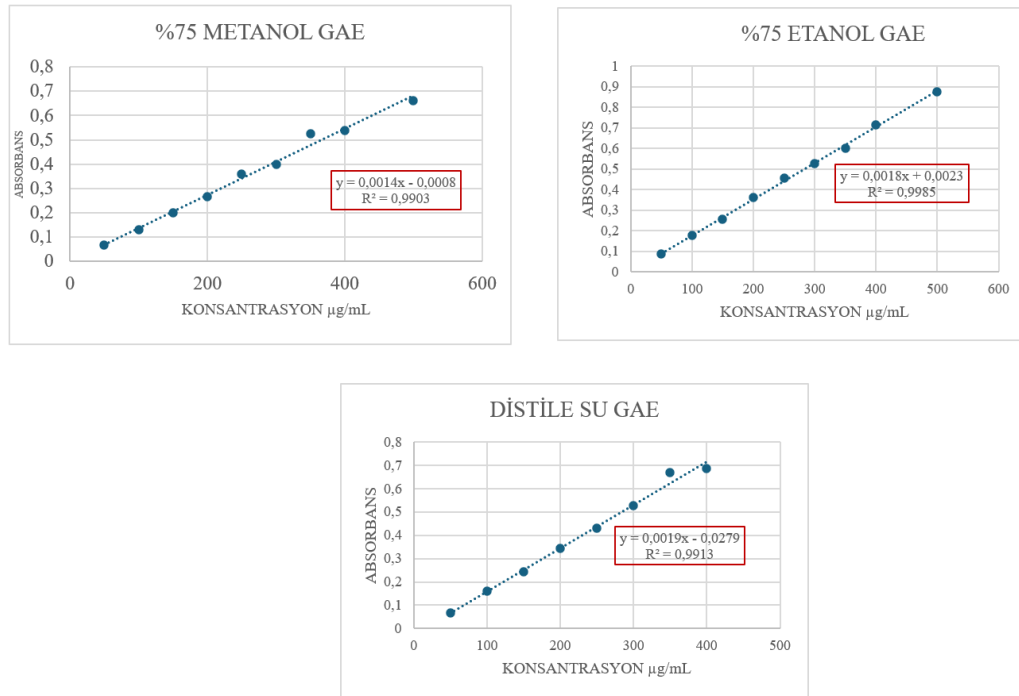
3.7 İstatistiksel Analiz

Deney tekrarları üç kez yapılmıştır ve istatistiksel ortalamaları hesaplanmıştır. Sitotoksisite sonuçları (MTT ve IC₅₀) istatistiksel analiz kapsamında GraphPad Prism 10.3.1 aracılığıyla değerlendirilmiştir. Migrasyon değerlendirmesi için Image J programı (Yazılım 1.48q, Rayne Rasband, Ulusal Sağlık Enstitüleri, ABD) ve Wound healing size tool (Individual image analysis) yazılımı kullanıldı. İstatistiksel farklılıklar gruplar arasındaki farklılığa göre normal dağılım gösterenler tek yönlü varyans analizi uygulanarak (OneWay ANOVA) analiz edildi. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 Toplam Fenolik Madde Miktar Sonuçları

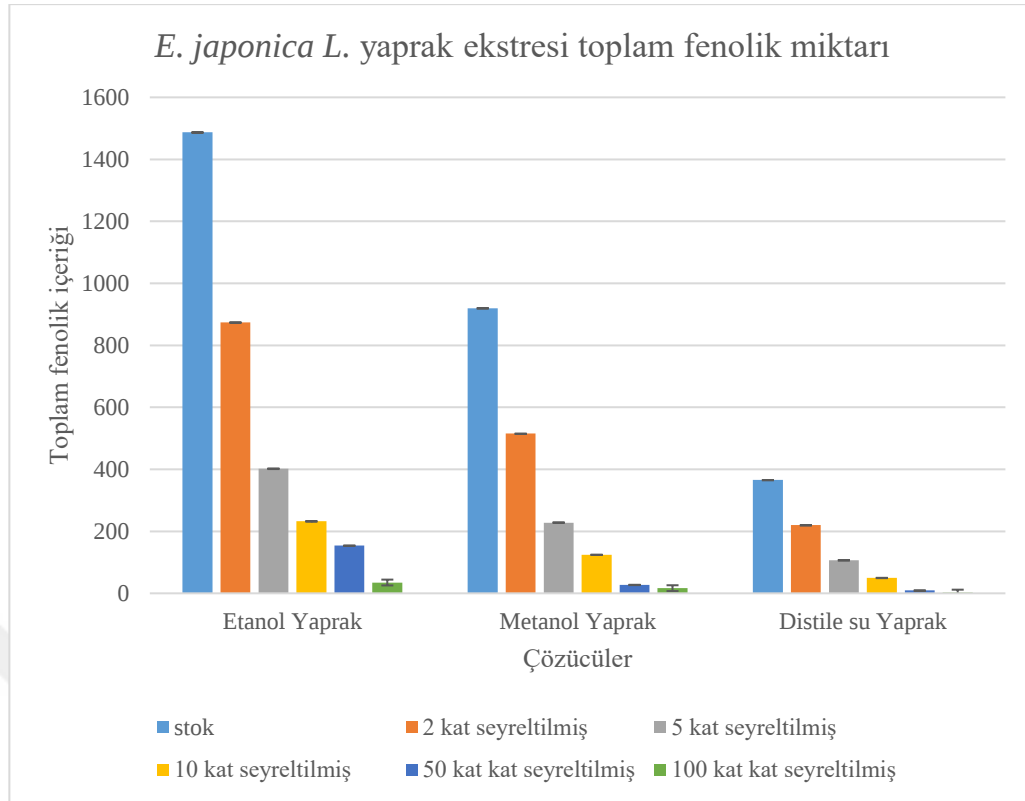
Standart eğri grafiği elde edebilmek için Gallik Asit eş değer alınarak 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ve 500 µg/mL konsantrasyonlar seçilip toplam fenolik madde miktar tayinindeki yöntem uygulanmıştır. Yöntemde kullanılan çözücüler (etanol, metanol ve distile su) kullanılarak 765 nm’de spektrofotometrede okunan absorbans değerleri ile R^2 formülüne sahip grafikler elde edilmiştir (Şekil 4.1). Her bir çözücüye ait denklemlerdeki değerler dikkate alınarak ekstrlerdeki toplam fenolik bileşik miktarı tayin edilmiştir.



Şekil 4.1. Gallik Asit standart eğrileri.

4.1.1 *E. japonica* L. yaprak ekstrlerinin toplam fenolik madde miktarı

E. japonica L. yaprağı ile yapılan üç farklı çözücünden (%75 etanol, %75 metanol ve distile su) elde edilen ekstrler stok, 2 kat, 5 kat, 10 kat, 50 kat ve 100 kat seyreltilerek üç tekrarlı çalışılmıştır. Spektrofotometre yardımı ile 765 nm de okunan değerler Gallik Asit kalibrasyonundan elde edilen denklemlerdeki y değerlerinin olarak değerlendirilip toplam fenolik miktarları hesaplanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *E. japonica* L. yaprağından elde edilen toplam fenolik madde miktarı.

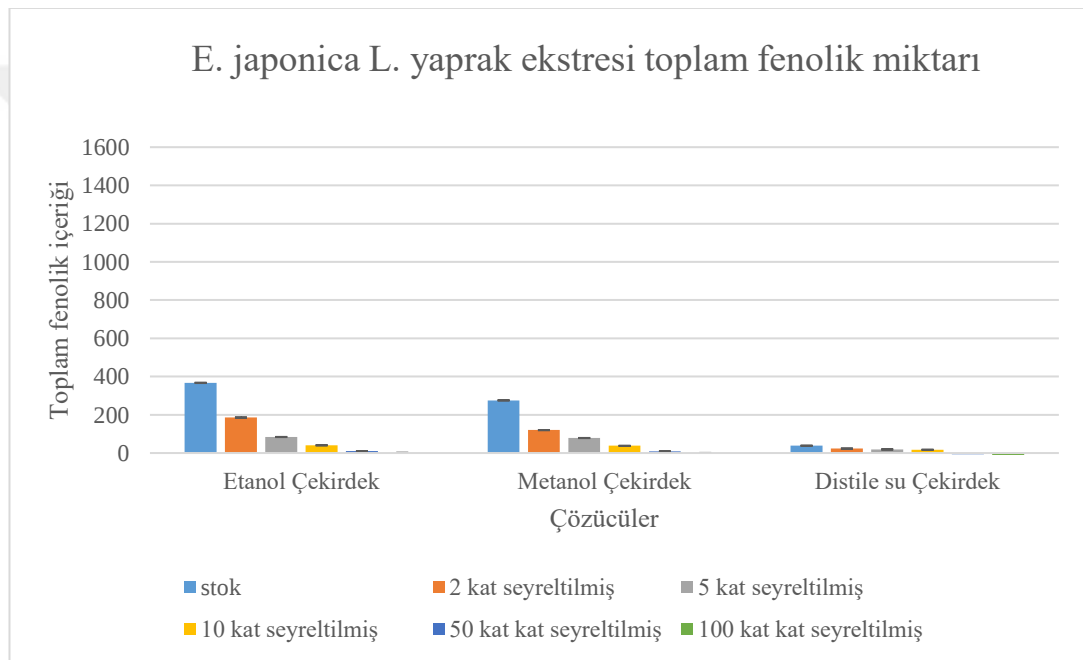
E. japonica L. yaprak ekstresi ile yapılan çalışmada toplam fenolik madde miktarı en yüksek $1487,05 \pm 0,038$ mgGAE/100g (etanol) ve en düşük $365,56 \pm 0,02$ mgGAE/100g (distile su) olarak saptanmıştır. Yaprak ekstralarının toplam fenolik madde miktar tayininde 6 farklı dilüsyonda da en iyi sonuç %75 etanol yaprak ekstresinde olduğu saptanmıştır.

Elde ettiğimiz sonuçları literatürle kıyasladığımızda Song vd. (2010) yaptıkları bir çalışmada *E. japonica* L. yaprağının metanol ekstresinde bulunan toplam fenolik içeriğinin $31,47 \pm 0,48$ mg GAE/g bildirmiştir yaptığımız çalışma ile kıyasladığımız metanol ekstresinde toplam fenolik içeriğin 919,78 bulmuş olup daha yüksek bir sonuç elde edilmiştir. Bir farklı çalışmada Hong vd. (2008) yaptıkları metanol ile ekstre edilen *E. japonica* L. yapraklarının toplam fenolik içeriğini $54,9 \pm 2,40$ mg GAE/g olarak bildirmişler. Khouya vd. (2022) elde edilen *E. japonica* L. su ekstresinin fenolik içeriği tayin edildiğinde $240,65 \pm 12,56$ mg kafeik asit eşdeğeri olarak bulmuşlardır. Pawłowska vd. (2023) yaptıkları çalışmada %70 etanol ile elde edilen *E. japonica* L. yaprak ekstresinin toplam fenolik madde miktarını $47,99 \pm 0,11$ mg GAE/g

bulmuşlardır. Literatürde yer alan verilere göre bizim etanol ekstremizden elde ettiğimiz toplam fenolik madde miktarları daha yüksek çıkmıştır.

4.1.2 *E. japonica* L. çekirdek ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarı

E. japonica L. çekirdeğinden yapılan üç farklı çözücü ile (%75 etanol, %75 metanol ve distile su) elde edilen ekstreler stok, 2 kat, 5 kat, 10 kat, 50 kat ve 100 kat seyreltilerek üç tekrarlı şekilde yapılmıştır. Spektrofotometre yardımı ile 765 nm de okunan değerler Gallik Asit kalibrasyonundan elde edilen denklem yerlerine konularak toplam fenolik miktarları elde edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4. 3. *E. japonica* L. çekirdeğinden elde edilen toplam fenolik madde miktarı.

E. japonica L. çekirdek ekstreleri içerisinde en iyi toplam fenolik madde miktarı %75 etanol ekstresi olduğu saptanmıştır. 6 farklı dilüsyonda da en iyi içerik $367,24 \pm 0,03$ mgGAE/100g %75 etanol ekstresinde gözlemlenmiştir en düşük sonuç ise $38,36 \pm 0,01$ mgGAE olarak saptanmıştır. Çekirdek ekstresinin yaprak ekstresine kıyasla daha düşük fenolik madde miktarı içerdiği belirlenmiştir.

Barbi vd. (2018) yaptıkları çalışmada olgunlaşmış ve olgunlaşmamış *E. japonica* L. meyvelerinden çekirdekler ayıklanmış ve %25 metanol çözücüsü kullanarak ekstre elde etmişlerdir. Olgunlaşmamış meyvelerden ayıkladıkları çekirdek ekstresinde $19.07 \pm 0,23$ mg GAE/g ve olgunlaşmış meyvelerden ayıkladıkları çekirdek

ekstresinde $11,14 \pm 0,6$ mg GAE/g olarak toplam fenolik madde miktarlarını saptamışlardır. Yapılan tez çalışmamızda çekirdek ekstresinden elde edilen toplam fenolik madde miktarının literatüre göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Fenolik bileşikler, bitki özütlerinde doğal olarak bulunan antioksidanlardır ve gümüş iyonlarını (Ag^+) gümüş nanoparçacıklarına (Ag^0) indirgerler. Fenolik hidroksil grupları, gümüş iyonlarını indirgerken oksitlenir ve NP oluşumuna katkıda bulunur (Iravani, 2011).

Fenolik madde miktarı ne kadar yüksekse, AgNP'ler o kadar hızlı ve verimli bir şekilde sentezlenir. Yapraktaki yüksek fenolik içeriğin, çekirdek ekstraktına göre daha hızlı AgNP oluşumuna neden olabileceği düşünülmektedir. Bu, sentez hızını etkilerken aynı zamanda AgNP'lerin fizikokimyasal özelliklerini de belirler (Singh vd., 2018). *E. japonica* L. yaprakları, çekirdeklerine göre daha yüksek fenolik içeriğe sahip olduğundan, bu fark AgNP'lerin oluşumu sırasında daha etkili ve hızlı bir indirgeyici ajan rolü oynar.

Fenolik bileşikler, bitkilerin zararlı organizmalara ve çevresel streslere karşı savunma mekanizmalarını güçlendirir. Yapraklar, genellikle dış etkenlere maruz kaldıkları için, bu bileşikler daha fazla biriktirirler. Örneğin, yapraklar patojenlere karşı koruma sağlarken, aynı zamanda zararlılara karşı da bir çeşit "kimyasal savunma" mekanizması oluşturur. Bu durum, yaprakların fenolik ve flavonoid içeriğini artırarak, bitkinin hayatta kalma şansını yükseltir (Sharma vd., 2020). *E. japonica* L. yaprak ekstresinin çekirdeğe göre yüksek olması bu sebeple ilişkilendirilebilir.

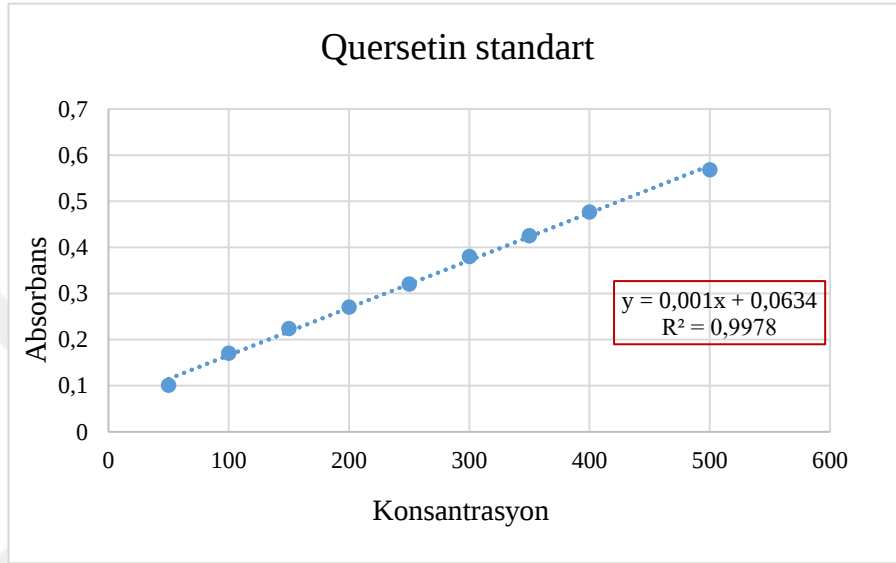
E. japonica L. yaprağı ve çekirdeğinden elde edilen ekstraterinden elde edilen toplam fenolik asit miktarları gerekli Gallik Asit kalibrasyonlarından elde edilen denklem yerlerine konularak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *E. japonica* L. yaprağı ve çekirdeğinden elde edilen ekstraterin toplam fenolik madde miktarları.

Ekstreler	%75 Etanol (mgGAE/100g)	%75 Metanol (mgGAE/100g)	Distile su (mgGAE/100g)
<i>E. japonica</i> L. yaprak ekstresi	$1487,05 \pm 0,03$	$919,78 \pm 0,01$	$365,56 \pm 0,02$
<i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstresi	$367,24 \pm 0,03$	$275,57 \pm 0,01$	$38,36 \pm 0,01$

4.2 Toplam Flavonoid Madde Miktar Tayini

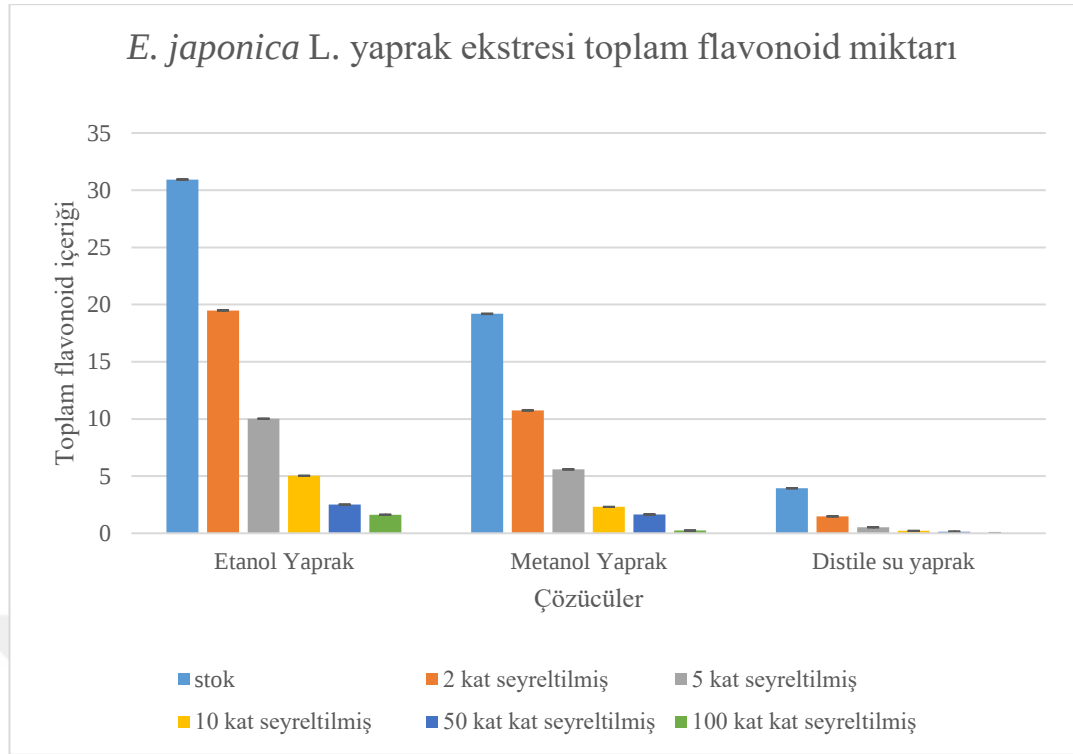
Toplam flavonoid madde miktar tayininde eş değer olarak Quersetin seçilerek 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda üç tekrarlı şekilde hazırlanan Quersetin toplam flavonoid madde miktar tayinindeki yöntem kullanılarak 510 nm de absorbans değerleri kaydedilmiştir. Elde edilen Quersetin kalibrasyon eğrisi Şekil 4.4' de verilmiştir.



Şekil 4.4. Quersetin kalibrasyon eğrisi.

4.2.1 *E. japonica* L. yaprak ekstrelerinin toplam flavonoid madde miktarı sonuçları

E. japonica L. yaprağı yapılan üç farklı çözücü ile (%75 etanol, %75 metanol ve distile su) elde edilen ekstreler stok, 2 kat, 5 kat, 10 kat, 50 kat ve 100 kat seyreltilerek üç tekrarlı olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon sonucunda artan flavonoid konsantrasyonunda pembe rengin koyulaştığı gözlenmiştir. Daha sonra spektrofotometre yardımı ile 510 nm de okunan değerler Quercetin kalibrasyonundan elde edilen denklem yerlerine konularak toplam flavonoid miktarları elde edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. *E. japonica* L. yaprak ekstresinden elde edilen toplam flavonoid madde miktarı.

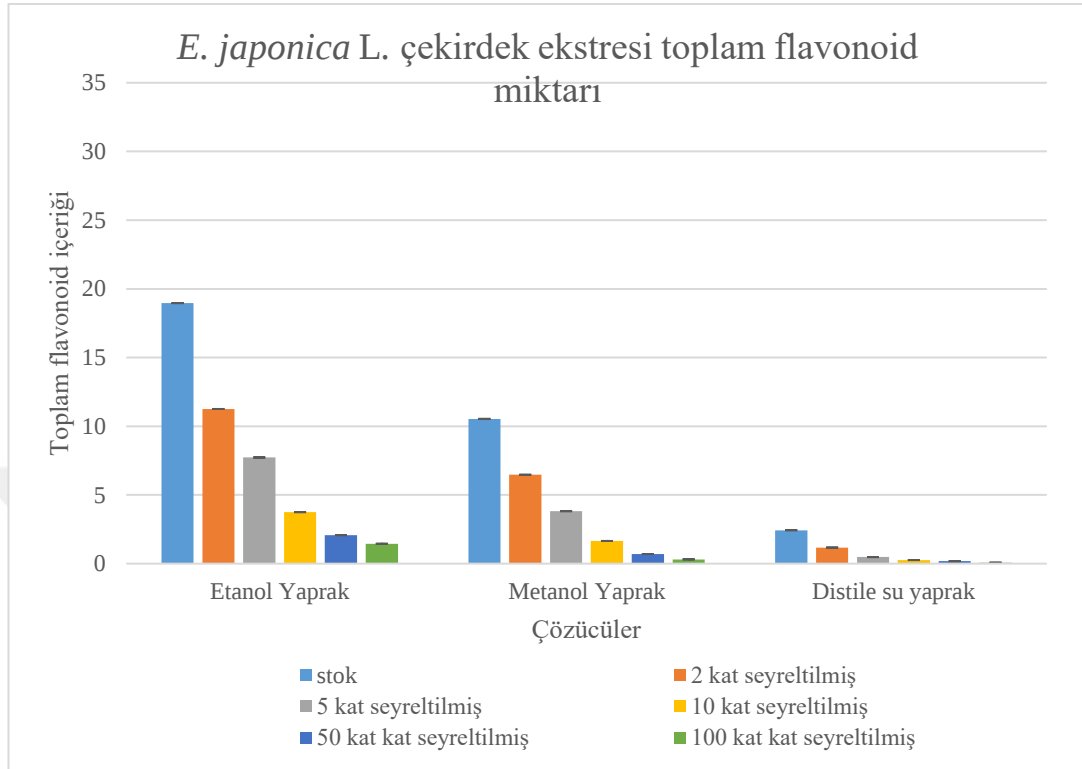
E. japonica L. yaprak ekstrelerinin (%75 etanol, %75 metanol ve distile su) en iyi flavonoid içere sahip çözücünün %75 etanol ekstresi olduğu saptanmıştır. Yapılan tüm seyreltmelerde en iyi içeriğin sırası ile etanol, metanol ve distile su çözücüler olduğu saptanmıştır. Yapılan tez çalışmamızda yapraktaki en yüksek flavonoid içeriğin $30,93 \pm 0,001$ mg/mL (QE) ile %75 etanol ekstresinde gözlenirken, en düşük içeriğin $3,93 \pm 0,005$ mg/mL (QE) ile distile suda olduğu gözlenmiştir.

Pawłowska vd. (2023) yaptıkları çalışmada, %70 etanol ile elde edilen *E. japonica* L. yaprak ekstresinin flavonoid içeriğini $7,84 \pm 0,00$ mg QE/100 g olarak belirlemişlerdir.

4.2.2 *E. japonica* L. çekirdek ekstrelerinin toplam flavonoid madde miktarı sonuçları

E. japonica L. çekirdeğinin üç farklı çözücü yardımıyla (%75 etanol, %75 metanol ve distile su) elde edilen ekstreleri stok, 2 kat, 5 kat, 10 kat, 50 kat ve 100 kat seyreltilerek üç tekrarlı olacak şekilde hazırlandı. Reaksiyon sonucunda artan flavonoid konsantrasyonunda pembe rengin koyulaştığı gözlenmiştir. Daha sonra spektrofotometre yardımı ile 510 nm de okunan değerler, Quercetin kalibrasyonundan

elde edilen denklemde yerlerine konuldu ve toplam fenolik miktarları hesaplandı. Çekirdek ekstresindeki toplam flavonoid miktar sonuçları Şekil 4.6’da verilmiştir.



Şekil 4.6. *E. japonica* L. çekirdek ekstresinden elde edilen toplam flavonoid madde miktarı.

E. japonica L. çekirdek ekstrelerinden (%75 etanol, %75 metanol ve distile su) en iyi flavonoid içeriğe sahip çözücünün %75 etanol ekstresi olduğu saptanmıştır.

E. japonica L. yaprağı ve çekirdeğinden elde edilen ekstrelerin seyreltilmeden stoktan alınarak elde edilen toplam flavonoid madde miktarları gerekli Quersetin kalibrasyonlarından elde edilen denklem yerlerine konularak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

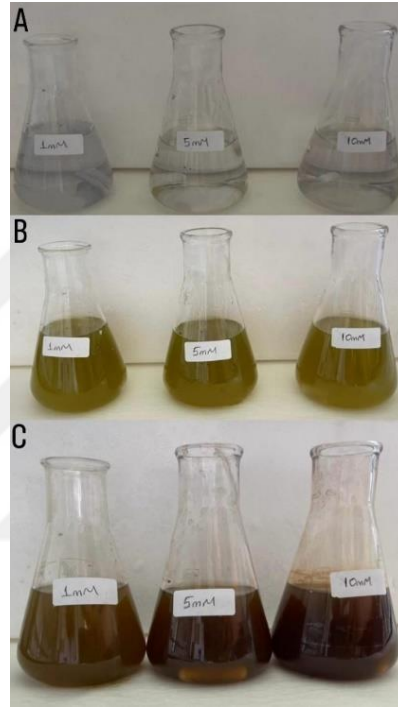
Çizelge 4.2. *E. japonica* L. yaprağı ve çekirdeğinden elde edilen ekstrelerin toplam flavonoid madde miktarları.

Ekstreler	%75 Etanol (mg/mL (QE))	%75 Metanol (mg/mL (QE))	Distile su (mg/mL (QE))
<i>E. japonica</i> L. yaprak ekstresi	30,93 ± 0,001	19,19 ± 0,003	3,93 ± 0,005
<i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstresi	18,96 ± 0,009	10,52 ± 0,011	2,42 ± 0,012

4.3 Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.3.1 Renk değişim analizi

NP eldesinde değişen renklerin makrosbik olarak yapılabilen değişim analizine ait sonuçlar Şekil 4.7’de gösterilmiştir. 1 mM, 5 mM ve 10 mM AgNO₃ çözeltilerine etanollü yaprak ekstreleri eklendiğindeki ve sentez sonrasındaki renk değişimleri verilmiştir.



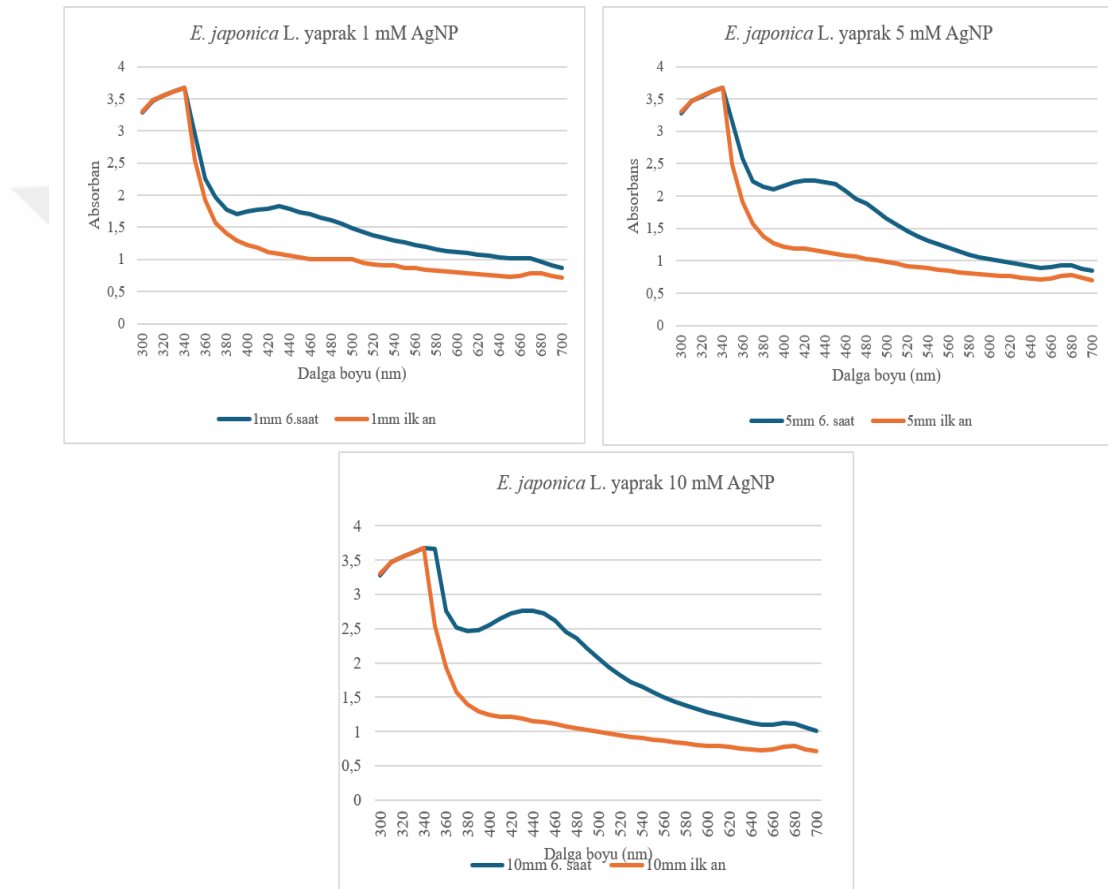
Şekil 4.7. *E. japonica* L. yaprak ekstresi ile AgNP sentezi.

Şekil 4.7’de; A: 1 mM, 5mM ve 10 mM gümüş nitrat çözeltileri, B: gümüş nitrat ve ekstrenin birleştiği ilk an ve C: sentez sonundaki görünümüleri verilmiştir.

4.3.2 UV-VIS spektroskopisi analizi

E. japonica L. yaprak ve çekirdek %75 etanol ekstresinden ile elde edilen 1 mM, 5 mM ve 10 mM AgNP’ler sentez boyunca UV-VIS spektroskopisi ile takip edilmiştir. Sentez boyunca çözeltilerden 30 dakika aralıklarla örnekler alınarak 300-700 nm aralığında ölçümleri yapılmıştır. 6. saatin sonunda renk değişiminin ve UV-VIS’deki pikin sabitlenmesiyle sentez sonlandırılmıştır. Literatürde AgNP’lerin UV-VIS ile karakterizasyonunda 400-450nm aralığında absorpsiyon bandının AgNP oluşumunu işaret ettiğini bildirmektedir (Huang vd., 2007).

E. japonica L. bitkisinin yaprağı kullanılarak elde edilen yeşil sentez aracılı AgNP'ler sentezin ilk başladığı andan itibaren bitene kadar UV-VIS spektroskopisinde 300-700 nm dalga boyları arasında absorbansları takip edilmiştir. AgNP'lerin oluşumunda 400-450 nm aralarında pik gözlemlenmesi beklenmiştir ve bu aralıklarda üç farklı konsantrasyonda pik gözlenmiştir. Her farklı konsantrasyon için üç tekrarlı analiz yapılmıştır. UV-VIS spektroskopisi ile yapılan analiz sonucunda elde edilen spektrumlar Şekil 4.8'de verilmiştir.

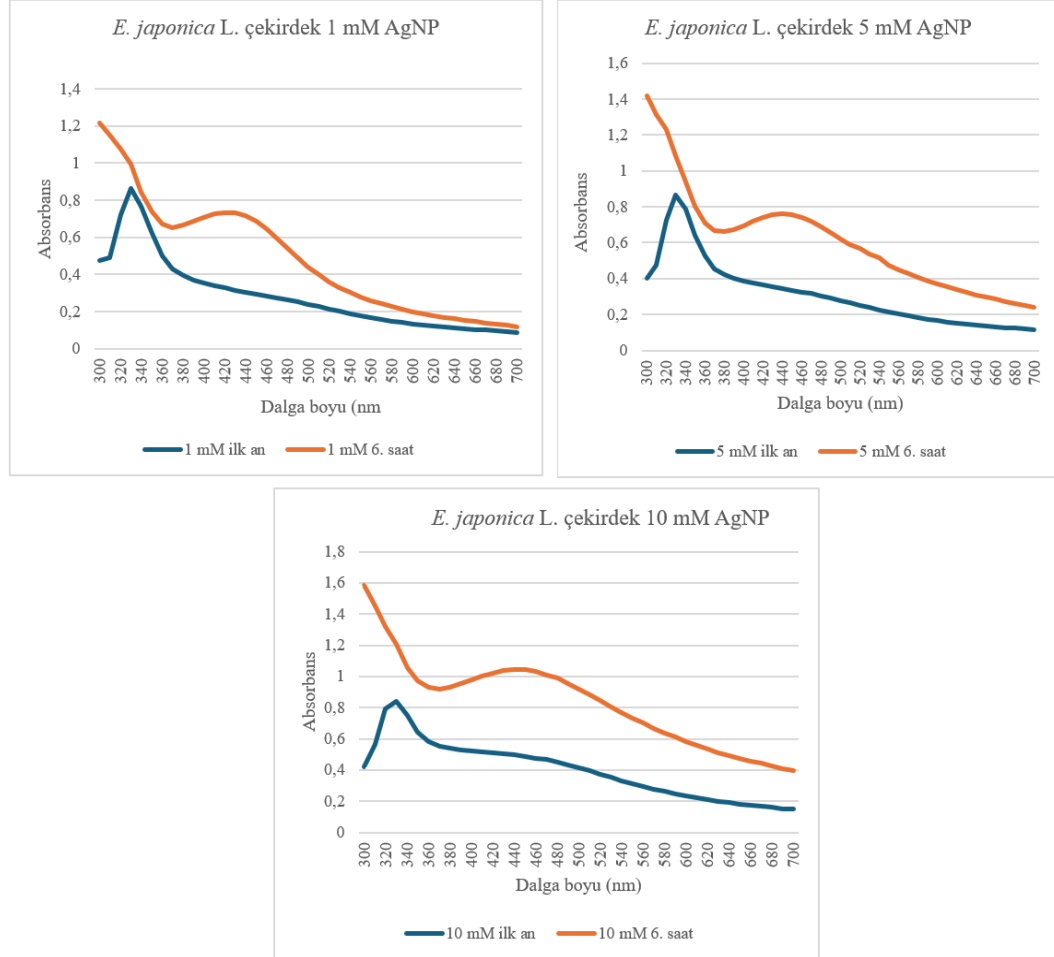


Şekil 4.8. *E. japonica* L. yaprak ekstresi 1 mM, 5 mM ve 10 mM AgNO₃ ile elde edilen AgNP'lerin UV-VIS spektroskopisi.

Yaptığımız çalışmada *E. japonica* L. yaprak AgNP'lerinden (1 mM, 5 mM ve 10 mM) elde edilen UV-VIS spektroskopisi sonuçlarında en yüksek absorbansın her üç konsantrasyonda da 430 nm olduğu gözlemlendi.

E. japonica L. bitkisinin çekirdeği kullanılarak elde edilen yeşil sentez aracılı AgNP'ler sentezin ilk başladığı andan itibaren bitene kadar UV-VIS spektroskopisinde 300-700 nm dalga boyları arasında absorbansları takip edilmiştir. AgNP'lerin

oluşumunda 400-450 nm aralarında pik gözlemlenmesi beklenmiştir ve bu aralıklarda üç farklı konsantrasyonda pik gözlenmiştir. Her farklı konsantrasyon için üç tekrarlı analiz yapılmıştır. UV-VIS spektroskopisi ile yapılan analiz sonucunda elde edilen spektrumlar Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9. *E. japonica* L. çekirdek ekstresi 1 mM, 5 mM ve 10 mM AgNO₃ ile elde edilen AgNP’lerin UV-VIS spektroskopisi.

Yaptığımız çalışmada *E. japonica* L. çekirdek AgNP’lerinden (1 mM, 5 mM ve 10 mM) elde edilen UV-VIS spektroskopisi sonuçlarında en yüksek absorbansın 1 mM AgNP için 420 nm ve 5-10 mM için 440 nm’de pik verdiği gözlenmiştir.

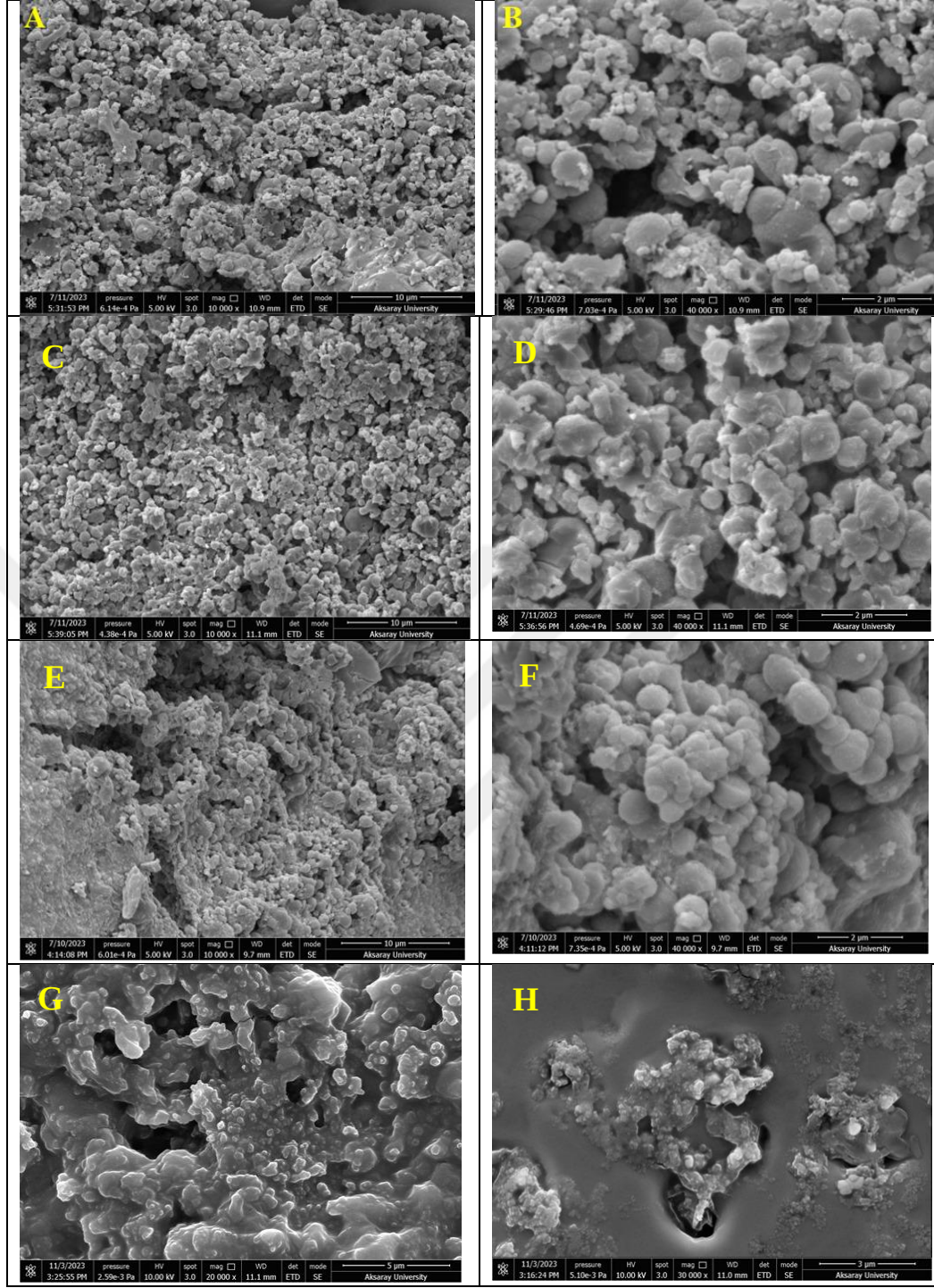
Jabir vd. (2021) yaptıkları çalışmada *E. japonica* L. kabuk distile su ekstresi ve 2 mM AgNO₃ ile elde ettikleri AgNP’lerin UV-VIS spektroskopisinde en yüksek pikin çalışmamıza benzer veriler içerdiği ve 430 nm olduğu gözlenmiştir. Yu vd. (2019) yaptıkları çalışmada ise, *E. japonica* L. yaprak distile su ekstresi ile 1 mM AgNO₃ kullanarak farklı sıcaklıklarda ve pH aralıklarının denendiği çalışmalarında oluşan

AgNP'lerin 450-490 nm aralığında absorpsiyon spektrumu gösterdiğini belirlemişlerdir. Belirtilen bu aralıklar AgNP eldemizin uygun aralıkta gerçekleştiğini dolayısıyla yaprak ve çekirdek ekstrelerinden NP sentezlendiği göstermiştir.

4.3.3 Taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscope, SEM)

Yeşil sentez ile *E. japonica* L. yaprak ve çekirdek ekstreleriyle elde ettiğimiz AgNP'lerin görünüm ve yüzey özellikleri Aksaray Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezinde (ASÜBTAM) Taramalı Elektron Mikroskobu ile belirlendi. Elde edilen AgNP'ler haricinde AgNO₃ ve yaprak ve çekirdek ekstrelerine ait görüntüler incelendi.

E. japonica L. yaprak ekstresinden sentezlenen 1 mM, 5 mM ve 10 mM AgNP'nin SEM görüntülerinde küresel şekilli oldukları saptandı. Jabir vd. (2021) *E. japonica* L. kabuk ekstrelerinden AgNP sentezlemişler ve çalışmamızdaki yaprak ekstresi verilerine benzer sonuçlar elde etmişlerdir. UV-VIS'de 430 nm de pik verdiği ve SEM görüntülerinde küresel şekilli olduğu bildirilmiştir. Yaprğa ait SEM görüntüleri Şekil 4.10'da verilmiştir.



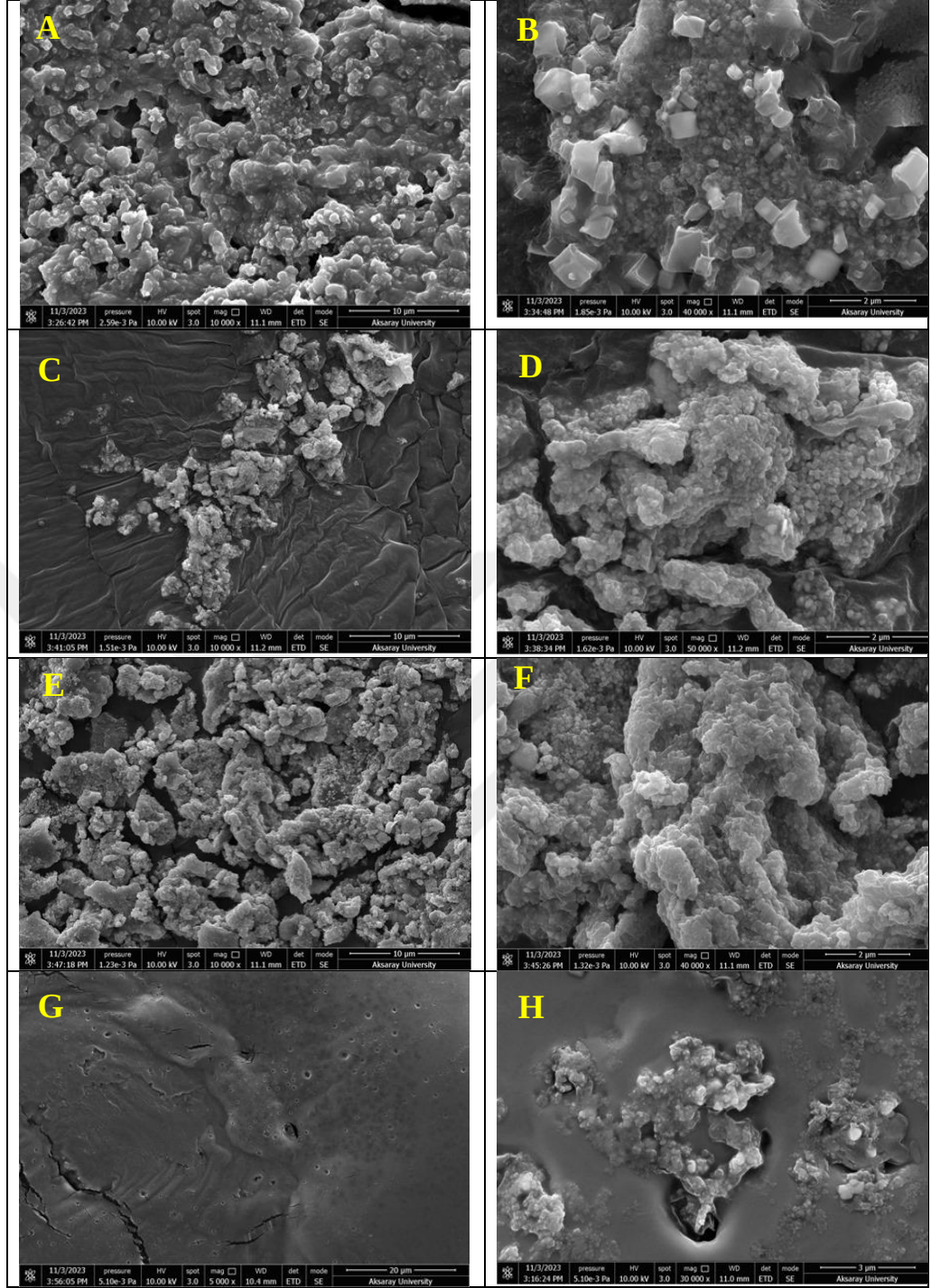
Şekil 4.10. *E. japonica* L. yaprağına ait SEM görüntüleri.

Şekil 4.10'da A ve B: 1 mM yaprak AgNP'ye ait, C ve D: 5 mM yaprak AgNP'ye ait, E ve F: 10 yaprak mM AgNP'ye ait ve G: yaprak ekstresi H: AgNO₃ ait SEM görüntüleri verilmiştir.

E. japonica L. çekirdek ekstresinden 1 mM, 5 mM ve 10 mM AgNP'nin SEM görüntülerinde kübik ve küresel şekilli oldukları saptandı. Konsantrasyon, AgNP'lerin

şeklinin belirlenmesinde etkilidir. Farklı konsantrasyonlarda küresel, üçgen veya kübik yapıda AgNP'ler oluşabilir. Yüksek konsantrasyonlarda daha fazla nükleasyon merkezi oluştuğundan, daha düzgün ve simetrik yapılar gözlenebilir (Song ve Kim, 2009). Çekirdeğe ait SEM görüntüleri Şekil 4.11'de verilmiştir.





Şekil 4.11. *E. japonica* L. çekirdeğe ait SEM görüntüleri.

Şekil 4.11’de; A ve B : 1 mM çekirdek AgNP’ye ait, C ve D: 5 mM çekirdek AgNP’ye ait, E ve F: 10 çekirdek mM AgNP’ye ait ve G: çekirdek ekstresi H: AgNO_3 ait SEM görüntüleri verilmiştir.

E. japonica L. yaprak ve çekirdeklerinden elde edilen AgNP’lerin (AgNP) şekillerindeki farklılıklar, biyolojik ekstraktların içerdiği biyomoleküllerin NP sentezi

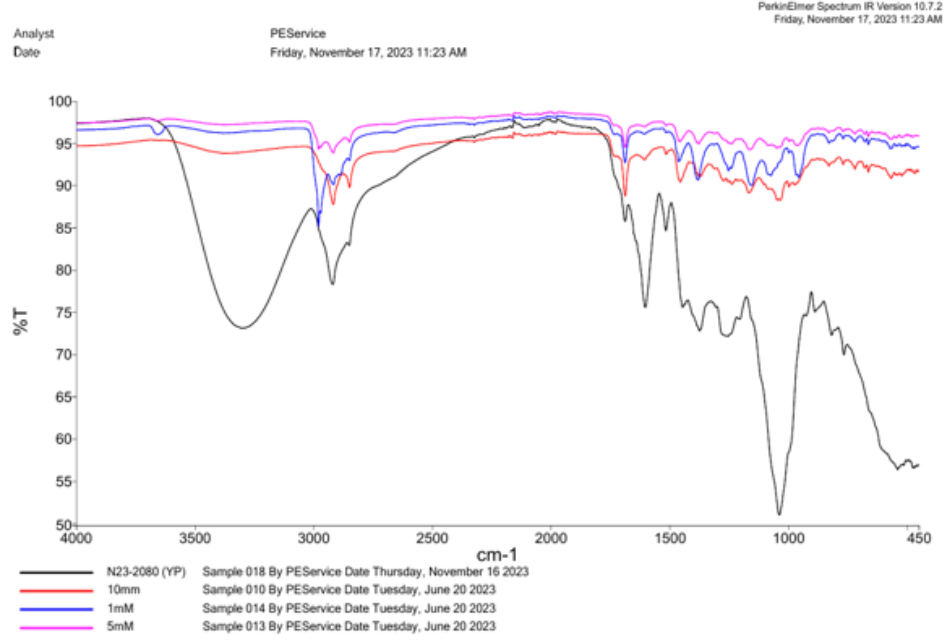
üzerindeki etkisinden kaynaklanabilir. Literatürde, bitkisel ekstraktların içerdiği polifenoller, flavonoidler ve proteinlerin NP oluşumunu yönlendirdiği gösterilmiştir. Örneğin, *Azadirachta indica* yaprak ekstraktı kullanılarak yapılan bir çalışmada, ekstraktın içerdiği flavonoid ve fenolik bileşiklerin AgNP'lerinin morfolojisini ve boyutunu etkilediği rapor edilmiştir (Ahmed vd., 2016). Benzer şekilde, *Citrus* limon kabuğu ekstraktı ile sentezlenen AgNP'lerinin şeklinin, biyomoleküllerin konsantrasyonuna ve pH'a bağlı olarak değişiklik gösterdiği bulunmuştur (İbrahim, 2015). Bu nedenle *E. japonica* L. yaprak ve çekirdeklerinden elde edilen AgNP'lerin şekillerindeki farklılıklar, her iki organın içerdiği biyomoleküllerin farklı indirgeme ve stabilizasyon mekanizmalarına sahip olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir.

Chithrani vd. (2006) yaptığı bir çalışmada, kübik ve yuvarlak şekilli altın NP'lerinin insan hücreleri üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında, yuvarlak NP'lerin hücre içi alımının daha hızlı ve toksisitesinin daha düşük olduğunu rapor etmiştir. Kübik NP'lerin ise hücre içine alımları daha yavaş olsa da belirli durumlarda, özellikle kanser tedavisi gibi yüksek reaktivite gerektiren uygulamalarda daha etkili olabildiği düşünülmektedir. Yara iyileşme testi (wound healing assay) sonuçlarımızda yapraktan elde edilen AgNP'lerin daha iyi sonuçlar göstermesinin sebebinin NP'nin yuvarlak şeklinden dolayı olduğunu düşündürmektedir.

4.3.4 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Yapılan tez çalışmamızda elde edilen yaprak ve çekirdek AgNP'lerin yapılarında bulunan bağlar, Aksaray Üniversitesi Bilimsel Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden hizmet alımı ile analiz edilmiştir. FTIR cihazında 400-4000 nm dalga boyları arasında ölçüm yapılarak titreşim verdikleri pik absorpsanları saptanmıştır.

E. japonica L. yaprak ekstresinden elde edilen AgNP'lerin FTIR analizi, hücresel etkililikleri ve potansiyel sitotoksikite mekanizmaları hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır (Şekil 4.12). Bu sonuçlar, çeşitli fonksiyonel grupların varlığını ve bu grupların biyolojik aktiviteler üzerindeki etkilerini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.12. *E. japonica* L. yaprak ekstresi ve yaprak ekstresi ile elde edilen AgNP'lerin FTIR sonuçları.

2980 cm^{-1} ve 2918 cm^{-1} pikleri, genellikle C-H bağlarının gerilme titreşimlerini temsil eder ayrıca pik alifatik hidrokarbonların varlığını gösterir. Bitki ekstrelerindeki alkoller veya yağ asitlerinin alifatik C-H grupları ile değerlendirilir (Khan vd., 2018).

2851 cm^{-1} 'de bulunan pik, C-H gerilme titreşimlerini işaret eder. Özellikle metilen gruplarının ($-\text{CH}_2$) varlığını gösterir (Zhao vd., 2018).

1461 cm^{-1} ve 1455 cm^{-1} pikleri, C-H eğilme titreşimlerinin varlığını gösterir ve özellikle bitkisel yağ asitlerinin ve alkol gruplarının varlığına işaret edebilir (Sharma vd., 2012).

1688 cm^{-1} 'de bulunan pik, genellikle karbonil gruplarının gerilme titreşimlerini ($\text{C}=\text{O}$) gösterir. Bu, bitki özütündeki karbonil grubu içeren bileşikler ile ilişkilendirilir (Nafady vd., 2020).

1155 cm^{-1} ve 1162 cm^{-1} pikleri, C-O bağlarının varlığını gösterir ve ester veya alkol fonksiyonel gruplarının bulunabileceğini işaret eder (İbrahim vd., 2022).

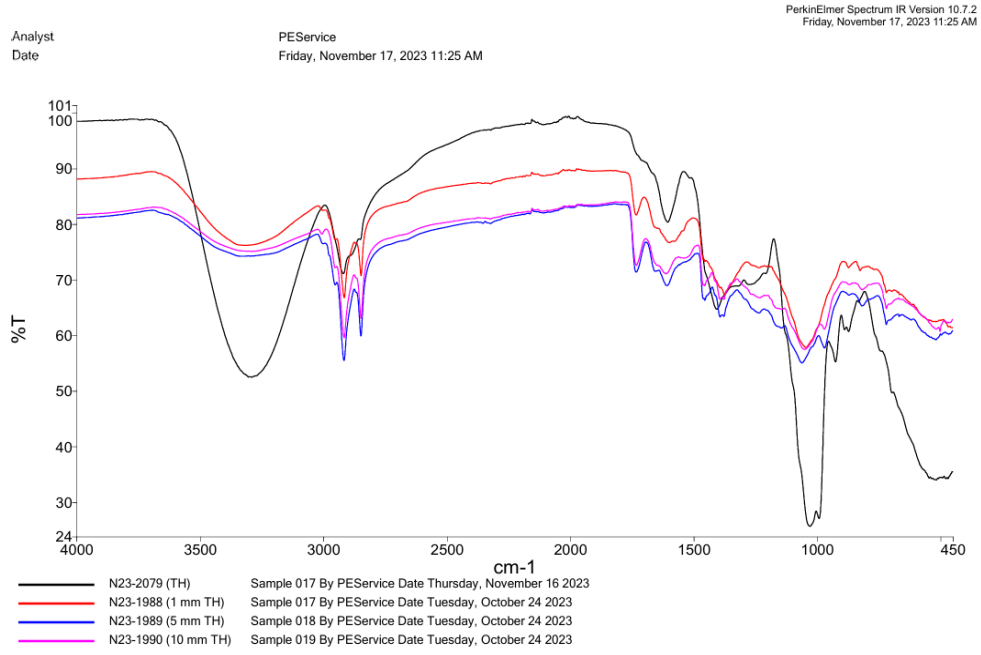
1047 cm^{-1} 'de bulunan pik, alkoller veya eterlerin varlığına işaret edebilir. Ayrıca, polisakkaritlerin veya glikozitlerin varlığıyla ilişkili olabilir (Nair vd., 2016).

FTIR analizi ile *E. japonica* L. yaprak ekstresinden elde edilen AgNP'lerin yüzeyinde çeşitli organik bileşiklerin varlığı belirlenmiştir. Bu bileşikler, AgNP'lerin sentezinde rol oynayabilir ve gümüş iyonlarının indirgendiği süreçte etkin olabilir. Elde edilen sonuçlar, bitki özütlerinin AgNP sentezinde önemli bir kaynak olduğunu vurgulamaktadır.

E. japonica L. bitkisine ait yaptığımız yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizlerine ait literatür taramasında, *E. japonica* L. yapraklarının fenolik bileşenler açısından oldukça zengin olduğu bildirilmiştir. Bu bitkinin yapraklarında 25 farklı fenolik bileşen karakterize edilmiş ve bu bileşenler yüksek antioksidan ve antiproliferatif özellikler sergilemiştir. Yaprak ekstresinin özellikle kanser hücre hatları (MCF-7, Caco-2, HT-29 ve U87MG) üzerinde önemli kemopreventif etki gösterdiğini, bu şekilde polifenolik bileşenlerin içeriklere kolayca bağlandığını belirlemişlerdir. Bu özellikler, *E. japonica* L. yapraklarının antioksidan etkisini artırarak, gıda takviyesi ve farmasötik ürünlerde kullanım potansiyelini desteklemektedir (Žurek vd., 2023).

FTIR analizindeki elde ettiğimiz bulgular (2980, 2918, 2851 cm^{-1} alifatik C-H, 1688-1687 cm^{-1} karbonil C=O ve 1155-1047 cm^{-1} C-O-C titreşimleri) *E. japonica* L. yaprak ekstrelerinin literatürdeki HPLC sonuçlarıyla uyum içindedir. HPLC'de tespit edilen fenolik bileşikler, flavonoidler ve polifenoller yapısal olarak bu FTIR sinyallerini doğrulamaktadır. Bu yapılar da ekstrenin antikanser ve biyolojik aktivitesine katkıda bulunan bileşenlerin varlığını destekler niteliktedir (Žurek vd., 2023).

E. japonica L. çekirdek ekstresinden elde edilen AgNP'lerin FTIR analizi, bu AgNP'lerin biyolojik aktiviteleri ve potansiyel sağlık yararları hakkında önemli bilgiler sunmaktadır (Şekil 4.13). FTIR sonuçları, çeşitli fonksiyonel grupların varlığını göstererek, bu grupların potansiyel etkilerini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.13. *E. japonica* L. çekirdek ekstresi ve çekirdek ekstresi ile elde edilen AgNP'lerin FTIR sonuçları.

FTIR analizinde elde edilen 3294 cm^{-1} piki, O-H bağlarının varlığını göstererek, alkol veya fenol gruplarının bulunduğunu ortaya koymaktadır. Bu bileşikler, antioksidan aktiviteleri ile bilinir ve hücrel sağkalımı artırabilir. Özellikle, hidrojen bağları içeren bileşiklerin, hücrelerin oksidatif strese karşı savunmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Sharma vd., 2012).

2849 cm^{-1} ve 2918 cm^{-1} pikleri, alifatik hidrokarbonların varlığını işaret etmektedir. Bu bileşikler, hücre zarının stabilitesini artırabilir ve hücrel metabolizmayı olumlu yönde etkileyebilir (Nafady vd., 2020). Alifatik bileşiklerin, hücrel işlevlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

1732 cm^{-1} 'de bulunan pik, karbonil grubu ve karboksilik asit piklerine işaret etmektedir. Karboksilik asit ve karbonil grubu ROS ile etkileşime girerek sitotoksik etkiler oluşturabilir. Bu grup, belirli konsantrasyonlarda toksik etki yaratabilirken, düşük konsantrasyonlarda hücrel proliferasyonu destekleyebilir (Zhao vd., 2018). MTT testleriyle elde edilen veriler bu durumun geçerliliğini desteklemektedir.

1613 cm^{-1} 'de bulunan pik, benzen halkasının karakteristik piki olup, aromatik bileşiklerin varlığını göstermekte ve bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri artırma potansiyeli taşıdığı bilinmektedir. Özellikle flavonoidler, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri ile dikkat çekmektedir (Nair vd., 2016). Bu bağlamda, FTIR ve MTT sonuçları arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak FTIR analizi, *E. japonica* L. çekirdek ekstresinden elde edilen AgNP'lerin zengin kimyasal yapısını ve potansiyel biyolojik aktivitelerini ortaya koymaktadır. Bu AgNP'lerin sağlık uygulamalarındaki potansiyel faydaları hem belirli bileşiklerin varlığından hem de bu bileşiklerin etkileşimlerinden kaynaklanmaktadır.

E. japonica L. çekirdeği üzerine yapılan literatürdeki çeşitli HPLC analizleri, bu bitkinin çekirdek ekstresinden önemli miktarda fenolik bileşikler ve flavonoidlerin bulunduğunu göstermektedir. Özellikle rutin ve klorojenik asit gibi bileşikler, antioksidan ve anti-inflamatuar aktiviteleri ile bilinir ve HPLC analizlerinde sıkça tespit edilmektedir. Bu bileşikler, Ayrıca yapılan çalışmalarda triterpenoid bileşikler de bu çekirdekten elde edilen ekstraktlarda bulunmuş olup, hücre proliferasyonunu baskılayıcı ve antioksidan özellikleri nedeniyle sağlık açısından önemlidir (Yokota vd., 2004; Zhang vd., 2016). Çekirdek ekstresinde bulunan bu bileşiklerin ROS temizleyici etkilerinin olduğu literatürde sıkça vurgulanmıştır ve bu açıdan *E. japonica* L. çekirdeklerinin biyolojik olarak ne kadar değerli olduğunu ortaya koymaktadır.

Literatürdeki HPLC analizleri, *E. japonica* L. çekirdeklerinde apigenin, luteolin ve Quersetin gibi flavonoidlerin yanı sıra polifenollerin varlığını ve konsantrasyonlarını bildirmektedir. FTIR analizinden elde ettiğimiz bulgular literatürdeki HPLC analizleriyle karşılaştırıldığında, bu bileşiklerin FTIR ile tespit edilen fonksiyonel grupların varlığı ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

4.3.5 Zeta potansiyeli (Elektriksel yükü)

E. japonica L. yaprak ve çekirdek ekstraktları ile sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyeli (elektriksel yükü) ve boyutları zeta analizi ile belirlenmiştir. Zeta potansiyeli parçacığın yüzeyinde bulunan yükünü (katyonik, anyonik veya nötr) tahmin etmek için kullanılan bir analiz yöntemidir.

Zeta potansiyelinin negatif değere sahip olması AgNP'ler arası kümelenmenin olmadığını ve kararlı bir yapıda oluşunu göstermektedir. AgNP'ler tarafından sergilenen negatif yük, bitki ekstralerinden gelen fitokimyasallar ile sentezlenen AgNP'lerin yüzeylerinin kaplandığını gösterir. Zeta potansiyeli 0 mV ve 0 mV'ye yakın olan partiküllerin kararlılıkları düşük olduğu için agregasyon ve sedimentasyon eğilimindedirler bunun yanı sıra koloidal çözelti ise yüksek pozitif (> +30 mV) veya negatif (< -30 mV) zeta potansiyeli gösteriyorsa partiküller birbirlerini iterek daha iyi dağılım gösterirler (Budama-Kilinc, 2019). Çizelge 4.3'te AgNP'lerin zeta potansiyel değeri ile kararlılığı arasındaki ilişki verilmiştir.

Çizelge 4.3. AgNP'lerin zeta potansiyel değeri ile kararlılığı arasındaki ilişki (Ateş, 2018).

Zeta değeri	Nanopartiküllerin kararlılığı
0-5 mV	Partiküller kümeleşme veya bir araya gelme eğilimi sergilerler
5-20 mV	Partiküller minimal düzeyde kararlıdır
20-40 mV	Partiküller orta düzeyde kararlıdır
40m +mV	Partiküller son derece kararlıdır

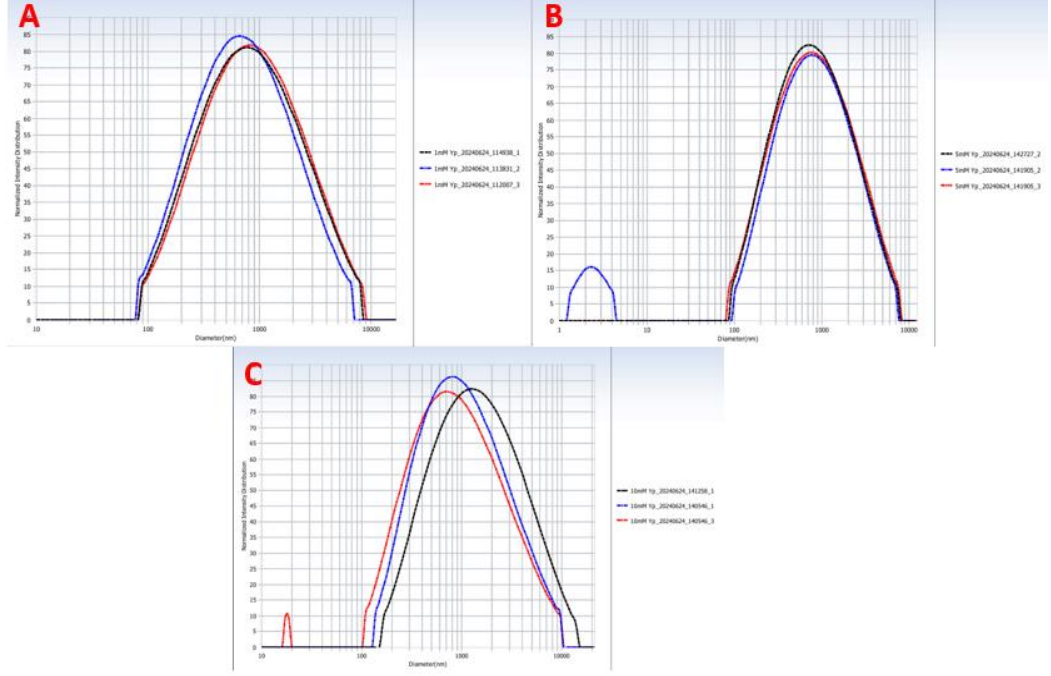
E. japonica L. yaprak ekstresi ile elde edilen 1 mM, 5 mM ve 10 mM AgNP'lerin zeta potansiyel ve zeta boyut analizleri Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. *E. japonica* L. yaprak ekstresi ile elde edilen AgNP'lerin zeta potansiyeli sonuçları.

AgNP	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)
1 mM yaprak AgNP	-98,31 mV	730,9 nm
5 mM yaprak AgNP	455 mV	372 nm
10 mM yaprak AgNP	24,63 mV	719 nm

Sonuçlar Çizelge 4.3 ile değerlendirildiğinde, *E. japonica* L. yaprak ekstresi ile elde edilen AgNP'lerin literatüre uygun 10 ila 1000 nm arasındaki boyutlarda olduğu fakat 1 mM ve 10 mM AgNP'nin partikül büyüklüklerinin oldukça fazla olması AgNP'lerin birleştiğini gösterirken, 5 mM AgNP'nin küçük partikül boyutu daha iyi dağıldığını göstermektedir. 1 mM AgNP yüksek negatif potansiyeli kararlı olduğunu gösterirken,

10 mM AgNP düşük zeta potansiyeli nedeniyle kararsız yapı sergiler. Hem zeta potansiyeli hem de partikül boyutu açısından değerlendirildiğinde dengeli ve kararlı konsantrasyonun 5 mM olduğu gözlenmiştir. (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *E. japonica* L. yaprak ekstresinden elde edilen AgNP'lerin zeta analiz spektrumları.

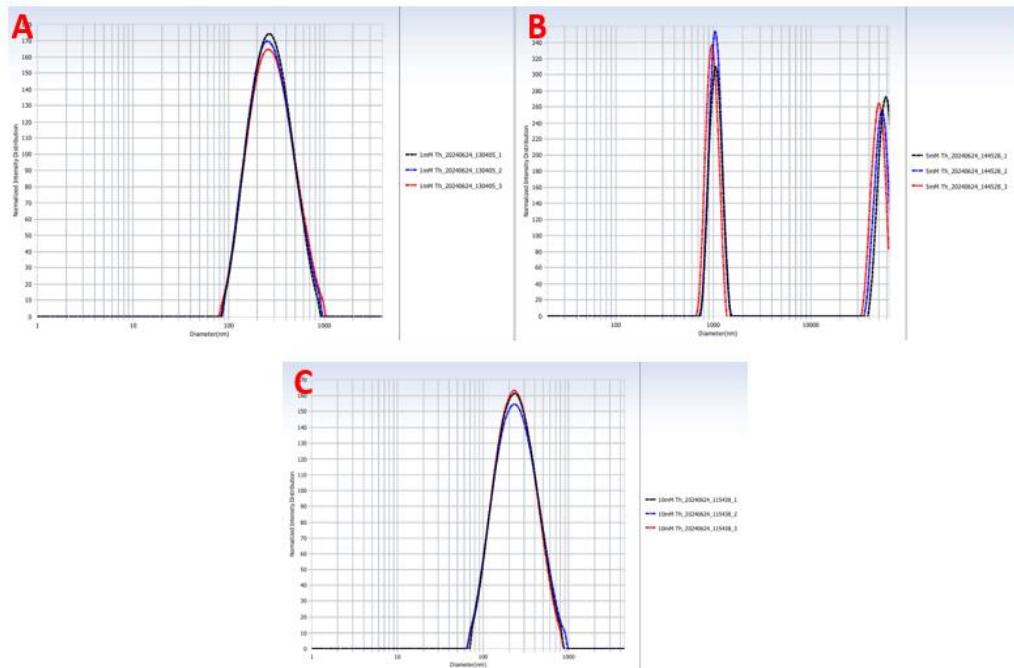
Şekil 4.14'te; A: 1 mM AgNP, B: 5 mM AgNP ve C: 10 mM AgNP'ye ait zeta görüntüleri verilmiştir.

E. japonica L. çekirdek ekstresi ile elde edilen 1 mM, 5 mM ve 10 mM AgNP'lerin zeta potansiyel ve zeta boyut analizleri Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.5. *E. japonica* L. çekirdek ekstresi ile elde edilen AgNP'lerin zeta potansiyeli sonuçları.

AgNP	Zeta potansiyeli (mV)	Partikül boyutu (nm)
1 mM çekirdek AgNP	22,88 mV	244,4 nm
5 mM çekirdek AgNP	-12,65 mV	218,6 nm
10 mM çekirdek AgNP	-159.79 mV	229,5 nm

Sonuçlar Çizelge 4.3'e göre değerlendirildiğinde, *E. japonica* L. çekirdek ekstresi ile elde edilen AgNP'lerin de literatüre uygun 10 ila 1000 nm arasında boyutlarda olduğu gözlenmiştir. Tüm konsantrasyonların partikül boyutunun küçük olduğu gözlenmiştir. Zeta potansiyeli açısından değerlendirildiğinde 1 mM AgNP zeta potansiyeli açısından sınırlı kararlılık gösterir fakat partikül boyutunun küçük olması zamanla kararlılığın bozulabileceğini göstermektedir. 5 mM AgNP'nin zeta potansiyelinin düşük olması partiküllerin kararlı olmadığını gösterir. 10 mM AgNP ise son derece yüksek negatif potansiyele sahip olduğu için son derece kararlı yapı sergilemesi nedeniyle en iyi konsantrasyon olarak değerlendirilebilir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *E. japonica* L. çekirdek ekstresinden elde edilen AgNP'lerin zeta analiz spektrumları.

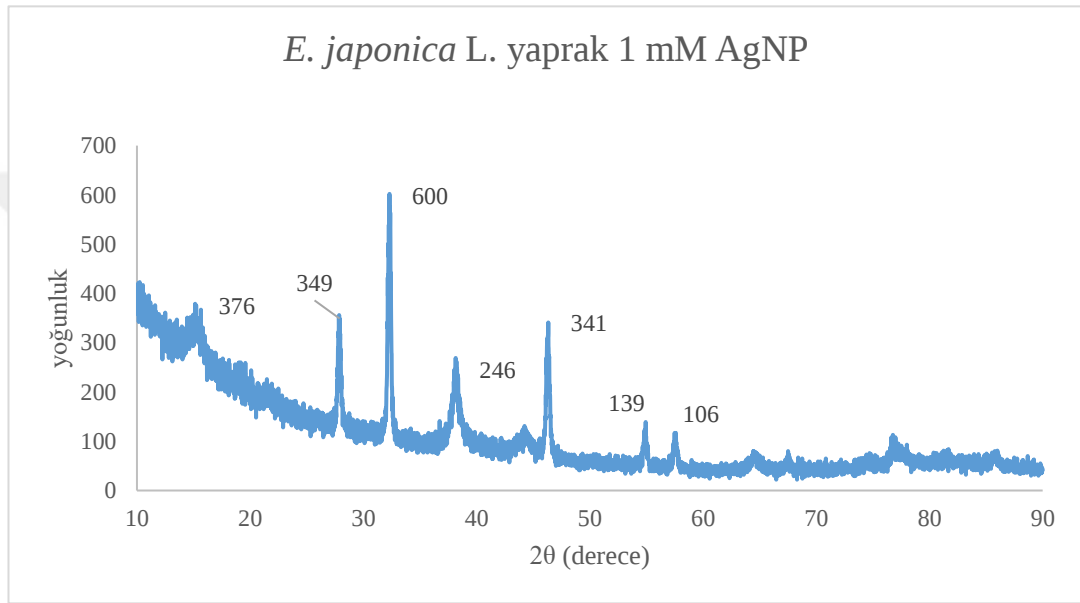
Şekil 4.15'te; A: 1 mM AgNP, B: 5 mM AgNP ve C: 10 mM AgNP ye ait zeta görüntüleri verilmiştir

Zeta potansiyeli, önemli ölçüde daha düşük negatif yüke sahip olan AgNP'ler hücrelere girişi daha kolay olmaktadır (Maddinedi vd., 2017; Tavakoli vd., 2016). Ancak partikül boyutları da bu kararlılığı etkilemektedir. Bu çalışmada, AgNP'lerin zeta potansiyeli bakımından 5 mM yaprak AgNP ve 10 mM çekirdek AgNP konsantrasyonlarda en iyi etkiye sahip olduğu gözlenmiştir.

4.3.6 X-ışını kırınım (XRD) analizi

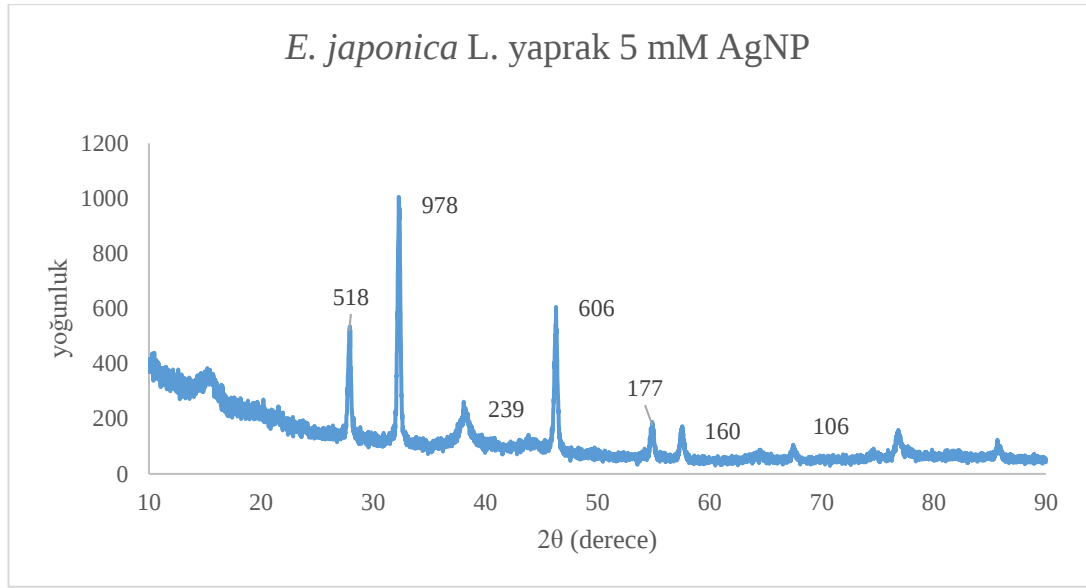
E. japonica L. yaprak ekstresi kullanılarak sentezlenen AgNP'ler (AgNP), XRD analizi ile karakterize edilmiştir.

E. japonica L. yaprak 1 mM AgNP XRD sonucunda $38,220^\circ$ açısı AgNP'lerin (111) düzlemi ile örtüşmektedir (Şekil 4.16). Bu pik, yüksek kristalinite göstermekte ve *E. japonica* L. yaprak kullanılarak elde edilen AgNP'lerin düzenli bir yapıya sahip olduğunu belirtmektedir (Nafady vd., 2020).



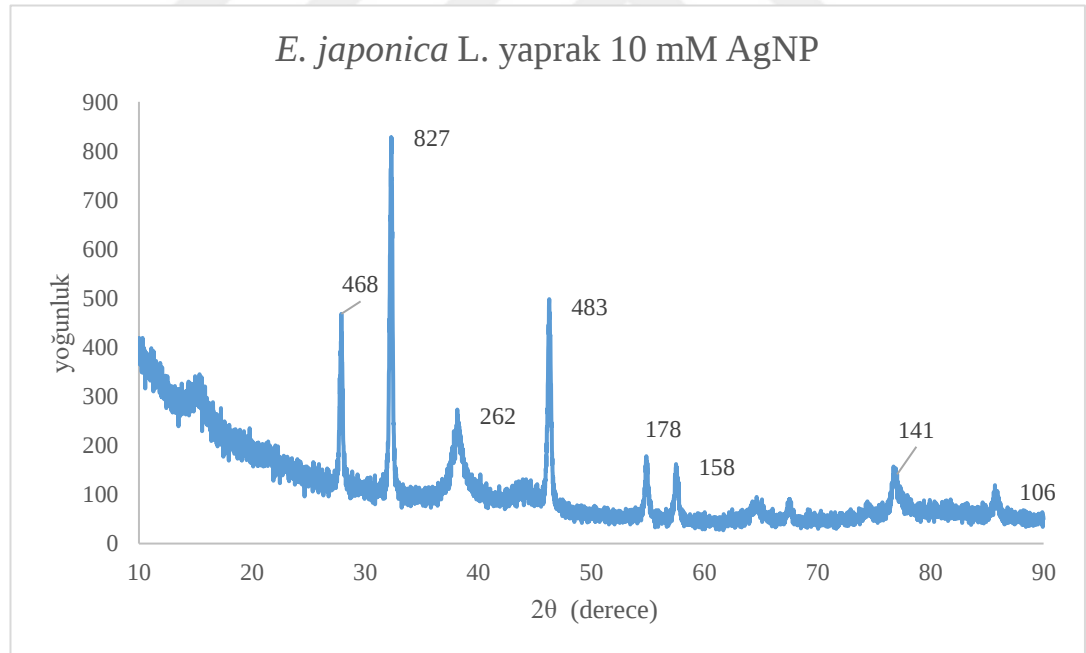
Şekil 4.16. *E. japonica* L. yaprak 1 mM AgNP XRD grafiği.

E. japonica L. yaprak 5 mM AgNP 1 mM'ye göre daha fazla belirginlik göstermektedir (Şekil 4.17). $38,246^\circ$ açısı yine AgNP'lerin (111) düzlemi ile örtüşmektedir ve daha yüksek pik yoğunlukları, bu örneğin daha iyi bir kristal yapıya sahip olduğunu göstermektedir (Zhang vd., 2015). Ayrıca, $67,448^\circ$ gibi ek pikin varlığı, farklı kristal fazların veya daha büyük AgNP'lerin varlığını gösterebilir.



Şekil 4.17. *E. japonica* L. yaprak 5 mM AgNP XRD grafiği.

E. japonica L. yaprak 10 mM AgNP daha geniş pikler göstermektedir (Şekil 4.18). Dolayısıyla bu NP boyutunun heterojen olduğuna işaret edebilir (Sharma vd., 2012). 38,181° açısı da gümüşün (111) düzlemiyle örtüşmektedir.



Şekil 4.18. *E. japonica* L. yaprak 10 mM AgNP XRD grafiği.

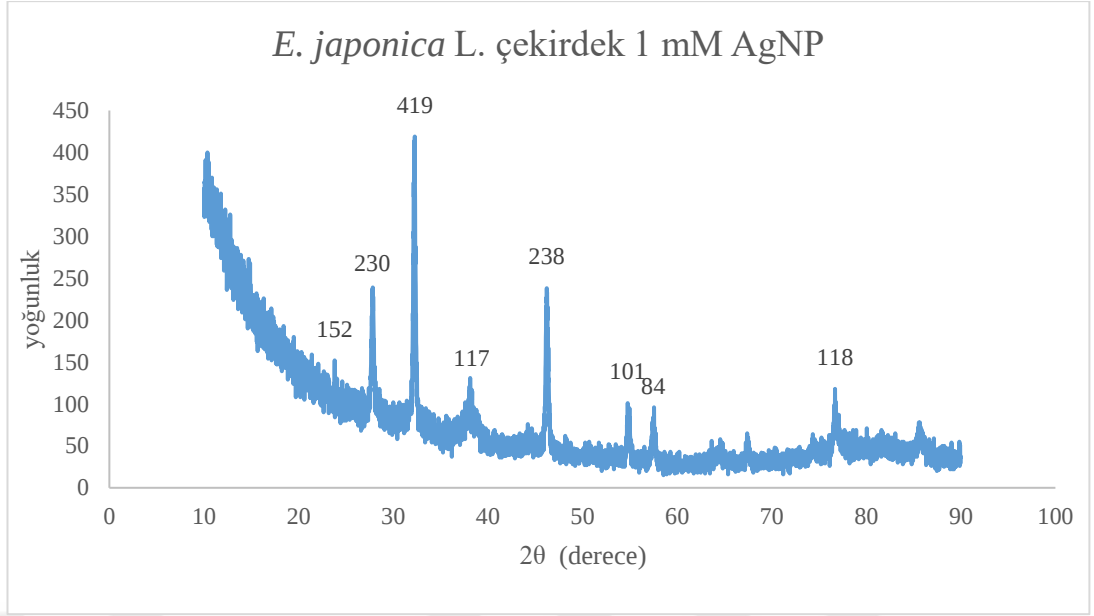
Sonuç olarak, *E. japonica* L. yaprak ekstresi kullanılarak sentezlenen AgNP'ler, farklı XRD sonuçları ile karakterize edilmiştir. 1 mM ve 5 mM'de belirgin kristal yapılar gözlemlenirken, 10 mM setin daha geniş pikleri, heterojen bir yapı veya düşük kristalizasyonu göstermektedir. Özellikle 5 mM yaprak AgNP 978'de verdiği yüksek kristalinite ve düzenli olduğunu gösterir.

Elde ettiğimiz XRD sonuçları literatürdeki benzer çalışmalarla da örtüşmektedir. Sharma vd. (2012) çalışmasında, *Azadirachta indica* yaprak ekstraktı ile sentezlenen AgNP’lerde de daha yüksek konsantrasyonlarda geniş XRD pikleri gözlenmiştir. Böylece yüksek konsantrasyonlarda NP boyutunda heterojenliğe yol açabileceğini ve kristal yapının bozulabileceğini bildirmişlerdir. Gopinath vd. (2013) yaptıkları çalışmada, *Aloe vera* ekstraktı kullanarak sentezledikleri AgNP’lerin de düşük konsantrasyonlarda daha düzenli ve kristalize yapılar sergilediğini, yüksek konsantrasyonların daha geniş ve heterojen piklerle sonuçlandığını raporlamışlardır.

5 mM konsantrasyonunda elde edilen AgNP’lerinin yüksek kristaliniteye sahip olması, literatürde *Ocimum sanctum* (Tulsi) yaprağı kullanılarak sentezlenen AgNP’lerinde de rapor edilmiştir (Kalpana ve Devi, 2018). Bu çalışmada da 5 mM civarındaki konsantrasyonlar, dar ve belirgin XRD pikleri ile yüksek kristaliniteyi işaret etmektedir. Ayrıca Krishnaraj vd. (2010), *Acalypha indica* bitkisi ile sentezledikleri AgNP’lerinde de 5 mM konsantrasyonunun düzenli yapılar sunduğunu, fakat daha yüksek konsantrasyonlarda kristalin yapının bozulduğunu ve geniş piklerin ortaya çıktığını belirtmişlerdir.

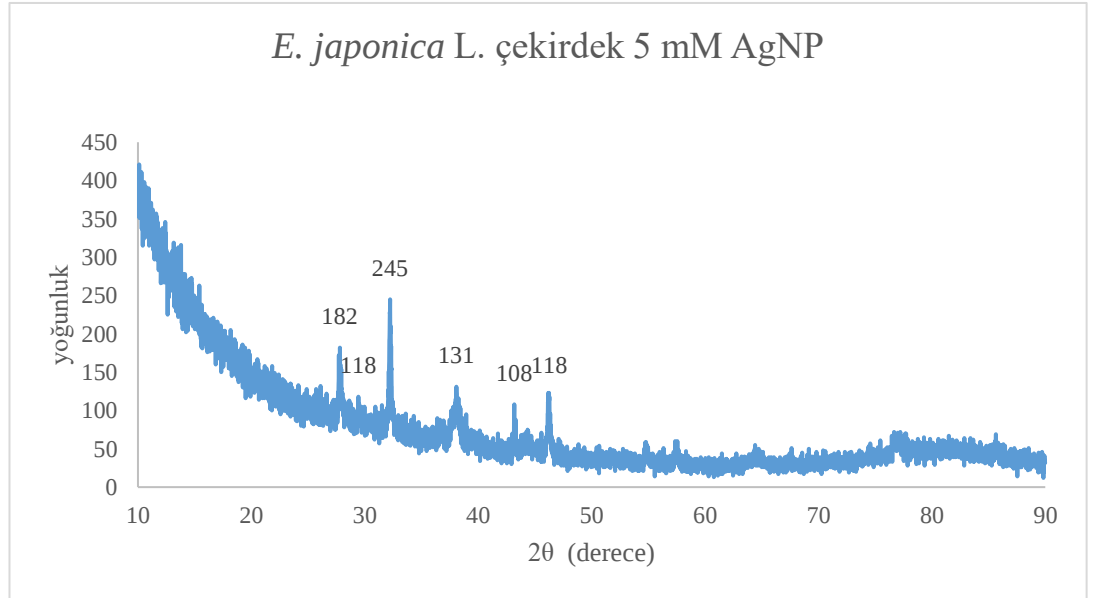
E. japonica L. çekirdek ekstresi ile hazırladığımız 1 mM, 5 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda AgNP sentezleri XRD analizi ile karakterize edilmiştir.

E. japonica L. çekirdek 1 mM AgNP XRD sonucunda belirgin pikler gözlemlenmiş (Şekil 4.19) ve özellikle 38,299° açısı gümüşün (111) düzlemi ile örtüşmektedir. Piklerin yoğunluğu ve keskinliği, yüksek kristalinite göstermektedir (Zhang vd., 2015).



Şekil 4.19. *E. japonica* L. çekirdek 1 mM AgNP XRD grafiği.

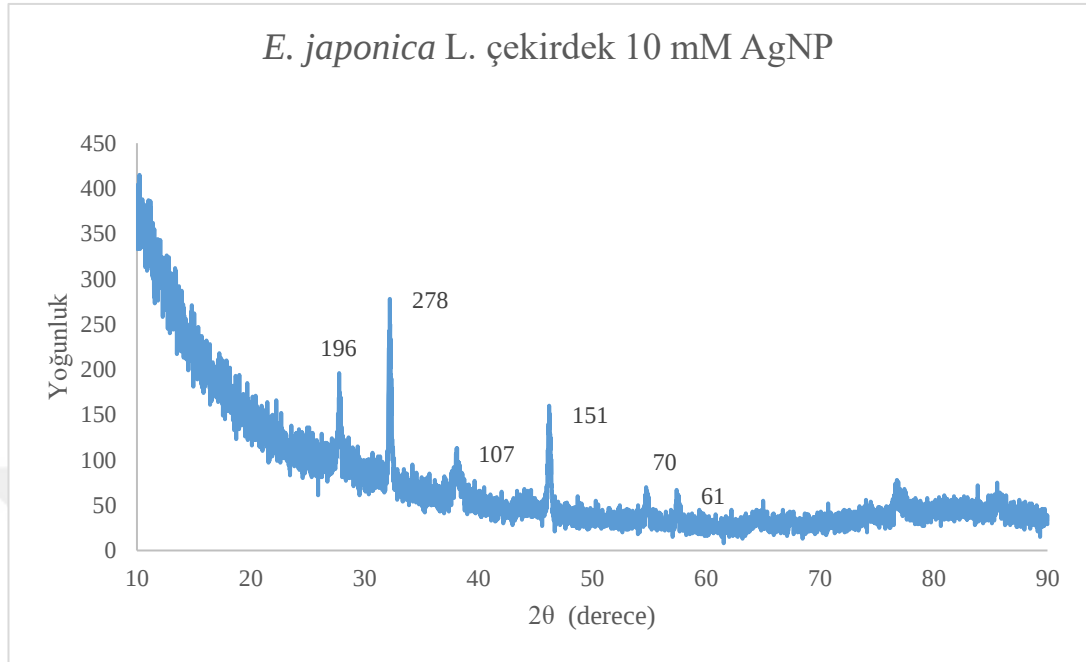
5 mM konsantrasyonunda, 1 mM'ye göre daha belirgin pikler gözlemlenmiştir (Şekil 4.20). 38,070° açısı, AgNP'lerin (111) düzlemiyle örtüşmekte ve daha yüksek kristalinite seviyeleri sunmaktadır. Piklerin yoğunluğu, 1 mM'a göre artış göstermektedir; bu da daha fazla gümüş iyonunun, NP oluşumunu desteklediğini işaret etmektedir (İbrahim vd., 2020).



Şekil 4.20. *E. japonica* L. çekirdek 5 mM AgNP XRD grafiği.

E. japonica L. çekirdek 10 mM AgNP'de elde edilen pikler, önceki iki konsantrasyona göre daha belirgin ve keskin olup, yüksek kristalinite ve büyük partikül boyutlarını göstermektedir (Şekil 4.21). Özellikle 38,023° açısı, yine gümüşün (111) düzlemi ile

örtüşmektedir. Bu, yüksek konsantrasyonların NP büyümesini teşvik ettiğini ve daha iyi kristal yapı sağladığını göstermektedir (Nafady vd., 2020).



Şekil 4.21. *E. japonica* L. çekirdek 10 mM AgNP XRD grafiği.

Sonuç olarak, *E. japonica* L. çekirdek ekstresi kullanılarak sentezlenen AgNP'ler, konsantrasyona bağlı olarak farklı kristal yapılar ve boyutlar göstermektedir. Daha yüksek konsantrasyonların (5 mM ve 10 mM) daha iyi kristalinite belirgin NP boyutları sunduğu, düşük konsantrasyonun (1 mM) ise daha az belirgin ve dağınık yapılar gösterdiği gözlenmiştir. Dhoondia ve Chakraborty (2012), *Azadirachta indica* (Neem) yaprak ekstraktı ile sentezledikleri AgNP'lerde yüksek konsantrasyonların daha iyi kristaliniteye yol açtığını ve NP'lerin büyüklüğünün arttığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Birla vd. (2013), *Coriandrum sativum* yaprak ekstraktı ile sentezledikleri AgNP'lerde yüksek konsantrasyonların daha belirgin XRD pikleri oluşturduğunu gözlemlemişlerdir. Literatürdeki bulgular, bitki ekstreleri ile NP sentezinde konsantrasyonun önemli bir rol oynadığını vurgulamaktadır (Sharma vd., 2012). Bu çalışmalara paralel olarak çalışmamızda da *Eriobotrya japonica* L. çekirdek ekstraktı ile sentezlenen AgNP'lerde de yüksek konsantrasyonların daha düzenli ve kristalin yapılar oluşturduğu gözlenmiştir.

4.4 Antikanser Aktivite Sonuçları

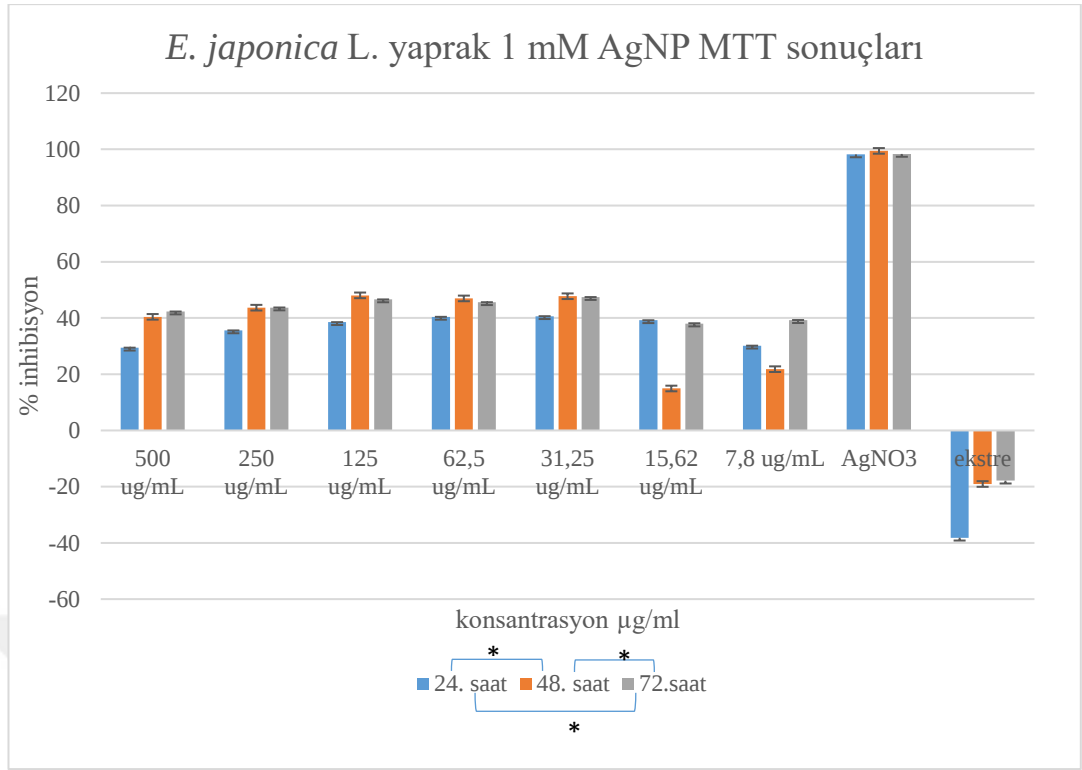
4.4.1 MTT sonuçları

Bu çalışmada *E. japonica* L. etanol yaprak ve çekirdek ekstraktları ile elde edilen AgNP'lerin sitotoksik etkisi, MTT testi ile kolorektal kanser hücre hattı olan HT-29 hücrelerinin canlılığı belirlenerek gerçekleştirildi. Hücrelere yaprak ve çekirdek ekstraktları ile bu ekstraktlardan elde edilen 1 mM, 5mM ve 10 mM AgNP'ler 24, 48 ve 72 saatlik düzende uygulama yapıldı. Her grubun ELİSA cihazı yardımıyla spektrofotometrik olarak absorbansları ölçülerek % inhibisyon oranları karşılaştırıldı. Bu veriler ile AgNP'lerin hücre üzerindeki potansiyel toksik etkileri ve zamanla değişen etkileri araştırıldı.

4.4.2. *E. japonica* L. yaprak ekstresi ve yaprak ekstresinden elde edilen AgNP'lerin MTT testi sonuçları

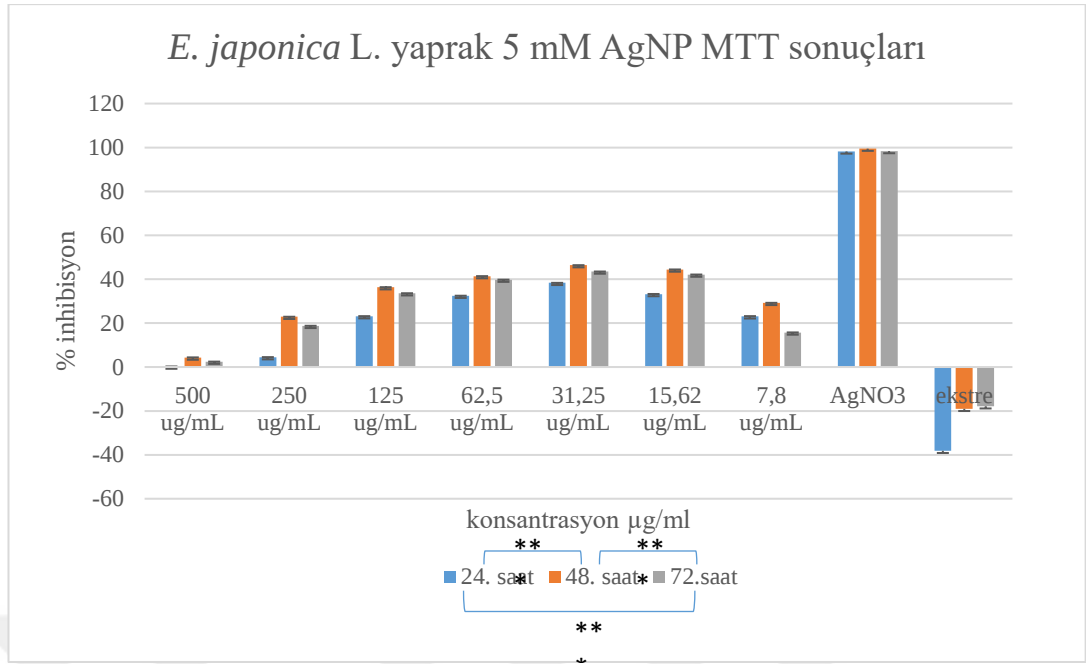
E. japonica L. etanol yaprak ekstresinden elde edilen 1 mM, 5 mM ve 10 mM AgNP'ler 500, 250, 125, 65.5, 31.25, 15.62, ve 7.8 µg/mL konsantrasyonlarda analiz gerçekleştirildi. Kontrol olarak uygulama yapılmamış hücreler (hücre+besiyeri) kullanıldı. AgNO₃ ve etanol yaprak ekstresinin sitotoksik etkisi de AgNP konsantrasyonları gibi kontrole karşı değerlendirilerek belirlendi.

Elde edilen MTT sonuçlarında 1 mM yaprak AgNP'ler (Şekil 4.22); 24. saatte %38,52, 48. saatte %48.06 ve 72. saatte %46.61 gibi oranlar gözlenmiştir. Burada, 48. saatten sonra % inhibisyon oranının azalma göstermesi, hücrelerin AgNP'lere karşı bir adaptasyon sürecine girdiğiyle ilişkilendirilebilir. Bu sonuçlar hücrelerin stres yanıtı olarak mekanizmalarını değiştirdiğini veya AgNP'lerin etkisini azaltabilecek koruyucu mekanizmalar geliştirdiğini gösterebilir (Zhang vd., 2022).



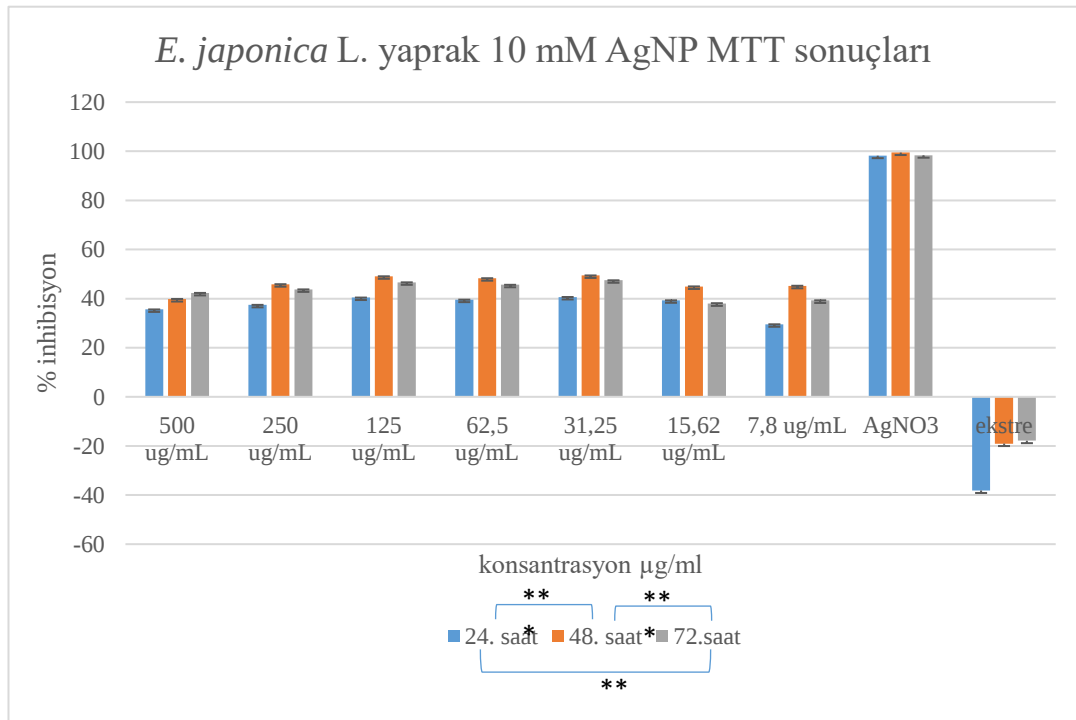
Şekil 4.22. *E. japonica* L. yaprak ekstresi ile elde edilen 1 mM AgNP'lerin MTT sonuçları (*p<0,05 ve **p<0,01).

5 mM yaprak AgNP'ler (Şekil 4.23) 48.saatte %41.39 gibi bir inhibisyon oranı ile belirgin bir etki göstermesine rağmen, 72. saatte %39.78'e düşmesi dikkat çekicidir. Bu da, AgNP'lerin zamanla hücrelerde yarattığı etkiyi azaltarak tolerans gelişimine yol açabileceğini göstermesiyle ilişkilendirilmiştir (Kumar vd., 2020).



Şekil 4.23. *E. japonica* L. yaprak ekstresi ile elde edilen 5 mM AgNP'lerin MTT sonuçları (**p<0,001).

10 mM yaprak AgNP'ler (Şekil 4.24) en yüksek inhibisyon oranını 48. saatte %49.07 olarak göstermişlerdir. Böylece 10 mM AgNP'nin hücre üzerindeki etkisini uzun süre sürdürebilme potansiyeli olduğu görülmektedir.



Şekil 4.24. *E. japonica* L. yaprak ekstresi ile elde edilen 10 mM AgNP'lerin MTT sonuçları (**p<0,01 ve ***p<0,001).

E. japonica L. yaprak ekstresi ile elde edilen AgNP'ler kontrol grupları ile kıyaslandığında (Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24), yaprak ekstresinin HT-29 kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkisi yok iken AgNP formunda olan 1 mM, 5 mM ve 10 mM yaprak AgNP'lerin sitotoksik etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. AgNO₃ kontrol grubunun sürekli yüksek % inhibisyon değerleri, gümüş bileşiklerinin yüksek toksisite potansiyeline işaret etmektedir (Shah vd., 2021). AgNP oluşturulurken kullanılan ve yüksek toksisiteye sahip olan AgNO₃'ün, ekstrelerle bir araya geldiğinde onların toksisite kapasitesini artırdığı da gözlenmiştir.

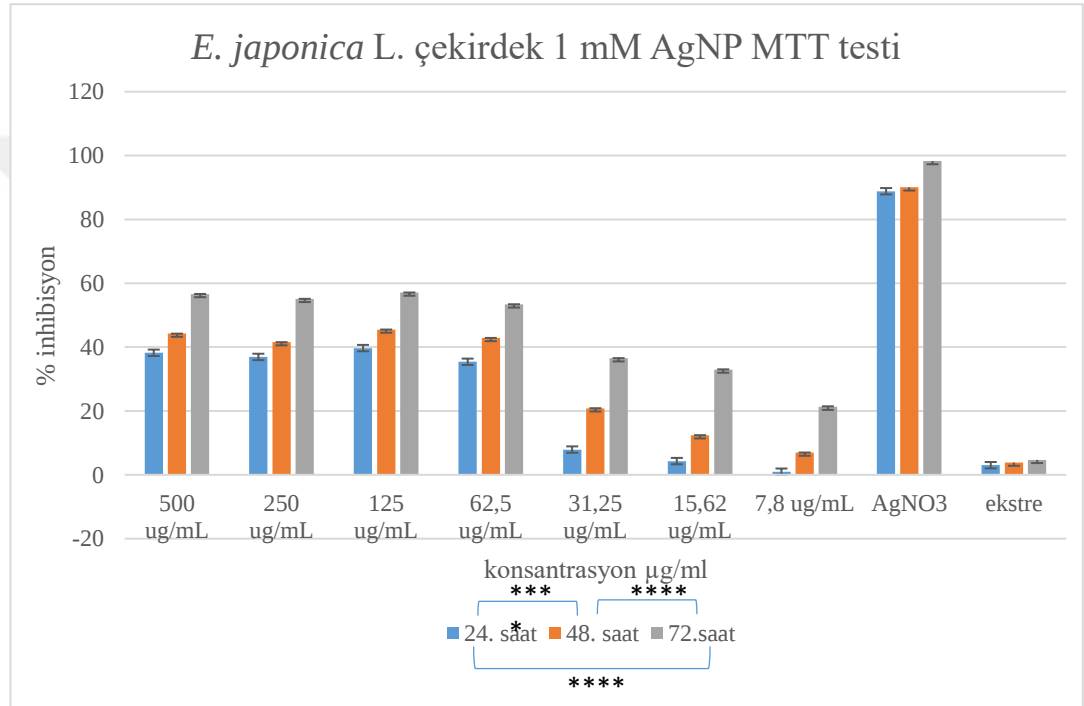
Zhang vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, AgNP'lerinin hücrelerde zamanla azalan toksik etkisi ve hücrelerin adaptasyon süreci vurgulanmıştır. Araştırmada hücrelerin AgNP'lere maruz kaldıkça stres yanıtlarını değiştirdiklerini ve savunma mekanizmaları geliştirdiklerini öne sürülmüştür. Kumar vd. (2020) çalışmalarında da benzer sonuçlar gözlenmiş ve 48 saatten sonra hücrelerin AgNP'lere karşı geliştirdikleri tolerans süreci olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin stres altındayken metabolik yollarını değiştirerek AgNP'lerin etkisini hafiflettiği ve böylece inhibisyon oranının düştüğü gözlenmiştir.

E. japonica L. yaprak ekstresinin FTIR sonuçlarına baktığımızda FTIR analizinde elde edilen C-H bağları (2980 cm⁻¹, 2918 cm⁻¹, 2851 cm⁻¹), alifatik hidrokarbonların ve yağ asitlerinin varlığını göstermektedir. Bu bileşikler, hücre zarının stabilitesini artırabilir ve hücrel metabolizmayı olumlu yönde etkileyebilir. Öte yandan, C=O karbonil grubu (1688 cm⁻¹) ve C-O bağları (1155 cm⁻¹, 1162 cm⁻¹), hücrel etkileşimleri artırabilecek potansiyele sahip bileşiklerin varlığını işaret etmektedir (Sharma vd., 2012; Nafady vd., 2020). Bu bulgular, MTT testlerinde gözlemlenen hücre canlılığındaki artış ile paralellik göstermektedir.

4.4.3 *E. japonica* L. çekirdek ekstresi ve çekirdek ekstresi ile elde edilen AgNP'lerin MTT testi sonuçları

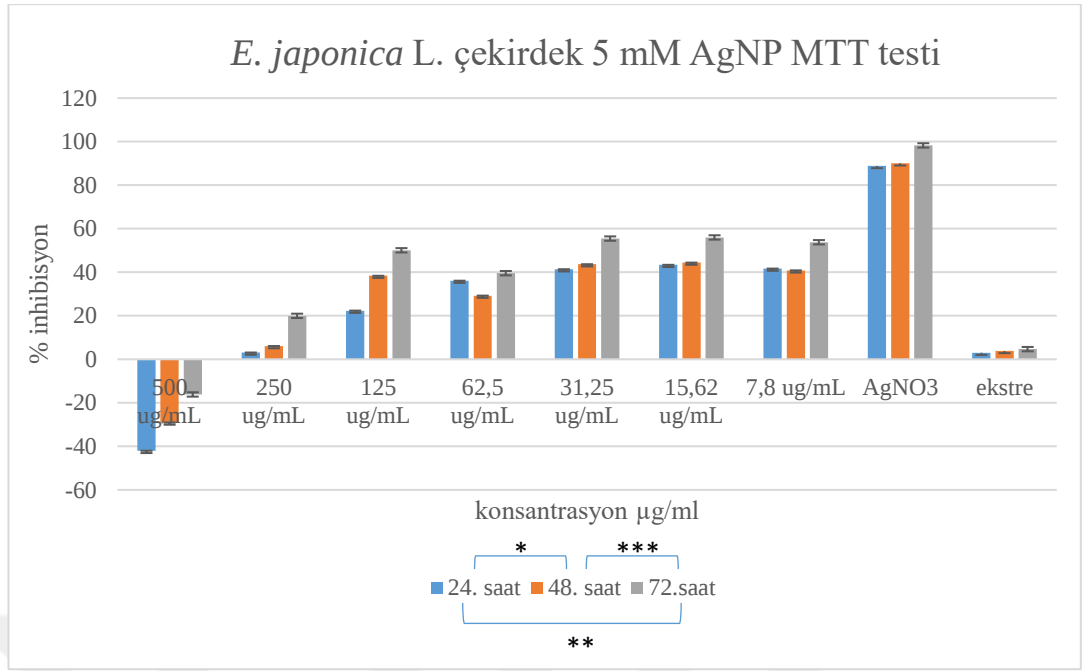
E. japonica L. etanol çekirdek ekstresinden elde edilen 1 mM, 5 mM ve 10 mM AgNP'lerin 500, 250, 125, 65.5, 31.25, 15.62, ve 7.8 µg/mL konsantrasyonları ile sitotoksitesi belirlendi. Kontrol olarak uygulama yapılmamış hücreler (hücre+besiyeri) kullanıldı. AgNO₃ ve etanol çekirdek ekstresinin sitotoksik etkisi de AgNP konsantrasyonları gibi kontrole karşı değerlendirilerek belirlendi.

1 mM çekirdek AgNP'ler (Şekil 4.25), 24. saatte en yüksek %38,52, 48. saatte %44,21 ve 72. saatte %56.63 inhibisyon oranları göstermektedir. Bu oranlar, zamanla artış gösteren bir inhibisyon trendini desteklemekte olup, hücrelerin gümüş NP'lere karşı adaptif bir yanıt geliştirdiğini düşündürmektedir. Benzer bir çalışma, Naraginti vd. (2015) *Syzygium cumini* yaprak ekstraktı ile sentezlenen AgNP'ler üzerinde yapılan araştırmasında, 24 saatten 72 saate kadar artan inhibisyon oranlarının gözlemlendiğini ve bu durumun hücrelerin zamanla AgNP'lere karşı daha fazla zarar gördüğünü ortaya koymuştur.



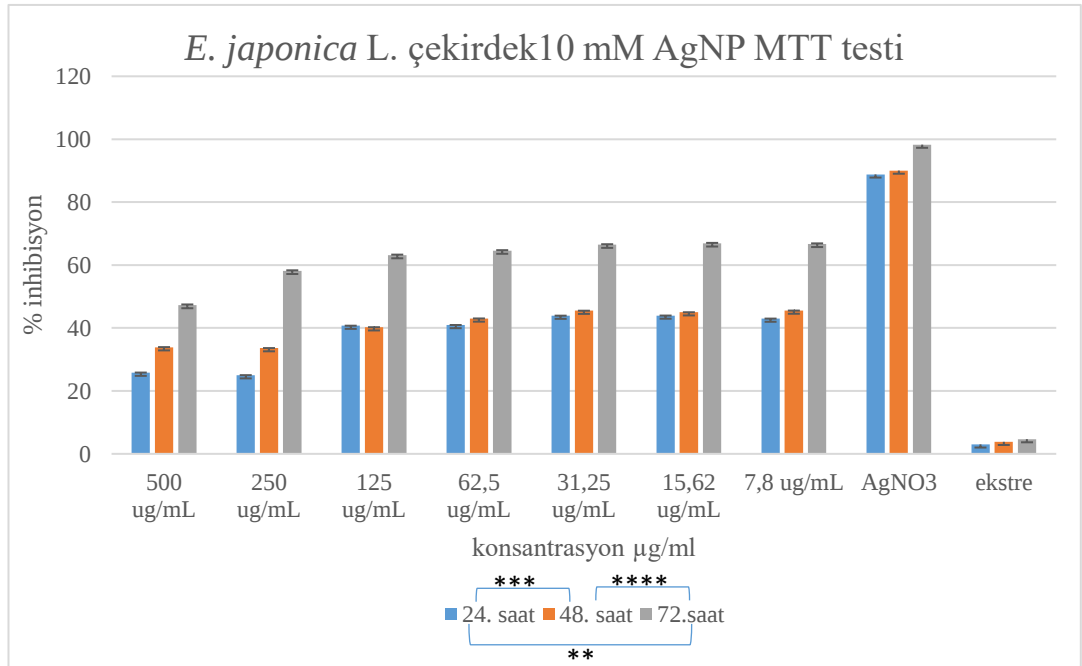
Şekil 4.25. *E. japonica* L. çekirdek ekstresi ile elde edilen 1 mM AgNP'lerin MTT sonuçları (****p<0,0001).

5 mM çekirdek AgNP'lerin (Şekil 4.26), inhibisyon oranları 24. saatte %43.40, 48. saatte %43,68 ve 72. saatte %55,93 olarak gözlenmiştir. Benzer şekilde, Kumar vd. (2020) yapmış olduğu çalışmada da 5 mM AgNP'lerin zamanla artan inhibisyon oranlarında olduğu bildirilmiştir. Bu durum, hücrelerin AgNP'lere karşı adapte olmadığını ve artan toksisite ile karşı karşıya kaldığını göstermektedir.



Şekil 4.26. *E. japonica* L. çekirdek ekstresi ile elde edilen 5 mM AgNP'lerin MTT sonuçları (*p<0,05, **p<0,01 ve ***p<0,001).

10 mM çekirdek AgNP'lerin (Şekil 4.27), en yüksek inhibisyon oranı 72. saat %66,89 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar, Sharma vd. (2012) çalışmasında da vurgulanmıştır. Çalışmada yüksek konsantrasyonlu AgNP'lerin hücrelerde daha uzun süreli ve daha güçlü etkiler gösterdiği bildirilmiştir.



Şekil 4.27. *E. japonica* L. çekirdek ekstresi ile elde edilen 10 mM AgNP'lerin MTT sonuçları (**p<0,01, ***p<0,001 ve ****p<0,0001).

AgNO₃ kontrol grubunun %90'ın üzerinde inhibisyon değerleri (Şekil 4.25, Şekil 4.26 ve Şekil 4.27), gümüş bileşiklerinin yüksek toksisite potansiyeline işaret etmektedir. Çekirdek ekstresi kontrol grubunun % inhibisyon değerleri toksik etkilerinin varlığını ortaya koymakta ve AgNO₃ ile AgNP sentezlendiğinde etkisinin arttığını göstermiştir.

E. japonica L. çekirdek ekstresinden sentezlenen AgNP'lerin sitotoksik etkisinin, konsantrasyon ve zaman bağımlı etkileri olduğu gözlemlendi. Elde edilen MTT sonuçlarında çekirdek ekstresinin yaprak ekstresine kıyasla sitotoksik bir etkisi olduğu saptandı. En yüksek sitotoksitenin 72. saatte % 4,67 inhibisyon oranında olduğu belirlendi. Her iki grup için zamanla artan etkiler gözlemlenmektedir; ancak çekirdek AgNP'leri, tüm zamanlarda (24, 48 ve 72. saat) daha yüksek % inhibisyon değerleri sunmaktadır.

4.4.4 Migrasyon (yara iyileşme deneyi) sonuçları

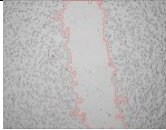
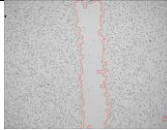
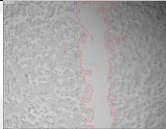
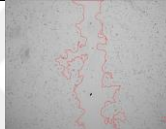
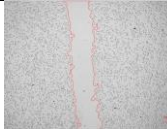
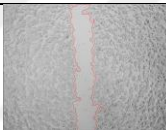
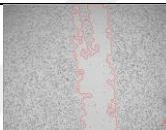
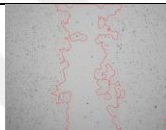
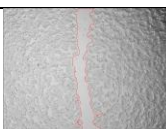
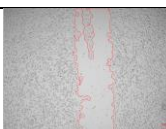
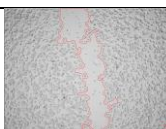
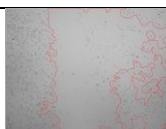
Hücre göçü, yara iyileşmesi ve metastaz gibi kritik biyolojik süreçlerde önemli bir faktördür. Hücre kapanma (migrasyon) yüzdesinin 0. saate göre düşük olması, hücrelerin göç yeteneğinin olduğunu göstermektedir. *E. japonica* L. yaprak ve çekirdek etanol ekstraktlarından elde edilen AgNP'lerin MTT yöntemi ile IC₅₀ değerleri belirlendi ve hücrelere bu değerlerin 1/8'i uygulandı. GraphPad prism 10.3.1 ile elde edilen IC₅₀ değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. *E. japonica* L. etanol yaprak ve çekirdek ekstraktları ve AgNP konsantrasyonlarına ait IC₅₀ değerleri.

Grup	IC ₅₀ (µg/mL)		
	24. saat	48. saat	72. saat
<i>E. japonica</i> L. yaprak ekstresi	3256,32	3115,452	2987,235
<i>E. japonica</i> L. yaprak 1 mM	0,780	10,44	1,339
<i>E. japonica</i> L. yaprak 5 mM	0,218	0,058	1,339
<i>E. japonica</i> L. yaprak 10 mM	1,629	0,058	1,339
<i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstresi	540, 159	540, 142	535, 263
<i>E. japonica</i> L. çekirdek 1 mM	45,140	28,670	13,95
<i>E. japonica</i> L. çekirdek 5 mM	22,180	12,058	8 ,339
<i>E. japonica</i> L. çekirdek 10 mM	19,218	8,058	2,339

E. japonica L. etanol yaprak ekstresi ve yaprak AgNP'lerinin HT-29 hücrelerinin migrasyonuna etkisi için 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar gerçekleştirildi. Tüm saatler 0. saate göre kıyaslandığında, migrasyon (yara iyileşmesi) yüzde sonuçları AgNP'lerin hücre göçünü azalttığını göstermiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. *E. japonica* L. etanol yaprak ekstresi ve yaprak 1 mM, 5 mM ve 10 mM AgNP'lerin migrasyon (yara iyileşme) yüzde sonuçları.

Uygulama saatleri		HT-29 + besiyeri	HT-29 + yaprak ekstresi	HT-29 + <i>E. japonica</i> L. yaprak 1 mM AgNP	HT-29 + <i>E. japonica</i> L. yaprak 5 mM AgNP	HT-29 + <i>E. japonica</i> L. yaprak 10mM AgNP
0.saat						
24 saat						
48. saat						
72. saat						
Yara genişliği	0. saat	23.014	17.88	14.648	10.467	12.985
	24.saat	14.740	16.373	14.167	15.443	12.886
	48.saat	10.560	16.253	13.116	24.486	12.576
	72.saat	7.379	17.756	12.543	50.277	14.200

HT-29 kanser hücrelerine ait kontrol grubu (hücre + besiyeri) başlangıç kapanma yüzdesi %23,01 olup, bu değer 72 saat sonunda %7,37'a düşmüştür. Bu azalma, hücrelerin göç ederek yara bölgesini etkin bir şekilde kapattığını göstermektedir.

E. japonica L. yaprak ekstresi uygulamasının başlangıç kapanma yüzdesi %17,88 olarak hesaplanırken, 72 saat sonunda bu değer %17,75'e düşmüştür. Bu durum, ekstrenin hücre göçünü hafifçe baskıladığını ve göç yeteneğini azaltabileceğini

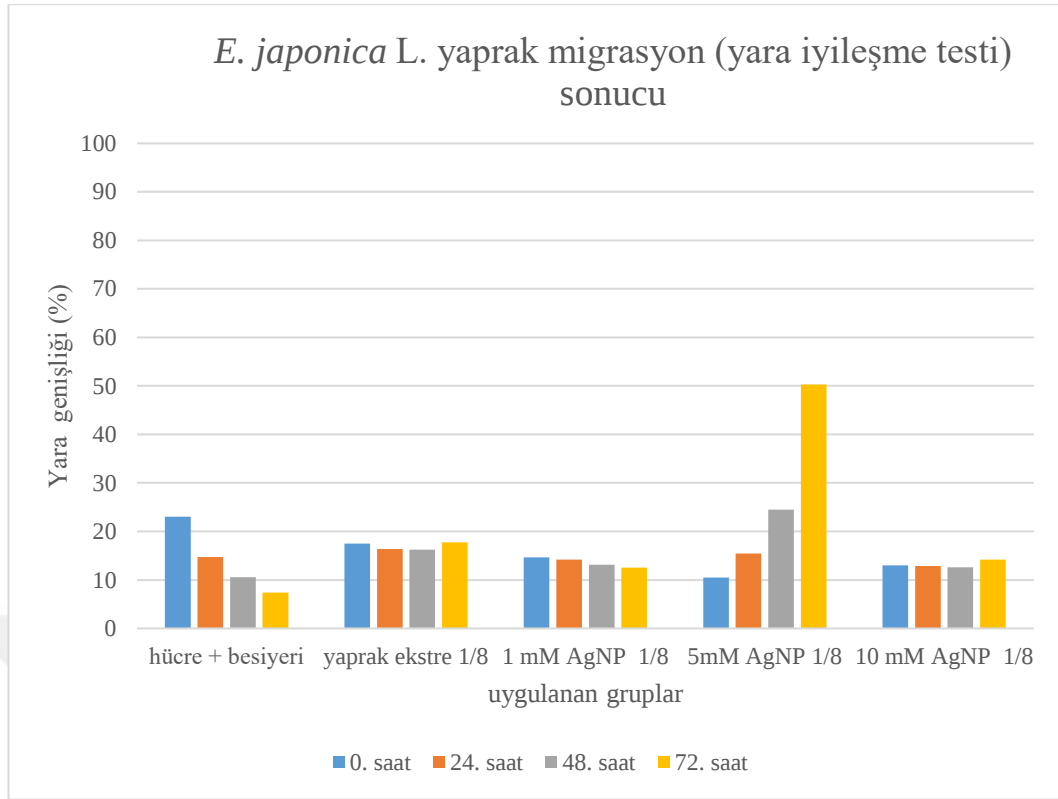
göstermektedir. Bu sonuç yaprak ekstrelerinin, migrasyonu engelleyici bir etkisi olduğunu göstermektedir (Zhao vd., 2018).

E. japonica L. yaprak 1 mM AgNP uygulandığında, başlangıçta %14,64 olan yara oranı, 72 saat sonunda %12,54'e düşmüştür. Bu durum, düşük konsantrasyondaki AgNP'lerin hücre göçünü hafif bir şekilde engellediğini ancak belirgin bir baskılama oluşturmadığını göstermektedir.

E. japonica L. yaprak 5 mM AgNP uygulandığında, başlangıçta %10,46 yara açıklığı iken, 72 saat sonunda %50,27'ye çıkmıştır. Bu ciddi bir artış olup, yüksek konsantrasyondaki AgNP'nin hücre göçünü büyük ölçüde inhibe ettiğini göstermektedir. Bu etki, AgNP'lerin sitotoksik özellikleriyle ilişkilendirilebilir (Nafady vd., 2020). Ayrıca 5 mM yaprak AgNP XRD sonuçlarımızda en iyi kristalinite'yi gösterdiği, daha düzenli, kararlı ve küçük bir yapıda olduğu belirlenmişti. Bu sonuçla migrasyon üzerine etkisi karşılaştırıldığında düzenli ve kararlı yapıların hücre migrasyonda da yüksek seviyede etkili olduğuna işaret etmektedir.

E. japonica L. yaprak 10 mM AgNP uygulandığında ise başlangıçtaki kapanma oranı %12,98 olup, 72 saat sonunda %14,20'ye çıkmıştır. Bu konsantrasyonda da hücre göçünün inhibe edildiği gözlemlenmiştir, ancak 5 mM konsantrasyonuna göre daha az bir etki göstermiştir. Bu durum, yüksek konsantrasyonların hücre içi stres yaratırken, bazı hücre mekanizmalarının adaptasyon geliştirebileceğini düşündürmektedir. Piao vd. (2011) bu durumu açıklamak için, yüksek doz AgNP'lerin hücre ölümünü tetikleyebileceğini ancak hücrelerin bu stresle başa çıkma mekanizmaları geliştirebileceğini belirtmişlerdir.

Sonuçlar karşılaştırıldığında *E. japonica* L. yaprak ekstrelerinden elde edilen AgNP'lerin yaprak ekstrelerine kıyasla daha iyi etki gösterdiğini, ekstrelerinin etkisini artırmak için AgNP formunda hazırlanmasının daha uygun olacağını göstermektedir (Şekil 4.28).



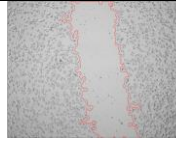
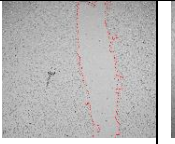
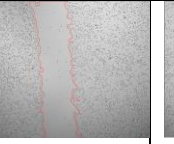
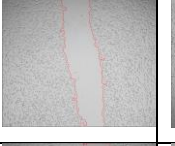
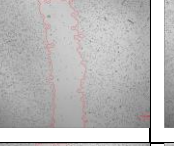
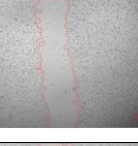
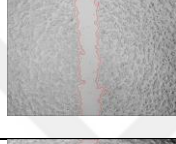
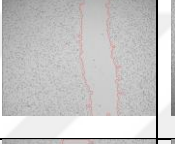
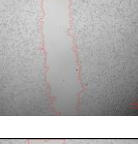
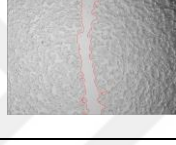
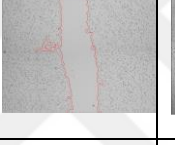
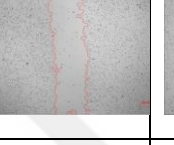
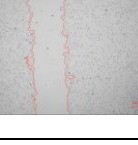
Şekil 4.28. *E. japonica* L. yaprak ekstresinin ve AgNP'lerinin HT-29 kanser hücreleri üzerindeki migrasyon (yara iyileşme testi) sonucu.

Migrasyon (yara iyileşme) yüzdesi *E. japonica* L. çekirdek ekstresi ve bu ekstreden sentezlenen AgNP'ler ile test edildiğinde, çekirdek ekstresine göre AgNP'lerin migrasyon üzerine daha etkili olduğu belirlendi.

Kontrol grubu (hücre + besiyeri) hücrelerinin başlangıç kapanma yüzdesi %23,014 olup, bu değer 72 saat sonunda %7,379'a düşmüştür. Bu azalma, hücrelerin göç ederek yara bölgesini etkin bir şekilde kapattığını göstermektedir.

E. japonica L. çekirdek ekstresi uygulamasında, başlangıçta %10.572 olan yara iyileşme oranı, 72. saat sonunda bu değer %11.026'ya ulaştığını göstermiştir. Bu durum, ekstrenin zamanla hücre göçünü bir miktar inhibe edebileceğini kısmi bir etki oluşturduğunu göstermektedir (Çizelge 4.8). Bu duruma benzer şekilde, Chung vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada da, bitkisel ekstraktların hücre göçü üzerindeki etkilerinin doza bağlı olarak değişkenlik gösterdiği, düşük konsantrasyonlarda hücre hareketini hafifçe inhibe ettiği belirtilmiştir. *E. japonica* L. çekirdek ekstresinin göçü inhibe etme yeteneği, özellikle içeriğinde bulunan flavonoidler ve fenolik bileşenlerin bu etkiye katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (Sharma vd., 2014).

Çizelge 4.8. *E. japonica* L. etanol çekirdek ekstresi ve bu ekstreden elde edilen 1mM, 5 mM ve 10 mM AgNP’lerin migrasyon sonuçları.

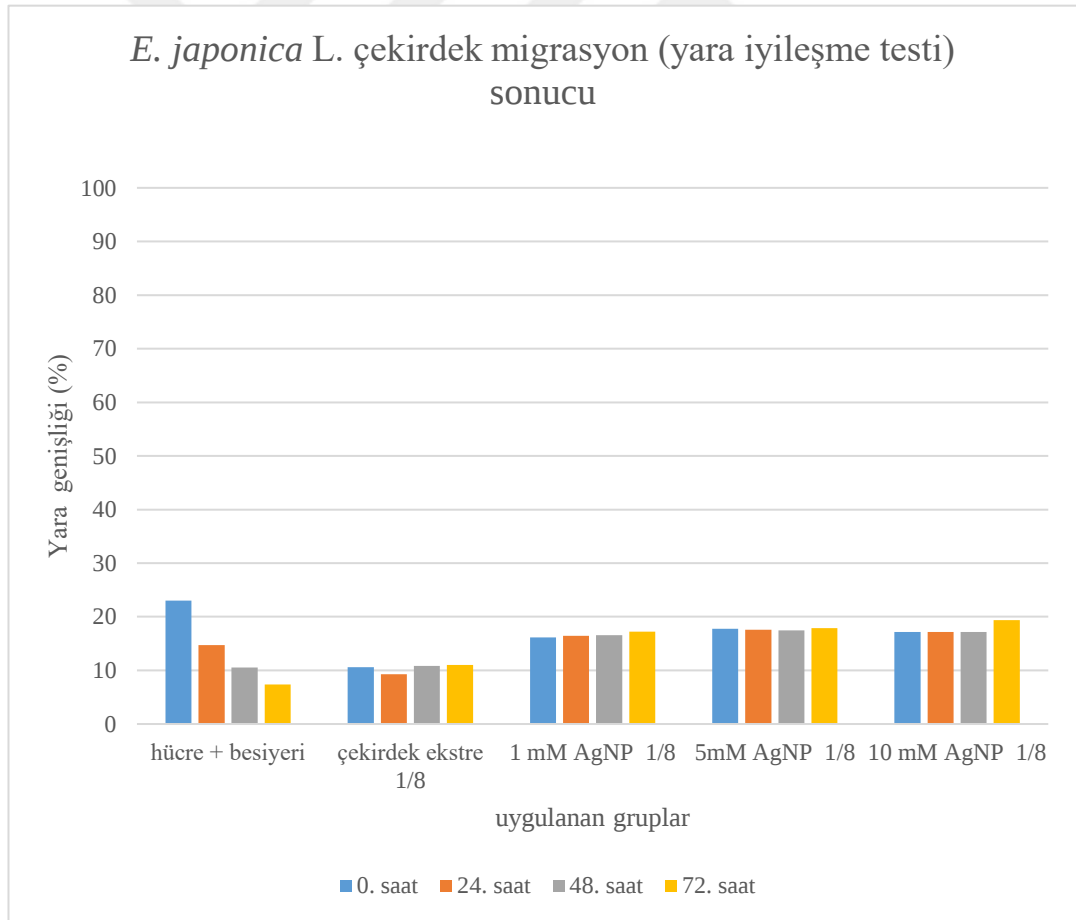
Uygulama saatleri		HT-29 + besiyeri	HT-29 + <i>E. japonica</i> L. çekirdek ekstresi	HT-29 + <i>E. japonica</i> L. çekirdek 1 mM AgNP	HT-29 + <i>E. japonica</i> L. çekirdek 5 mM AgNP	HT-29 + <i>E. japonica</i> L. çekirdek 10 mM AgNP
0.saat						
24 saat						
48. saat						
72. saat						
Yara	0. saat	23.014	10.572	16.142	17.774	17.142
	24.saat	14.740	9.284	16.448	17.606	17.178
	48.saat	10.560	10.837	16.561	17.456	17.180
	72.saat	7.379	11.026	17.252	17.889	19.353

E. japonica L. çekirdek 5 mM AgNP uygulamasında yara iyileşme yüzdesi 0. saatte %16.142 olarak gözlenirken, 72. saate kadar hafif bir artışla %17.25'e çıkmıştır. Bu sonuçlar, düşük konsantrasyonda AgNP’lerin hücre göçünü çok fazla inhibe etmediğini ancak kısmi bir etki oluşturduğunu göstermektedir. Rai vd. (2016) tarafından yapılan araştırmada, AgNP’lerin hücre yüzeyine bağlanarak ROS artırdığı ve hücre zarlarını bozarak hücre hareketini sınırladığı ifade edilmiştir. Aynı şekilde AgNP’lerin hücre göçünü inhibe etme yeteneği, özellikle metastazın önlenmesi açısından önemli bir bulgu olarak literatürde de sıkça vurgulanmaktadır (Gurunathan vd., 2014).

E. japonica L. çekirdek 10 mM AgNP uygulamasında başlangıçtaki yara iyileşme yüzdesi %17,14 iken, 72. saat sonunda bu değer %19.35'e yükselmiştir. Bu sonuç, daha yüksek konsantrasyondaki AgNP'lerin hücre göçünü daha belirgin bir şekilde inhibe ettiğini ve hücrelerin hareket kabiliyetini önemli ölçüde azalttığını

göstermektedir. Bu bulgu NP'lerin toksik etkilerinin doza bağlı olarak arttığını gösteren birçok çalışmayı desteklemektedir. Foldbjerg vd. (2011) yaptıkları çalışmada, AgNP'lerin hücre içi ROS seviyelerini artırarak mitokondriyal disfonksiyon ve hücre göçü üzerinde inhibitör etki oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bu etki, özellikle yüksek konsantrasyonlarda belirginleşmiş ve hücrelerin göç etme yeteneğini önemli ölçüde etkilemiştir.

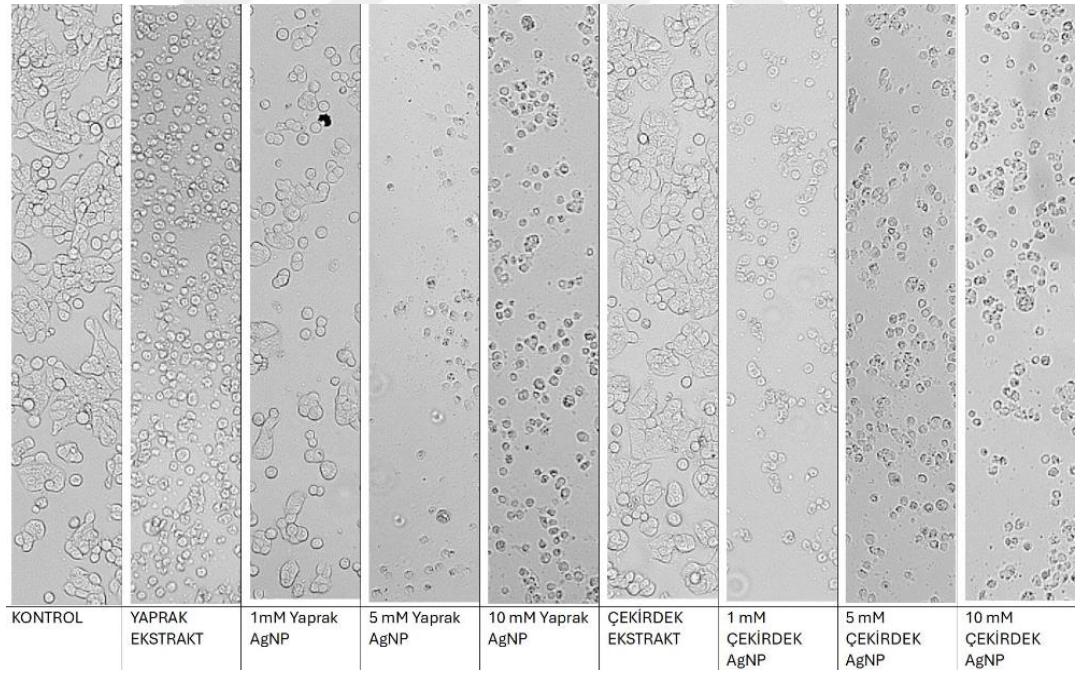
Genel olarak, *E. japonica* L. çekirdek ekstresi ve bu ekstreten sentezlenen AgNP'ler, hücre göçünü inhibe edici etkiye sahiptir (Şekil 4.29). Ancak bu etki AgNP konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yüksek konsantrasyonlarda (10 mM) AgNP'ler, hücrelerin göç etme yeteneğini daha fazla sınırlarken, düşük konsantrasyonlarda (1 mM) bu etki daha zayıf kalmaktadır. Elde edilen bu sonuçlar, özellikle kanser hücrelerinin göç yapmasını önlemede AgNP'lerin potansiyel bir ajan olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.29. *E. japonica* L. çekirdek ekstresinin ve AgNP'lerinin HT-29 kanser hücreleri üzerindeki migrasyon (yara iyileşme testi) sonucu

Bu sonuçları, *E. japonica* L. çekirdek ve yaprak ekstraları ile NP uygulamalarını karşılaştırarak değerlendirebiliriz. Hem çekirdek hem de yaprak ekstraları, hücre göçünü inhibe etme potansiyeline sahip olsa da elde edilen bulgular, konsantrasyona ve uygulanan NP türüne bağlı olarak farklılıklar göstermektedir.

Elde edilen migrasyon verileri diğer analiz edilen bulgularla (XRD, SEM, zeta potansiyeli, MTT) karşılaştırıldığında, migrasyona uyumlu şekilde en iyi etkinin 5 mM yaprak AgNP’de ve 10 mM çekirdek AgNP’de olduğunu göstermiştir. Bu karşılaştırmalara ek olarak ekstraların ve AgNP konsantrasyonlarının 24 saatlik uygulama sonrası mikroskopik görüntüleri de Şekil 4.30’da sunulmuştur. Mikroskopik görüntüler de tüm bu sonuçların doğruluğunu kanıtlar niteliktedir. Bu uygulamalar hücrelerin morfolojilerinde önemli değişiklikler olduğunu göstermiştir. Çalışmamızdaki *E. japonica* L. bitkisinin iki farklı bölümü (yaprak ve çekirdek) ele alındığında ise, kolorektal kanser hücrelerinde en etkin AgNP’nin yapraktan elde edilen nanopartikül sentezinde olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.30. HT-29 hücrelerine uygulama yapıldıktan 24 saat sonraki mikroskop görüntüleri (10X).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Eriobotrya japonica Lindl, Çin halk tıbbında uzun yıllardır kullanılan bir meyve türüdür. Çiçekleri kurutulduktan sonra özellikle kış aylarında tüketilmek üzere kaynatılarak kullanılmaktadır. Fenolik ve flavonoid açısından zengin içeriği nedeniyle AgNP sentezi ile etkinliğinin belirlenmesini amaçlayan çalışmamızda, sentez, karakterizasyon ve kolorektal kanser hücrelerine olan etkileri incelenmiştir. Özellikle *E. japonica* L. yaprak ve çekirdek kısımlarından AgNP sentezlenmesi ve bunların kolorektal hücre hattı üzerine etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Bitki ekstraksiyonunda kullanılan çözücü, bitkiden elde edilecek bileşiklerin türünü ve miktarını doğrudan etkilediği için büyük önem taşımaktadır. Doğru çözücünün seçilmesi hem ekstraksiyon verimini hem de elde edilen ekstraktların etkinliğini optimize etmek açısından kritik öneme sahiptir. Çalışmamızda özellikle fenolik ve flavonoid madde miktarları değerlendirilerek *E. japonica* L.'nin yaprak ve çekirdeklerinin ekstraksiyonunda en iyi çözücünün %75 etanol olduğu belirlendi. Bu sayede bitkinin bu kısımlarının biyolojik açıdan aktif bileşenleri en verimli şekilde açığa çıkarılmış oldu. Literatürde de fenolik ve flavonoidlerin antioksidan özellikleri ve serbest radikallerle mücadele yetenekleri nedeniyle AgNP sentezinde kritik rol oynadıkları rapor edilmiştir (Das vd., 2013).

AgNP sentezinde NP'lerin boyutu, şekli, dağılımı ve biyolojik etkileri gibi birçok özelliği doğrudan çözücüdeki gümüş iyonlarının konsantrasyonuna bağlıdır. Bu nedenle yaprak ve çekirdek ekstraktlarında üç farklı konsantrasyonun (1 mM, 5 mM ve 10 mM) etkileri araştırılmıştır. Bunun için elde edilen AgNP'lerin karakterizasyon işlemi gerçekleştirildiğinde her analiz sonucu birbirini destekler nitelikte sonuç verirken, karakterizasyon analiz sonuçları ile antikanser aktivite sonuçları arasında da birbirini destekler nitelikte sonuçlar gözlenmiştir. Özellikle yaprak ekstraktlarından elde edilen AgNP'lerden 5 mM konsantrasyonun, çekirdek ekstraktlarından elde edilen AgNP'lerden ise 10 mM konsantrasyonun etkili olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. HT-29 kanser hücre hattı üzerine yaptığımız MTT ve migrasyon sonuçlarında da aynı konsantrasyonların daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Bu hücre hattında her iki bitki bölümü (yaprak ve çekirdek) etkili olmasına rağmen, en etkili AgNP'nin yaprak olduğu sonucuna varılmıştır. Ancak sitotoksikite ve migrasyon haricinde tüm verilere ek olarak diğer antikanser analizlerinin de

alışılması gerekmektedir. Örneğin hücre ölümünün olduğu gözlenen araştırmamızda, özellikle hangi mekanizmayla hücre ölümünün gerçekleştiğinin araştırılması, hücre döngüsü analizi ile kanser tedavisinde hangi fazın etkili olduğunun araştırılması, kanser hücrelerinin uzun süre hayatta kalma ve çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi, ROS Türlerinin artışını analiz ederek AgNP'nin hücre ölümüne yatkınlığının araştırılması, kanserle ilişkili proteinlerin veya genlerin ekspresyonlarının araştırılması, bu NP'lerin DNA hasarı üzerindeki etkilerinin araştırılması gerekir. Tüm bu *in vitro* analizlere ek olarak hayvan modelleri kullanılarak, bu bitki ekstrelerinden elde edilen AgNP'lerin tedaviye etkisinin araştırıldığı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

AgNP'ler biyomedikal uygulamalarda geniş bir potansiyele sahip olsalar da bu partiküllerin vücutta uzun süre kalmasının yaratabileceği potansiyel zararlar da göz ardı edilmemelidir. AgNP'lerin sistemik dolaşıma girmesi ve organlarda birikmesi, özellikle karaciğer, böbrekler ve dalak gibi detoksifikasyon organlarında olumsuz etkileri araştırılmalıdır. alışmalar, yüksek dozlarda AgNP'lere maruz kalındığında oksidatif strese neden olabileceğini ve hücre zarlarına zarar verebileceğini göstermektedir (Kim vd., 2012). Bu süreç, hücre ölümüne ve inflamatuvar yanıtların artmasına yol açabilir. Ayrıca NP'lerin uzun süreli birikimi de insan vücudunda toksik yan etkilere ve kronik hastalıklara neden olabilmektedir.

Sonuç olarak, elde edilen veriler ışığında *E. japonica* L. yaprak ve çekirdeklerinin daha fazla araştırılması gerektiği kanısına varılmıştır. Özellikle, bu bitkinin yaprak ve çekirdeklerinden elde edilen ekstrelerin sitotoksik etkisinin daha detaylı incelenmesi gerekmektedir. Çalışmamızda elde edilen AgNP'lerin, HT-29 kolorektal kanser hücre hattına karşı umut verici sitotoksik etkiler gösterdiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, AgNP'lerin sağlıklı hücre hatlarına karşı potansiyel zararlarını değerlendirmek, onların klinik kullanıma geçiş sürecinde büyük önem taşımaktadır. Literatürde de NP'lerin genellikle seçici sitotoksik etkiler sergilediği, ancak yüksek dozlarda veya uzun süreli maruziyetlerde sağlıklı hücrelerde de olumsuz etkilere yol açabileceği rapor edilmiştir (Foldbjerg vd., 2012). Bu nedenle, ilerleyen çalışmalarda sağlıklı hücre hatları üzerinde yapılacak testler de NP'lerin güvenliği açısından kritik bir rol oynayacaktır.

Bununla birlikte, AgNP'ler genellikle düşük dozlarda kullanıldığında biyolojik olarak uyumlu ve güvenli kabul edilmektedir. Ancak AgNP'lerin dozu, maruziyet süresi ve vücuttan atılma mekanizmaları, güvenli kullanım sınırlarını belirlemede kilit faktörlerdir. Bu nedenle, AgNP'lerin vücut içinde ne kadar süreyle kaldığı ve hangi organlarda birikme eğilimi gösterdiği gibi konular, daha ileri çalışmalarda detaylı olarak incelenmelidir.

AgNP'lerin antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri de oldukça dikkat çekicidir. NP'lerin yüksek yüzey alanı, bakteriyel hücrelerle etkileşim potansiyelini artırır ve bu da güçlü antimikrobiyal etkiler gösterilmesine olanak sağlar. Bu bağlamda, NP'lerin çeşitli mikroorganizmalar üzerinde nasıl bir etki yarattığı ve hangi patojenlere karşı daha etkili olduğu, ilerleyen araştırmalarda ele alınmalıdır. NP'lerin sahip olduğu bu özellikler, medikal cihazlarda, yara tedavisinde ve çevresel temizlik uygulamalarında kullanılabilirliklerini artırmaktadır (Rai vd., 2012).

Ayrıca, AgNP'lerin antioksidan aktiviteleri de serbest radikallere karşı savaşma yeteneklerini ortaya koyar. Bu durum, özellikle oksidatif stresle ilişkili hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek potansiyel tedavi seçeneklerini araştırma açısından önemlidir. İlerleyen çalışmalar, AgNP'lerin farklı hastalık modellerinde nasıl bir antioksidan etki gösterdiğini ve vücut üzerindeki genel etkilerini incelemelidir.

E. japonica L.'nin biyolojik aktivitesini ve AgNP'lerin çok yönlü uygulamalarını keşfetmeye yönelik çalışmalar yapılarak bitkinin tedavi edici ve koruyucu ajan olarak kullanımı açısından önemli sonuçlar verebilir. Özellikle elde edilen AgNP'lerin antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik etkileri üzerine yapılacak araştırmalar, gelecekte potansiyel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli rol oynayacaktır. Bununla birlikte elde edilen NP'lerin uzun süreli vücut üzerinde birikmesi ve sağlıklı hücreler üzerindeki potansiyel zararları üzerine daha kapsamlı çalışmalar yürütülmelidir.

Bu araştırmalar, yalnızca *E. japonica* L. bitkisinin biyolojik ve kimyasal özelliklerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamakla kalmayacak, aynı zamanda gelecekte potansiyel tedavi ve koruyucu ajanların geliştirilmesine de ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdel Raouf, G. F., Said, A. ve Ismail, S., 2021. Assessment of the chemical composition, antimicrobial potential and cytotoxic activity of *Eriobotrya japonica* fruits, Egyptian Journal of Chemistry, 64, 10, 5493-5502.
- Ahmad, N., Alam, M. K., Singh, V. N. ve Sharma, S., 2009. Bioprospecting AgNPs from wild desmodium species, Journal of Bionanoscience, 32, 97-104.
- Ahmad, N., Sharma, S., Singh, V. N., Shamsi, S. F., Fatma, A. ve Mehta, B. R., 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Desmodium triflorum*: A novel approach towards weed utilization, Biotechnology Research International, 2011, 1, 454090.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L. ve Ikram, S., 2016a. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise, Journal of Advanced Research, 7, 1, 17-28.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L. ve Ikram, S., 2016b. Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. Journal Of Radiation Research And Applied Sciences, 9, 1, 1-7.
- Albrecht, M. A., Evans, C. W. ve Raston, C. L., 2006. Green chemistry and the health implications of nanoparticles, Green Chemistry, 8, 5, 417-432.
- Alexander, J. W., 2009. History of the medical use of silver, Surgical Infections, 10, 3, 289-292.
- Alshaker, H. A., Qinna, N. A., Qadan, F., Bustami, M. ve Matalaka, K. Z., 2011. *Eriobotrya japonica* L. hydrophilic extract modulates cytokines in normal tissues, in the tumor of Meth-A-fibrosarcoma bearing mice, and enhances their survival time, BMC Complementary and Alternative Medicine, 11, 1-11.
- Alsharif, M. H., Ali, H. S., ve Zhang, W., 2024. Silver nanoparticles in therapeutics and beyond: A review of mechanism insights and applications, Nanomaterials, 14, 20, 1618.
- Al-Warthan, A., Kholoud, M. M., El-Nour, A., Eftaiha, A. ve Ammar, R. A. A., 2010. Synthesis and applications of silver nanoparticles, Arabian J Chem, 3, 135-140.
- Antony, J. J., Sivalingam, P., Siva, D., Kamalakkannan, S., Anbarasu, K., Sukirtha, R. ve Achiraman, S., 2011. Comparative evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles synthesized using *Rhizophora apiculata* and glucose, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 88, 1, 134-140.
- Arnold, M., Sierra, M. S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. ve Bray, F., 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality, Gut, 66, 4, 683-691.

- Arroyo, G. V., Madrid, A. T., Gavilanes, A. F., Naranjo, B., Debut, A., Arias, M. T. ve Angulo, Y., 2020. Green synthesis of silver nanoparticles for application in cosmetics, *Journal of Environmental Science And Health, Part A*, 55, 11, 1304-1320.
- Arulkumar, S. ve Sabesan, M., 2010. Biosynthesis and characterization of gold nanoparticle using antiparkinsonian drug *Mucuna pruriens* plant extract, *Int J Res Pharm Sci*, 4, 1, 417-20.
- Ateş, M. 2018. Nanoparçacıkların ölçme ve inceleme teknikleri, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 11, 1, 63-69.
- Bankar, A., Joshi, B., Kumar, A. R. ve Zinjarde, S., 2010. Banana peel extract mediated novel route for the synthesis of silver nanoparticles, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 368, 3, 58-63.
- Barbi, R. C. T., Teixeira, G. L., Hornung, P. S., Ávila, S. ve Hoffmann-Ribani, R., 2018. *Eriobotrya japonica* seed as a new source of starch: Assessment of phenolic compounds, antioxidant activity, thermal, rheological and morphological properties, *Food Hydrocolloids*, 77, 646-658.
- Bhatia, S., 2016. Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications, 33-93, Bhatia, S. (Editor), *Natural polymer drug delivery systems*, Springer Cham, Basel, Switzerland.
- Bindhu, M. R. ve Umadevi, M., 2013. Synthesis of monodispersed silver nanoparticles using *Hibiscus cannabinus* leaf extract and its antimicrobial activity, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 101, 184-190.
- Birla, S. S., Tiwari, V. V., Gade, A. K., Ingle, A. P., Yadav, A. P. ve Rai, M. K., 2013. Fabrication of silver nanoparticles by *Coriandrum sativum* leaf extract and their antimicrobial activity, *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 5, 1, 1-6.
- Blackadar, C. B., 2016. Historical review of the causes of cancer, *World Journal of Clinical Oncology*, 7, 1, 54
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. ve Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 68, 6, 394-424.
- Budama-Kilinc, Y., 2019. Piperine nanoparticles for topical application: Preparation, characterization, in vitro and in silico evaluation, *ChemistrySelect*, 4, 40, 11693-11700.
- Castellano, J. J., Shafii, S. M., Ko, F., Donate, G., Wright, T. E., Mannari, R. J. ve Robson, M. C., 2007. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs, *International Wound Journal*, 4, 2, 114-122.

- Centelles, J. J., 2012. General aspects of colorectal cancer, *International Scholarly Research Notices*, 2012, 1, 139268.
- Ceylan, R., Demirbas, A., Ocsoy, I. ve Aktumsek, A., 2021. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extracts of three *Sideritis* species from Turkey and evaluations bioactivity potentials, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 21, 100426.
- Cha, D. S., Eun, J. S. ve Jeon, H., 2011. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the leaves of *Eriobotrya japonica* L, *Journal of Ethnopharmacology*, 134, 2, 305-312.
- Chithrani, B. D., Ghazani, A. A. ve Chan, W. C., 2006. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano Letters*, 6, 4, 662-668.
- Chopra, I., 2007. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: A useful development or a cause for concern?, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 4, 587-590.
- Choudhury, R., Majumder, M., Roy, D. N., Basumallick, S. ve Misra, T. K., 2016. Phytotoxicity of Ag nanoparticles prepared by biogenic and chemical methods, *International Nano Letters*, 6, 153-159.
- Chung, Y. C., Shin, Y. J. ve Kwon, H. S., 2020. Cytotoxic, antimicrobial, antioxidant properties and effects on cell migration of phenolic compounds of selected Transylvanian medicinal plants, *Antioxidants*, 9, 2, 166.
- Cubiella, J., Marzo-Castillejo, M., Mascort-Roca, J. J., Amador-Romero, F. J., Bellas-Beceiro, B., Clofent-Vilaplana, J. ve de Familia, S. E. D. M., 2018. Guía de práctica clínica. Diagnóstico y prevención del cáncer colorrectal. Actualización 2018, *Gastroenterología y Hepatología*, 41, 9, 585-596.
- Dahl, J. A., Maddux, B. L. ve Hutchison, J. E., 2007. Toward greener nanosynthesis, *Chemical reviews*, 107, 6, 2228-2269.
- Das, B., Dash, S. K., Mandal, D., Ghosh, T., Chattopadhyay, S., Tripathy, S. ve Roy, S., 2013. Green synthesized silver nanoparticles destroy multidrug resistant bacteria via reactive oxygen species mediated membrane damage, *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 6, 862-876.
- Das, J., Das, M. P. ve Velusamy, P., 2013. *Sesbania grandiflora* leaf extract mediated green synthesis of antibacterial silver nanoparticles against selected human pathogens, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 104, 265-270.
- Davis, P. H., 1985. 1965-1985: Flora of Turkey and the east Aegean Islands, 1. Cilt, 9. Baskı, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, UK.

- Davis P. H., Mill R. R ve Tan K., 2000. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 1. Cilt, 10. Baskı, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, Scotland.
- De Sousa e Melo, F., Kurtova, A. V., Harnoss, J. M., Kljavin, N., Hoeck, J. D., Hung, J. ve de Sauvage, F. J., 2017. A distinct role for Lgr5⁺ stem cells in primary and metastatic colon cancer, *Nature*, 543, 7647, 676-680.
- Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M. ve Wallace, M. B., 2019. Colorectal cancer, *The Lancet*, 394, 1467-1480.
- Dhoondia, Z. H. ve Chakraborty, H., 2012. Lactobacillus mediated synthesis of silver oxide nanoparticles, *Nanomaterials and Nanotechnology*, 2, 1, 15-21.
- Dipankar, C. ve Murugan, S., 2012. The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 98, 112-119.
- Doll, R. ve Peto, R. 1981. The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 66, 6, 1192-1308.
- Dong, X., Ji, X., Wu, H., Zhao, L., Li, J. ve Yang, W., 2009. Shape control of silver nanoparticles by stepwise citrate reduction, *The Journal of Physical Chemistry C*, 113,16, 6573-6576.
- Duman, H., 2000. Flora of Turkey and the East Aegean Islands, 198-199, Güner A., Özhatay, N., Ekim T. ve Başer K. H. C. (Editorler), Edinburgh University Press, Edinburgh, Scotland.
- Elavazhagan, T. ve Arunachalam, K. D., 2011. Memecylon edule leaf extract mediated green synthesis of silver and gold nanoparticles, *International Journal of Nanomedicine*, 1265-1278.
- Ertekin, A. S., Aksoy, A., Duran, A. ve Sarıoğlu, W., 2012. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler), 102-115, Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. ve Babaç, M. T. (Editor), Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, İstanbul.
- Fabrega, J., Luoma, S. N., Tyler, C. R., Galloway, T. S. ve Lead, J. R., 2011. Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment, *Environment International*, 37, 2, 517-531.
- Fanelli, G. N., Dal Pozzo, C. A., Depetris, I., Schirripa, M., Brignola, S., Biason, P. ve Fassan, M., 2020. The heterogeneous clinical and pathological landscapes of metastatic Braf-mutated colorectal cancer, *Cancer Cell International*, 20, 1, 1-12.

- Fogh, J. ve Trempe, G., 1975., In Human tumor cells in vitro, 115-159, Fogh, J (Editor), New Human Tumor Cell Lines, Boston, MA: Springer US, Boston, ABD.
- Foldbjerg, R., Dang, D. A. ve Autrup, H., 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549, Archives of Toxicology, 85, 7, 743-750.
- Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D. A., Hoffmann, H. J. ve Autrup, H., 2009. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes, Toxicology Letters, 190, 2, 156-162.
- Foldbjerg, R., Olesen, P., Hougaard, M., Dang, D. A., Hoffmann, H. J. ve Autrup, H., 2012. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. Toxicology Letters, 209, 2, 75-83.
- Fu, X., Kong, W., Peng, G., Zhou, J., Azam, M., Xu, C. ve Chen, K., 2012. Plastid structure and carotenogenic gene expression in red-and white-fleshed loquat (*Eriobotrya japonica* L.) fruits, Journal of Experimental Botany, 63, 1, 341-354.
- Fujiwara, Y., Komohara, Y., Ikeda, T. ve Takeya, M., 2011. Corosolic acid inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of signal transducer and activator of transcription-3 and nuclear factor-kappa B in tumor cells and tumor-associated macrophages, Cancer Science, 102, 1, 206-211.
- Gan, P. P. ve Li, S. F. Y., 2012. Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications, Reviews in Environmental Science and Bio/Technology, 11, 169-206.
- Geethalakshmi, R. ve Sarada, D. V. L., 2012. Gold and silver nanoparticles from *Trianthema decandra*: synthesis, characterization, and antimicrobial properties, International Journal of Nanomedicine, 5375-5384.
- Gemmell, C. G., Edwards, D. I., Fraise, A. P., Gould, F. K., Ridgway, G. L. ve Warren, R. E., 2006. Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in the UK, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57, 4, 589-608.
- Ghosh, S., Patil, S., Ahire, M., Kitture, R., Kale, S., Pardesi, K. ve Chopade, B. A., 2012. Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents, International Journal of Nanomedicine, 483-496.
- Gopinath, K., Gowri, S. ve Arumugam, A., 2013. Green synthesis of silver nanoparticles using *Aloe vera* leaf extract and their antibacterial activity, Industrial Crops and Products, 56, 112-118.

- Gopinath, V., MubarakAli, D., Priyadarshini, S., Priyadharsshini, N. M., Thajuddin, N. ve Velusamy, P., 2012. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: a novel biological approach, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 96, 69-74.
- Gudikandula, K. ve Charya Maringanti, S., 2016. Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties, *Journal of Experimental Nanoscience*, 11, 9, 714-721.
- Gurunathan, S., Han, J. W., Dayem, A. A., Eppakayala, V. ve Kim, J. H., 2014. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in *Pseudomonas aeruginosa*, *International Journal of Nanomedicine*, 9, 1179-1195.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence, *The Lancet*, 344, 8924, 721-724.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R. A., 2000. The hallmarks of cancer, *Cell*, 100, 1, 57-70.
- Hano, C. ve Abbasi, B. H., 2021. Plant-based green synthesis of nanoparticles: Production, characterization and applications, *Biomolecules*, 12, 1, 31.
- Henglein, A. ve Giersig, M., 1999. Formation of colloidal silver nanoparticles: Capping action of citrate, *The Journal of Physical Chemistry B*, 103, 44, 9533-9539.
- Ho, H. Y., Lin, W. C., Kitanaka, S., Chang, C. T. ve Wu, J. B., 2008. Analysis of bioactive triterpenes in *Eriobotrya japonica* L. Lindl. by high-performance liquid chromatography, *Journal of Food and Drug Analysis*, 16, 6, 5.
- Hong, Y., Lin, S., Jiang, Y. ve Ashraf, M., 2008a. Variation in contents of total phenolics and flavonoids and antioxidant activities in the leaves of 11 *Eriobotrya species*, *Plant Foods For Human Nutrition*, 63, 200-204.
- Hong, Y., Qiao, Y., Lin, S., Jiang, Y. ve Chen, F., 2008b. Characterization of antioxidant compounds in *Eriobotrya fragrans* Champ leaf, *Scientia Horticulturae*, 118, 4, 288-292.
- Huang, Y. F., Chattopadhyay, S., Jen, Y. J., Peng, C. Y., Liu, T. A., Hsu, Y. K. ve Chen, L. C., 2007. Improved broadband and quasi-omnidirectional anti-reflection properties with biomimetic silicon nanostructures, *Nature Nanotechnology*, 2, 12, 770-774.
- Ibrahim, A. A., Al-Fatesh, A. S., Kumar, N. S., Abasaeed, A. E., Kasim, S. O. ve Fakeeha, A. H., 2020. Dry reforming of methane using Ce-modified Ni supported on 8% PO₄⁺ ZrO₂ catalysts, *Catalysts*, 10, 2, 242.
- Ibrahim, A. S., Ali, G. A., Hassanein, A., Attia, A. M. ve Marzouk, E. R., 2022. Toxicity and uptake of CuO nanoparticles: Evaluation of an emerging nanofertilizer on wheat (*Triticum aestivum* L.) plant, *Sustainability*, 14, 9, 4914.

- Ibrahim, H. M., 2015. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative microorganisms, *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8, 3, 265-275.
- Idikio, H. A., 2011. Human cancer classification: a systems biology-based model integrating morphology, cancer stem cells, proteomics, and genomics, *Journal of Cancer*, 2, 1, 107.
- Ijaz, I., Gilani, E., Nazir, A. ve Bukhari, A., 2020. Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles, *Green Chemistry Letters and Reviews*, 13, 3, 223-245.
- Iravani, S., 2011. Green synthesis of metal nanoparticles using plants, *Green Chemistry*, 13,10, 2638-2650.
- Ito, H., Kobayashi, E., Li, S. H., Hatano, T., Sugita, D., Kubo, N. ve Yoshida, T., 2002. Antitumor activity of compounds isolated from leaves of *Eriobotrya japonica* L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 8, 2400-2403.
- Ito, H., Kobayashi, E., Takamatsu, Y., LI, S. H., Hatano, T., Sakagami, H. ve Yoshida, T., 2000. Polyphenols from *Eriobotrya japonica* L. and their cytotoxicity against human oral tumor cell lines, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48, 5, 687-693.
- Jabir, M. S., Hussien, A. A., Sulaiman, G. M., Yaseen, N. Y., Dewir, Y. H., Alwahibi, M. S. ve Rizwana, H., 2021. Green synthesis of silver nanoparticles from *Eriobotrya japonica* L. extract: A promising approach against cancer cells proliferation, inflammation, allergic disorders and phagocytosis induction, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 49, 1, 48-60.
- Jacob, S. J. P., Finub, J. S. ve Narayanan, A., 2012. Synthesis of silver nanoparticles using Piper longum leaf extracts and its cytotoxic activity against Hep-2 cell line, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 91, 212-214.
- Jayaramudu, T., Raghavendra, G. M., Varaprasad, K., Reddy, G. V. S., Reddy, A. B., Sudhakar, K. ve Sadiku, E. R., 2016. Preparation and characterization of poly (ethylene glycol) stabilized nano silver particles by a mechanochemical assisted ball mill process, *Journal of Applied Polymer Science*, 133, 7.
- Jeyaraj, M., Rajesh, M., Arun, R., MubarakAli, D., Sathishkumar, G., Sivanandhan, G. ve Ganapathi, A., 2013. An investigation on the cytotoxicity and caspase-mediated apoptotic effect of biologically synthesized silver nanoparticles using Podophyllum hexandrum on human cervical carcinoma cells, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 708-717.
- Juan, M. E., Planas, J. M., Ruiz-Gutierrez, V., Daniel, H. ve Wenzel, U., 2008. Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of maslinic and oleanolic acids, two pentacyclic triterpenes from olives, on HT-29 colon cancer cells, *British Journal of Nutrition*, 100, 1, 36-43.

- Kalaierasi, R., Jayalakshmi, N. ve Venkatachalam, P., 2010. Phytosynthesis of nanoparticles and its applications, *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 11, 1-16.
- Kalpana, V. N. ve Devi, R. M., 2018. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaf extract and their antibacterial activity, *Materials Science and Engineering: C*, 91, 300-305.
- Kang, S. C., Lee, C. M., Choi, H., Lee, J. H., Oh, J. S., Kwak, J. H. ve Zee, O. P., 2006. Evaluation of oriental medicinal herbs for estrogenic and antiproliferative activities, *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20, 11, 1017-1019.
- Kannan, N., Mukunthan, K. S. ve Balaji, S., 2011. A comparative study of morphology, reactivity and stability of synthesized silver nanoparticles using *Bacillus subtilis* and *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86, 2, 378-383.
- Khan, S. A., Khan, S. B., Khan, L. U., Farooq, A., Akhtar, K. ve Asiri, A. M., 2018. Fourier transform infrared spectroscopy: Fundamentals and application in functional groups and nanomaterials characterization, *Handbook of Materials Characterization*, 317-344.
- Kharissova, O. V., Kharisov, B. I., Oliva González, C. M., Méndez, Y. P. ve López, I., 2019. Greener synthesis of chemical compounds and materials, *Royal Society Open Science*, 6, 11, 191378.
- Khouya, T., Ramchoun, M., Elbouny, H., Hmidani, A. ve Alem, C., 2022. Loquat (*Eriobotrya japonica* L. (Thunb) Lindl.): Evaluation of nutritional value, polyphenol composition, antidiabetic effect, and toxicity of leaf aqueous extract, *Journal of Ethnopharmacology*, 296, 1, 115473.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J. ve Cho, M. H., 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3, 1, 95-101.
- Kim, M. S., You, M. K., Rhyu, D. Y., Jeong, K. S., Kim, Y. J., Baek, H. Y. ve Kim, H. A., 2011. Oral administration of loquat suppresses DMBA-induced breast cancer in rats, *Food Science and Biotechnology*, 20, 491-497.
- Kim, M. S., You, M. K., Rhuy, D. Y., Kim, Y. J., Baek, H. Y. ve Kim, H. A., 2009. Loquat (*Eriobotrya japonica* L.) extracts suppress the adhesion, migration and invasion of human breast cancer cell line, *Nutrition Research and Practice*, 3, 4, 259.
- Kim, S., Choi, J. E., Choi, J., Chung, K. H., Park, K., Yi, J. ve Ryu, D. Y., 2012. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells, *Toxicology in Vitro*, 26, 2, 344-352.

- Knudson Jr, A. G., 1991. Overview: Genes that predispose to cancer, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 247, 2, 185-190.
- Koba, K., Matsuoka, A., Osada, K. ve Huang, Y. S., 2007. Effect of loquat (*Eriobotrya japonica* L.) extracts on LDL oxidation, *Food Chemistry*, 104, 1, 308-316.
- Komiya, T., Achiwa, Y., Katsuzaki, H., Imai, K., Sakurai, S., Urakawa, K. ve Hibasami, H., 1998. Effect of oleanolic and ursolic acids isolated from Loquat (*Eriobotrya*) on the growth of human lymphoid leukemia cells, *Food Science and Technology International*, Tokyo, 4, 4, 282-284.
- Kora, A. J., Sashidhar, R. B. ve Arunachalam, J., 2012. Aqueous extract of gum olibanum (*Boswellia serrata*): a reductant and stabilizer for the biosynthesis of antibacterial silver nanoparticles, *Process Biochemistry*, 47, 10, 1516-1520.
- Krishnaraj, C., Jagan, E. G., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P. T. ve Mohan, N., 2010. Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 7, 61, 50-56.
- Kumar, A., Kumar, V. ve Sharma, A., 2020a. Concentration-dependent effects of silver nanoparticles on human cells, *Nanotechnology Reviews*, 9, 5, 1137-1150.
- Kumar, A., Umar, A. ve Kumar, V., 2020b. Green synthesis of silver nanoparticles using *Ziziphus jujuba* leaf extract: Characterization and its antibacterial activity, *Materials Letters*, 280, 128613.
- Kumar, K. M., Sinha, M., Mandal, B. K., Ghosh, A. R., Kumar, K. S. ve Reddy, P. S., 2012. Green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* extract at room temperature and their antimicrobial studies, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 91, 228-233.
- Kumar, N., Biswas, K. ve Gupta, R. K., 2016. Green synthesis of Ag nanoparticles in large quantity by cryomilling, *RSC Advances*, 6, 112, 111380-111388.
- Kumar, V., Yadav, S. C. ve Yadav, S. K., 2010. Syzygium cumini leaf and seed extract mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their characterization, *Journal of Chemical Technology ve Biotechnology*, 85, 10, 1301-1309.
- Kumar, V. ve Yadav, S. K., 2009. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications, *Journal of Chemical Technology ve Biotechnology: International Research in Process, Environmental ve Clean Technology*, 84, 2, 151-157.
- Lauby-Secretan B., Vilahur N., Bianchini F., Guha N. ve Straif K., 2018. International Agency for Research on Cancer Handbook Working Group The IARC perspective on colorectal cancer screening, *N Engl J Med* 378, 18, 1734–1740.

- Liveri, V. T., 2006. Controlled synthesis of nanoparticles in microheterogeneous systems, Springer Science+Business Media, Inc., New York, ABD.
- Loo, Y. Y., Chieng, B. W., Nishibuchi, M. ve Radu, S., 2012. Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia sinensis*, *International Journal of Nanomedicine*, 4263-4267.
- Lukman, A. I., Gong, B., Marjo, C. E., Roessner, U. ve Harris, A. T., 2011. Facile synthesis, stabilization, and anti-bacterial performance of discrete Ag nanoparticles using *Medicago sativa* seed exudates, *Journal of Colloid and Interface Science*, 353, 2, 433-444.
- Lü, H., Chen, J., Li, W. L., Ren, B. R., Wu, J. L. ve Zhang, H. Q., 2009. Hypoglycemic effect of the total flavonoid fraction from *Folium Eriobotryae*, *Phytomedicine*, 16, 10, 967-971.
- Maddinedi, S. B., Mandal, B. K. ve Anna, K. K., 2017. Tyrosine assisted size controlled synthesis of silver nanoparticles and their catalytic, in-vitro cytotoxicity evaluation, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 51, 23-29.
- Mafuné, F., Kohno, J. Y., Takeda, Y., Kondow, T. ve Sawabe, H., 2000. Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution, *The Journal of Physical Chemistry B*, 104, 39, 9111-9117.
- Mao, L., 1998. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993; 9: 138–41. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 90, 16, 1182-1184.
- Marimuthu, S., Rahuman, A. A., Santhoshkumar, T., Jayaseelan, C., Kirthi, A. V., Bagavan, A. ve Velayutham, K., 2012. Lousicidal activity of synthesized silver nanoparticles using *Lawsonia inermis* leaf aqueous extract against *Pediculus humanus capitis* and *Bovicola ovis*, *Parasitology Research*, 111, 2023-2033.
- Marin, S., Mihail Vlasceanu, G., Elena Tiplea, R., Raluca Bucur, I., Lemnaru, M., Minodora Marin, M. ve Mihai Grumezescu, A., 2015. Applications and toxicity of silver nanoparticles: a recent review, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15, 16, 1596-1604.
- Medema, J. P., 2013. Cancer stem cells: The challenges ahead, *Nature Cell Biology*, 15, 4, 338-344.
- Miller, K. D., Nogueira, L., Mariotto, A. B., Rowland, J. H., Yabroff, K. R., Alfano, C. M. ve Siegel, R. L., 2019. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 69, 5, 363-385.
- Misra, K. P. ve Misra, R. D. K., 2023. Multifunctional nanomaterials for environmental remediation and biological sustainability, *Environmental Science and Pollution Research*, 1-2.

- Mitscher, L. A., Telikepalli, H., McGhee, E. ve Shankel, D. M., 1996. Natural antimutagenic agents, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 350, 1, 143-152.
- Mittal, A. K., Chisti, Y. ve Banerjee, U. C., 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts, *Biotechnology Advances*, 31, 2, 346-356.
- Mittal, A. K., Kaler, A. ve Banerjee, U. C., 2012. Free radical scavenging and antioxidant activity of silver nanoparticles synthesized from flower extract of *Rhododendron dauricum*, *Nano Biomedicine ve Engineering*, 4, 3.
- Mody, V. V., Siwale, R., Singh, A. ve Mody, H. R., 2010. Introduction to metallic nanoparticles, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2, 4, 282-289.
- Morgan, E., Arnold, M., Gini, A., Lorenzoni, V., Cabasag, C. J., Laversanne, M. ve Bray, F., 2023. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: Incidence and mortality estimates from globocan, *Gut*, 72, 2, 338-344.
- Mukherjee, S., Chowdhury, D., Kotcherlakota, R., Patra, S., Vinothkumar, B., Bhadra, M. P. ve Patra, C. R., 2014. Potential theranostics application of bio-synthesized silver nanoparticles (4-in-1 system), *Theranostics*, 4, 3, 316.
- Nabikhan, A., Kandasamy, K., Raj, A. ve Alikunhi, N. M., 2010. Synthesis of antimicrobial silver nanoparticles by callus and leaf extracts from saltmarsh plant, *Sesuvium portulacastrum* L., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79, 2, 488-493.
- Nafady, A. A., Abdel-Fattah, A. M. ve El-Sherbiny, I. M., 2020. Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts: Characterization and applications, *Materials Today: Proceedings*, 25, 1201-1208.
- Nagarajan, K. J., Ramanujam, N. R., Sanjay, M. R., Siengchin, S., Surya Rajan, B., Sathick Basha, K. Ve Raghav, G. R., 2021. A comprehensive review on cellulose nanocrystals and cellulose nanofibers: Pretreatment, preparation, and characterization, *Polymer Composites*, 42, 4, 1588-1630.
- Nair, B. R., Pradeep, T. ve Ghosh, S., 2016. Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts: A review, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16, 2, 147-164.
- Nair, L. S. ve Laurencin, C. T., 2007. Silver nanoparticles: Synthesis and therapeutic applications, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3, 4, 301-316.
- Naraginti, S. ve Sivakumar, A. 2015. Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Syzygium cumini* and evaluation of their antibacterial activity, *Materials Letters*, 146, 57-60.
- Narayanan, K. B. ve Sakthivel, N., 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes, *Advances in Colloid and Interface Science*, 156, 1-2, 1-13.

- Narayanan, K. B. ve Sakthivel, N., 2011. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents, *Advances in Colloid and Interface Science*, 169, 2, 59-79.
- Nassar, D. ve Blanpain, C., 2016. Cancer stem cells: Basic concepts and therapeutic implications, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11, 47-76.
- Nordling, C., 1953. A new theory on the cancer-inducing mechanism, *British Journal of Cancer*, 7, 1, 68.
- Nurhayati, N., Siadi, K. ve Harjono, H., 2012. Pengaruh konsentrasi natrium benzoat dan lama penyimpanan pada kadar fenolat total pasta tomat (*Lycopersicum esculentum* Mill), *Indonesian Journal of Chemical Science*, 1, 1, 2.
- Oh, J., Min, O. J., Kim, H. A., Kim, Y. J., Baek, H. Y. ve Rhyu, D. Y., 2011. Effect of *Eriobotrya japonica* L. on adipogenesis and body weight, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54, 382-387.
- Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Spiegelhalder, B. ve Bartsch, H., 2000. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil, *European Journal of Cancer*, 36, 10, 1235-1247.
- Panáček, A., Kvitek, L., Pucek, R., Kolář, M. Večeřová, R., Pizúrová, N. ve Zbořil, R., 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 33, 16248-16253.
- Pasupuleti, V. R., Prasad, T. N. V. K. V., Shiekh, R. A., Balam, S. K., Narasimhulu, G., Reddy, C. S. ve Gan, S. H., 2013. Biogenic silver nanoparticles using *Rhinacanthus nasutus* leaf extract: Synthesis, spectral analysis, and antimicrobial studies, *International Journal of Nanomedicine*, 3355-3364.
- Patil, R. S., Kokate, M. R. ve Kolekar, S. S., 2012. Bioinspired synthesis of highly stabilized silver nanoparticles using *Ocimum tenuiflorum* leaf extract and their antibacterial activity, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 91, 234-238.
- Patra, S., Mukherjee, S., Barui, A. K., Ganguly, A., Sreedhar, B. ve Patra, C. R., 2015. Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics, *Materials Science and Engineering: C*, 53, 298-309.
- Pawłowska, A. M., Żurek, N., Kapusta, I., De Leo, M. ve Braca, A., 2023. Antioxidant and antiproliferative activities of phenolic extracts of *Eriobotrya japonica* L. (Thunb.) Lindl. *Fruits and Leaves, Plants*, 12, 18, 3221.
- Philip, D., 2011. *Mangifera indica* leaf-assisted biosynthesis of well-dispersed silver nanoparticles, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78, 1, 327-331.

- Piao, M. J., Kang, K. A., Lee, I. K., Kim, H. S., Kim, S., Choi, J. Y. ve Hyun, J. W., 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis, *Toxicology Letters*, 201, 1, 92-100.
- Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M. D., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J. ve Zweibaum, A., 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line HT-29, *The Journal of Cell Biology*, 94, 3, 507-514.
- Pokrajac, L., Abbas, A., Chrzanowski, W., Dias, G. M., Eggleton, B. J., Maguire, S. ve Mitra, S., 2021. Nanotechnology for a sustainable future: Addressing global challenges with the international networksustainable nanotechnology, *ACS Nano*, 15, 12.
- Prabakar, K., Sivalingam, P., Rabeek, S. I. M., Muthuselvam, M., Devarajan, N., Arjunan, A. ve Wembonyama, J. P., 2013. Evaluation of antibacterial efficacy of phyto fabricated silver nanoparticles using *Mukia scabrella* (*Musumusukkai*) against drug resistance nosocomial gram negative bacterial pathogens, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 104, 282-288.
- Prabhu, S. ve Poulouse, E. K., 2012. Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects, *International Nano Letters*, 2, 1-10.
- Prakash, P., Gnanaprakasam, P., Emmanuel, R., Arokiyaraj, S. ve Saravanan, M., 2013. Green synthesis of silver nanoparticles from leaf extract of *Mimusops elengi*, Linn. for enhanced antibacterial activity against multi drug resistant clinical isolates, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 255-259.
- Prasad, R., 2014. Synthesis of silver nanoparticles in photosynthetic plants, *Journal of Nanoparticles*, 2014, 1, 963961.
- Qin, Y., Ji, X., Jing, J., Liu, H., Wu, H. ve Yang, W. 2010. Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 372, 1-3, 172-176.
- Raghunandan, D., Borgaonkar, P. A., Bendegumble, B., Bedre, M. D., Bhagawanraju, M., Yalagatti, M. S. ve Abbaraju, V., 2011a. Microwave-assisted rapid extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using carom seed (*Trachyspermum copticum*) extract and in vitro studies, *American Journal of Analytical Chemistry*, 2, 04, 475.
- Raghunandan, D., Mahesh, B. D., Basavaraja, S., Balaji, S. D., Manjunath, S. Y. ve Venkataraman, A., 2011b. Microwave-assisted rapid extracellular synthesis of stable bio-functionalized silver nanoparticles from guava (*Psidium guajava*) leaf extract, *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 2021-2028.

- Rai, M., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P. ve Gade, A. K., 2012. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria, *Journal of Applied Microbiology*, 112, 5, 841-852.
- Rai, M., Yadav, A. ve Gade, A., 2016. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their potential applications: A review, *Journal of Nanobiotechnology*, 14, 1-12.
- Rajan, R., Chandran, K., Harper, S. L., Yun, S. I. ve Kalaichelvan, P. T., 2015. Plant extract synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials, *Industrial Crops and Products*, 70, 1, 356-373.
- Raveendran, P., Fu, J. ve Wallen, S. L., 2003. Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 125, 46, 13940-13941.
- Reyes-Zurita, F. J., Rufino-Palomares, E. E., Lupiáñez, J. A. ve Cascante, M., 2009. Maslinic acid, a natural triterpene from *Olea europaea* L., induces apoptosis in HT29 human colon-cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway, *Cancer Letters*, 273, 1, 44-54.
- Rodríguez-León, E., Iñiguez-Palomares, R., Navarro, R. E., Herrera-Urbina, R., Tánori, J., Iñiguez-Palomares, C. ve Maldonado, A., 2013. Synthesis of silver nanoparticles using reducing agents obtained from natural sources (*Rumex hymenosepalus* extracts), *Nanoscale Research Letters*, 8, 1, 1-9.
- Roleira, F. M., Tavares-da-Silva, E. J., Varela, C. L., Costa, S. C., Silva, T., Garrido, J. ve Borges, F., 2015. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties, *Food Chemistry*, 183, 235-258.
- Roni, M., Murugan, K., Panneerselvam, C., Subramaniam, J. ve Hwang, J. S., 2013. Evaluation of leaf aqueous extract and synthesized silver nanoparticles using *Nerium oleander* against *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae), *Parasitology Research*, 112, 1, 981-990.
- Sahu, N., Soni, D., Chandrashekhar, B., Sarangi, B. K., Satpute, D. ve Pandey, R. A., 2013. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Cynodon dactylon* leaves and assessment of their antibacterial activity, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, 999-1004.
- Sala, A., Recio, M. D. C., Giner, R. M., Máñez, S., Tournier, H., Schinella, G. ve Ríos, J. L., 2002. Anti-inflammatory and antioxidant properties of *Helichrysum italicum*, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54, 3, 365-371.
- Salatino, M. L. F. ve Prado, J., 1998. Flavonoid glycosides of Pteridaceae from Brazil, *Biochemical Systematics And Ecology*, 26, 7, 761-769.
- Salleh, A., Naomi, R., Utami, N. D., Mohammad, A. W., Mahmoudi, E., Mustafa, N. ve Fauzi, M. B., 2020. The potential of silver nanoparticles for antiviral and antibacterial applications: A mechanism of action, *Nanomaterials*, 10, 8, 1566.

- Sankar, R., Karthik, A., Prabu, A., Karthik, S., Shivashangari, K. S. ve Ravikumar, V., 2013. *Origanum vulgare* mediated biosynthesis of silver nanoparticles for its antibacterial and anticancer activity, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 108, 80-84.
- Santhoshkumar, T., Rahuman, A. A., Rajakumar, G., Marimuthu, S., Bagavan, A., Jayaseelan, C. ve Kamaraj, C., 2011. Synthesis of silver nanoparticles using *Nelumbo nucifera* leaf extract and its larvicidal activity against malaria and filariasis vectors, *Parasitology Research*, 108, 693-702.
- Sarkar, S., Horn, G., Moulton, K., Oza, A., Byler, S., Kokolus, S. ve Longacre, M., 2013. Cancer development, progression, and therapy: An epigenetic overview, *International journal of Molecular Sciences*, 14, 10, 21087-21113.
- Sathishkumar, G., Gobinath, C., Karpagam, K., Hemamalini, V., Premkumar, K. ve Sivaramakrishnan, S., 2012. Phyto-synthesis of silver nanoscale particles using *Morinda citrifolia* L. and its inhibitory activity against human pathogens, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 235-240.
- Sathishkumar, M., Sneha, K., Won, S. W., Cho, C. W., Kim, S. ve Yun, Y. S., 2009. Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73, 2, 332-338.
- Saxena, A., Tripathi, R. M. ve Singh, R. P., 2010. Biological synthesis of silver nanoparticles by using onion (*Allium cepa*) extract and their antibacterial activity, *Dig J Nanomater Bios*, 5, 2, 427-432.
- Schofield, P., Mbugua, D. M. ve Pell, A. N., 2001. Analysis of condensed tannins: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 1-2, 21-40.
- Scolaro, C., Geldbach, T. J., Rochat, S., Dorcier, A., Gossens, C., Bergamo, A. ve Dyson, P. J., 2006. Influence of hydrogen-bonding substituents on the cytotoxicity of RAPTA compounds, *Organometallics*, 25, 3, 756-765.
- Septiani, N. K. A., Parwata, I. M. O. A. ve Putra, A. A. B., 2018. Penentuan kadar total fenol, kadar total flavonoid dan skrining fitokimia ekstrak etanol daun gaharu (*Gyrinops versteegii*), *Wahana Matematika dan Sains: Jurnal Matematika, Sains, dan Pembelajarannya*, 12, 1, 78-89.
- Shah, R., Khan, Y. ve Ali, A. 2021. Effects of silver nanoparticles on colorectal cancer cells, *Journal of Nanobiotechnology*, 19, 1, 123-135.
- Sharma, M., Rahim, M. S., Kumar, P., Mishra, A., Sharma, H. ve Roy, J., 2020. Large-scale identification and characterization of phenolic compounds and their marker-trait association in wheat, *Euphytica*, 216, 1-18.
- Sharma, R. P., Kaur, M., Kumar, S. ve Devi, P., 2014. Phytochemical and pharmacological potential of *Eriobotrya japonica*: A review, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, 2, 157-164.

- Sharma, V., Bhatt, D. ve Kaur, G., 2012. Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts: A review, *Journal of Chemical Sciences*, 124, 2, 135-145.
- Sharma, V. K., Yngard, R. A. ve Lin, Y., 2009. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities, *Advances in Colloid and Interface Science*, 145, 1-2, 83-96.
- Shimokawa, M., Ohta, Y., Nishikori, S., Matano, M., Takano, A., Fujii, M. ve Sato, T., 2017. Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. *Nature*, 545, 7653, 187-192.
- Siegel, R., DeSantis, C. ve Jemal, A., 2014. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 64, 2, 104-117.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fedewa, S. A., Ahnen, D. J., Meester, R. G., Barzi, A. ve Jemal, A., 2017. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 67, 3, 177-193.
- Singh, M., Kumar, M., Kalaivani, R., Manikandan, S. ve Kumaraguru, A. K., 2013. Metallic silver nanoparticle: A therapeutic agent in combination with antifungal drug against human fungal pathogen, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, 407-415.
- Singh, P., Garg, A., Pandit, S., Mokkaapati, V. R. S. S. ve Mijakovic, I., 2018. Antimicrobial effects of biogenic nanoparticles, *Nanomaterials*, 8, 12, 1009.
- Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., ve Yang, D. C., 2016. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms, *Trends in Biotechnology*, 34, 7, 588-599.
- Singleton V. L. ve Rossi J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 3, 144-158.
- Song, F. L., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xiao, Q., Kuang, L. ve Li, H. B., 2010. Total phenolic contents and antioxidant capacities of selected Chinese medicinal plants, *International Journal of Molecular Sciences*, 11, 6, 2362-2372.
- Song, J. Y. ve Kim, B. S., 2009. Biological synthesis of bimetallic Au/Ag nanoparticles using Persimmon (*Diopyros kaki*) leaf extract, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 26, 1, 326-332
- Subba Rao, N., Subrahmanyam, A. ve Babu Rao, G., 2013. Fluoride-bearing groundwater in Gummanampadu sub-basin, Guntur district, Andhra Pradesh, India, *Environmental Earth Sciences*, 70, 575-586.
- Subramanian, V. ve Suja, S., 2012. Green synthesis of silver nanoparticles using *Coleus amboinicus* lour, antioxidant activity and in vitro cytotoxicity against Ehrlich's ascite carcinoma, *J. Pharm, Res*, 5, 2, 3-1272.

- Suganya, A., Murugan, K., Kovendan, K., Mahesh Kumar, P. ve Hwang, J. S., 2013. Green synthesis of silver nanoparticles using *Murraya koenigii* leaf extract against *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*, *Parasitology Research*, 112, 1385-1397.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. ve Bray, F., 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 71, 3, 209-249.
- Takahara, P. M., Rosenzweig, A. C., Frederick, C. A. ve Lippard, S. J., 1995. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin, *Nature*, 377, 6550, 649-652.
- Takuma, D., Guangchen, S., Yokota, J., Hamada, A., Onogawa, M., Yoshioka, S. ve Nishioka, Y., 2008. Effect of *Eriobotrya japonica* L. seed extract on 5-fluorouracil-induced mucositis in hamsters, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31, 2, 250-254.
- Taniguchi, S., Imayoshi, Y., Kobayashi, E., Takamatsu, Y., Ito, H., Hatano, T. ve Yoshida, T., 2002. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* L. calli, *Phytochemistry*, 59, 3, 315-323.
- Tavakoli, M. M., Tavakoli, R., Hasanzadeh, S. ve Mirfasih, M. H., 2016. Interface engineering of perovskite solar cell using a reduced-graphene scaffold, *The Journal of Physical Chemistry C*, 120, 35, 19531-19536.
- Turkevich, J., Stevenson, P. C. ve Hillier, J., 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55-75.
- Umashankari, J., Inbakandan, D., Ajithkumar, T. T. ve Balasubramanian, T., 2012. Mangrove plant, *Rhizophora mucronata* (Lamk, 1804) mediated one pot green synthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity against aquatic pathogens, *Aquatic Biosystems*, 8, 1, 1-7.
- Veerasamy, R., Xin, T. Z., Gunasagaran, S., Xiang, T. F. W., Yang, E. F. C., Jeyakumar, N. ve Dhanaraj, S. A., 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities, *Journal of Saudi Chemical Society*, 15, 2, 113-120.
- Vijayaraghavan, K., Nalini, S. K., Prakash, N. U. ve Madhankumar, D., 2012. One step green synthesis of silver nano/microparticles using extracts of *Trachyspermum ammi* and *Papaver somniferum*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94, 114-117.
- Wang, J., Li, Y., Wang, X. ve Jiang, C., 2012. Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in human glioblastoma cell lines U251 by suppressing TGF- β 1/miR-21/PDCD 4 pathway, *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 111, 2, 106-112.

- Wang, Y., Zhang, L., Liu, Y., Chen, R., ve Xu, Z., 2024. Clinical translation and landscape of silver nanoparticles, *Drug Delivery and Translational Research*, 14, 1, 35-57.
- Wangchuk, P., 2018. Therapeutic applications of natural products in herbal medicines, biodiscovery programs, and biomedicine, *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 8, 1, 1-20.
- Wen, H., Jung, H. ve Li, X., 2015. Drug delivery approaches in addressing clinical pharmacology-related issues: Opportunities and challenges, *The AAPS Journal*, 17, 1327-1340.
- Wennersten, R., Fidler, J. ve Spitsyna, A., 2008. Nanotechnology: A new technological revolution in the 21st century, 943-952 , En, K. ve Misra, B. (Editorler), *Handbook of Performability Engineering*, Springer, London, England.
- Yokota, J., Takahashi, M., ve Hata, S., 2004. The role of triterpenoids in apoptosis and cell proliferation inhibition, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27, 9, 1421-1424.
- Yokota, J., Takuma, D., Hamada, A., Onogawa, M., Yoshioka, S., Kusunose, M. ve Nishioka, Y., 2008. Gastroprotective activity of *Eriobotrya japonica* seed extract on experimentally induced gastric lesions in rats, *Journal of Natural Medicines*, 62, 96-100.
- Yousaf, H., Mehmood, A., Ahmad, K. S. ve Raffi, M., 2020. Green synthesis of silver nanoparticles and their applications as an alternative antibacterial and antioxidant agents, *Materials Science and Engineering: C*, 112, 110, 901.
- Yu, C., Tang, J., Liu, X., Ren, X., Zhen, M. ve Wang, L., 2019. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Eriobotrya japonica* L. (Thunb.) leaf extract for reductive catalysis, *Materials*, 12, 1, 189.
- Zhang, J., Zu, Y., Dhanasekara, C. S., Li, J., Wu, D., Fan, Z. ve Wang, S., 2017. Detection and treatment of atherosclerosis using nanoparticles, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 9, 1, e1412.
- Zhang, W., Liu, Y., Liu, J., Zhang, S. ve Li, H., 2022a. Green synthesis of silver nanoparticles using *Cymbopogon citratus* (lemon grass) leaf extract and their antibacterial activity, *Materials Science and Engineering: C*, 32, 3, 533-538.
- Zhang, W., Xu, C. ve Li, X., 2016. Biological activities of extracts from loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.): A review, *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 12, 1983.
- Zhang, W., Zhao, X., Sun, C., Li, X. ve Chen, K., 2015. Phenolic composition from different loquat (*Eriobotrya japonica* L. Lindl.) cultivars grown in China and their antioxidant properties, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20, 1, 542–555.

- Zhang, Y., Li, J. ve Wang, X., 2022b. Adaptive responses of cancer cells to long-term exposure to silver nanoparticles, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79, 7, 372.
- Zhao, Y. ve Wei, W., 2018. Characterization of silver nanoparticles synthesized from plant extracts: A review, *Environmental Chemistry Letters*, 16, 1, 145-158.
- Zhou, C., Chen, K., Sun, C., Chen, Q., Zhang, W. ve Li, X., 2007. Determination of oleanolic acid, ursolic acid and amygdalin in the flower of *Eriobotrya japonica* L. Lindl by HPLC, *Biomedical Chromatography*, 21, 7, 755-761.
- Zhou, C. H., Li, X., Xu, C. J., Sun, C. D. ve Chen, K. S., 2012. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity of loquat fruits, *Journal of Food Biochemistry*, 36, 5, 621-626.
- Žurek, N., Kapusta, I., De Leo, M. ve Braca, A., 2023. Antioxidant and antiproliferative activities of phenolic extracts of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. *Fruits and Leaves, Plants*, 12, 18, 3221.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Beyzanur ENGEZ

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray üniversitesi Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji,
2017-2021

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji,
2021-2024

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi / Gönüllü yaz stajı / 2020

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Kongrelerde Sunulan Makaleler

1. Engez B. ve Doğaner F., 2024. *Eriobotrya japonica* L. (malta eriği) ekstraktı aracılı AgNP sentezi, karakterizasyonu ve antibakteriyel aktivitesinin araştırılması, International Topkapı Congress III, İstanbul, Bildiriler Kitabı, 457-469.