



T.C.

HİTİT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

***ASTRAGALUS MEMBRANACEUS*'DAN YEŞİL SENTEZ İLE**

HAZIRLANAN GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN

ANTİMİKROBİYAL VE ANTİKANSER ETKİNLİĞİNİN

İNCELENMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Ferhan Öztolüt

Çorum - 2023

***ASTRAGALUS MEMBRANACEUS*'DAN YEŞİL SENTEZ İLE
HAZIRLANAN GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN
ANTİMİKROBİYAL VE ANTİKANSER ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

Lisanüstü Eğitim Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Aslı Kara

Ferhan ÖZTOLÜT

Ferhan ÖZTOLÜT tarafından hazırlanan “*Astragalus membranaceus*’ dan Yeşil Sentez İle Hazırlanan Gümüş Nanopartiküllerin Antimikrobiyal ve Antikanser Etkinliğinin İncelenmesi ” adlı tez çalışması 27/04/2023 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Hitit Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Burçin ÖZÇELİK

.....

Dr. Öğr. Üyesi Aslı KARA

.....

Dr. Öğr. Üyesi Naile ÖZTÜRK

.....

Hitit Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../..... tarih ve sayılı kararı ile Ferhan Öztolüt ’ün Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Yüksek Lisans/Doktora derecesi alması onanmıştır.

(İmza)

Prof. Dr. Muhammed Asif YOLDAŞ

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

* Jüri Başkanının adı yazılmalıdır.

** Tez danışmanının adı yazılmalıdır.

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını beyan ederim.

FERHAN ÖZTOLÜT

ASTRAGALUS MEMBRANACEUS'DAN YEŞİL SENTEZ İLE HAZIRLANAN GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN ANTİMİKROBİYAL VE ANTİKANSER ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Ferhan ÖZTOLÜT

ORCID: 0000-0002-6855-7396

HİTİT ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans

Nisan 2023

ÖZET

Gümüş, geçmişten günümüze sterilizasyon ya da yanık, ülser gibi hastalıkların tedavisi gibi pek çok farklı alanda kullanılmıştır. Gümüş nanopartiküller (AgNP) ise bakteri, virüs gibi mikroorganizmalar üzerinde kullanılan doza bağlı olarak üremelerini inhibe edici özelliklerinden ötürü pek çok çalışmada kullanılmıştır. Son yıllarda çevre kirliliği gibi küresel sorunlar nedeniyle çevre dostu olan yeşil sentez (biyosentez) yöntemi oldukça önemli bir konum kazanmış olup basit ve düşük maliyetli olması, toksik madde kullanımını gerektirmemesi nedeniyle popüler hale gelmiştir. Yeşil sentez yöntemiyle zehirli indirgeme ajanları yerine, çevre dostu indirgeme ajanları kullanılarak metal nanoparçacık, metal oksit ve manyetik parçacıklar gibi nanoürünlerin sentezi yapılabilmektedir. *Astragalus membranaceus* (Geven), çin tıbbında yüzyıllardır teşhis ve tedavi amaçlı kullanılan temel bitkilerden birisidir. Bu nedenle birçok çalışmada terapötik etkileri araştırılmıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak tez çalışmamızda *Astragalus* yaprak ve kökünden elde edilen ekstraktlar kullanılarak yeşil sentez yöntemi ile gümüş nanopartiküller elde edilmiş, elde edilen nanopartiküllerin karakterizasyonları yapılmış, disk difüzyon yöntemi ile seçilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi tayin edilmiş, sağlıklı fibroblast hücrelerinde biyouyumlulukları ve meme kanseri hücre hattı üzerinde potansiyel *in vitro* sitotoksik etkileri analiz edilmiştir. Tez çalışmamızın sonuçlarına göre, *Astragalus* kök ve yaprağından elde edilen ekstraktlar ile gümüş nitratin indirgenme reaksiyonuna bağlı olarak gümüş nanopartiküller yeşil sentez yöntemi ile elde edilmiştir. *Astragalus* kökünden sentezlenen gümüş nanopartiküllerin partikül büyüklüğü 14 nm, yapraktan sentezlenen gümüş nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ise 55 nm olarak tayin edilmiştir. Sentezlenen bu nanopartiküller ile yapılan antimikrobiyal aktivite ve antikanser etkinlik analizleri çalışmalarında, nanopartiküllerin

kullanılan doza bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca sağlıklı fibroblast hücrelerinde yapılan biyouyumluluk analizlerinde ise gümüş nanopartiküllerin sitotoksik etki göstermediği bulunmuştur. Bu tez çalışması ile Astragalus bitkisi kullanılarak yeşil sentez yöntemi ile gümüş nanopartikülleri başarılı bir şekilde sentezlenmiş, nanopartiküllerin antimikrobiyal ve antikanser etkinlikleri tayin edilmiştir.

Anahtar Kavramlar: *Astragalus membranaceus*, Gümüş nanopartiküller, kanser, yeşil sentez.

Bilim Kodu: 20609

Bu tez çalışması Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeler Birimi tarafından 19004-Lisansüstü Tez Projesi (Yüksek Lisans) kapsamında SMYO19004.22.001 kodu ile desteklenmiştir.

INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL AND ANTI-CANCER EFFICIENCY OF SILVER
NANOPARTICLES PREPARED BY GREEN SYNTHESIS FROM ASTRAGALUS MEMBRANACEUS

Ferhan OZTOLUT

ORCID: 0000-0002-6855-7396

HITIT UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL

Master of Science Thesis

April 2023

ABSTRACT

Silver has been used in many different areas from past to present, such as sterilization or treatment of diseases such as burns and ulcers. Silver nanoparticles (AgNP) have been used in many studies due to their growth-inhibiting properties on microorganisms such as bacteria and viruses, depending on the dose used. In recent years, due to global problems such as environmental pollution, the environmentally friendly green synthesis (biosynthesis) method has gained a very important position and has become popular because it is simple and low-cost and does not require the use of toxic substances. With the green synthesis method, nanoproducts such as metal nanoparticles, metal oxides and magnetic particles can be synthesized by using environmentally friendly reducing agents instead of toxic reducing agents. Astragalus membranaceus (Astragalus) is one of the basic plants used for diagnosis and treatment in Chinese medicine for centuries. For this reason, its therapeutic effects have been investigated in many studies. Based on this information, in our thesis study, silver nanoparticles were obtained by the green synthesis method using extracts obtained from Astragalus leaves and roots, the obtained nanoparticles were characterized, their antimicrobial effect against selected microorganisms was determined by the disk diffusion method, their biocompatibility in healthy fibroblast cells and breast cancer cell line. Potential in vitro cytotoxic effects on were analyzed. According to the results of our thesis study, silver nanoparticles were obtained by the green synthesis method based on the reduction reaction

of silver nitrate with extracts obtained from Astragalus root and leaf. The particle size of the silver nanoparticles synthesized from the Astragalus root was determined as 14 nm, and the particle size of the silver nanoparticles synthesized from the leaf was determined as 55 nm. In the antimicrobial activity and anticancer activity analysis studies conducted with these synthesized nanoparticles, it was found that the nanoparticles showed cytotoxic effects depending on the dose used. In addition, in biocompatibility analyzes performed on healthy fibroblast cells, it was found that silver nanoparticles did not have a cytotoxic effect. In this thesis study, silver nanoparticles were successfully synthesized by the green synthesis method using the Astragalus plant, and the antimicrobial and anticancer activities of the nanoparticles were determined.

Key Terms: *Astragalus membranaceus*, Silver nanoparticles, cancer, green synthesis.

Science Code: 20609

This thesis work was supported by Hitit University Scientific Research and Projects Unit under the 19004-Graduate Thesis Project (Master's) with the code SMY019004.22.001.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince tecrübelerini ve bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen, bana karşı her zaman ilgili alakalı hoşgörölü ve sabırlı yaklaşan, çok değerli ve kıymetli danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Aslı KARA'ya,

Antimikrobiyal çalışmamda bilgi ve alakası ile yanımda bulunan sayın jüri üyem Dr. Öğr. Üyesi Burçin ÖZÇELİK'e, tez çalışmamda değerli öneri ve katkılarıyla beni destekleyen sayın jüri üyem Dr. Öğr. Üyesi Naile ÖZTÜRK'e, tez çalışmamda kullanılan karakterizasyon analizinde bilgi ve alakası ile yardımcı olan Arş. Gör. Ömer YURDAKUL'a,

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim boyunca her türlü desteği veren ve bu tezin her aşamasında çok büyük emeği olan Moleküler Biyoloji ve Genetik alanında yüksek lisans yapan canım arkadaşım Eda PERÇİN'e,

Tez çalışmalarının yürütülmesinde teknik olarak alt yapı desteği sağlayan Hitit Üniversitesi, Bilimsel Teknik Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜBTÜAM),

Tez çalışmalarının gerçekleştirilmesi için gerekli maddi desteği sağlayan Hitit Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)'ne,

Sabırlarından, anlayışından ve her zaman desteklerinden dolayı Sevgili Aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ferhan ÖZTOLÜT

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar	xi
GRAFİKLER	xii
HARİTALAR	xiii
ŞEKİLLER	xiv
RESİMLER	xv
GİRİŞ	1
1. BÖLÜM	2
1.1 Geven (<i>Astragalus membranaceus</i>) Hakkında Genel Bilgiler	2
1.1.1 Astragalus'un Tedavide Kullanımı	3
1.1.2 Astragalus'un Kimyasal İçeriği	3
1.1.3 Kanser Hakkında Kısa Bilgi	5
1.2 Nanoteknolojiye Genel Bakış	9
1.2.1 Nanopartiküler Sistemler	9
1.2.2 Nanopartiküllerin Sınıflandırılması	10
1.2.3 Gümüş Nanopartiküller	12
1.2.4 Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri	14
1.2.5 Yeşil Sentez (Biyolojik Sentez) Yöntemi	15
1.2.6 Bitki Ekstraktından Nanopartikül Hazırlanması	17
1.2.7 Bitkilerden Gümüş Nanopartikül Sentezi	17
1.2.8 Gümüş Nanopartikül Sentez Mekanizması	18
1.2.9 Nanopartiküllerin Toksik Etkileri	20
1.2.10 Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri	21
2. MATERYAL VE YÖNTEM	25
2.1 Materyal	25
2.1.1 Laboratuvarda Kullanılan Malzemeler	25

2.2 Yöntem.....	28
2.2.1 Astragalus Bitkisinin Temin Edilmesi.....	28
2.2.2 Astragalus'tan Soxhlet Cihazında Sulu Ekstrenin Hazırlanması	29
2.2.3. Yöntem 1: Bitki Ekstrelerinden Çözücünün Uzaklaştırılması	32
2.2.4 Gümüş Nanopartikül Sentezinde Yöntem 2	32
2.2.5 Gümüş Nitrat (AgNO_3) Çözeltilisinin Hazırlanması.....	32
2.2.6 Gümüş Nanopartiküllerin (AgNP) Sentezlenmesi	34
2.2.7 Gümüş Nanopartikül (AgNP)'lerin Karakterizasyonu.....	35
2.2.7.1 Gümüş nanopartikül (AgNP)'lerin Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile Partikül Boyut Analizi ve Zeta Potansiyelinin Belirlenmesi	35
2.2.7.2 Gümüş nanopartikül (AgNP)'lerin Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile Boyut ve Morfolojisinin Analizi.....	36
2.2.7.3 Gümüş nanopartikül (AgNP)'lerin UV-Vis Spektrofotometre Analizi	36
2.2.7.4 Gümüş nanopartikül (AgNP)'lerin Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektrofotometre (FT-IR) Analizi.....	36
2.2.8 Gümüş Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	36
2.2.9 Gümüş Nanopartiküllerin Biyoyumluluk Tayini	38
2.2.10 Gümüş Nanopartiküllerin Antikanser Etkinliğinin Belirlenmesi.....	38
2.2.11 İstatiksel Analiz.....	39
3. SONUÇLAR	40
3.1 Gümüş nanopartiküller (AgNP)'lerin Karakterizasyonu: UV-Vis Spektrofotometre Sonuçları	40
3.2 Gümüş nanopartikül (AgNP)'lerin Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile Partikül Boyut Analizleri Ve Zeta Potansiyelleri	54
3.3 Gümüş Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Sonuçları	57
3.4 Gümüş Nanopartiküllerin FT-IR Analiz Sonuçları.....	59
3.5 Gümüş Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Test Sonuçları	63
3.6 Gümüş Nanopartiküllerin Biyoyumluluk Analiz Sonuçları	67
3.7 Gümüş Nanopartiküllerin Antikanser Etkinliğinin Belirlenmesi	69
4. TARTIŞMA.....	72
SONUÇ VE ÖNERİ.....	82
KAYNAKÇA.....	85

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
Tablo 1:Astragalus'un kimyasal içeriği (Shan ve ark., 2019).....	4
Tablo 2:Astragalus'ta bulunan saponinlerin, kanser türleri üzerine etkileri (Du, Long ve Chen, 2014).....	7
Tablo 3:Geven1'den elde edilen nanopartiküllerin, partikül boyutu, zeta potansiyeli ve PDI verileri (Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir).....	56
Tablo 4:Geven2'den elde edilen naopartiküllerin, partikül boyutu, zeta potansiyeli ve PDI verileri (Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir).....	56
Tablo 5: Gümüş nanopartiküllerin L929 hücrelerinde 48 saatlik biyoyumluluk analiz sonuç verileri(% olarak ifade edilmiştir).....	68
Tablo 6:MCF-7 hücrelerinde 48 saatlik in vitro sitotoksosite sonuçları.....	70

GRAFİKLER

Grafik	Sayfa
Grafik 1: Geven1'den elde edilen gümüş nanopartiküllerinin (AgNP) boyut dağılımı.....	55
Grafik 2: Geven1'den elde edilen gümüş nanopartiküllerinin (AgNP) zeta potansiyel değeri. 55	
Grafik 3: Geven 2'den elde edilen nanopartiküllerinin (AgNP) boyut dağılımı	57
Grafik 4:Geven 2'den elde edilen gümüş nanopartiküllerin (AgNP) zeta potansiyel değeri.....	57
Grafik 5: Geven1 nanopartiküllerinin FT-IR analiz verileri.....	60
Grafik 6: Geven1 ekstraktının FT-IR analiz verileri.....	60
Grafik 7: Geven 2 nanopartiküllerinin FT-IR analiz verileri.....	61
Grafik 8: Geven 2 ekstraktının FT-IR analiz verileri.....	61
Grafik 9: Geven1 ekstrakt ve Geven 1 nanopartikül verilerinin karşılaştırmalı analiz sonuçları	62
Grafik 10:Geven2 ekstrakt ve Geven2 nanopartikül verilerinin karşılaştırılmalı analiz sonuçları	63
Grafik 11: L929 hücrelerinde 48 saatlik in vitro biyouyumluluk çalışması.	69
Grafik 12: Gümüş nanopartiküllerinin MCF-7 hücrelerinde 48 saatlik in vitro sitotoksosite sonuçları.	71

HARİTALAR

Harita

Sayfa

Harita 1: Astragalus'un yetiştiği lokasyon	28
--	----



ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 1: Normal hücre ve kanserli hücrenin bölünmesi (Yazıcı, 2021)	6
Şekil 2:Nanopartiküllerin Biyoloji ve Tıpta Kullanım Alanları (Yavuz ve Yılmaz, 2021; Koçak, 2019)	10
Şekil 3: Tasarlanan nanopartikül (NP)'lerin özellikleri	11
Şekil 4: Nanopartikül sentezinde kullanılan nanomalzemelerin şeması ('Nanomalizemeler' Nanoteknoloji; Resim 1)	12
Şekil 5:Nanopartikül sentez yönteminde Top Down ve Bottom Up yöntemleri (Bruna, 2021)	14
Şekil 6: Bir tepkimenin ya da malzemenin yeşil olabilmesi için gereken adımlar (Koçak, 2019)	16

RESİMLER

Resim	Sayfa
Resim 1: Astragalus familyasına ait bir tür	2
Resim 2:Astragalus familyasına ait başka bir tür (Orman Genel Müdürlüğü BİYOD Veritabanı' dan alınmıştır).....	2
Resim 3:Astragalus membranaceus'un çizim görünümü (Plant ISOform sequencing database veritabanından alınmıştır).....	3
Resim 4: Gümüş nanopartiküllerin elektron mikroskop görüntüsü (Bağyu, 2020).....	13
Resim 5:Gümüş nanopartiküllerinin antimikrobiyal etki basamakları (Karakaya, 2021)	13
Resim 6:Bitki Ekstraktında bulunan polifenoller ile kaplanmış gümüş nanopartikül (Yazıcı, 2021).....	18
Resim 7:Bitki ekstraktından metal nanopartikül sentezinin genel şematik görünümü (Kütük, 2019).....	19
Resim 8:Gümüş nanopartiküllerin yeşil sentez ile elde edilmesi (Gündoğan, 2021).....	20
Resim 9: Astragalus membranaceus, Çorum,2022.....	28
Resim 10:Astragalus membranaceus'un diğer bitkiler ile görünümü.	29
Resim 11:Astragalus membranaceus'un yapraklarının ve kökünün yıkanarak kurutulmuş hali	29
Resim 12:Ekstraksiyon için havanda ezilen yapraklar	30
Resim 13:Ekstraksiyon için küçük parçalara ayrılarak hazırlanan kökler	30
Resim 14:Hazırlanan örnekler, filtre kağıdına sarılarak sokslet cihazında ekstrakte edilmesi.	31
Resim 15:Optimizasyon için hazırlanan Gümüş nitrat (AgNO_3) konsantrasyonları	33
Resim 16:Nanopartiküllerin sentezlendikten sonra santrifüj ile çözücünden ayrılması ve nanopartiküllerin kuru hali	35
Resim 17:Geven 1 ile AgNP sentezi (4 saat başlangıç).....	40
Resim 18: Geven 1 ile AgNP sentezi (4 saat sonu)	40
Resim 19: Geven 1 + 1 M AgNO_3 (4 saat).....	41
Resim 20:Geven 1 + 3 mM AgNO_3 (4 Saat)	42
Resim 21:Geven 1 + 5 mM AgNO_3 (4 Saat)	42
Resim 22:Geven 1 ile AgNP sentezi (8 saat başlangıç).....	43
Resim 23:Geven 1 ile AgNP sentezi (8 saat sonu)	43
Resim 24:Geven 1 + 1M AgNO_3 (8 saat).....	44
Resim 25:Geven 1 + 3mM AgNO_3 (8 saat).....	44
Resim 26:Geven 1 + 5 mM AgNO_3 (8 saat).....	44
Resim 27:Geven 1 ile AgNP sentezi (24 saat başlangıç)	45
Resim 28:Geven 1 ile AgNP sentezi (24 saat sonu).....	45
Resim 29:Geven 1 + 1mM AgNO_3 (24 saat).....	46

Resim 30: Geven 1 + 3 mM AgNO ₃ (24 saat)	46
Resim 31: Geven 1 + 5mM AgNO ₃ (24 saat)	47
Resim 32: Geven 2 ile AgNP sentezi (4 saat başlangıç)	48
Resim 33: Geven 2 ile AgNP sentezi (4 saat sonu)	48
Resim 34: Geven 2 + 1M AgNO ₃ (4 saat)	49
Resim 35: Geven 2 + 3 mM AgNO ₃ (4 saat)	49
Resim 36: Geven 2 + 5 mM AgNO ₃ (4 saat)	49
Resim 37: Geven 2 ile AgNP sentezi (8 saat başlangıç)	50
Resim 38: Geven 2 ile AgNP sentezi (8 saat sonu)	50
Resim 39: Geven 2 + 1M AgNO ₃ (8 saat)	51
Resim 40: Geven 2 + 3 mM AgNO ₃ (8 saat)	51
Resim 41: Geven 2 + 5 mM AgNO ₃ (8 saat)	52
Resim 42: Geven 2 ile AgNP sentezi (24 saat başlangıç)	52
Resim 43: Geven 2 ile AgNP sentezi (24 saat sonu)	53
Resim 44: Geven 2 + 1M AgNO ₃ (24 saat)	53
Resim 45: Geven 2 + 5 mM AgNO ₃ (24 saat)	54
Resim 46: Geven 2 + 3 mM AgNO ₃ (24 saat)	54
Resim 47: Geven1 gümüş nanopartiküllerinin SEM ile boyut analiz verileri	58
Resim 48: Geven 1 gümüş nanopartiküllerinin SEM görüntüsü	58
Resim 49: Geven 2 gümüş nanopartiküllerinin SEM görüntüsü ve boyut analiz verileri	59
Resim 50: Geven 1 ile sentezlenen nanopartiküllerin Acinetobacter de etkisi	64
Resim 51: Geven 1 ile sentezlenen nanopartiküllerin Escherichia coli de etkisi	64
Resim 52: Geven 1 ile sentezlenen nanopartiküllerin Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus (MRSA) da etkisi	65
Resim 53: Geven1 ile sentezlenen nanopartiküllerin Klebsiella pnömoni de etkisi	65
Resim 54: Geven 1 ile sentezlenen nanopartiküllerin Pseudomonas aeruginosa da etkisi	66
Resim 55: Geven 1 ile sentezlenen nanopartiküllerin Staphylococcus aureus da etkisi	66
Resim 56: Geven 2 gümüş nanopartiküllerinin mikroorganizmalarda antimikrobiyal etkinliği sonucu	67
Resim 57: Gümüş nanopartiküllerinin L929 hücrelerindeki etkisinin inverted mikroskop görüntüsü	68
Resim 58: Gümüş nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerinde etkisinin Inverted mikroskop görüntüsü	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kullanılan Simgeler

mg	miligram
g	gram
nm	nanometre
s	saat
dk	dakika
ml	mililitre
cm	santimetre
µg	mikrogram
°C	derece santigrat
M	molar
mM	mili molar
rpm	dakikadaki devir sayısı

Kullanılan Kısaltmalar

AgNO ₃	Gümüş Nitrat
AgNP	Gümüş nanopartikül
DLS	Dinamik ışık saçılımı
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
MTT	3-4,5- dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
np	Nanopartikül
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
UV	Ultraviyole ışın

GİRİŞ

Son yıllarda çalışmalarda kullanımı artan gümüş, çok uzun yıllardan beri hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılmaktadır. Gümüş nanopartiküller (AgNP) ise antimikrobiyal etkilerinden dolayı görüntüleme, tanı ve tedavi gibi pek çok çalışmada kullanılmıştır. Bu metalik nanoparçacıklar fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere farklı yollarla elde edilebilirler. Fiziksel ve kimyasal yöntemlerle sentezlenen metalik nanoparçacıkların biyolojik yöntemlere nazaran daha yüksek enerji, yüksek basınç, yüksek maliyet gerektirmesi ve toksik kimyasallar içermesinden ötürü biyolojik yöntemlerin daha uygun olduğu bildirilmiştir. Buna ek olarak son yıllarda çevre kirliliği gibi küresel sorunlar nedeniyle çevre dostu olan yeşil sentez (biyosentez) biyolojik yöntemler içerisinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Biyosentez, basit ve az maliyetli olup toksik madde kullanımını gerektirmez. Yeşil sentezde, zehirli indirgeme ajanları yerine çevre dostu indirgeme ajanları kullanılarak metal nanoparçacık, metal oksit nanoparçacık ve manyetik nanoparçacıkların sentezi gerçekleştirilir.

Bitkiler, mantarlar, mikroorganizmalar ve biyolojik olarak parçalanabilen polimerler, nanopartiküllerin yeşil sentez yöntemiyle üretimi için indirgeme, kaplama ve dengeleyici ajanlar olarak kullanılabilir. Nanopartikül sentezi için bitki kullanımının en önemli sebeplerinden biri kolay bulunabilirliğidir. Bitki ve bitki bölümleri, karbonhidrat, yağ, protein, nükleik asit, pigment ve çeşitli indirgeyici maddeleri yapılarında bulundurmalarından ötürü kimyasal indirgeyici maddelere gerek duyulmadan ve dolayısıyla toksik etki oluşturmada gümüş nanopartikül üretimini sağlayabilmektedirler.

Astragalus membranaceus (Geven), Çin tıbbında yüzyıllardır tedavi amaçlı kullanılan temel bitkilerden birisidir. Bu nedenle birçok çalışmada terapötik etkileri araştırılmıştır. Astragaluslar, baklagiller (Fabaceae) familyasına ait bir ya da çok yıllık olabilen ancak çoğunlukla odunsu olan bir cinstir. Ülkemizde ise pek çok türü bulunmakla birlikte endemik türlere de rastlanmaktadır. Literatürde genellikle bitki kökünden antimikrobiyal etkinlik tayinine yönelik araştırmalar bulunmakta olup, bitkinin diğer kısımları ile ilgili yeterince çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalarda ise sadece bitki ekstraktının antimikrobiyal, antioksidan ve antikanser etkinlikleri değerlendirilmiş olup özellikle *Astragalus*'tan yeşil sentez yöntemi ile gümüş nanopartiküllerin üretimi ve karakterizasyonuna yönelik literatür verisine rastlanmamıştır.

Bu bilgilerden yola çıkarak tez çalışmamızda *Astragalus* bitkisi yaprak ve kökünden elde edilen ekstaktların kullanımı ile yeşil sentez yöntemiyle elde edilen gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonlarının yapılması, disk difüzyon yöntemi ile seçilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisinin belirlenmesi ve L929 sağlıklı fare fibroblast hücre hattı üzerindeki biyouyumlulukları ile MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkisinin tayin edilmesi hedeflenmiştir.

1.BÖLÜM

1.1 Geven (*Astragalus membranaceus*) Hakkında Genel Bilgiler

Astragaluslar, baklagiller (Fabaceae) familyasına ait bir ya da çok yıllık olabilen ancak çoğunlukla odunsu olan bir cinstir (Akkurt, 2020). Bu cins esas olarak Avrupa, Kuzey Afrika, Asya ve Akdeniz’ de doğal yayılış göstermektedir (Sharifi- Rad ve ark., 2020). Ülkemizde ise pek çok türünün yanı sıra endemik türleri de bulunmakta olup, çayır, mera ve doğada kendiliğinden yetişmektedir (Resim 1 ve Resim 2). Bazı Astragalus bitkileri ise hiçbir bitkinin yetişemeyeceği yerlerde yetişebilirler. Böylece toprağın korunmasını ve yeni toprak oluşumunu sağlarlar. Doğal olarak yetişen bu bitkiler hem evcil hem de yabani hayvanların yiyecek kaynaklarını oluştururlar (Başbağ, 2018). Ayrıca bazı türler tıbbi olarak kullanılmakla birlikte bazı taksonları boya, dokuma ve kağıt hammaddesi olarak kullanılırlar (Kadioğlu ve ark., 2008).



Resim 1: Astragalus familyasına ait bir tür

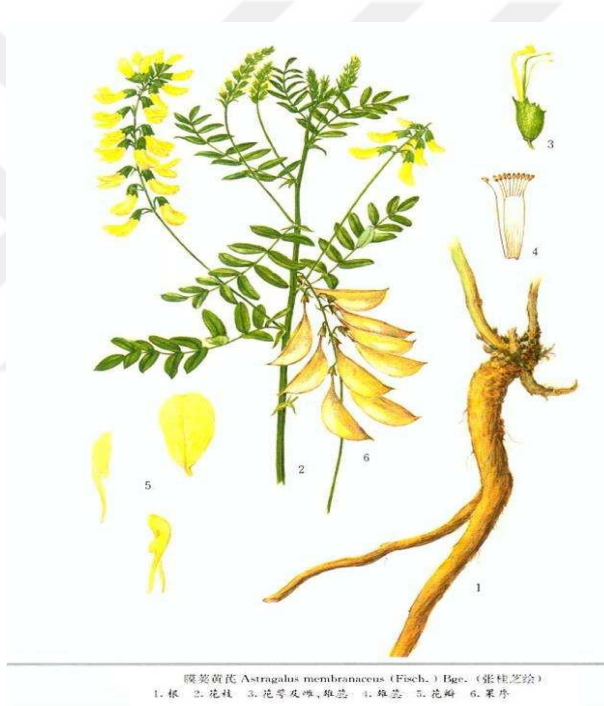


Resim 2:Astragalus familyasına ait başka bir tür (Orman Genel Müdürlüğü BİYOD Veritabanı’
dan alınmıştır)

1.1.1 Astragalus'un Tedavide Kullanımı

Antik çağlardan beri Astragalus bitkisi özellikle kökleri, bağışıklık sistemini güçlendirmek ve iltihabı azaltmak için Avrupa'da ve Çin'de halk hekimleri arasında ana ilaç olarak uygulanmaktadır (Sharifi-Rad ve ark., 2020).

Çin'de bitki kitaplarında üstün bir bitki olarak kaydedilmiş ve kökün renginden dolayı 'sarı lider' olarak adlandırılmıştır. Semptomatik olarak iştahsızlık, yorgunluk ve kronik ishal şeklinde ortaya çıkan hastalıklar için tedavi amaçlı bitkisel karışımlarda kullanılmıştır (Auyeung ve ark., 2016). Bununla birlikte kökler, göz, tümör, boğaz, göğüs ve sırt ağrılarının tedavisinde, zarar gören dokuları yenilemek ve yaraları iyileştirmede kullanılmıştır (Sharifi-Rad ve ark., 2020). Ayrıca bazı Asya topluluklarında ise sağlıklı gıda takviyesi olarak kullanılmıştır. Bitkinin tıbbi olarak kullanılan kısımları ilkbahar ve sonbaharda 4-7 yıllık bitkilerden toplanan kökleridir (Auyeung ve ark., 2016).



Resim 3:Astragalus membranaceus'un çizim görünümü (Plant ISOform sequencing database veritabanından alınmıştır).

Astragalus bitkisi, hastanın durumuna ya da hastalığın çeşidine göre tek olarak ya da Angelica (Melek otu), Poria (Mantar) ve Ginseng gibi çeşitli bitkilerle karıştırılarak kullanılabilir (Zhou ve ark., 2018). Kullanılan doz ise her bir kaynatma için 9 g ila 30 g arasında değişebilir (Auyeung ve ark., 2016). Genellikle kullanımı güvenli bir bitki olarak kabul edilebilir. Yapılan bir çalışmada *Radix Astragali*'nin *in vitro* ve *in vivo* olarak bir zehirlenme etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir (Upton ve ark., 2011).

1.1.2 Astragalus'un Kimyasal İçeriği

Astragalus membranaceus, karışık bir kimyasal yapıya sahip olmasına rağmen içeriğinde şimdiye kadar 200'den fazla bileşik tespit edilmiştir. *Astragalus* türleri üzerinde yapılan fitokimyasal araştırmalara göre kimyasal yapısında temel olarak polisakkaritler, flavonoidler, saponinler, stereoller ve çeşitli uçucu yağlar bulunmaktadır (Shan ve ark., 2019, Sharifi- Rad ve ark., 2020). Ayrıca çinko, demir, magnezyum, kalsiyum, sodyum, potasyum ve gümüş gibi çeşitli elementler de eser miktarda bulunmaktadır (Auyeung ve ark., 2016).

Tablo 1: *Astragalus*'un kimyasal içeriği (Shan ve ark., 2019)

Gruplar	Biyoaktif Kimyasal içerikleri
Triterpen	Astragalositler
Saponinleri	Asetilstragalosit Isoastragalosit Astramembrannin Sikloastragenol Siklosieversigenis Soyasaponin Soyasapogenol Lupeol
Flavonoidler	Isoflavononlar Isoflavanlar Pterokarpanlar Flavononlar Kalkonlar
Polisakkaritler	Glukanlar Heteropolisakkaritler

Saponinler, triterpen veya steroidal yapıda bulunan sulu çözeltileri çalkalandığında kalıcı köpük oluşturan ve kandaki alyuvarları hemoliz edebilen glikozitlerdir. Ayrıca balıklar gibi soğukkanlı canlılarda toksik etki göstermeleri ve antibiyotik etkiye sahip olmaları nedeniyle oldukça ilgi çekmektedirler. Doğada özellikle Orta Asya'da yetişen pek çok bitki familyasına ait bitki türlerinden alınan örnekler ile yapılan çalışmalarda, örneklerde yaklaşık % 45 oranında saponin türü bileşikler tespit edilmiştir (Küçükkurt ve Fidan, 2008). Saponin kelimesinin temelinde latince "sapo" kelimesi bulunur ve sabun anlamına gelmektedir (Küçükkurt ve Fidan, 2008).

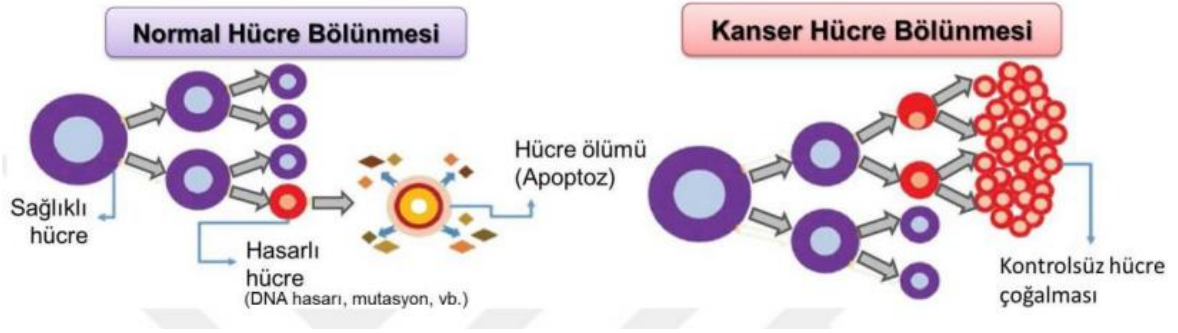
Astragalus kökü 0,5-3,0 mg/g aralığında flavonoid içermektedir. *Astragalus* kökünden toplamda 12 farklı flavonoid izole edilmiştir. Bu flavonoidler arasında izoflavanlar, izoflavanlar ve flavonlar bulunmaktadır. *Astragalus* içeriğinde bulunan Kalikozin 7-O- β -D glikozit bitkinin kalite analizlerinde kimyasal bir belirteç olarak kullanılmaktadır. *Astragalus* polisakkaritleri

ise son yıllarda çok büyük ilgi görmüştür. Bu polisakkaritler arasında A, B, ve C glukanlar ve polisakkarit D denilen heteropolisakkaritler bulunmaktadır. Astragalus kökünden polisakkaritlerin izole edilmesi ve karakterize edilmesi oldukça zor bir işlemdir. Yapılan bir çalışmaya göre bitkinin toprak üstü kısımlarından elde edilen 14 adet polisakkaritin bağırsak yamalarında immünmodülatör aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Polisakkaritlerin karmaşık yapısı ve makromoleküler yapıları nedeniyle bilim insanları için kalite kontrolü hala büyük zorluktur. Bu nedenle biyoaktiviteleri henüz tam olarak belirlenememiştir (Ayeung ve ark., 2016).

1.1.3 Kanser Hakkında Kısa Bilgi

Kanser, organizmaya ait hücrelerin çok çeşitli nedenlerden ötürü kontrolsüz bir biçimde bölünmesi ve anormal hücrelerin uzak dokulara metastazı ile karakterize edilen bir hastalık grubu olarak adlandırılmaktadır. Kanser, normal hücreleri, malignant hücrelere dönüştüren çok aşamalı bir süreçten oluşur (Al Semerci, 2020). Tüm kanserler DNA' da meydana gelen bazı mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Oluşan kanserlerin yaklaşık %10-15'lik kısmının anne ve babadan gelen genlerle aktarıldığı yani genetik kökenli olduğu, yaklaşık %85-90'ının ise sürekli canlı olan hücrelerdeki DNA'nın, mutajenlere maruz kalması sonucu DNA'da meydana gelen değişiklikler ve kopyalama hataları sonucunda ortaya çıktığı bildirilmiştir. DNA'da oluşan bu mutasyonlarla hücrelerin yaşamını sürdürdüğü ve gelişmesi ile bu hücreden kanser klonunun oluşmasına neden olduğu belirtilmiştir (Şimşek, 2021).

Tümör hücrelerinin oluşmasına neden olan genetik değişikliklere hem iç hem de dış etkenler neden olabilir. İç faktörler hücrenin DNA'sında meydana gelen bozukluklara neden olmaktadır. Kanser hücrelerinin oluşumundan, normal hücre büyümesini sınırlandırmaktan sorumlu tümör baskılayıcı genlerin inaktifleştirilmesi, kontrolsüz hücre bölünmesine neden olan onkogenlerin aktivasyonu ve amplifikasyonu da dahil olmak üzere büyük genetik değişiklikler sorumludur (Al Semerci, 2020). Organizmadaki hücreleri kansere çeviren genetik faktörler genel olarak, DNA hasarı tamir mekanizmalarında oluşan kayıplar, bazı tümör baskılayıcı genlerin işlevini kaybetmesi, apoptozda görev alan genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler ve protoonkogenlerin mutasyon sebebiyle onkogenlere dönüşmesi olarak sıralanabilir (Yazıcı, 2021). Dış faktörler ise viral ve bakteriyel enfeksiyonlar, kimyasal karsinojenlere uzun süreli maruziyet, iyonize veya UV radyasyon ve sigara bu grupta sayılabilir (Al Semerci, 2020).



Şekil 1: Normal hücre ve kanserli hücrenin bölünmesi (Yazıcı, 2021)

Kanser, Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018'deki verilerine göre 9,6 milyon ölüm oranı ile kardiyovasküler hastalıklardan sonra en yüksek ikinci ölüm nedenidir. Ülkemizde en çok görülen kanser türleri erkeklerde, akciğer, kalın bağırsak, mide, pankreas ve prostat kanserleri iken, kadınlarda ise meme, serviks, kalın bağırsak, akciğer, yumurtalık ve mide kanserleridir (Yazıcı, 2021).

Meme kanseri, dünyada kadın popülasyonunda en sık rastlanılan kanser türüdür. Amerikan Kanser Derneği'nin 2020 yılı verilerine göre, Amerika'da 276,480 yeni kanser vakası rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra ülkemizde ise meme kanseri insidansı 100 binde 43 olup her sene yaklaşık 15000 kadına meme kanseri teşhisi konulmaktadır. Rapor edilen kanser vakalarının yaş aralıklarına bakıldığında ise %44,5'inin 50-69 yaş aralığında ve %40,4'ünün ise 25-49 yaş aralığında olduğu belirlenmiştir.

Meme kanserinin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalarda meme kanseri görülme riskinin bazı kriterlere sahip kadınlarda daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Breast Cancer Gene (BRCA) 1 ve 2 genlerinde meydana gelen mutasyonlar meme kanseri risk faktörlerinin başında gelmektedir (Al Semerci, 2020).

Meme kanseri insidans ve mortalite açısından dünya çapında kadınları en çok tehdit eden sağlık sorunudur. Cerrahi rezeksiyon meme kanserinin en etkili tedavisi olarak kabul edilmektedir. PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunun anormal aktivasyonu, meme kanserleri de dahil olmak üzere çok sayıda kanserde gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun meme kanseri büyümesi, hayatta kalması ve hareketliliğinin yanı sıra ilaç direncinin kazanılmasında da çok önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Bu nedenle, PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu, meme kanseri hastalarını tedavi etmek için tek başına veya diğer hedefli tedavilerle kombinasyon halinde kullanılabilecek yeni antikanser ajanların geliştirilmesi için çekici bir hedef olarak kabul edilmektedir (Zou ve ark., 2018).

1.1.4 Astragalus'un Tedavide Kullanımı

Son yıllarda yapılan çalışmalar bitkide bulunan doğal triterpen saponinlerin antikanser özellik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu triterpen saponinlerin, *in vitro* ve *in vivo* olarak yapılan çalışmalarda geniş aralıkta malign hücreler üzerinde kemoterapötik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca yapılan çalışmada triterpenoid saponinlerin antikanser etkilerinin insan ve hayvan kanser modelleri üzerinde etkilerine bakılmıştır. Buna göre bazı triterpen saponinlerin kanser hücreleri üzerinde normal sağlıklı hücrelere göre daha yüksek hassasiyet gösterdiği ve hayvanlarda tümör gerilemesine neden olan dozların ise iyi tolere edilebildiği ve organlarda veya vücut ağırlığında farklılıklar gibi gözlemlenebilir hiçbir yan etki veya toksisite belirtisi göstermediğini ortaya koymuştur (Du, Long ve Chen, 2014).

Tablo 2:Astragalus'ta bulunan saponinlerin, kanser türleri üzerine etkileri (Du, Long ve Chen, 2014).

Tür	Saponinler	Kanser Türleri	Moleküler mekanizması
<i>Astragalus membranaceus var. mongolicus</i>	Astragalus saponinleri	AGS Hücresi (Mide Kanseri)	Kaspaz-3' ü aktive eder ve siklin B1 MMP ve VEGF'yi azaltır.
<i>Astragalus membranaceus</i>	Astragalosit II	Bel-7402, Bel- 7402/FU (İnsan papilloma virüsü ile ilişkili endoservikal adenokarsinom)	MAPK'ları inhibe eder ve P-gb'yi ve MDR1 ifadesini azaltır.
<i>Astragalus sp.</i>	Astragalosit IV	HepG2 (Karaciğer Kanseri)	Vav3.1 ifadesini inhibe eder.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, çoğu kanserin tedavisinin tam olarak başarıya ulaşamadığı ve ek olarak bazı tedavi şekillerinin çok ciddi yan etkilere sebep olduğu raporlanmıştır. Shen ve arkadaşları (2008), *Astragalus membranaceus'un*, kanser tedavisinde potansiyel olarak umut vadeden terapötik bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Shen ve ark., 2008).

Yapılan bir çalışmaya göre, *Astragalus* özütünün çeşitli kolon kanseri hücrelerinin büyümesini *in vitro* olarak inhibe ettiği bulunmuştur (Lin ve ark., 2003). *Astragalus membranaceus'* un kullanıldığı başka bir antikanser çalışmasında, mide kanseri kaynaklı mezotel hücre apoptozu araştırılmıştır. Bu çalışmada, mide kanseri hücresi tarafından indüklenen insan peritoneal mezotel hücrelerinin apoptozunu *Astragalus* ile inhibe edeceği öne sürülmüştür. Elde edilen sonuçlar, *Astragalus'un* mide kanseri tedavisinde adjuvan kemoterapötik ajan olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Na ve ark., 2009). Diğer bir çalışma, *Astragalus* bitki ekstraktının peritoneal makrofajların tümör öldürücü aktivitesini büyük oranda arttırdığını ve *in vitro* sitotoksik hücrelerin oluşumunu uyardığını göstermiştir. Ayrıca sonuçlar, konakçının birincil ve metastatik tümörlere karşı savunmasının güçlendirdiğini ve eski bağışıklık fonksiyonlarına geri getirmeye yardımcı olduğunu ortaya koymuştur (Cho ve Leung, 2007).

Geleneksel tıpta, çoğunlukla doğu tıbbında ve Çin’de Astragalus, ödemi tedavi etmek ve bağışıklığı güçlendirmek için kullanılmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Astragalus’un kurutulan köklerinin ana bileşenleri olan polisakkaritlerin geniş bir biyolojik aktiviteye ve farmakolojik etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Adesso ve ark., 2018).

Ma ve arkadaşları, Astragalus’un kökünden izole edilen polisakkaritler ile sentezledikleri gümüş nanopartiküllerin 4 klinik izolat ve 4 referans bakteri suşu olmak üzere toplamda 8 farklı mikroorganizma üzerinde disk difüzyon yöntemi kullanarak antibakteriyel aktivitesi analiz edilmiştir. Astragalus’un kök polisakkaritleri ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerin hem klinik olarak izole edilen bakterilere (Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), Metisiline Dirençli *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), *Escherichia coli* (E. Coli) ve *Pseudomonas aeruginosa* (P.Aeruginosa)) hem de standart suşlara (*Staphylococcus aureus* (S.aureus), *Staphylococcus epidermidis* (S. Epidermidis), *Escherichia coli* (E. Coli) ve *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeruginosa) karşı doza bağlı bir şekilde antibakteriyel aktivite sergilediği rapor edilmiştir (Ma ve ark., 2017).

Kora ve Arunachalam, yeşil yöntem ile *Astragalus gummifer*’den sentezledikleri gümüş nanopartiküllerin gram negatif ve gram pozitif bakterilerde büyüme üzerine inhibe edici etkisini incelemiştir. Gram pozitif bakteriyel *S. aureus*’ta yaklaşık 11,5 mm inhibisyon zonu ve gram negatif bakteri suşu olan *E. coli* ve *P. aeruginosa*’da ise sırasıyla 9,5 mm ve 10,5 mm inhibisyon zonu ölçülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin her gram sınıfında önemli antibakteriyel aktivite segiledikleri için, antibiyotik direncinin önemli bir sorun olduğu durumlarda umut verici biyomedikal uygulamalara sahip olabileceği ortaya konulmuştur (Kora ve Arunachalam, 2012).

Astragalus’da bulunan APS’ler, antioksidan, antiinflamatuvar, antidiyabet ve immünomodülasyon gibi pek çok biyoaktivitelerden sorumlu ana bileşenler olarak tanımlanmış, sıçan ve farelerde yapılan çalışmaya göre APS’nin vücut ağırlığı ve kan şekerini azalttığı ve insülin duyarlılığını iyileştirdiği bulunmuştur (Huang ve ark., 2017).

Astragalus membranaceus ile yapılan klinik ve deneysel çalışmalar bitkinin antioksidatif etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Astragalus kökünün özünden elde edilen flavonidler gibi aktif kimyasal bileşenler, zarlarda bulunan serbest radikallerin neden olduğu hasarı en aza indirir ve antioksidatif etki sağlarlar (Aeyeung ve ark., 2016). Buna örnek olarak, bitki özütünün bazı nöron hücrelerince (PC12 cells) glutamatın neden olduğu hasarı inhibe ettiği ve süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerin aktivitelerini arttırdığı ayrıca bitkide bulunan flavonoidlerin hücrede oluşan oksidatif hasarı önlediği tayin edilmiştir (Yu ve ark., 2005 ve Yu ve ark., 2009). Ayrıca, Astragalus flavonoidleri ve saponinler, hücrede süperoksit, hidrojen peroksit ve ultraviyole ışınlarının neden olduğu membran lipid peroksidasyonunu büyük oranda inhibe ederken, bitkide bulunan polisakkaritlerin ise daha zayıf bir koruyucu etki gösterdiği bulunmuştur (Aeyeung ve ark., 2016).

1.2 Nanoteknolojiye Genel Bakış

Nanoteknoloji, boyut bakımından 1-100 nm büyüklüğündeki nanomalzemelerin karakterizasyonu, uygulamaları, üretilmesi ve geliştirilmesidir. Bu alan bilim ve teknolojiadaki gelişmeler ile yeni ürünler üretmek amacıyla ortaya çıkan ve hızla büyüyen yeni bir teknoloji dalıdır (Al Semerci, 2020). Nanoteknoloji, latince cüce anlamına gelen ‘nano’ kelimesinden türemektedir (Altuncu, 2021). Bilimsel olarak nano kelimesi ise bilimde kullanılan herhangi bir birimin milyarda biri anlamına gelmektedir. Buna göre ancak 2-3 tane atom yan yana gelerek bir nanometreyi oluşturabilir. Böylece yaklaşık 100-1000 tane atom bir araya gelerek nano boyutta bir nesneyi oluşturabilir (Gündoğan, 2021; Bağyu, 2020). Nanoteknoloji kelime olarak ise ilk kez Norio Taniguchi tarafından 1974 yılında kullanılmıştır (Karakaya, 2021). Profesör Taniguchi’ye göre “ileri düzeyde duyarlılık ile mevcut olan teknolojinin küçültülmesine dayanan teknoloji” olarak tanımlanmıştır (Bağyu, 2020).

Nanoteknolojinin temel olarak amaçları ise şunlardır:

- I. Nanometre ölçeğinde yapıların sentezlenmesi
- II. Nanometre ölçekli yapıların analizi
- III. Nanometre boyutunda olan yapıların fiziksel özelliklerinin ortaya çıkarılması
- IV. Ortaya çıkarılan yapıların farklı ve üstün malzeme özelliklerinin ve üretim süreçlerinin saptanması
- V. Daha hafif ve daha dayanıklı yapıların üretilmesi
- VI. Daha az enerji ve malzeme kullanımı (Aktepe, 2021).

Bu teknoloji ile üretilen pek çok nanoürün bulunmakta olup ilaç ve gen taşıyıcı özellikleri ile üstün nitelikli nanopartiküler sistemler günümüzde önemli bir yere sahiptir.

1.2.1 Nanopartiküler Sistemler

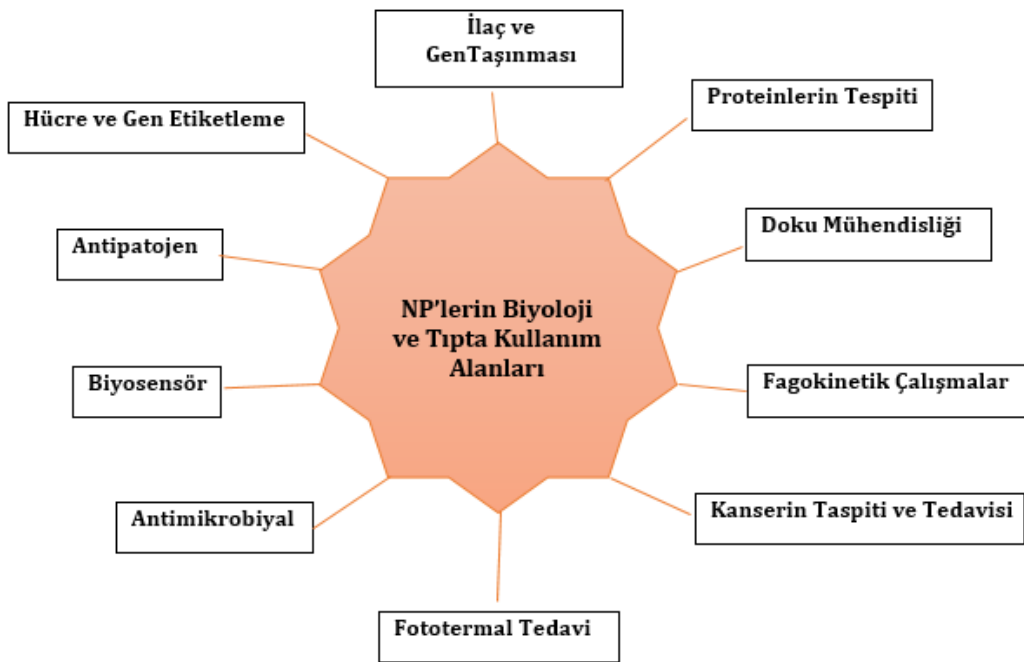
Fizik, kimya ve biyolojinin mühendislikle ortaya çıkardığı en önemli yapılardan olan nanopartiküller, makro malzemeler ile karşılaştırıldığında fiziksel ve kimyasal özellikleri farklılık göstermektedir. Diğer bir ifade ile, herhangi materyal küçülmesine bağlı olarak fiziksel ve kimyasal özellikleri de değişmektedir (Şimşek, 2021). Nanopartiküller (Np), yığın halde bulunan dökme malzeme ile moleküler materyaller arasında, maddenin ara malzeme halini temsil etmede kullanılmaktadır (Dağlıoğlu ve Yılmaz, 2018).

Nanopartiküller, makro boyuttaki malzemelere kıyasla tamamen yeni ve gelişmiş özellikler taşımaktadır. Bu yeni özellikler, partiküllerin büyüklüğü, dağılımı ve morfolojik yapı gibi spesifik özelliklerinde meydana gelen değişimler ile elde edilir. Elde edilen bu moleküller sergiledikleri farklı ve üstün özelliklerden dolayı günümüzde tıp, kozmetik, eczacılık, biyomedikal ve biyoteknoloji gibi pek çok alanda etkili bir biçimde kullanılmaktadır (Çiftçi, 2021). Farklı özelliklerde tasarlanan nanoparçacıklar, elektriksel ve tanısal özellikleri

sebebiyle çokça araştırılmaktadır. Bu nanopartiküllerin geniş yüzey alanları nedeniyle ilaç taşıyıcı rol oynamasına ve katalizör aktiviteleri nedeniyle moleküler görüntülemeye yer almalarına dair sonuçlar raporlanmıştır (Deepika ve ark., 2019).

Günümüzde nanopartiküllerin diğer malzemelerden daha çok tercih edilmesinin sebepleri şunlardır:

- Yüksek yüzey alanı/hacim oranı
- Yüzeyde bulunan atomların benzersiz özellikte karakterleri
- Elektronik yapısının boyut bağımlılığı
- Kuantum boyutta etkileri (Acar, 2021; Koçak, 2019)



Şekil 2:Nanopartiküllerin Biyoloji ve Tıpta Kullanım Alanları (Yavuz ve Yılmaz, 2021; Koçak, 2019)

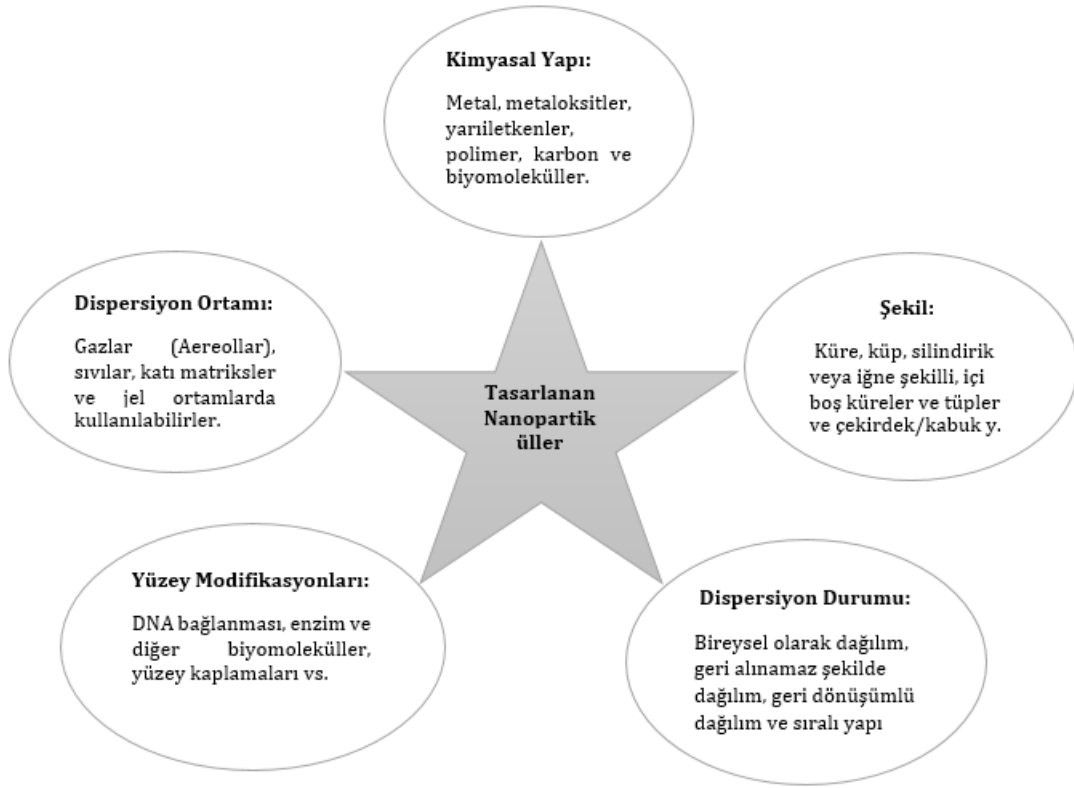
Sentezlenen nanopartiküller nano boyutlu yapılarından ötürü diğer makro ve mikro yapılara göre hücre içerisine çok daha kolay penetre olmaktadır (Aktepe, 2021). Nanopartiküllerin bu kadar küçük olmaları nedeniyle hücre membranını daha kolay geçmeleri sağlanmakta ve hücre içinde bulunan materyaller ile etkileşmeleriyle istenen etkiler daha kolay elde edilmektedir (Çiftçi, 2021).

1.2.2 Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

Nanopartiküller Şekil 3'te gösterildiği gibi, genel olarak morfolojilerine, boyutlarına, kompozisyonlarına, şekillerine ya da fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır (Kütük, 2019).

Tasarlanan nanomalzemeler sınıflandırılırken esas olarak boyutlarına bakılmaktadır. Buna göre tüm dış boyutları nano ölçekte olan malzemeler sıfır boyutlu olarak kategorize edilirler. Nanopartiküller ve nanodotlar sıfır boyutlu malzemelere örnektir. Tek boyutlu nanomalzemelere ise nanoteller, nanotüpler ve nanoçubuklar örnek verilebilir. İki boyutlu nanomalzemeler ise plaka benzeri yapılar olup, grafen, nanotabakalar ve nanofimler örnek gösterilebilir. Son olarak üç boyutlu nanomalzemelere ise nanotüpler ve çoklu nanokatmanlar örnek olarak verilebilirler (Abeşka, 2019).

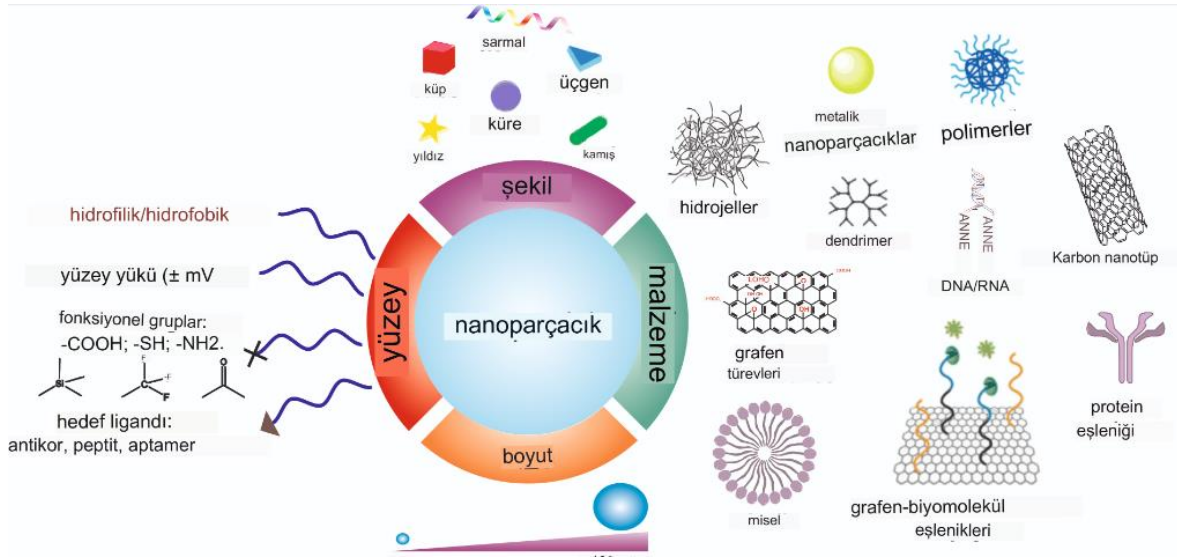
Nanopartiküller, farklı kimyasal özelliklere sahip malzemeler ile sentezlenebilirler. Bunlarmarasında metaller, silikatlar, polimerler ve organik moleküller yaygın olarak kullanılan malzemelerdir (Al Semerci, 2020).



Şekil 3: Tasarlanan nanopartikül (NP)'lerin özellikleri

Nanopartiküller, karbon bazlı, organik, inorganik ve kompozit esaslı malzemeler kullanılarak sentezlenmektedirler. İnorganik temelli malzemeler, metal veya metaloksit içeren nanopartiküllerdir. Bunlara altın (Au) ya da gümüş (Ag) gibi metaller, çinko oksit (Zn) ve titanyum dioksit (TiO₂) gibi metaloksitler örnek olarak verilebilir. Karbon bazlı yapılar karbon nanotüpleri içermektedir. Organik nanomalzeme olarak ise dendrimerler, miseller, polimer nanoparçacıklar ve lipozomlar örnek olarak verilebilir. Son olarak kompozit nanoürünler ise,

organik bazlı, karbon esaslı veya metal bazlı nanomalzemelerin herhangi bir malzeme ile kombinasyonu ile oluşturulmaktadır (Sadak, 2019) (Şekil 4).



Şekil 4: Nanopartikül sentezinde kullanılan nanomalzemelerin şeması ('Nanomalzemeler' Nanoteknoloji; Resim 1)

1.2.3 Gümüş Nanopartiküller

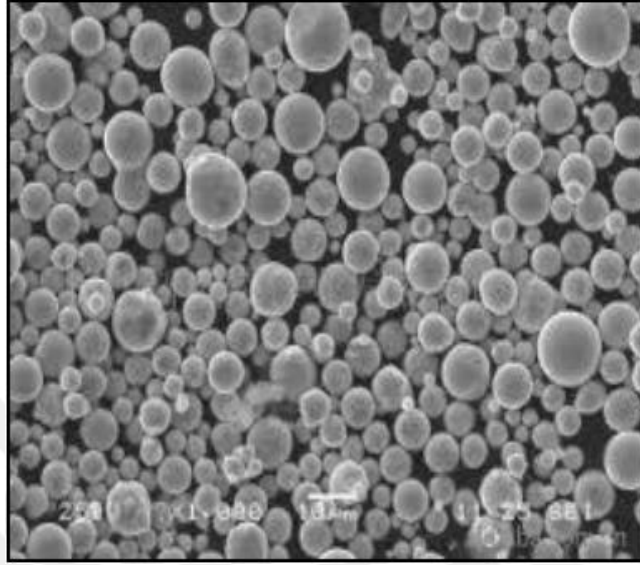
Gümüş, geçmişten günümüze tanı ve tedavi alanında pek çok kez kullanılmıştır. Yarı soy metal grubundan olan gümüş, çok çeşitli kullanım alanlarının bulunması ve sağlığa zarar vermemesi gibi üstün yeteneklerinden dolayı nanopartikül sentezinde sıklıkla tercih edilen bir elementtir. Soy metallerden elde edilen nanopartiküller, malzemenin dökme halinden büyük ölçüde farklı olan, benzersiz elektronik, optik, manyetik, mekanik ve kimyasal özellikleri nedeniyle son yıllarda pek çok çalışmaya konu olmuştur (Altuncu, 2021).

Periyodik tablodaki simgesi Ag olan gümüş, beyaz renkli, ışığı çok iyi yansıtan, esnek, oksitlenmeye direç gösterebilen değerli bir metaldir. Ağır metaller arasında olan gümüş düşük toksik özelliği ve yüksek antimikrobiyal özelliği nedeniyle tıpta çokça kullanılmaktadır. Ayrıca gümüş nitrattan elde edilen çözeltiler uzun yıllardır yanık tedavisinde kullanılmıştır (Gündoğan, 2021).

Kolloidal halde olan gümüş, iletkenliği ve yüksek termal/kimyasal kararlılığı nedeniyle pek çok çalışmada incelenmiştir. Bu özellikler, yığın materyal ve nanometre ölçeğindeki malzeme ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde farklılık göstermektedir (Deepika, 2019).

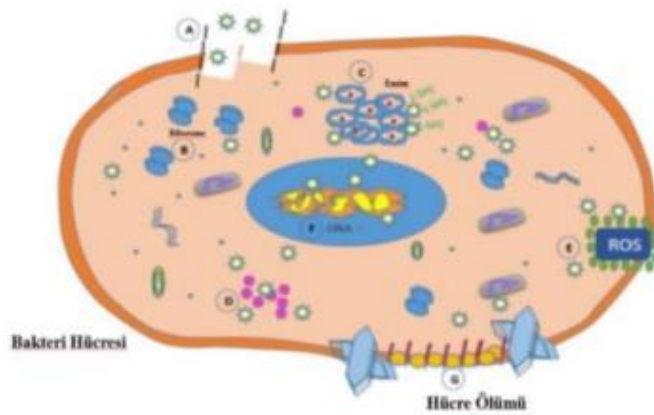
Gümüş nanopartiküller nanoteknolojide ticarileştirmesi en yüksek nanomalzemelerden biridir. Bu nanopartiküller kendilerine has kimyasal, fiziksel ve biyolojik yapıları nedeniyle oldukça fazla ilgi görmektedirler (Şimşek, 2021).

Gümüş nanopartiküller, yüksek antimikrobiyal özelliklerinden dolayı antibiyotiklere alternatif olarak kullanılmaktadır. Ayrıca elektriksel iletkenlik, manyetik ve optik olarak polarize edilebilmeleri ve DNA sekanslama gibi birçok kullanım alanı bulunmaktadır (Resim 4). Bu üstün özelliklerinden dolayı çalışmaların da odak noktası olmuştur (Altuncu, 2021).



Resim 4: Gümüş nanopartiküllerin elektron mikroskop görüntüsü (Bağyu, 2020)

Çok iyi bir antimikrobiyal olan gümüşün, bu özelliğinin mekanizması tam olarak aydınlatılmış olmasa da bakterilerde morfolojik ve yapısal değişiklikler oluşturarak etki gösterdiği bildirilmektedir. Sentezlenen gümüş nanopartiküller bakteri hücrelerinin membranına yapışarak onların solunumunu ve geçirgenliklerini etkilemektedir (Gündoğan, 2021). Bakteri hücreleriyle etkileşime girerek, elektron taşıma zincirinin etkilenmesine, hücre duvarlarının bozulmasına, ribozomlarla etkileşime girerek protein sentezinin etkilenmesine ve DNA'yı etkileyerek DNA hasarlarına sebep olmaktadır (Karakaya, 2021) (Resim 5).



Resim 5:Gümüş nanopartiküllerinin antimikrobiyal etki basamakları (Karakaya, 2021)

Gümüş nanopartiküller, peptidoglikan tabakası daha ince olan gram negatif bakterilere, gram pozitif bakterilerden daha duyarlıdır (Gündoğan, 2021). Literatürde gümüş nanopartiküllerin antibiyotiğe direnç gösteren bakterilere karşı antibiyotik etkinliğin başarılı olduğu tayin edilmiştir (Aslan, 2022).

1.2.4 Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri

Nanopartiküllerin üretimi için fiziksel, kimyasal ve yeşil sentez olarak da ifade edilen biyolojik sentez olmak üzere 3 farklı sentez yöntemi bulunmaktadır (Erdoğan, 2019). Kimyasal sentez, çeşitli organik çözücüler veya su kullanılarak nanopartikül sentezlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Genellikle yüksek hacimli çalışmalar için düşük maliyetli olması yöntemin avantajıdır. Ancak nanopartikül sentezi için kullanılan kimyasallar tortu yaptığı için saflık dereceleri düşüktür. Fiziksel yöntemlerle sentezlenen nanopartiküller ise buharlaştırma/yoğunlaştırma ile tüp fırınlarında sentezlenmektedir. Fiziksel yöntemlerin en önemli avantajları hızlı olmalarıdır (Karayel, 2020) (Şekil 5).

Genel olarak nanopartiküller, fiziksel ve kimyasal yöntemler ile sentezlenmektedir fakat bu yöntemler son yıllarda artan çevre bilinci nedeniyle çevre dostu olarak kabul edilmemektedir. Bu nedenle biyolojik yöntemler, fiziksel ve kimyasal yöntemlerin aksine güvenilir, uygun maliyetli ve çevre dostu bir alternatif yöntem olarak öne sürülmektedir (Manikprabhu ve ark., 2013).



Şekil 5:Nanopartikül sentez yönteminde Top Down ve Bottom Up yöntemleri (Bruna, 2021)

Nanopartiküller, özellikle teşhis ve tedavi alanındaki gelişmeler ile antimikrobiyal ilaç direncinin aşılması ve yaşam kalitesinin iyileştirilmesi gibi pek çok sorunu çözme konusunda umut vaat etmektedir. Bunlarla birlikte biyoyumlu malzeme ile tasarlanan nanoürünler, kanser ve bulaşıcı hastalıkların tedavisinde etkili stratejiler sağlayabilmektedir. Bu gelişmiş özelliklere sahip biyoyumlu nanopartiküller üretmek için yukarıda ifade edildiği gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Kullanılan yöntemlerden fiziksel yöntemler genellikle yüksek sıcaklık ve yüksek basınç gerektirir bu da nanoparçacıkların büyük ölçekli üretimleri için uygun maliyette olmayabilir. Diğer bir yöntem olan kimyasal yöntemde ise istenen özelliklere sahip nanopartiküller üretilmektedir ancak toksik etki göstermesi ve tehlikeli çözücülerin kullanılması bu yöntemin dezavantajlarından (Khorrami ve ark., 2018).

Kimyasal sentez aşamasında kullanılan kimyasallar ile çevreye ve canlılara ciddi zararlar verebilen toksik kimyasallar kullanılmaktadır. Bu sayılan dezavantajlardan dolayı fiziksel ve kimyasal yöntemlerin kullanımı sınırlıdır. Bu yöntemler yerini daha çevre dostu ve ucuz bir yöntem olan biyolojik yöntem bırakmaktadır. Biyolojik yöntemde yer alan yeşil sentez için bitkiler, bakteriler, mantarlar ve algler nanopartiküllerin sentezinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Erdoğan ve ark., 2019).

Son zamanlarda popüler hale gelen yeşil sentez yönteminde, bitki özleri gibi biyolojik bileşikler, mikroorganizmalar ve hatta ökaryotik hücreler hem indirgeyici ajan hem de stabilize edici ajan olarak davranarak istenilen özelliklere sahip nanopartiküllerin üretilmesini sağlamaktadırlar (Khorrami ve ark., 2018).

1.2.5 Yeşil Sentez (Biyolojik Sentez) Yöntemi

Nanopartikül sentezinin önünde bulunan en büyük sorun bu boyuta sahip materyallerin ortaya çıkarabilecekleri risklerin ve sorunların henüz tam olarak tam bilinmiyor olması ve haliyle engellenememesidir (Altuncu, 2021). Nanopartiküllerin üretiminde kullanılan kimyasal yöntemler genellikle, partikül reaktivitesini ve toksisitesini artıran ve yapısındaki öngörülemezlikten dolayı insan sağlığına ve çevreye zarar verebilecek kimyasal moleküllerin oluşmasını doğurmaktadır. Bu nedenle bu duruma alternatif olarak toksik madde barındırmayan ve çevre dostu yeşil sentez yöntemleri geliştirilmiştir (Doğanyigit ve ark., 2019).

Biyosentez, terim olarak biyoloji içerisinde canlı organizmalarda enerji kullanılarak gerçekleştirilen basit yapıdaki maddelerden daha karmaşık yapıdaki maddelerin elde edilmesi sürecine denilmektedir. Nanoteknolojide biyosentez ise bitki ekstraktı, mantar, maya, alg veya mikroorganizma gibi canlı organizmalar kullanılarak nanopartikül sentezlenmesine verilen isimdir (Koçak, 2019). Pahalı cihaz, kimyasallar ve toksik madde barındırmayan ayrıca yüksek enerji tüketimi olmadan doğal malzemelerden indirgeme ve stabilize edici ajanlar kullanılarak nano boyutta üretime dayalı olan biyosentez, yeşil sentez için en uygun yöntemdir. Nanopartiküllerin biyosentezi, biyomoleküllerin tepkime sırasında hem indirgeyici hem de

stabilize edici ajanlar olarak kullanıldığı bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Altuncu, 2021).

Nanopartiküllerin biyolojik olarak sentezinin başlıca avantajlarından birisi de nanopartikül oluşumunun tek aşamada gerçekleşmesidir. Çoğu yöntemde bir metal öncü bileşene gereksinim duyulur ve indirgeyici ajan olarak ise bitki ekstraktından elde edilen biyokimyasallar aracılık ederler, bu yöntemde ise indirgenme veya kimyasal olarak değişim sonrasında nanopartiküllerin agregasyonu tek bir adımda gerçekleşir (Kütük, 2019).



Şekil 6: Bir tepkimenin ya da malzemenin yeşil olabilmesi için gereken adımlar (Koçak, 2019)

Nanopartiküllerin biyosentezi üç etkene bağlıdır;

1. Toksik olmayan malzemeler (Bitki ekstraktı, mikroorganizmalar vs.)
2. İndirgenen ajan (Ag, Zn, Au gibi metaller)
3. Çözücü

Biyosentez yöntemlerinin en büyük avantajı sentez için proteinlerin, amino asitlerin, diğer metabolitlerin veya fenolik bileşiklerin kullanılması ile partiküllerin agregasyonunun engellenmesi için gerekli olan fazladan adımın ortadan kaldırılmasıdır. Ayrıca bu yöntemler ile sentezlenen nanopartiküllerin şekli ve boyutu kontrol edilebilmektedir. Sentezde indirgeyici ajan olarak bitki ekstraktları ya da mikroorganizmalara ait proteinleri kullanarak oluşturulan nanopartiküllerin boyutu, şekli ve polidispersitesi de kontrol edilebilmektedirler (Karayel, 2020). Biyolojik yöntemlerin diğer avantajı ise çok çeşitli kaynaklardan olması, çalışılacak malzemenin kolay bulunabilirliği, zamandan tasarruf edilmesi, stabilitesi, yüksek yoğunluğu ve sentezlenen nanopartiküllerin suda çözünabilir özellikte olmasıdır (Murty ve ark., 2013).

Yeşil sentez ile hazırlanan nanopartiküllerin, antimikrobiyal, antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser etkinlikleri tayin edilmekte ve bu nanopartiküller biyoremediasyon ajan olarak gıdada, akıllı tarımda, tekstil endüstrisinde ve atık su arıtımı gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Salem ve Fouda, 2021).

1.2.6 Bitki Ekstraktından Nanopartikül Hazırlanması

Bakteri, maya, mantar, alg ve virüsler, fiziksel ya da kimyasal yöntemler kullanılmadan yeşil sentez ile nanopartikül sentezinde büyük potansiyele sahiptirler. Mikroorganizmalar, yüksek büyüme hızları ve genetik modifikasyonları ile farklı boyut ve morfolojiye sahip nano materyaller üretmek için hücre içinde ya da hücre dışında bulunan mineralleri biyomineralize edebilme özellikleri nedeniyle iyi bir potansiyeldir (Ahmed ve ark., 2019). Ancak mikroorganizmalar kullanılarak yapılan nanopartikül sentezi düşük üretimle ve uzun sürede gerçekleşmektedir. Ayrıca biyosentezlenen ürünlerin geri kazanımı ve saflaştırılması pahalı kültür aşamalarını gerektirmektedir. Bununla birlikte mikrobiyal bakım, izolasyon ve kültürleme gibi takip edilecek fazladan karmaşık adımlar sebebiyle de çok zaman alıcıdır. Bu gibi dezavantajlarından dolayı nanopartiküllerin biyosentezi için bitki kaynaklı materyallerin kullanımı daha yaygın hale gelmektedir (Lin ve ark., 2010).

Bitkiden elde edilen ekstraktların nanopartikül sentezinde, biyoindirgeme potansiyelleri mikroorganizma kullanılarak yapılan sentezlere göre daha yüksektir (Ünal, 2019).

Bitkilerin doğada kolay bulunması, eskiden beri hastalıkların tedavisinde ve ilaç üretiminde kullanılması nedeniyle nanopartikül sentezinde çokça kullanıldığı ifade edilmektedir (Özeşer, 2023). Ayrıca sentez sonrasında ortaya çıkan atıklar çevreye zarar vermemektedir (Ünal, 2019). Yapılan çalışmalarda araştırmacılar, bitkinin yapraklarını, köklerini, kabuklarını ve meyvelerini kullanarak başarılı bir şekilde yaptıkları biyosentezleri rapor etmişlerdir (Erdoğan, 2019).

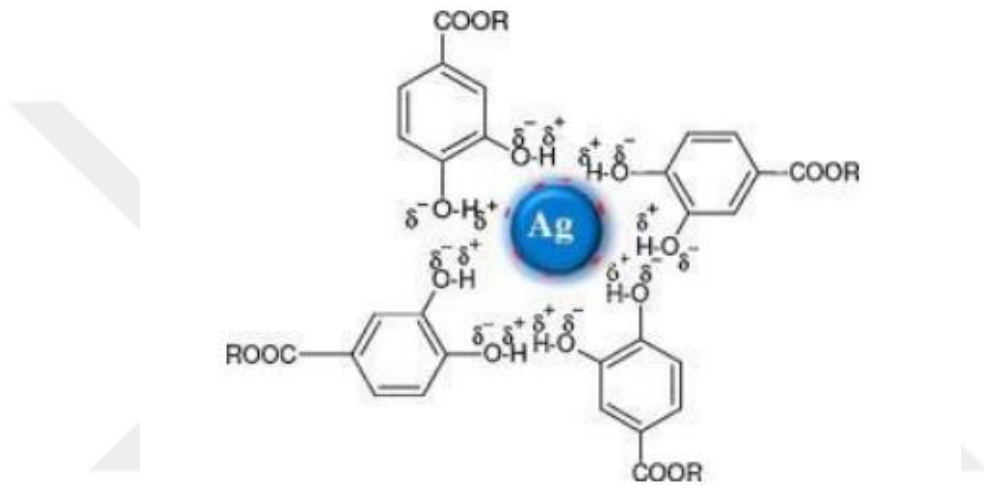
1.2.7 Bitkilerden Gümüş Nanopartikül Sentezi

Gümüş nanopartikül sentezinde bitkilerden elde edilen ekstraktların kullanımının sayısı son yıllarda oldukça artmıştır (Yazıcı, 2021). Sentezde fitokimyasal ajanlar bulunan bitki ekstraktları kullanarak yeşil nanopartiküller sentezlemek oldukça yaygındır (Doğan, 2022).

Nanopartikül sentezinde bitki ekstraktlarının biyoindirgeme yeteneği diğer mikrobiyal malzemelerden yapılan senteze göre daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca gümüş nanopartikül sentezi sonrasında ortaya çıkan atık ürünler genellikle doğaya zarar vermezler. Yani bitkiden elde edilen sentez sıfır kirliliğe sahip ve çevreyle uyumludur (Ünal, 2021).

Gümüş nanopartikül sentezinde bitkilerin kullanımı oldukça yaygındır. Bitkilerin geçmişten günümüze ilaç yapımında kullanılması, hastalıkları iyileştirmede ve doğada kolay bulunması sebebiyle gümüş nanopartiküllerin sentezinde de kullanılmasını sağlamıştır (Özeşer, 2023). Yapılan çalışmalarda bitkilerin kabuk, meyve, kök, yaprak veya dallarının kullanılmasıyla yeşil gümüş nanopartikül sentezledikleri bulunmuştur (Erdoğan, 2019; Yazıcı, 2021). Bitki

içerisinde bulunan fitokimyasal ajanlar ile gümüş nanopartikül sentezi yapılmaktadır (Yazıcı, 2021). Bitki ekstraktlarının içerisinde yer alan metabolitler biyoindirgeme görevi görürler (Özeşer, 2023). Bitkiden elde edilen ekstrakt içerisinde, polifenoller, şekerler, alkaloidler, flavonoidler, terpenoidler, fenolik asitler, karboksilik asitler ve proteinler gibi çözülmüş halde bulunan maddeler nanopartikül sentezinde gümüşün indirgenmesi sağlayan fitokimyasal ajanlardır (Doğan, 2022; Yazıcı, 2021). Ekstakt içerisinde bulunan bu çeşitli metabolitler, nanopartikül sentezi sırasında metalleri pozitif oksidasyon durumundan sıfır oksidasyon durumuna getirirler (Doğan, 2022). Bitki ekstraktlarında bulunan biyomalzemelerin reaksiyon sırasında metal iyonlarını indirgemesi yanında onları stabilize de ettiği bulunmuştur (Ünal, 2019).



Resim 6:Bitki Ekstraktında bulunan polifenoller ile kaplanmış gümüş nanopartikül (Yazıcı, 2021).

Gümüş nanopartiküllerin sentezinde, ekstrakta bulunan biyobileşiklerin varlığı nanopartiküllerin boyut ve dağılımlarını büyük ölçüde etkilemektedir. Elde edilen ekstraktlarda güçlü indirgeyici ajanların bulunması reaksiyon hızını ve yeni nanopartiküllerin oluşumunu desteklemektedir (Doğan, 2021).

1.2.8 Gümüş Nanopartikül Sentez Mekanizması

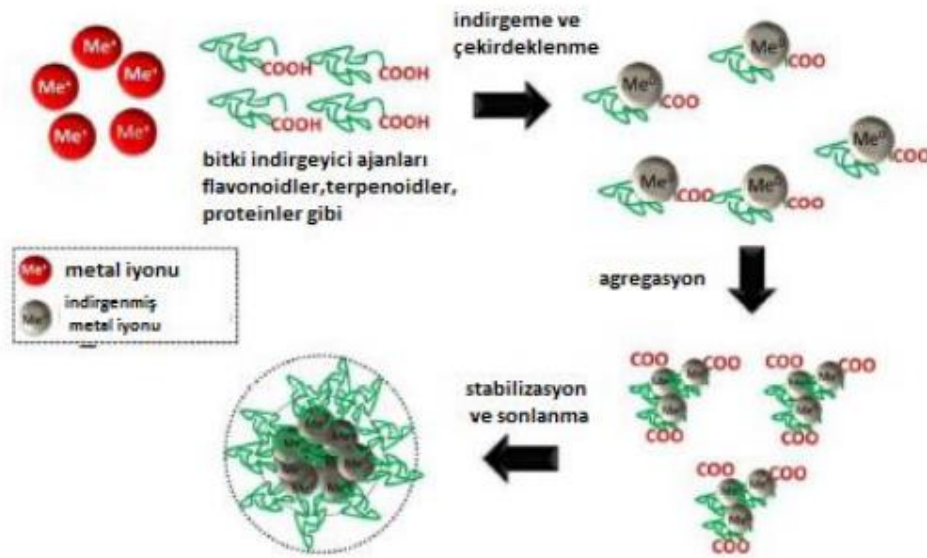
Bitkilerden elde edilen nanopartiküllerin yeşil sentezinde, ekstrakt içerisinde bulunan biyomaddeler, indirgeme, kaplama ve stabilize edici madde kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bitkiler ile yapılan çalışmalarda, bitkilerin metalleri nanopartikül şeklinde depoladıkları bulunmuştur (Bağyu, 2020).

Bitkiden elde edilen ekstraktlarda bulunan biyo-indirgeyici ajanlar, metalik iyonlarla (Me^+) reaksiyona girerek onları (Me^0) metalik atomlara indirgemektedir. Bitki ekstraktında stabilize edici ajan olarak davranan biyomoleküller, indirgenmiş atomlara bağlanarak stabilizeyi sağlamakta ve onları korumaktadır. Bu işlemler devam ederek nanopartiküller oluşmakta ve

bunları takiben nanopartiküller bir araya gelerek büyüme davranışı sergilemektedir (Kütük, 2019) (Resim 7).

Nanopartiküllerin oluşum mekanizması temel olarak 3 ana aşama ile gerçekleşmektedir:

- İyonların indirgenmesi
- Çekirdeklenme
- Nanopartiküllerin büyümesi (Ünal, 2019)



Resim 7: Bitki ekstraktından metal nanopartikül sentezinin genel şematik görünümü (Kütük, 2019).

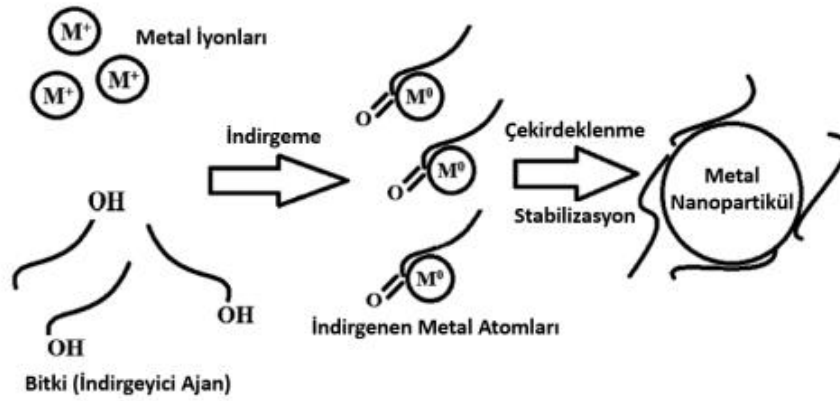
Sentezlenen nanopartiküllerin boyut ve şekilleri, bitkinin türüne ya da bitkinin hangi kısımlarından sentezlendiğine, farklı metallerin kullanımına ve bitki veya metalin miktarına bağlıdır.

Daha yüksek verimde nanopartikül sentezi için; bitki ekstraktı hazırlanırken ekstraktın kaynatılma süresi, ekstraktın pH'ı ve reaksiyon süresi kriterlerine dikkat edilmelidir. Sentezlenen nanoparçacıkların absorbans yoğunlukları, ekstraktın ve gümüş nitrat konsantrasyonunun artması ile artmaktadır. Daha fazla miktarda biyomoleküllerin varlığı, gümüş iyonlarını daha yüksek oranda indirgemesi sonucu düşük boyutlu nanopartiküller sentezlenebilmektedir (Deepika ve ark. 2019).

Nanopartikül sentezindeki başarı, Gümüş nitrat (AgNO_3) konsantrasyonuna, pH'a, indirgeyici ajanın yapısına ve konsantrasyonuna bağlıdır (Jain ve Maheta, 2017). Yapılan araştırmalar bitkide çok yüksek oranda suda çözünmüş şekilde polifenol ve antioksidan varlığını ortaya koymuştur. Bitkilerde bulunan bu fenolik bileşikler, metallere bağlanabilen ve şelat etkisi gösteren ketonik ve hidroksil gruplar taşımaktadır ancak fenolik bileşiklerin bu bağlanma özelliklerinin, molekül içerisindeki şelatlanma gruplarından değil aromatik halkaların yüksek neofilik özellikleriyle bağlantılı olduğu bulunmuştur (Ünal, 2019).

Bitki ekstraktından metal nanopartiküllerin sentezi için hidroksil, karbonik, karboksilik ve amin fonksiyonel grupları sorumludur. Hidroksil grupları metal iyonlarının indirgenmesini sağlayarak sentezde direkt görev almaktadır. Karboksilik gruplar da metal iyonlarına bağlanarak onları indirgemekte ve yüzeylerine yapışarak hareket ve stabilizasyonu sağlamaktadır. Serbest amino ve karbonil grupları ise yine metal iyonlarının indirgenmesine, nanopartiküllerin stabilitesini sağlamasına ve metallere bağlanarak aglomerasyonun önlenmesine yardımcı olmaktadır (Özeşer, 2023).

Bazı araştırmalarda bitkilerin içerdikleri flavonoidlerde bulunan $-\text{OH}$ (hidroksil) gruplarının, gümüş iyonlarının gümüş nanopartiküllere indirgenmesinde görev aldığı bulunmuştur (Ünal, 2019). Ayrıca flavonoidler sentez sırasında, gümüş iyonlarını gümüş nanopartiküllere indirgeyen reaktif H atomu ortaya çıkarmaktadır (Jain ve Mahata, 2017) (Resim 8). Flavonoidlerin sahip olduğu antioksidan etki de elektronları veya hidrojen atomlarını verme esasına dayanmaktadır. Bitki ekstraktlarında yer alan fenolik bileşikler ve diğer kimyasal maddeler hem gümüş tuzlarını indirgemekte hem de partiküllerin etrafını çevreleyerek agregasyona karşı da dayanıklılık sağlamaktadır (Ünal, 2019)



Resim 8:Gümüş nanopatiküllerin yeşil sentez ile elde edilmesi (Gündoğan, 2021).

1.2.9 Nanopartiküllerin Toksik Etkileri

Doğada pek çok alanda kullanılan nanopartiküllerin her ne kadar yüksek oranda olumlu özellikleri bulunsun da hayvan ve insan sağlığı üzerinde bazı olumsuz etkileri bulunmaktadır.

Ancak oluşturdukları toksik etkiler henüz tam olarak ortaya konulmamıştır (Kim ve ark., 2008).

Yapılan çalışmalara göre küçük partikül boyutuna sahip katyonik nanopartiküllerin, hücrelere ve dokulara kolay penetre olduğu ancak hızla biyodegrade olduğu bulunmuştur. Bazı nanopartiküllerin inflamatuvar cevaba neden olduğu, bazılarının oksidatif strese sebep olduğu ve artan yüzey alanı nedeniyle de hücresel makromoleküllerle etkileşime girdiği bildirilmiştir (Karayel, 2020). Ayrıca bazı nanopartiküllerin ise solunum, enfeksiyon, deri ya da mide ile etkileşime girerek çoğu kimyasallar gibi miktar ve maruziyet yerine bağlı olarak farklı doku ve organlarda toksik etki gösterdiği raporlanmıştır (Wided ve ark., 2018).

Sentezlenen nanopartiküllerin toksisitesini incelemek için yeni yöntemlerin geliştirilmesi ve farklı biyolojik sistemler üzerindeki etkilerinin karşılaştırmalı olarak gösterilmesi gerekmektedir. Genellikle nanopartiküllerin toksisitesi incelendiğinde kullanılan biyolojik sistemler karmařıklařtıķça toksisite azalmaktadır. Diğer bir ifade ile hücre ya da organizma ne kadar karmaşık olursa gümüş nanopartiküllerin oluşturacağı toksik etkilere karşı o kadar az duyarlı olmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda gümüş nanopartiküllerin farklı şekillerde, boyutlarda ve farklı kaplama ajanı kullanılarak sentezlenmesi; farklı kùltür ortamları ve metodolojisi kullanılarak iki veya üç farklı biyolojik grup üzerinde çalışılması gibi nedenlerden dolayı toksisite karşılaştırmaları yapmak zorlaşmaktadır (Ünal, 2019).

1.2.10 Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri

Nanopartiküllerin sentezinden sonra en önemli basamaklardan birisi nanopartiküllerin karakteristik yapılarının belirlenmesidir (Ünal, 2019). Sentezlenen nanopartiküllerin fiziksel/kimyasal yapıları, yüzey özellikleri, şekilleri, boyutları, morfolojileri ve sahip olduğu fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesi, karakterizasyonda önemli parametreler arasında bulunmaktadır (Kütük, 2019; Özeşer, 2023). Sentezlenen bu nanopartiküllerin karakterizasyonlarının belirlenmesi ve anlaşılması, nanopartiküllerin canlı sistemler ile etkileşimlerini tespit etme ve uygulama alanlarının belirlenmesinde önemli bir yere sahiptir (Kütük, 2019). Üretilen nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılan yöntemler; Spektroskopik, Mikroskopik, Kromatografik ve Santrifüjleme-Filtrasyon teknikleri olmak üzere 4 ana grupta toplanmaktadır (Erbay, 2021). Nanopartiküllerin karakterizasyonu için: UV-Vis Spektroskopisi ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) gibi spektroskopik yöntemler, Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) gibi mikroskopik yöntemler, Boyut Dışlama Kromatografisi gibi kromatografik yöntemler, Ultrasantrifüj gibi santrifüjleme yöntemleri en sık kullanılan teknikler arasında bulunmaktadır (Kütük, 2019). Ayrıca bu yöntemlere ek olarak Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ve zeta potansiyel analizi de sıklıkla kullanılmaktadır (Ünal, 2019).

Biyolojik yöntem ile sentezlenen nanopartiküllerin, sentezin başladığını gösteren ilk parametre gözle görölen renk değişikliğinin saptanmasıdır. Bu verilen bilgiye göre

karakterizasyonun belirlenmesinde ilk yöntem spektrofotometrik yöntemlerdir. Sentezlenen nanopartiküllerde kullanılan metal türüne göre renk değişimleri farklılık göstermektedir. Örneğin gümüş nanopartiküller için koyu kahverengiye doğru renk değişirken altın kullanılan nanopartiküllerde ise kırmızı-mor rengine doğru renk değişimi gözlemlenmektedir (Özeşer, 2023).

Nanopartiküllerin sahip olduğu bu optik özellikler sentez hakkında dolaylı olarak bilgi vermektedir. UV-Vis spektroskopisi, nanopartikülleri içeren çözeltiye gönderilen ışığın absorbansını ve geçirgenliğini ölçen güvenilir ve hızlı bir analitik yöntemdir (Doğan, 2022; Ünal, 2019). UV-spektroskopisi ile nanopartiküllerin karakterizasyonu için 200-800 nm dalgaboyu aralığı belirlenir ve bu aralıktaki tüm dalga boyu taranarak, nanopartikül çözeltisinin bu dalga boyları arasında maksimum absorbans pik verdiği dalga boyu kayıt edilmektedir. UV-Vis spektroskopisinin pek çok avantajı vardır. Bu avantajlara, yöntemin basit, hızlı, nanopartiküllere duyarlı, kısa ölçüm süresi ve kalibrasyona gerek olmaması sayılmaktadır (Doğan, 2022; Ünal, 2019).

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR) yöntemi, nanopartiküllerin yapısını oluşturan fonksiyonel grupların (Aminoasit, flavonoid, keton vs.) tespit edilmesinde kullanılır (Erbay, 2021). Bu yöntem ile organik ve inorganik bileşiklerin karakterizasyonu yapılmaktadır. Kızılötesi (IR) spektrumu, maddeyi meydana getiren atomların arasındaki bağların titreşimi ile oluşan frekanslara karşılık absorpsiyon pikleri ile parmak izi gibi benzersiz spektrumlarının olduğu gösterilmektedir. IR ışını gümüş nanopartikül örnekleri ile etkileşime girdiğinde, kimyasal bağlarda gerilme, bükülme ve büzülme gibi farklı titreşim hareketleriyle absorbe olur ve bu kızılötesinde gerçekleşen kimyasal bağların titreşimlerindeki değişim ve absorpsiyonlar farklı özelliklerde spektral piklerin oluşumunu sağlamaktadır. FT-IR, sentezlenen nanopartiküllerin indirgenmesi ve stabilizasyonundan sorumlu biyomoleküllerin tanımlanmasında kullanılan basit ve uygun maliyetli bir yöntemdir (Ünal, 2019).

Mikroskopik yöntemler, sentezlenen nanopartiküllerin boyut, morfolojik yapı, şekil, dağılım ve agregasyon özelliklerinin görüntülenmesini sağlayan optik ya da elektron mikroskopu yöntemlerini içermektedir (Ünal, 2019 ve Erbay, 2021).

Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM), sentezlenen nanomalzemelerin nano ve mikroyutta nanoparçacıkların şekli, yüzey morfolojisi, partikül boyutu ve boyut dağılımlarını tanımlamada kullanılan bir tekniktir (Doğan, 2022; Ünal, 2019). SEM’de odaklanmış elektron demeti örnek yüzeyini tarayarak numune hakkında bilgi veren sinyaller üreterek görüntü verir (Doğan, 2022). Bu yöntemde, kullanılan elektron ışını ve elektronlar nanopartiküllerin yüzeyi ile etkileşime girer ve sonrasında geri saçılan elektron veya X ışını fotonları ölçülür (Ünal, 2019). SEM analizinin sonucunda 3 boyutlu görüntüler elde edilmektedir. SEM analizi için toz halinde kullanılan örnekler analiz yapılırken statik elektrik yükünün birikmesini önlemek amacıyla nanopartikül örnekleri altın, krom, tungsten veya platin gibi iletken maddeler ile

kaplanmaktadır (Özeşer, 2023). Bu kaplama nedeniyle bazı elde edilecek olan bilgilerin kaybolma riski bulunmaktadır ancak en azından tek bir tarafının iletken olması gerekmektedir. SEM’de numuneler ince kesitler halinde kesilmediği için hazırlanması çok kolaydır ve çok sayıda örnekler ile çalışmayı mümkün kılmaktadır (Ünal, 2019).

Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM), sentezlenen nanopartiküllerin morfolojilerini, boyut dağılımlarını, partikül büyüklüklerini ve aynı anda nanomalzemenin kristalografik ve morfolojik bilgilerini verebilen önemli bir mikroskobik yöntemdir (Ünal, 2019). TEM ile elde edilen görüntüler 2 boyutlu ve yüksek oranda çözünürlüğe sahiptir. TEM cihazı ile yapılan analizlerde nanopartiküller, nötron kırınımı ve X-ışını ile görüntülenerek bilgiler elde edilmektedir (Özeşer, 2023). TEM’de çok ince bir katman şeklinde kesilen nanomalzemeye yüksek enerjili elektron ışını gönderilerek numunenin içerisinden geçirilir ve absorbe olmayan elektronlar ile nanopartiküllerin direkt görüntülenmesini sağlayan bir görüntüleme dedektörü ile istenilen bilgi elde edilmektedir. Elde edilen numunenin kalınlığına göre TEM’de elde edilen görüntünün çözünürlüğü değişmektedir (Ünal, 2019).

Dinamik Işık Saçılımı (DLS) yöntemi sentezlenen nanopartiküllerin boyutlarının ve çözelti içerisindeki agregasyonun belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemdir (Dağlıoğlu ve Yılmaz, 2018). DLS yöntemi, hazırlanan süspansiyonda brownian hareketi yapan küçük partiküllerin ışık saçılımının ölçülmesini ve bunun partikül boyutu ile ilişkilendirilmesine dayanmaktadır. Bu prensibe göre partikül boyutu küçüldükçe ışık saçılma açısı da küçülür ve şiddeti azalır. DLS aynı zamanda hızlı ve gerçek zamanlı boyutlandırmayı sağlamaktadır. Ancak bu yöntemin bazı dezavantajları bulunmaktadır. DLS yönteminde büyük partiküller daha fazla ışık saçtıkları için süspansiyonda oluşan agregasyonlar, nanopartiküllerin çaplarını etkileyerek daha büyük boyut dağılımları verebilmektedir (Ünal, 2019). Ayrıca heterojen boyut dağılımına sahip süspansiyonların ve içeriği bilinmeyen, saf olmayan numunelerin ölçümlerinin yorumlanması oldukça zor olmaktadır (Dağlıoğlu ve Yılmaz, 2018).

Zeta potansiyel analizi, kolloid haldeki nanopartiküllerin yüzey yükünü belirleyen bir yöntemdir. Zeta potansiyel analizinin temeli Doppler prensibi kullanılarak elektrik alanı uygulanan nanopartiküllerin hızının ölçülmesine dayanmaktadır. Zeta potansiyel analizi sonucunda elde edilen değer, partikül stabilitesi hakkında bilgi vermektedir. Zeta potansiyel değeri arttıkça partiküller arasında daha fazla elektrostatik itme sebebiyle partiküllerin bir araya gelerek oluşturdukları agregatlar engellenerek kolloidal süspansiyonda kararlılık artmaktadır. Ayrıca zeta potansiyel nanopartiküllerin içerisinde bulunduğu çözeltinin pH değeri ile farklılık göstermektedir (Ünal, 2019).

Santrifüjleme ve filtrasyon teknikleri ise numunelerin hazırlanması ve boyutlarının fraksiyonlamasında kullanılan, düşük maliyetli, yüksek hızlı ve yüksek hacimli yöntemlerdir.

Kromatografik yöntemlerde ise süspansiyondan nanopartiküllerin ayrılması için kromatografiye dayalı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntem hızlı, hassas ve zararsızdır.

Bu bilgilerden yola çıkarak tez çalışmamızda kullanımı çok eskiye dayanan gümüş ve tedavi amaçlı kullanılan *Astragalus membranaceus*'u çevreye zarar vermeyen yeşil sentez yöntemi ile bir araya getirmek planlanmıştır. Bu şekilde gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu, mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliğinin tayin edilmesi, sağlıklı fibroblast hücreleri üzerinde biyouyumluluğunun ve meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinde antikanser etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu tez çalışması ile literatürde konuya ilişkin var olan açığın kapatılması ve benzer çalışmalar için yol gösterici bir kılavuz oluşturması hedeflenmiştir.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Laboratuvarda Kullanılan Malzemeler

- 4 °C buzdolabı (Arçelik)
- -20 °C derin dondurucu (Arçelik)
- 5ml'lik enjektör
- -80 °C derin dondurucu (Visecryo)
- 96 kuyucuklu plate (Biologix)
- Balon joje
- Beherglas
- Bek ateşi
- Cam baget
- Cam balon
- Cam şişe
- Cetvel
- CO₂ inkübatör (ESCO)
- Deney tüpü
- Dereceli silindir (Mezür)
- Distile su cihazı
- Elisa mikro plate okuyucu (Rayto RT-3100)
- Ependorf tüp
- Erlenmayer
- Etüv
- Filtre kâğıdı
- Halka uçlu öze
- Hassas terazi (Rodwag)

- Hücre kültürü flaskları
- Hücre sayım cihazı (Bio-Rad)
- Hücre sayım lamı (Bio-rad)
- Huni
- Inverted mikroskop (Zeizz)
- Işık mikroskobu (Olympos)
- Lam
- Lamel
- Manyetik karıştırıcı
- Membran filtre
- Mikro pipet (Dragonlab)
- Mikro pipet ucu
- Numune tepsisi
- Otoklav (Alp)
- Parafilm
- Pastör Fırını
- Penset
- Petri kabı
- PH metre
- Pipet
- Piset
- Soğutmalı santrifüj (Sigma 3-30KS)
- Soxhlet cihazı
- Spektrofotometre (Biochrom)
- Üçgen uçlu öze
- Vorteks (Dragonlab mx-f)

2.1.2. Kullanılan-hazırlanan çözeltiler

- %70 yoğunlukta etil alkol (C_2H_5OH)
- %98 yoğunlukta etil alkol (C_2H_5OH)
- Bazik Fuksin
- Distile su
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- $DMSO_4$ (Dimetil Sülfat)
- İyot-lugol çözeltisi
- Kütlece %95'lik Kristal viyole
- MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid)
- Mueller-Hinton agar: Hacimce 34g/L ve PH7,2 (Merc)
- PBS: 200 ml içerisine 1 tablet ve PH 7,2 (Sigma 4417)
- Tripan mavisi: Hacimce %4'lük ve PH7,4 (Bio-Rad)
- Tripsin edta %0,25'lik

2.2 Yöntem

2.2.1 Astragalus Bitkisinin Temin Edilmesi

Çalışma için bitki 2022 yılının yaz mevsiminde (Haziran ayında) Çorum'un Kuyumcu Köyü'nde Harita 1' gösterilen 40°46'03.0"N 34°48'44.3" lokasyonundan toplanmıştır.

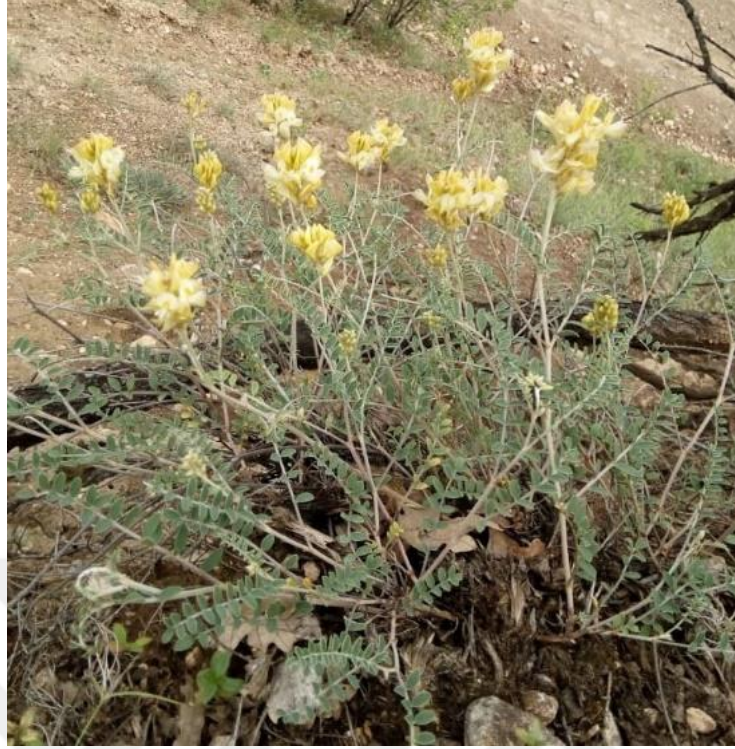


Harita 1:Astragalus'un yetiştiği lokasyon (Google Maps'den alındı)

Bitki, 1. Bölüm'de Resim 3'te bulunan *Astragalus*'un çizim görünümü ile gösterilen karakteristik özelliklerine bakılarak tespit edilmiştir. Bitkinin dalları karşılıklı yaprak diziliminde ve sarı katmanlı çiçeklere sahip olması ile kök özelliklerinden yola çıkılarak tespiti yapılmıştır. Bitki karakteristik olarak sarı ve çok uzun bir köke sahiptir. Tüm bunlar göz önüne alınarak toplanan örneklerin çalışılmak istenen *Astragalus* türü olduğuna karar verilmiştir (Resim 9-10).



Resim 9: *Astragalus membranaceus*, Çorum,2022



Resim 10: *Astragalus membranaceus*'un diğer bitkiler ile görünümü.

2.2.2 Astragalus'tan Soxhlet Cihazında Sulu Ekstrenin Hazırlanması

Yukarıda bahsedilen özellikler dikkate alınarak çalışılmak istenen tür olduğuna karar verilen *Astragalus* bitkisi toplanarak laboratuvara getirilmiştir. Bitki öncelikle el ile temizlenerek kök ve yaprak kısımları ayrıştırılmıştır. Bitkiden toplanılan kök ve yaprak kısımları önce içme suyuyla ardından distile su ile iyice yıkanıp temizlendikten sonra Resim 11'de olduğu gibi oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.



Resim 11: *Astragalus membranaceus*'un yapraklarının ve kökünün yıkanarak kurutulmuş hali

Astragalus bitkisi öncelikle yıkanarak kurutulduktan sonra ekstraksiyon için hazırlanmıştır. Bitkinin yaprakları ve kökleri ayrı olarak cam havanda ezilerek ekstraksiyon için hazırlanmıştır. Kullanılan bitkinin yaprakları Resim 12’de gösterildiği gibi havanda iyice ezilerek toz haline getirilmiştir. Bitkinin kök kısmı havanda ezilerek toz haline gelmediği için Resim 13’de görüldüğü şekilde makas ve el ile çok küçük parçalara ufalanarak ekstraksiyon için öğütülmüştür.



Resim 12:Ekstraksiyon için havanda ezilen yapraklar



Resim 13:Ekstraksiyon için küçük parçalara ayrılarak hazırlanan kökler

Astragalus kök ve yaprak örnekleri ekstraksiyon için kurutulup hazırlanmıştır. Astragalus'un ekstrakt için hazırlanan kök ve yaprak kısımları hassas terazide 25 g olarak tartılmıştır. Tartılan örnekler filtre kağıdına yerleştirilerek ip ile ekstraksiyon sırasında açılmaması için bağlanmıştır. Daha sonra 25 g örnek 250 ml distile su içerisinde Soxhlet cihazına yerleştirilmiştir. Resim 14'te gösterildiği şekilde 8 saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon sırasında renk değişimi takip edilerek çözeltinin rengi sarı renge dönüşmesi ile özüt oluşumu ile ekstraksiyon doğrulanmıştır. Ekstraksiyondan sonra örnekler oda sıcaklığına kadar soğumaya bırakılmıştır. Devamında ekstraktlar filtre kağıdından süzülerek steril koyu renkli cam şişelerde muhafaza edilmiştir. Süzülen örnekler sonraki çalışmaya kadar +4°C' de saklanmıştır.



Resim 14: Hazırlanan örnekler, filtre kağıdına sarılarak sokslet cihazında ekstrakte edilmesi.

Astragalus'un kök ve yapraklarından Soxhlet cihazında başarılı bir şekilde ekstraksiyon yapıldıktan sonra gümüş nanopartiküllerin (AgNP) sentezi için iki farklı yöntem kullanılarak optimum karakterizasyona sahip nanopartiküllerin üretimi için uygun yöntem belirlenmiştir.

2.2.3. Yöntem 1: Bitki Ekstrelerinden Çözücünün Uzaklaştırılması

Astragalus kök ve yaprağından soxhlet cihazı ile daha önce anlatıldığı şekilde başarılı bir şekilde ekstraksiyon yapılmıştır. Ekstraksiyon sonrasında Astragalus ekstrelerinden fazla çözücünün uzaklaştırılması için santrifüj yöntemi kullanılmıştır.

Soxhlet ile hazırlanan Astragalus ekstreleri ayrı ayrı olacak şekilde 50 ml'lik falkonlara her bir falkona 50 ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Daha sonra bu falkonlar 12.000 rpm' de 20 dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüjden çıkan örneklerden önce süpernatant atılmış ve pellet ile çalışılmaya devam edilmiştir.

Geriye kalan pellet üzerine 5 ml distile su eklenmiş sonrasında pellet pipetaj ve vorteks ile homojen hale getirilmiştir. Daha sonra iki aynı örnek tüpü bir araya getirilerek tek bir falkonda toplam 10 ml örnek hacmine getirilerek birleştirilmiştir.

Ayarlanan bu 10 ml örnek falkonları yıkama için tekrar 12.000 rpm de 20 dk santrifüj edilmiştir. Böylece örneklerin birinci yıkama işlemi yapılmıştır. Santrifüjden sonra tekrar süpernatant atılmıştır. Kalan pelletin üzerine bu defa her örneğe 10 ml distile su eklenerek pipetaj ve vorteks yardımıyla örnekler homojen hale getirilmiştir. Bu defa aynı örnek tüpleri tekrar birleştirilerek 20 ml son hacme sahip örnekler oluşturulmuştur. Bu örnekler bir sonraki çalışmaya kadar +4°C 'de saklanmıştır.

2.2.4 Gümüş Nanopartikül Sentezinde Yöntem 2

Gümüş nanopartikül sentezinde kullanılan ikinci yöntemde, soxhlet cihazı ile hazırlanan ekstraktlar filtre kağıdından süzülerek hazırlandıktan sonra doğrudan gümüş nitrat ile muamele edilerek gümüş nanopartikül sentezi yapılmıştır.

Astragalus'un ekstraksiyonundan sonra kök ve yaprak olarak iki farklı ekstrakttan gümüş nitrat ile nanopartikül sentezi yapılmıştır. Bu işlem her iki yöntemde de ortak olarak yapılarak gümüş nanopartikül sentezi yapılmıştır.

İki farklı yöntem ile hazırlanan gümüş nanopartiküllerin sentezinde Yöntem 2, Yöntem1' e göre daha verimli ve uygun bulunmuştur. Nanopartikül sentezinden sonra yapılan diğer çalışmalara, Yöntem 2'ye göre sentezlenen nanopartiküller ile devam edilmiştir.

2.2.5 Gümüş Nitrat (AgNO₃) Çözeltilisinin Hazırlanması

Astragalus kök ve yapraklarından ekstraksiyon hazırlandıktan sonra gümüş nanopartikül sentezi için gümüş nitrat çözeltisi hazırlanmıştır.

Nanopartikül sentezinde kullanılmak için öncelikle gümüş nitrat (AgNO₃) ile stok çözelti hazırlanmıştır.

1 M stok çözelti hazırlamak için saf haldeki AgNO_3 tuzu, 200 ml için hassas terazide 33,974 g tartılan gümüş nitrat (AgNO_3) tuzu erlene konulmuş ve üzerine 100 ml distile su eklenmiştir. Daha sonra manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözündürülmüştür. Sonrasında elde edilen çözeltinin üzerine distile su eklenerek son hacim 200 ml'ye tamamlanmıştır.

Farklı Konsantrasyonlarda AgNO_3 çözeltilerinin Hazırlanması: Çalışmada optimizasyon çalışmaları için 4 farklı konsantrasyona sahip gümüş nitrat çözeltileri hazırlanmıştır.

Bu derişimler stok çözeltden seyretme yöntemi ile 1mM, 3mM ve 5mM konsantrasyona sahip olacak şekilde hazırlanmıştır.

- **1 mM AgNO_3 için:**

Stok çözelti olan 1 M AgNO_3 'den 100 μl alınmış ve distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

- **3 mM AgNO_3 için:**

Yine stok çözeltden 300 μl alınarak distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

- **5 mM AgNO_3 için:**

1 M çözeltden 500 μl alınarak distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Böylelikle gümüş nitrattan stok konsantrasyon olan 1 M, seyreltilerek 1 mM, 3 mM ve 5 mM konsantrasyona sahip toplamda 4 farklı konsantrasyonda AgNO_3 çözeltisi hazırlanmıştır.

Çalışmada optimizasyon için farklı parametreler kullanarak en uygun çözelti konsantrasyonu belirlenmiştir.



Resim 15:Optimizasyon için hazırlanan Gümüş nitrat (AgNO_3) konsantrasyonları

2.2.6 Gümüş Nanopartiküllerin (AgNP) Sentezlenmesi

Gümüş nanopartiküllerin sentezi için önceden hazırlanan Astragalus ekstraktları ve farklı konsantrasyonlarda (1, 3, 5mM ve 1M) hazırlanan AgNO₃ çözeltisi kullanılmıştır.

Sentez için farklı AgNO₃ çözeltilerinden 9 ml ve kök ve yapraktan hazırlanan ekstraktlardan ise 1 ml alınarak 20 ml'lik cam şişelere yavaş yavaş eklenerek 10 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım kuvvetlice karıştırılmıştır. Daha sonra karanlıkta, oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde belirlenen süreler boyunca inkübe edilmiştir. İnkübe edilen çözeltilerin renk değişimini gözlemlemek için 4, 8 ve 24 saat inkübasyon süreleri çalışılarak optimum süre belirlenmiştir.

İnkübasyon süresince, Astragalus'da bulunan biyomaddeler ile gümüş iyonlarının indirgenmesi sonucu açık sarı ve açık kahverengi olan çözeltinin koyu kahverengiye ya da kırmızımsı kahverengiye doğru renk değişimi göstermesinin gözlemlenmesi ile gümüş nanopartiküllerin oluşumu doğrulanmıştır.

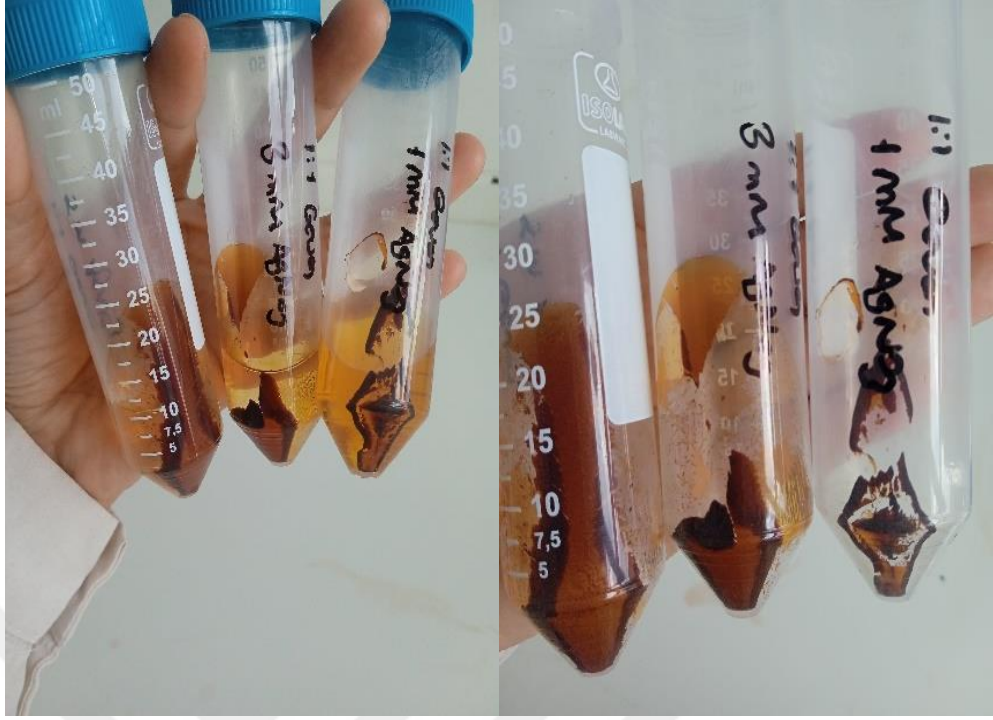
Gümüş nanopartiküllerin Karışımdan Ayrılması

Gümüş nanopartiküllerin sentezinde inkübasyon sonunda renk değişimi ile oluşumu doğrulanan gümüş nanopartiküllerin çözeltilerden ayrılması ve saflaştırılması için santrifüjleme yapılmıştır. Sentezlenen AgNp'ler soğutmalı santrifüjde 10°C'de 20 dakika boyunca 12000 rpm de santrifüj edilmiştir. Böylelikle gümüş nanopartikülleri çöktürülmüştür. Çöktürme sonrasında nanopartiküllerin yıkanması için süpernatant atılmış ve kalan pellet üzerine 10 ml distile su eklenerek tekrar 12,000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir.

Gümüş nanopartiküllere çöktürme sonrası 2 kez yıkama yapılarak çözeltide bulunan fazla gümüş tuzları ve organik maddeler uzaklaştırılmıştır.

Bu işlemler sonrasında Resim 16'da gösterildiği gibi kalan pellet üzerine 10 ml distile su eklenerek su içerisinde nanopartiküller disperse edilmiştir.

Hazırlanan gümüş nanopartiküller karakterizasyon çalışmalarına kadar +4°C'de saklanmıştır.



Resim 16:Nanopartiküllerin sentezlendikten sonra santrifüj ile çözücünden ayrılması ve nanopartiküllerin kuru hali

2.2.7 Gümüş Nanopartikül (AgNP)'lerin Karakterizasyonu

Astragalus kök ve yaprağından elde edilen ekstrakt ile hazırlanan gümüş nanopartiküllerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi için karakterizasyon analizleri yapılmıştır. Tez çalışmamızda sentezlenen AgNP'lerin karakterizasyonu için UV-Vis spektrofotometre, Dinamik Işık Saçılımı (DLS), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) ve Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) yöntemleri kullanılmıştır.

2.2.7.1 Gümüş nanopartikül (AgNP)'lerin Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile Partikül Boyut Analizi ve Zeta Potansiyelinin Belirlenmesi

AgNP'lerin gerçek boyut dağılımlarını tayin etmek amacıyla DLS yöntemi kullanılmıştır. Sentezlenen AgNP'ler santrifüj sonrası distile suda disperse edildikten sonra 0,22 µm'lik enjektör tipi filtre ile süzülerek steril edilmiştir.

Hazırlanan örneklerin partikül boyut ve yüzey yükü analizi Hitit Üniversitesi Bilimsel Teknik Uygulama ve Araştırma Merkezi (HÜBTÜAM)'da gerçekleştirilmiştir. Ölçüm için örnekler her defasında taze hazırlanmıştır.

2.2.7.2 Gümüş nanopartikül (AgNP)'lerin Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile Boyut ve Morfolojisinin Analizi

Hazırlanan nanopartiküllerin boyut ve morfolojilerinin analizi SEM görüntüleme ile yapılmıştır. Örnekler, 0,22 µm'lik membran filtreden geçirildikten sonra analiz için HÜBTÜAM'a gönderilmiştir.

2.2.7.3 Gümüş nanopartikül (AgNP)'lerin UV-Vis Spektrofotometre Analizi

Gümüş nanopartiküllerin oluşumunu doğrulamak adına partiküllerin belirli dalga boyunda verdikleri absorbansın tayin edilmesi için UV-Vis Spektrofotometrede ölçümleri yapıldı. Bunun için kök ve yaprakтан ayrı ayrı ekstrakte edilerek hazırlanan gümüş nanopartikül solüsyonları 2 mL'lik kuvartz küvetlere konularak, gümüş nanopartiküllerin maksimum absorbans değerlerini belirlemek için örnekler 200-800 nm dalga boyu aralığında taranmıştır.

2.2.7.4 Gümüş nanopartikül (AgNP)'lerin Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektrofotometre (FT-IR) Analizi

Gümüş nanopartiküllerin ve ekstraktta bulunan biyomoleküllerin özelliklerini ve nanopartiküllerin yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupları incelemek amacıyla Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektrofotometre (FT-IR) yöntemi kullanılmıştır.

Astragalus kök ve yaprağından elde edilen ekstraktlardan sentezlenen gümüş nanopartiküller 12.000 rpm de 40 dk santrifüj edilmiştir. Ayrıca kontrol olarak kullanılmak üzere aynı kök ve yaprak ekstraktları da santrifüj edildikten sonra süpernatantlar uzaklaştırılarak pelletler 1 gece boyunca kurumaya bırakılmıştır.

Kurutulan nanopartikül ve ekstraktların 1mg'ı ile 100 mg KBr tozu karıştırılmış ve kağıt kalınlığına gelene kadar preslenmiştir. Preslendikten sonra şeffaf hale gelen örnekler FT-IR cihazında katı örnekler için kullanılan KBr yöntemi ile 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında taranmıştır.

2.2.8 Gümüş Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Gümüş nanopartiküllerin karakterizasyon analizinden sonra biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi için antimikrobiyal aktivite tayini yapılmıştır. Antimikrobiyal aktivite tayini için 6 farklı test mikroorganizması (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus (MRSA)*, *Klebsiella pnömoni*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acineto bacter*) kullanılmıştır. Çalışmada hazırlanan AgNP'lerin seçilen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile tayin edilmiştir.

Disk difüzyon yöntemi: Bu yöntemde mikroorganizmalar Mueller Hinton Broth içerisinde iki kez aktifleştirilerek 37°C'de inkübe edilmiştir. Kültürler aktifleştirildikten sonra optik yoğunluğu (OD) spektrofotometrik olarak 600 nanometre dalga boyunda 0,600 OD'ye

ayarlanmıştır ($OD_{600} \approx 0,6$). Aktifleştirilen mikroorganizmalar Mueller Hinton Agara inoküle edilerek tüm agar yüzeyine yayılması sağlanmıştır. Whatman filtre kağıdından hazırlanan steril disklerle, Astragalus'un kök ve yaprak ekstraktlarının indirgenmesi ile hazırlanan AgNP'lerden kök için 24 saat 5 mM $AgNO_3$ olan konsantrasyon ile indirgenen ve yaprak için 4 saat 5 mM $AgNO_3$ olan konsantrasyon ile hazırlanan formülasyonların 3 farklı konsantrasyonları (1 mg, 0,5 mg ve 0,25 mg/mL) disklerle emdirilerek 24 saat süre ile 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Steril distile su emdirilmiş diskler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda tüm petri kaplarında antimikrobiyal aktivite değerlendirilmiştir. Disk difüzyon testleri 2 tekrarlı olarak yapılmış ve tüm antimikrobiyal aktivite zonları cetvel yardımı ile ölçülerek sonuçlar kaydedilmiştir.

- **Mueller Hinton Broth Besiyerinin Hazırlanması:** Mueller Hinton Broth (BBL) besiyeri için 11 g kuru besiyeri hassas terazide tartılmıştır. Tartılan kuru besiyerinin üzerine bir miktar distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda iyice çözündürülmüştür. Daha sonra son hacim 500 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Son olarak tüplere 5 ml olarak paylaştırılmış ve tüplerin ağızları sıkı bir şekilde pamuk ile kapatılarak otoklavda steril edilmiştir. Sterilite kontrolü için besiyerleri 37°C'de inkübe edilmiş ve kontaminasyon gözlenmeyen besiyerleri ile çalışmalara devam edilmiştir.
- **Mueller Hinton Agar Besiyerinin Hazırlanması:** Mueller Hinton Agar (Condalab) besiyeri için 38g/L olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışma için gereken miktar hesaplandıktan sonra 1,2 L besiyeri için 45,6 g kuru besiyerinden tartılmıştır. Daha sonra bir miktar distile su ile manyetik karıştırıcıda çözündürüldükten sonra son hacim 1,2 L olacak şekilde distile su ile tamamlanmıştır. Daha sonra otoklavlanmış ve uygun ısıya geldikten sonra petrilere yaklaşık 20 ml olacak şekilde bek ateşinin önünde paylaştırılmıştır. İnkübatörde 37°C'de 1 gece bırakılmış ve sterilite kontrolünden sonra antimikrobiyal analiz çalışmaları için kullanılmıştır.
- **Mikroorganizmaların Aktifliklerinin Yapılması:** Katı besiyerindeki mikroorganizmaların (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus (MRSA)*, *Klebsiella pnömoni*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Aceoto bacter*) birinci aktiflikleri için tek kolonilerden halka uçlu öze ile alınarak sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. Sıvı besiyerine ekilen örnekler vortekslelendikten sonra 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İkinci aktiflik için, inkübasyona bırakılan mikroorganizmalardan 100µl alınarak taze sıvı besiyerine ekimi yapılmış ve CO_2 'li inkübatörde 37°C'de 18 saat inkübe edilmiştir.
- **Mikroorganizmaların Antimikrobiyal Test İçin Hazırlanması:** Aktiflikleri tamamlanan mikroorganizmaların, antimikrobiyal aktivitesinin tayini için yaklaşık olarak eşit sayıda bakteri ile çalışılması gerekmektedir. Bu sebeple mikroorganizmaların üreme yoğunlukları UV-spektrofotometrede absorbans değerleri

ölçülerek sabitlenmiştir. Boş besiyerinin kör olarak kullanıldığı çalışmada, mikroorganizmaların yoğunlukları 600 nm’de 0,6 OD’ye ayarlanmıştır.

- **AgNP’lerin Hazırlanması:** Antimikrobiyal aktivite tayini için kök ekstraktından elde edilen AgNP’lerden 24 saat 5 mM AgNO₃ içeren konsantrasyon ve yaprak ekstraktından elde edilen AgNP’lerden 4 saat 5 mM AgNO₃ içeren konsantrasyon seçilerek 3 farklı dilüsyon oranında çalışılmıştır. Tüm örnekler 0,22 µm’lik membrane filtre kullanarak steril edilmiştir.
- **Antimikrobiyal Testin Uygulanması:** OD’leri 0,6’ya ayarlanan mikroorganizmalar, 2 kontrollü olacak şekilde petrilere 100 µl olarak konulmuş ve drigalski öze ile besiyerinin her tarafına homojen bir şekilde yayılmış ve 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra petrilere ekilen mikroorganizmaların üzerine daha önceden Whatman kağıdından kesilerek steril edilen diskler yerleştirilmiştir. Bu disklerin üzerine 10 µl olacak şekilde farklı konsantrasyonlardaki gümüş nanopartikül solüsyonları emdirilmiştir. Sonrasında petriler inkübatörde 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda petrilerde oluşan zonlar ölçülerek kayıt edilmiştir.

2.2.9 Gümüş Nanopartiküllerin Biyoyumluluk Tayini

Sentezi yapılan gümüş nanopartiküllerin *in vitro* hücre kültürü biyoyumluluk ve antikanser etkinlik analizleri gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen gümüş nanopartiküllerin canlı hücrelerdeki biyoyumluluğunun tayini için sağlıklı fare fibroblast hücreleri (L929) kullanılmıştır. Bunun için %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri içerisindeki L929 (Fare Fibroblast hücre hattı) hücreleri 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. 18 saatin sonunda hücre yüzeyindeki besiyeri uzaklaştırılarak antimikrobiyal çalışmalarda uygulanan 3 farklı konsantrasyondaki gümüş nanopartiküller besi ortamında (1 mg/mL, 0,5 mg/mL ve 0,25 mg/mL) disperse edilerek 100 µL olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır. 48 saatlik inkübasyon sonunda formülasyonlar üzerine 25 µL 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) uygulanmıştır. 4 saat sonunda MTT uygulaması sonucu oluşan formazan kristallerinin çözülmesi için 200 µL Dimetilsülfoksit (DMSO) kuyucuklar üzerine uygulanarak absorbans 570 nm’de mikroparka okuyucuda ölçülmüştür. Canlılık aşağıda verilen formül üzerinden hesaplanmış ve AgNP ile muamele edilmemiş kültür ortamı kontrol olarak kullanılarak %100 canlılık olarak kabul edilmiştir.

$$\% \text{ canlılık} = \frac{\text{Maruz bırakılmış hücre} * 100}{\text{Maruz bırakılmamış hücre}}$$

2.2.10 Gümüş Nanopartiküllerin Antikanser Etkinliğinin Belirlenmesi

MCF-7 meme kanseri hücre hattı % 10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ortamında %5 CO₂ içeren etüvde 37°C’de inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Hücreler % 80 konfluensiye ulaştığında 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve daha sonra AgNP’lerin antikanser etkinliği MTT testi ile tayin edilmiştir. Buna göre 18 saatin

sonunda hücre yüzeyindeki besiyeri uzaklaştırılarak antimikrobiyal çalışmalarda uygulanan 3 farklı konsantrasyondaki (1 mg/mL, 0,5 mg/mL ve 0,25 mg/mL) AgNP'ler besiyerinde disperse edilerek 100 µL olacak şekilde hücrelere uygulanmıştır. 48 saatlik inkübasyon sonunda formülasyonlar üzerine 25 µL 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) uygulanmıştır. 4 saat sonunda MTT uygulaması sonucu oluşan formazan kristallerinin çözündürülmesi için 200 µL Dimetilsülfoksit (DMSO) kuyucuklar üzerine uygulanarak absorbans 570 nm'de mikropilaya okuyucuda ölçülmüştür. AgNP ile muamele edilmemiş kültür ortamı kontrol olarak kullanılarak %100 canlılık olarak kabul edilmiştir.

2.2.11 İstatiksel Analiz

Tez çalışmamızda elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilerek, tekrarlı analizler ile sonuçlar ifade edilmiştir. Hücre kültürü analiz sonuçları tek yönlü ANOVA ile değerlendirilerek (* $p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3. SONUÇLAR

3.1 Gümüş nanopartiküller (AgNP)'lerin Karakterizasyonu: UV-Vis Spektrofotometre Sonuçları

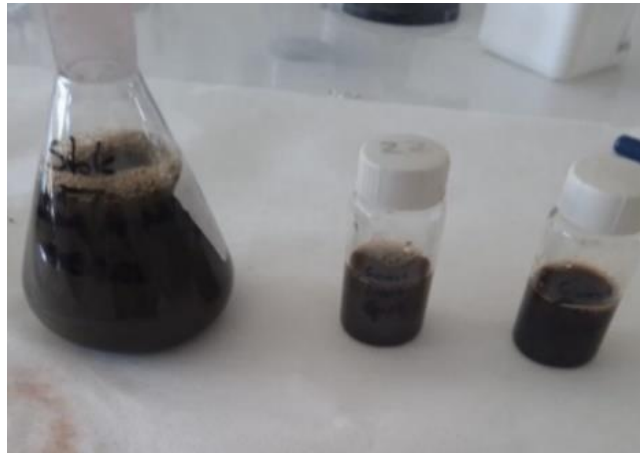
Geven 1 (Astragalus Yaprak) Örneği

Geven (1) 4 Saat:

Astragalus bitkisi yaprak örneği 8 saat süre ile su içerisinde ekstraksiyona tabi tutulduktan sonra elde edilen ekstrakttan gümüş nanopartikül sentezi yapılmıştır. Bunun için 1 M, 3 mM ve 5mM konsantrasyonda hazırlanan gümüş nitrat çözeltisi ile 4 saat süre ile indirgenen yaprak örneklerinden gümüş nanopartikül oluşumu öncelikle renk değişimine bağlı olarak karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile renk değişimine dayanarak çalışılan tüm konsantrasyonlarda Resim 17 ve Resim 18'de gösterildiği gibi gümüş nanopartiküllerin başarılı bir şekilde oluştuğu doğrulanmıştır.



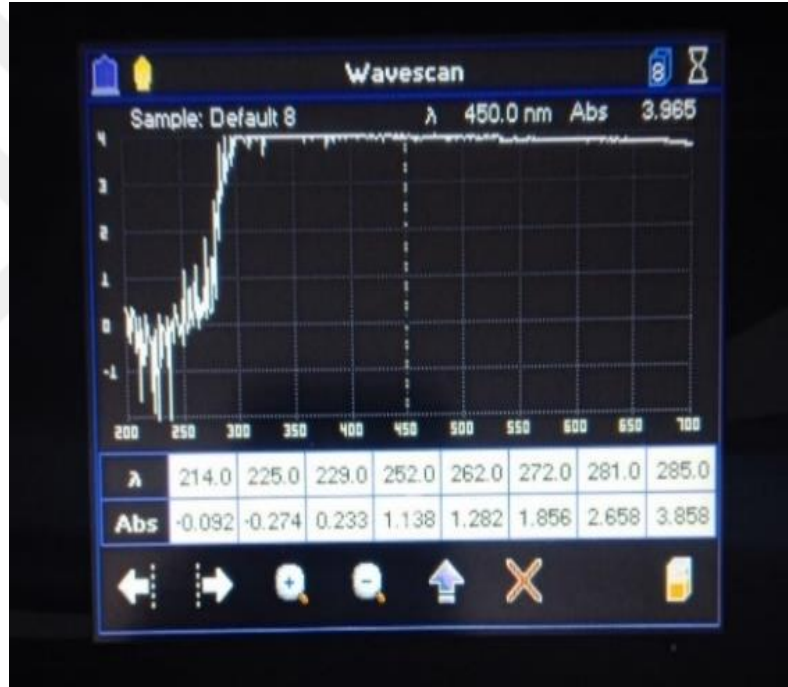
Resim 17: Geven 1 ile AgNP sentezi (4 saat başlangıç)



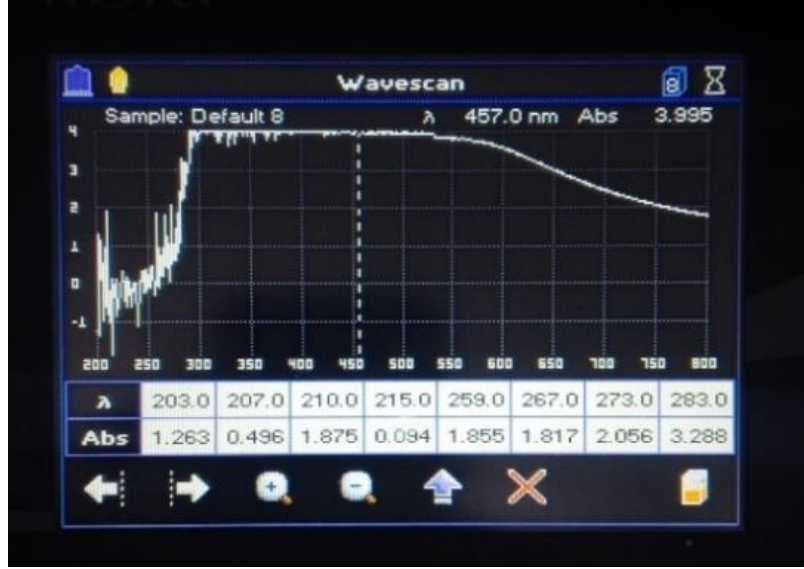
Resim 18: Geven 1 ile AgNP sentezi (4 saat sonu)

UV-Vis Spektrofotometre Sonuçları

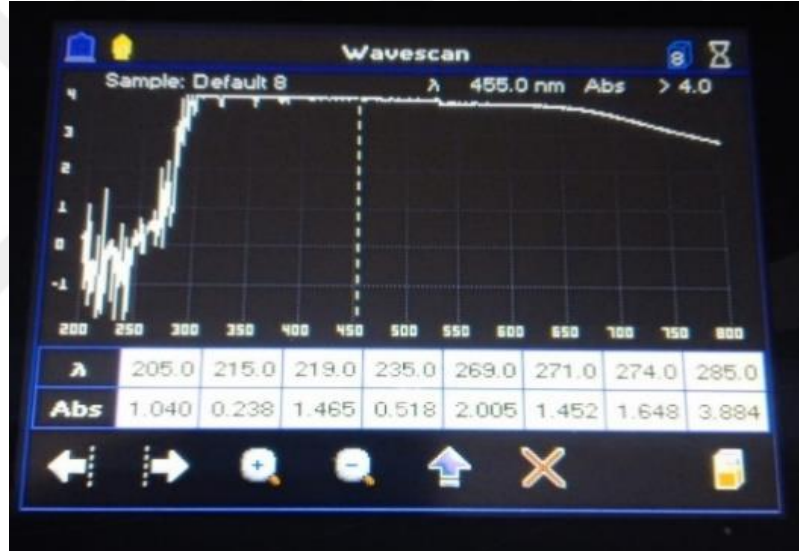
Yaprak ekstraktından sentezlendiği düşünülen gümüş nanopartiküllerin varlığını saptamak için UV-Vis spektrofotometre ile 200-800 nm dalga boyu aralığında maksimum absorbans piki taranmıştır. Gümüş nitrat (AgNO_3)'ın farklı konsantrasyonları ile 4 saatlik indirgenme reaksiyonuna bağlı olarak sentezlenen gümüş nanopartiküller literatür verileri ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 400-450 nm aralığında maksimum absorbans piki vermektedir. Buna bağlı olarak tez çalışmamızda Astragalus yapraklarından elde edildiği düşünülen gümüş nanopartiküller UV spektrofotometre ile ölçülerek sentezin başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği analiz edilmiştir. Buna göre, örnekler Resim 19, 20 ve 21'de gösterildiği gibi yaklaşık 450 nm dalga boyunda maksimum absorbans piki vermiştir. Böylece Astragalus bitkisinin yaprağından AgNO_3 ile indirgenme reaksiyonu gerçekleştirilerek başarılı bir şekilde gümüş nanopartiküllerin sentezlendiği doğrulanmıştır.



Resim 19: Geven 1+ 1 M AgNO_3 (4 saat)



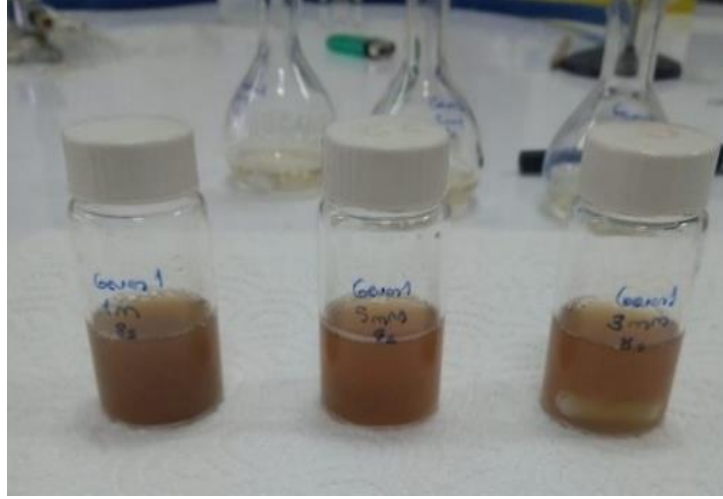
Resim 20:Geven 1 + 3 mM AgNO_3 (4 Saat)



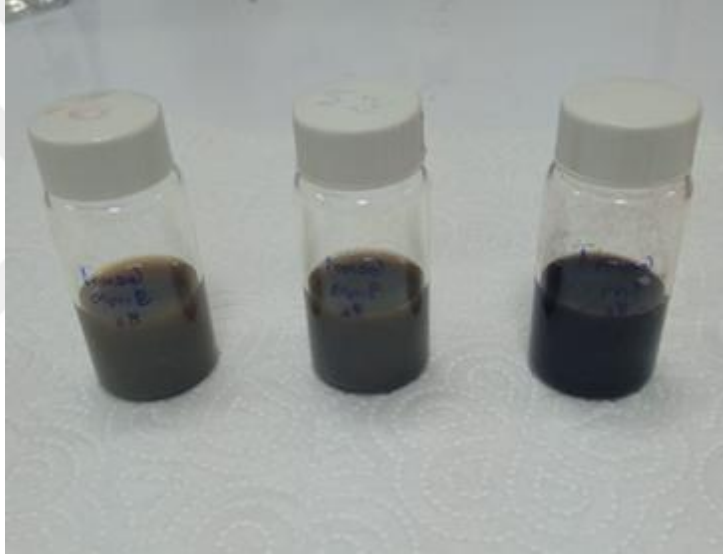
Resim 21:Geven 1 + 5 mM AgNO_3 (4 Saat)

Geven (1) 8 Saat:

Astragalus bitkisi yaprak örneği 8 saat süre ile su içerisinde ekstraksiyona tabi tutulduktan sonra elde edilen ekstrakttan gümüş nanopartikül sentezi yapılmıştır. Bunun için 1 M, 3 mM ve 5mM konsantrasyonda hazırlanan gümüş nitrat çözeltisi ile 8 saat süre ile indirgenen yaprak örneklerinden gümüş nanopartikül oluşumu öncelikle renk değişimine bağlı olarak karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, literatüre benzerlik göstermekte olup, gümüş nanopartiküllerin renk değişimine dayanarak çalışılan tüm konsantrasyonlarda başarılı bir şekilde oluştuğu doğrulanmıştır (Resim 22 ve Resim 23).



Resim 22:Geven 1 ile AgNP sentezi (8 saat başlangıç)

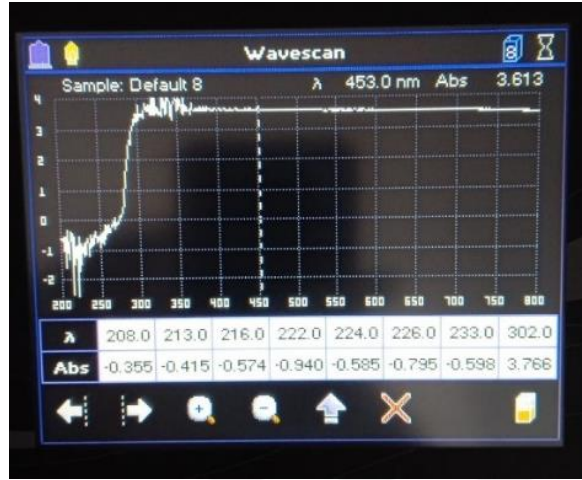


Resim 23:Geven 1 ile AgNP sentezi (8 saat sonu)

UV-Vis Spektrofotometre Sonuçları

Yaprak ekstraktından sentezlendiği düşünülen gümüş nanopartiküllerin varlığını saptamak için UV-Vis spektrofotometre ile 200-800 nm dalga boyu aralığında maksimum absorbans piki taranmıştır. Gümüş nitrat (AgNO_3)'ın farklı konsantrasyonları ile 8 saatlik indirgenme reaksiyonuna bağlı olarak sentezlenen gümüş nanopartiküller literatür verileri ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 400-450 nm aralığında maksimum absorbans piki vermektedir. Buna bağlı olarak tez çalışmamızda Astragalus yapraklarından elde edildiği düşünülen gümüş nanopartiküller UV spektrofotometre ile ölçülerek sentezin başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği analiz edilmiştir. Buna göre 8 saatlik inkübasyon sonucu oluşan örnekler Resim 24, 25 ve 26' da gösterildiği gibi yaklaşık 450 nm dalga boyunda maksimum absorbans piki vermiştir. Bu sonuç referans alınan çalışmalar ile benzerlik

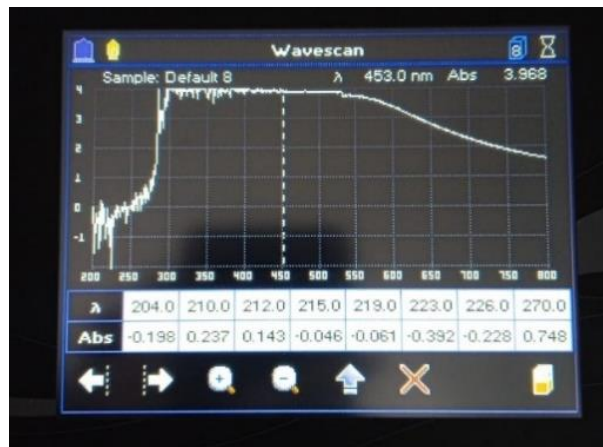
göstermiştir. Böylece Astragalus bitkisinin yaprağından AgNO_3 ile indirgenme reaksiyonu gerçekleşerek başarılı bir şekilde gümüş nanopartiküllerin sentezlendiği doğrulanmıştır.



Resim 24:Geven 1 + 1M AgNO_3 (8 saat)



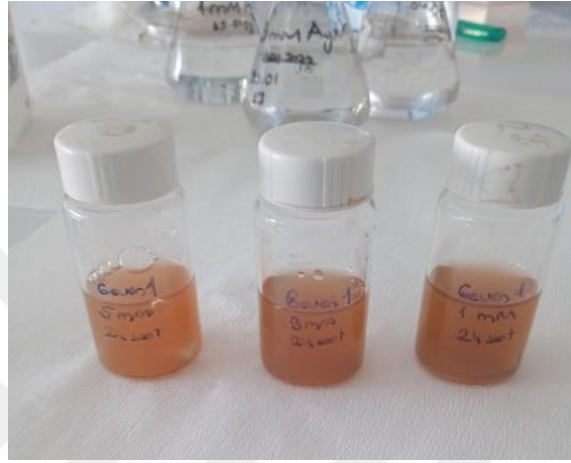
Resim 25:Geven 1 + 3mM AgNO_3 (8 saat)



Resim 26:Geven 1 + 5 mM AgNO_3 (8 saat)

Geven (1) 24 Saat:

Astragalus bitkisi yaprak örneği 24 saat süre ile su içerisinde ekstraksiyona tabi tutulduktan sonra elde edilen ekstrakttan gümüş nanopartikül sentezi yapılmıştır. Bunun için 1 M, 3 mM ve 5mM konsantrasyonda hazırlanan gümüş nitrat çözeltisi ile 24 saat süre ile indirgenen yaprak örneklerinden gümüş nanopartikül oluşumu öncelikle renk değişimine bağlı olarak karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, literatüre benzerlik göstermekte olup, gümüş nanopartiküllerin renk değişimine dayanarak çalışılan tüm konsantrasyonlarda başarılı bir şekilde oluştuğu doğrulanmıştır (Resim 27 ve Resim 28).



Resim 27:Geven 1 ile AgNP sentezi (24 saat başlangıç)



Resim 28:Geven 1 ile AgNP sentezi (24 saat sonu)

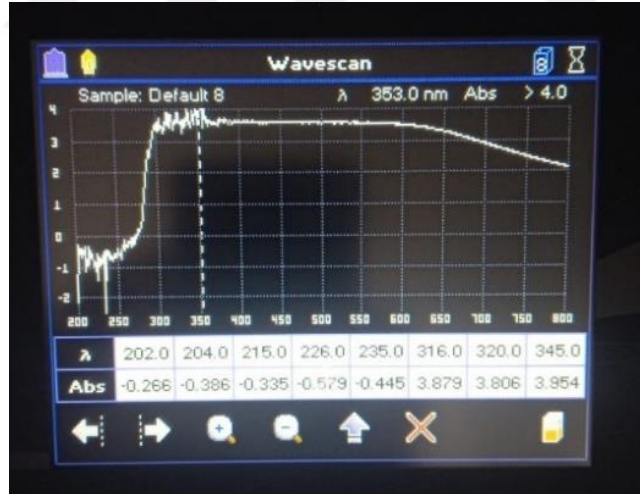
UV-Vis Spektrofotometre Sonuçları

Yaprak ekstraktından sentezlendiği düşünülen gümüş nanopartiküllerin varlığını saptamak için UV-Vis spektrofotometre ile 200-800 nm dalga boyu aralığında maksimum absorbans piki taranmıştır. Gümüş nitrat (AgNO_3)'ın farklı konsantrasyonları ile 24 saatlik indirgenme reaksiyonuna bağlı olarak sentezlenen gümüş nanopartiküller literatür verileri ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 400-450 nm aralığında maksimum absorbans piki

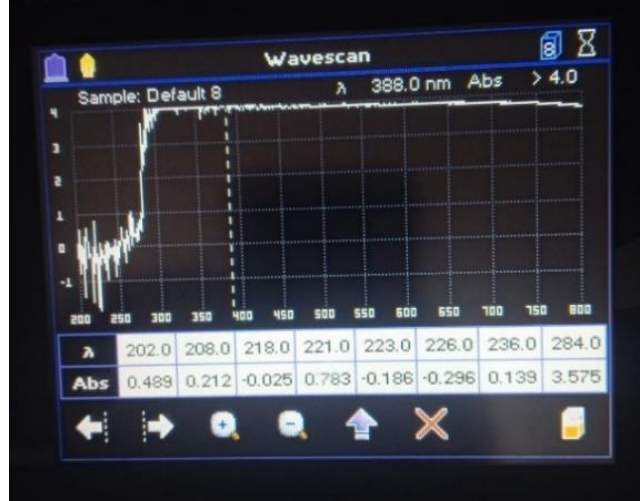
vermektedir. Buna bağılı olarak tez çalışmamızda Astragalus yapraklarından elde edildiğı düşünölen gümüş nanopartiköller UV spektrofotometre ile ölçölerek sentezin başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğı analiz edilmiştir. Buna göre örnekler Resim 29, 30 ve 31’de gösterildiğı gibi yaklaşık 390 nm dalga boyunda maksimum absorbans piki vermiştir. Bu sonuç referans alınan çalışmalar ile yakınlık göstermiştir. Böylece Astragalus bitkisinin yaprağından AgNO₃ ile indirgenme reaksiyonu gerçekleşerek başarılı bir şekilde gümüş nanopartiköllerin sentezlendiğı doğrulanmıştır.



Resim 29:Geven 1 + 1mM AgNO₃ (24 saat)



Resim 30:Geven 1 + 3 mM AgNO₃ (24 saat)



Resim 31: Geven 1 + 5mM AgNO₃ (24 saat)

GEVEN 2 (KÖK) ÖRNEĞİ

Geven (2) 4 Saat:

Astragalus bitkisi kök örneği 8 saat süre ile su içerisinde ekstraksiyona tabi tutulduktan sonra elde edilen ekstraktan gümüş nanopartikül sentezi yapılmıştır. Bunun için 1 M, 3 mM ve 5mM konsantrasyonda hazırlanan gümüş nitrat çözeltisi ile kök ekstraktı 4 saat süre ile manyetik karıştırıcıda indirgenerek gümüş nanopartikül oluşumu öncelikle renk değişimine bağlı olarak karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, literatüre benzerlik göstermekte olup, gümüş nanopartiküllerinin oluşumu sırasında yaprak ekstraktlarından elde edilen gümüş nanopartiküllere kıyasla daha az bir renk değişimi meydana getirdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçların yanı sıra gümüş nanopartikül oluşumu UV-spektrofotometrik karakterizasyon sonuçlarının teyidinde ihtiyaç duyduğundan spektrofotometrik yöntem ile nanopartikül oluşumu karakterize edilmiştir (Resim 32 ve Resim 33).



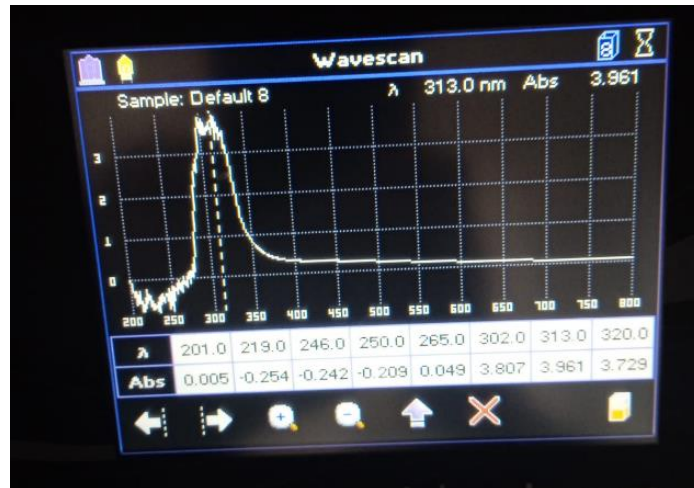
Resim 32: Geven 2 ile AgNP sentezi (4 saat başlangıç)



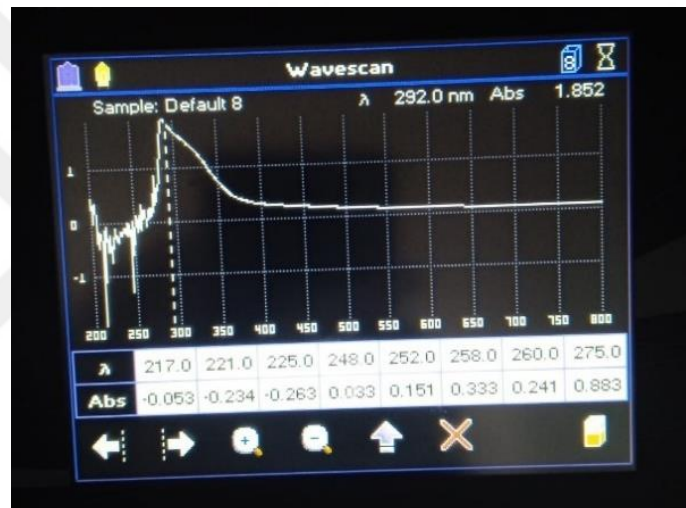
Resim 33: Geven 2 ile AgNP sentezi (4 saat sonu)

UV-Vis Spektrofotometre Sonuçları

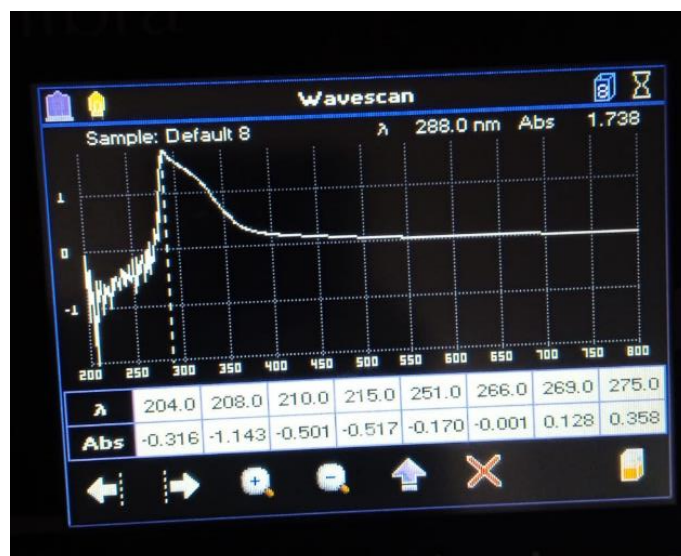
Kök ekstraktından sentezlendiği düşünülen gümüş nanopartiküllerin varlığını saptamak için UV-Vis spektrofotometre ile 200-800 nm dalga boyu aralığında maksimum absorbans piki taranmıştır. Buna göre Gümüş nitrat (AgNO_3)'ın farklı konsantrasyonları ile 4 saatlik indirgenme reaksiyonuna bağlı olarak sentezlenen gümüş nanopartiküller literatür verileri ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 400-450 nm aralığında maksimum absorbans piki vermektedir. Tez çalışmamızda ise bitki kökünden elde edilen gümüş nanopartiküllerin 290 nm de pik verdiği bulunmuştur (Resim 34-36).



Resim 34: Geven 2 + 1M AgNO₃ (4 saat)



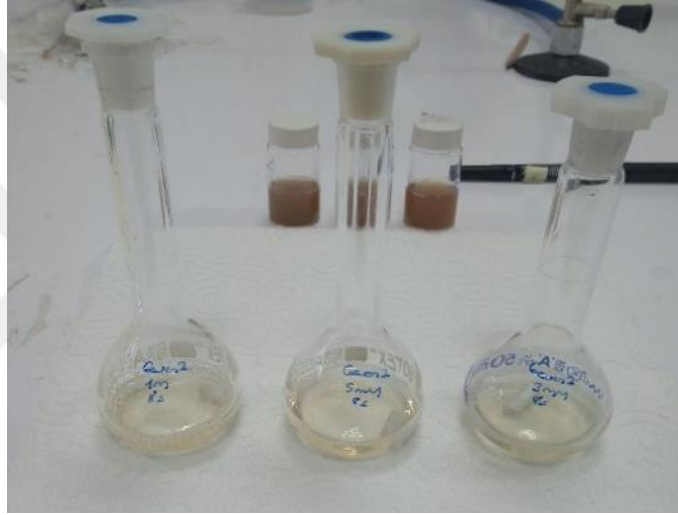
Resim 35: Geven 2 + 3 mM AgNO₃ (4 saat)



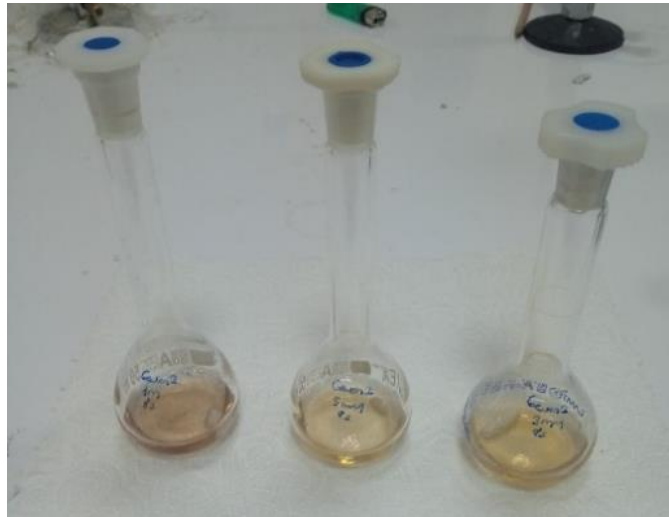
Resim 36: Geven 2 + 5 mM AgNO₃ (4 saat)

Geven (2) 8 Saat

Astragalus bitkisi kök örneği 8 saat süre ile su içerisinde ekstraksiyona tabi tutulduktan sonra elde edilen ekstraktan gümüş nanopartikül sentezi yapılmıştır. Bunun için 1 M, 3 mM ve 5mM konsantrasyonda hazırlanan gümüş nitrat çözeltisi ile kök ekstraktı 8 saat süre ile manyetik karıştırıcıda indirgenerek gümüş nanopartikül oluşumu öncelikle renk değişimine bağlı olarak karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, literatüre benzerlik göstermekte olup, gümüş nanopartiküllerinin oluşumu sırasında yaprak ekstraktlarından elde edilen gümüş nanopartiküllere kıyasla daha az bir renk değişimi meydana getirdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçların yanı sıra gümüş nanopartikül oluşumu UV-spektrofotometrik karakterizasyon sonuçlarının teyidinde ihtiyaç duyduğundan spektrofotometrik yöntem ile nanopartikül oluşumu karakterize edilmiştir (Resim 37 ve Resim 38).



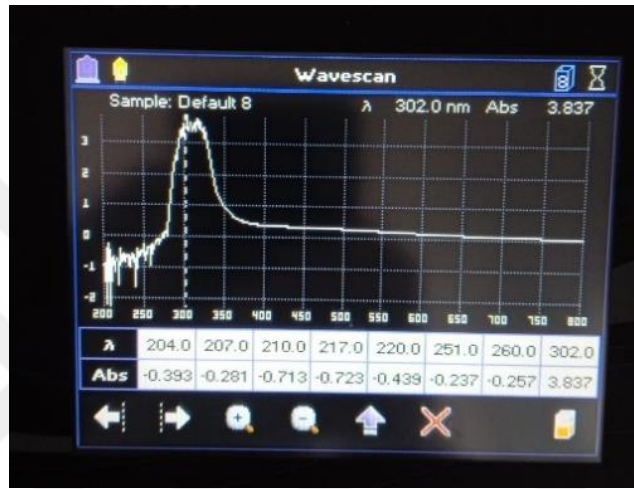
Resim 37: Geven 2 ile AgNP sentezi (8 saat başlangıç)



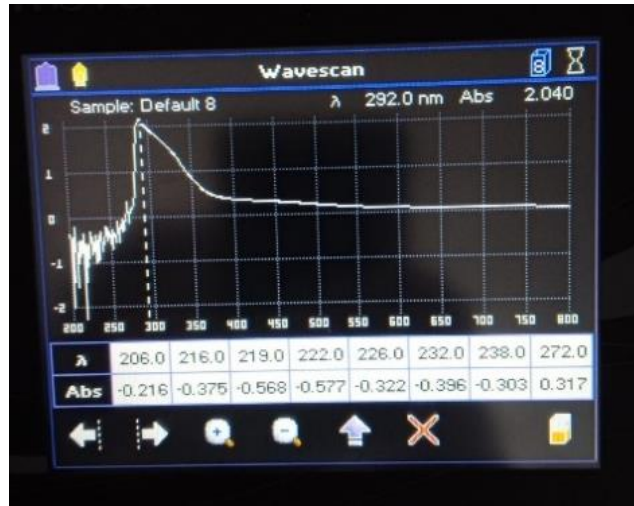
Resim 38: Geven 2 ile AgNP sentezi (8 saat sonu)

UV Spektrofotometre Sonuçları

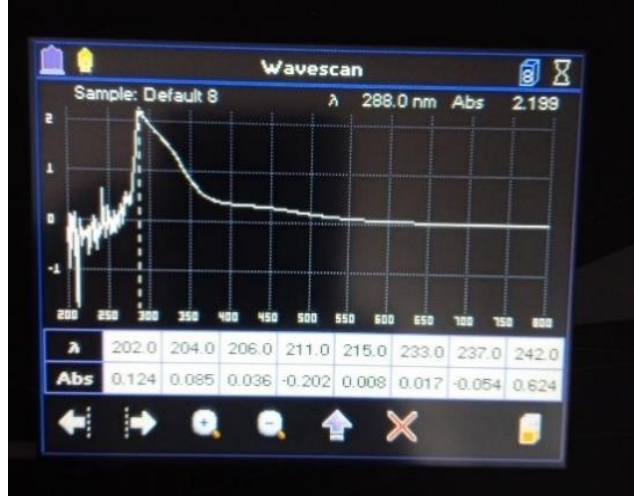
Kök ekstraktından sentezlendiği düşünülen gümüş nanopartiküllerin varlığını saptamak için UV-Vis spektrofotometre ile 200-800 nm dalga boyu aralığında maksimum absorbans piki taranmıştır. Buna göre Gümüş nitrat (AgNO_3)'ın farklı konsantrasyonları ile indirgenme reaksiyonuna bağlı olarak sentezlenen gümüş nanopartiküller literatür verileri ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 400-450 nm aralığında maksimum absorbans piki vermektedir. Tez çalışmamızda ise bitki kökünden elde edilen gümüş nanopartiküllerin 8 saatlik indirgenme reaksiyonu sonucu 295-300 nm aralığında maksimum absorbans piki verdiği bulunmuştur (Resim 39-41)



Resim 39:Geven 2 + 1M AgNO3 (8 saat)



Resim 40:Geven 2 + 3 mM AgNO3 (8 saat)



Resim 41: Geven 2 + 5 mM AgNO₃ (8 saat)

Geven (2) 24 Saat:

Astragalus bitkisi kök örneği 24 saat süre ile su içerisinde ekstraksiyona tabi tutulduktan sonra elde edilen ekstraktan gümüş nanopartikül sentezi yapılmıştır. Bunun için 1 M, 3 mM ve 5mM konsantrasyonda hazırlanan gümüş nitrat çözeltisi ile kök ekstraktı 24 saat süre ile manyetik karıştırıcıda indirgenerek gümüş nanopartikül oluşumu öncelikle renk değişimine bağlı olarak karakterize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, literatüre benzerlik göstermekte olup, gümüş nanopartiküllerinin oluşumu sırasında yaprak ekstraktlarından elde edilen gümüş nanopartiküllere kıyasla daha az bir renk değişimi meydana getirdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçların yanı sıra gümüş nanopartikül oluşumu UV-spektrofotometrik karakterizasyon sonuçlarının teyidine ihtiyaç duyduğundan spektrofotometrik yöntem ile nanopartikül oluşumu karakterize edilmiştir (Resim 42 ve Resim 43).



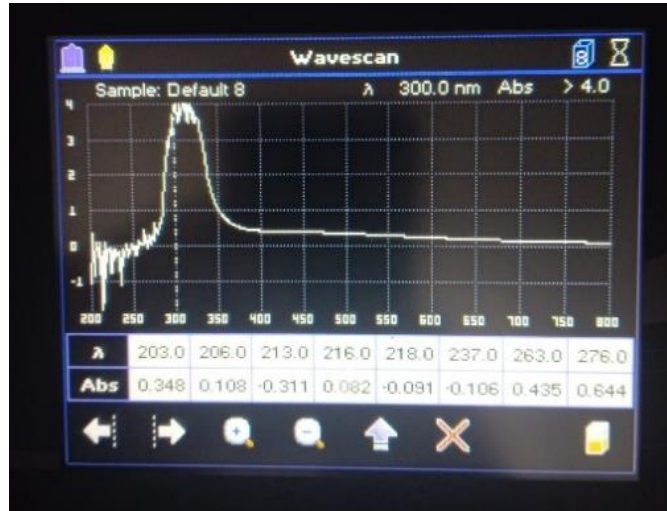
Resim 42: Geven 2 ile AgNP sentezi (24 saat başlangıç)



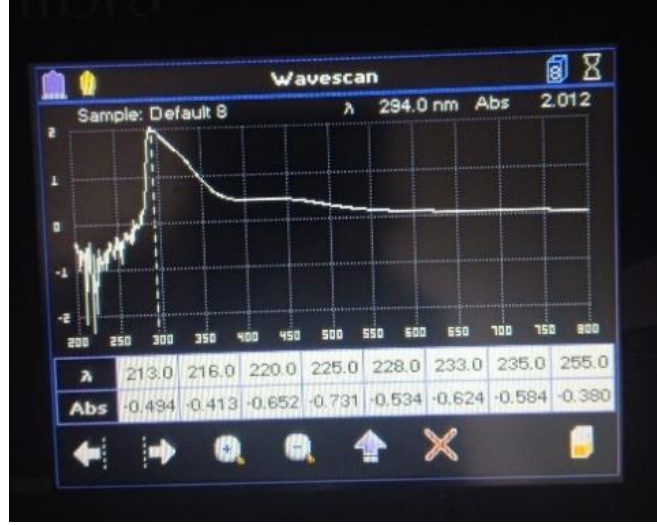
Resim 43:Geven 2 ile AgNP sentezi (24 saat sonu)

UV-Vis Spektrofotometre Sonuçları

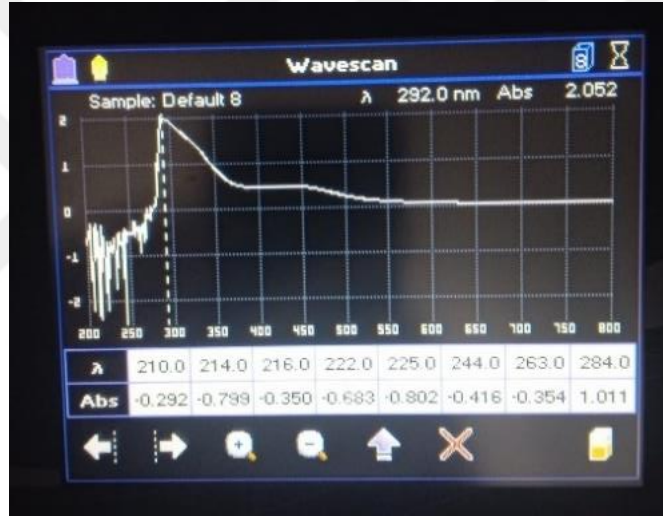
Kök ekstraktından sentezlendiği düşünülen gümüş nanopartiküllerin varlığını saptamak için UV-Vis spektrofotometre ile 200-800 nm dalga boyu aralığında maksimum absorbans piki taranmıştır. Buna göre Gümüş nitrat (AgNO_3)'ın farklı konsantrasyonları ile indirgenme reaksiyonuna bağlı olarak sentezlenen gümüş nanopartiküller literatür verileri ile karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 400-450 nm aralığında maksimum absorbans piki vermektedir. Tez çalışmamızda ise bitki kökünden elde edilen gümüş nanopartiküllerin 24 saatlik indirgenme reaksiyonu sonucu 295 nm de maksimum absorbans piki verdiği bulunmuştur (Resim 44-46).



Resim 44:Geven 2 + 1M AgNO_3 (24 saat)



Resim 45:Geven 2 + 5 mM AgNO₃ (24 saat)



Resim 46:Geven 2 + 3 mM AgNO₃ (24 saat)

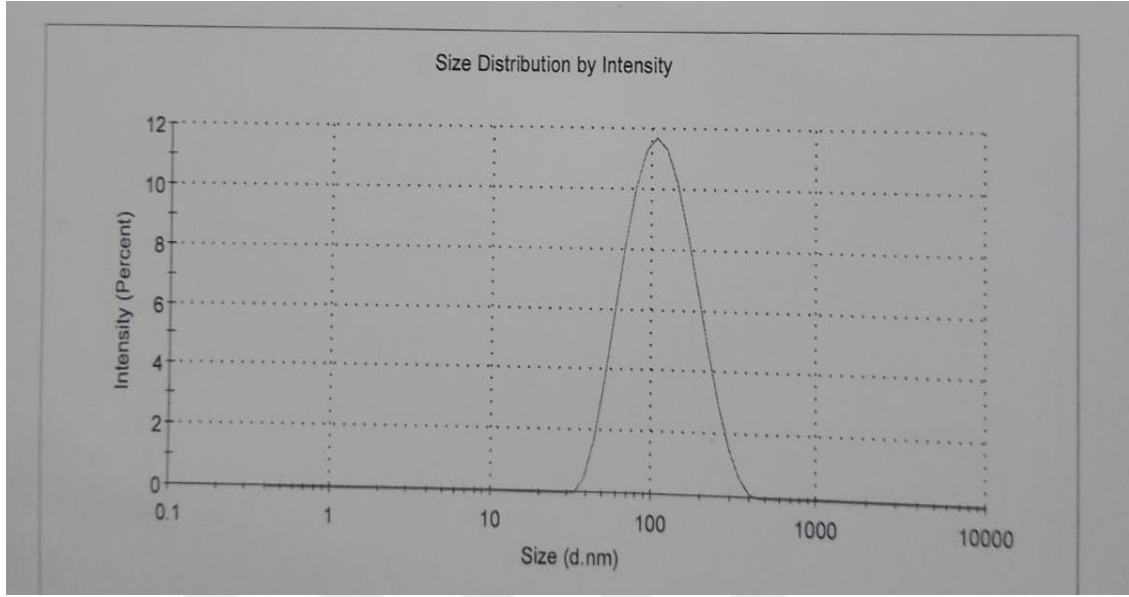
3.2 Gümüş nanopartikül (AgNP)'lerin Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ile Partikül Boyut Analizleri Ve Zeta Potansiyelleri

Astragalus yaprak ekstraktından ve Astragalus kök ekstraktından sentezlenen gümüş nanopartiküller, Zetasizer cihazında DLS yöntemi ile partikül boyutu, zeta potansiyeli ve polidispersite (PDI) değerleri açısından analiz edilmiştir (Grafik 1-2).

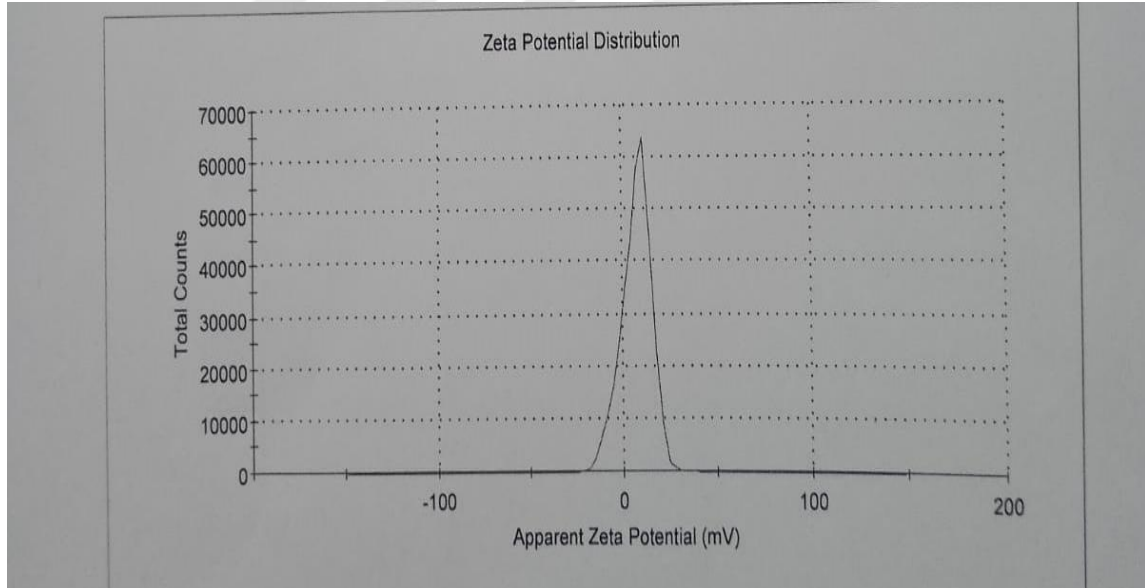
Astragalus yaprak ekstraktından (Geven 1) elde edilen gümüş nanopartiküllerin partikül boyut, zeta potansiyel ve PDI değerleri gümüş nitrat konsantrasyonu ve süreye bağlı olarak değişiklik göstermiş olup sonuçlar Tablo 3' de verilmiştir.

Tez çalışmamız sırasında kullanılan Astragalus yaprak örneğinden gümüş nanopartikül oluşumunda renk değişimi ve UV spektrofotometrik analizler açısından uygun olduğu belirlenen örnek ile sonraki karakterizasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Bunun için 5mM gümüş nitrat varlığında 4 saat süre ile inkübe edilen ekstraksiyonlardan elde edilen gümüş

nanopartiküllerin yaklaşık olarak boyutu 97 nm, zeta potansiyeli -22 mV ve PDI değeri ise 0,2 olarak belirlenmiştir.



Grafik 1: Geven1'den elde edilen gümüş nanopartiküllerinin (AgNP) boyut dağılımı



Grafik 2: Geven1'den elde edilen gümüş nanopartiküllerinin (AgNP) zeta potansiyel değeri

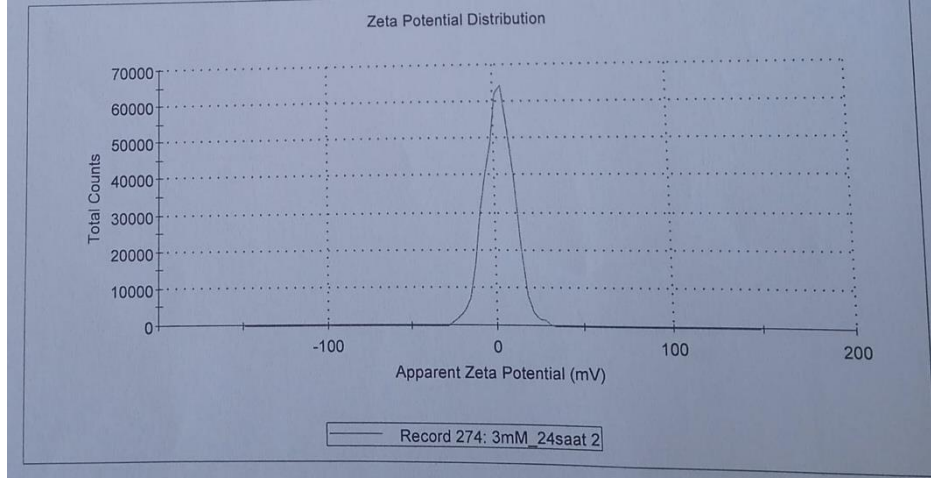
Tablo 3:Geven1'den elde edilen nanopartiküllerin, partikül boyutu, zeta potansiyeli ve PDI verileri (Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir).

Geven 1	Partikül Boyutu (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)	PDI
5 mM 4 saat	97±1,6 nm	- 21,8±2,2	0,224±0,0
3 mM 24 saat	101,3±1,6 nm	- 21,1±2,2	0,184±0,0
5 mM 24 saat	103,2±1,6 nm	- 23,3±2,2	0,217±0,0

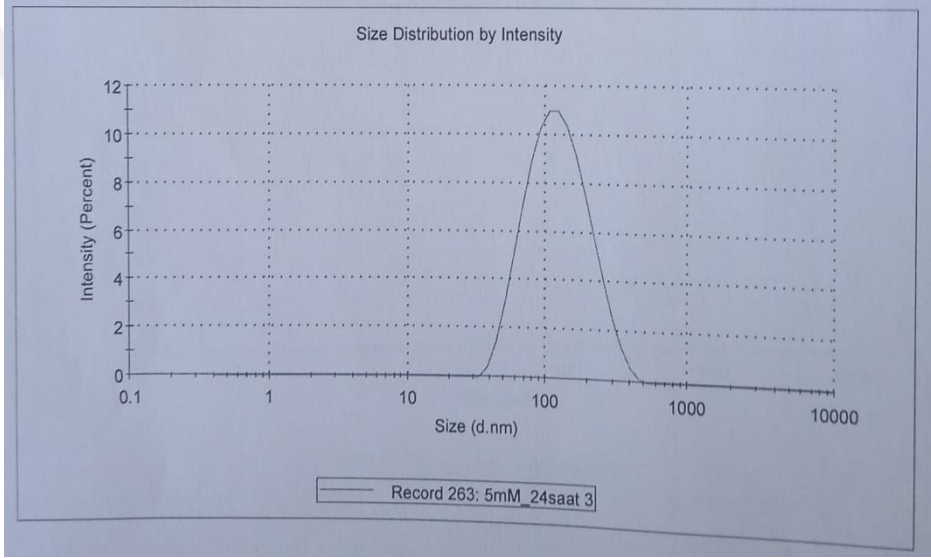
Tez çalışmamız sırasında kullanılan Astragalus kök örneğinden gümüş nanopartikül oluşumunda renk değişimi ve UV spektrofotometrik analizler açısından uygun olduğu belirlenen örnek ile sonraki karakterizasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Bunun için 5mM gümüş nitrat varlığında 24 saat süre ile inkübe edilen ekstraksiyonlardan elde edilen gümüş nanopartiküller Tablo 4'te gösterildiği gibi yaklaşık olarak boyutu 85 nm, zeta potansiyeli -24 mV ve PDI değeri ise 0,2 olarak belirlenmiştir. Geven 2'den elde edilen gümüş nanopartiküllerin zeta potansiyel boyut dağılım grafiği ise Grafik 3'te gösterilmiştir.

Tablo 4:Geven2'den elde edilen naopartiküllerin, partikül boyutu, zeta potansiyeli ve PDI verileri (Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir)

Geven 2	Partikül Boyutu (nm)	Zeta Potansiyeli	PdI
5 mM 24 saat	85,4±1,6 nm	- 24,2±2,2	0,2±0,0



Grafik 3: Geven 2'den elde edilen nanopartiküllerinin (AgNP) boyut dağılımı



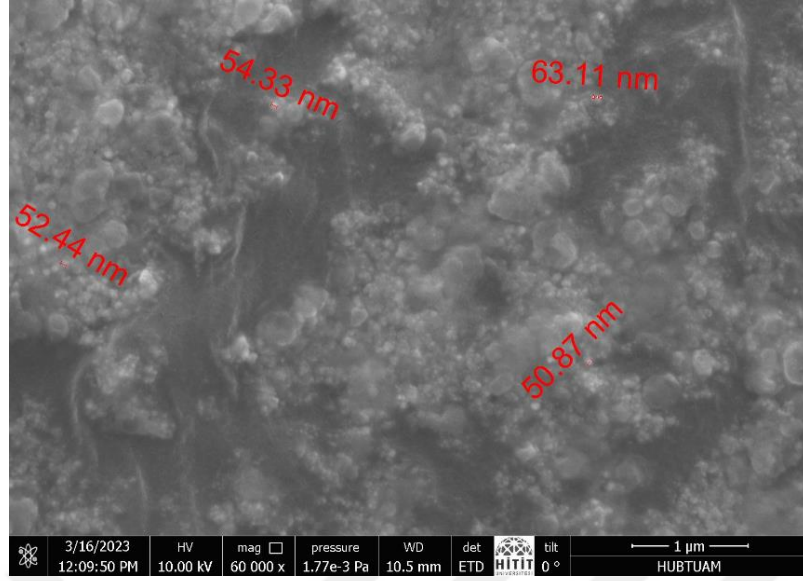
Grafik 4: Geven 2'den elde edilen gümüş nanopartiküllerin (AgNP) zeta potansiyel değeri

3.3 Gümüş Nanopartiküllerin Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) Sonuçları

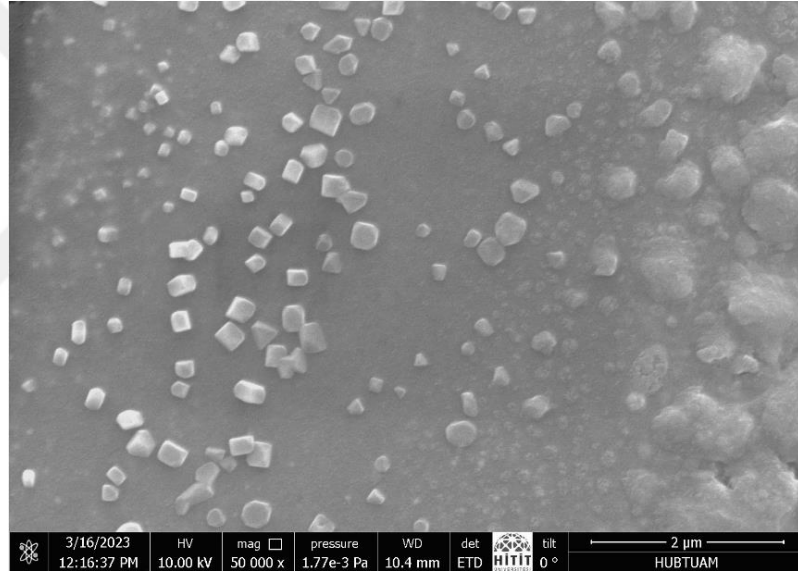
Geven1 (5 mM 4 saat) ve Geven2 (5 mM 24 saat) den sentezlenen gümüş nanopartiküllerin DLS yöntemi ile optimum boyuta sahip olduğu belirlenen formülasyonlarına ait partikül boyut ve morfolojileri, taramalı elektron mikroskop (SEM) yöntemi ile tayin edilmiştir.

SEM yöntemi ile saptanan sonuçlara göre Geven1'den elde edilen gümüş nanopartiküllerin partikül boyutu yaklaşık 55 nm ve morfolojilerinin ise ağırlıklı olarak küresel agregatlar ve kare kristaller şeklinde olduğu gözlemlenmiştir (Resim 47 ve Resim 48).

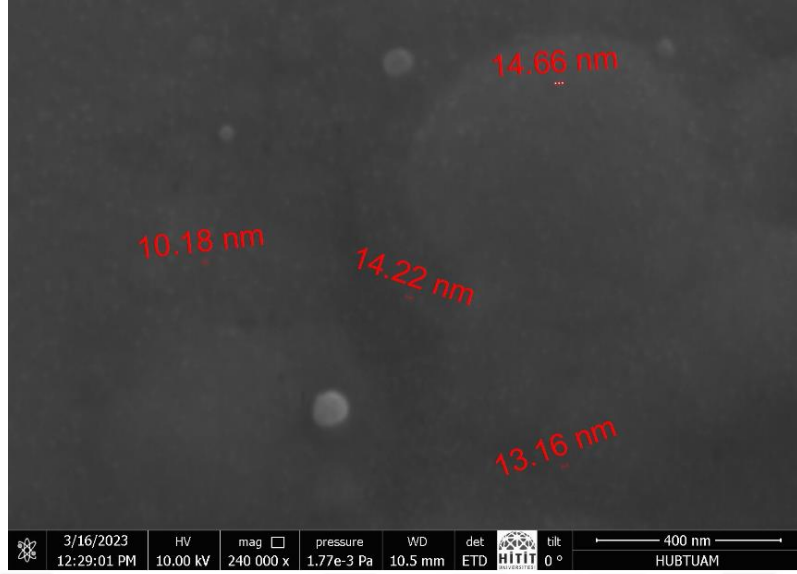
Belirlenen optimum özellikli Geven2'den sentezlenen gümüş nanopartiküllerin SEM sonuçlarına göre partiküllerin boyutları yaklaşık 14 nm ve morfolojileri ise küresel agregatlar şeklindedir (Resim 49).



Resim 47: Geven1 gümüş nanopartiküllerinin SEM ile boyut analiz verileri



Resim 48: Geven 1 gümüş nanopartiküllerinin SEM görüntüsü



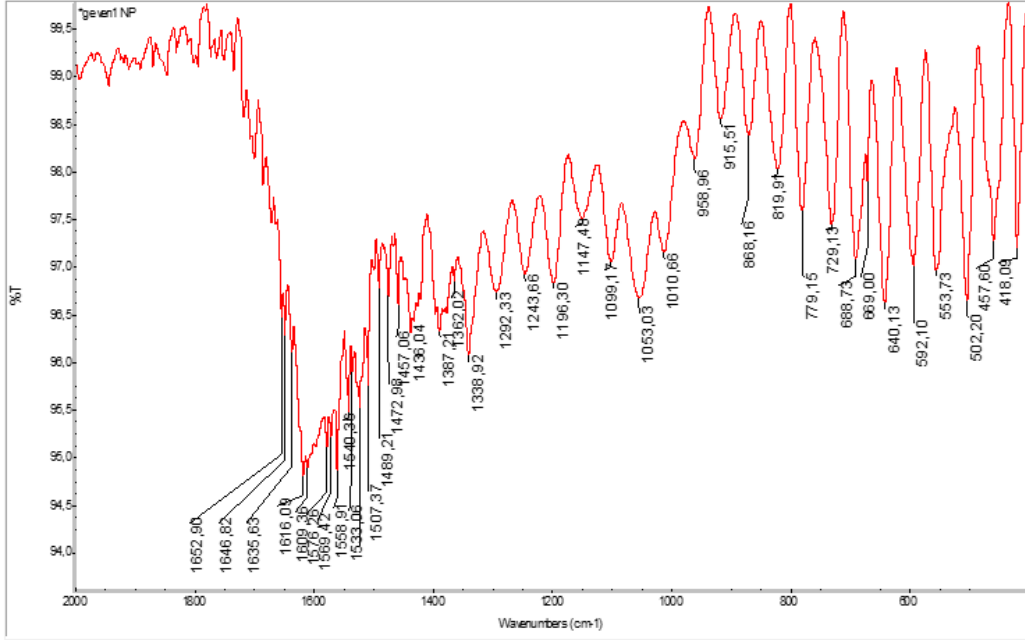
Resim 49:Geven 2 gümüş nanopartiküllerinin SEM görüntüsü ve boyut analiz verileri

3.4 Gümüş Nanopartiküllerin FT-IR Analiz Sonuçları

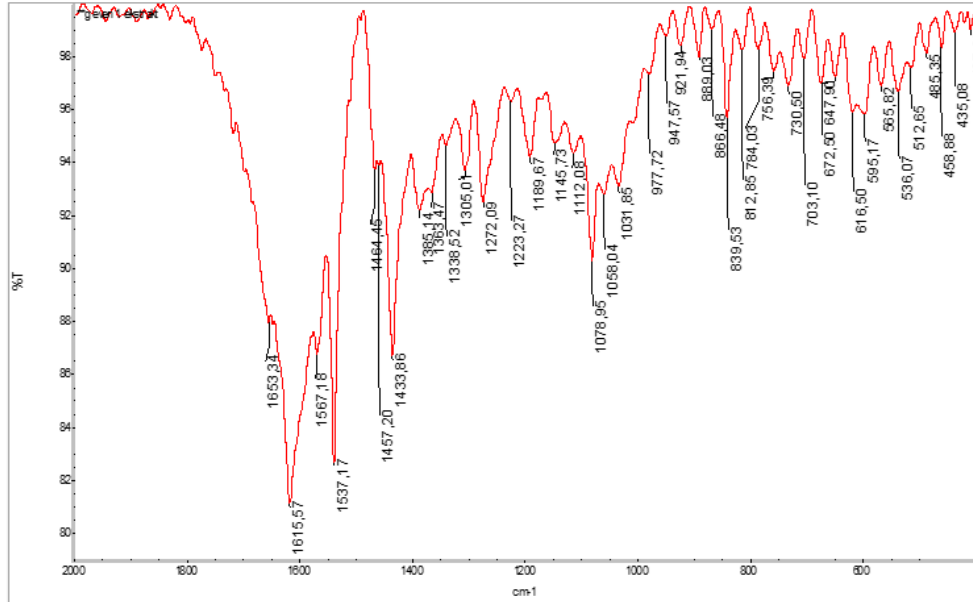
Yaprak ve kök ekstraktlarından hazırlanan gümüş nanopartiküllere ait belirlenen optimum özellikteki formülasyonlar kurutularak FT-IR cihazında 400-4000 nm dalga boyları arasında taranarak, titreşim piki verdikleri absorbands bantları tespit edilmiştir.

1030, 1080, 1150, 1370, 1616, 2930 ve 3333 cm^{-1} 'de gözlemlenen absorpsiyon bantları, numune yüzeyinde çeşitli fonksiyonel grupların varlığını açıkça göstermektedir. 1030 ve 1150 cm^{-1} 'deki zirveler, C-O-C titreşimlerine bağlanır. 1080 cm^{-1} 'deki zirve, C-O-H titreşimleriyle ilişkilidir. 1370 ve 2930 cm^{-1} 'deki bantlar, CH_3 ve CH_2 gruplarının titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1616 ve 3333 cm^{-1} 'deki pikler, sırasıyla C = O ve O-H titreşimleriyle ilişkilidir. *Astragalus membranaceus* ekstraktı ve AgNP örneklerinin FT-IR analiz verilerine

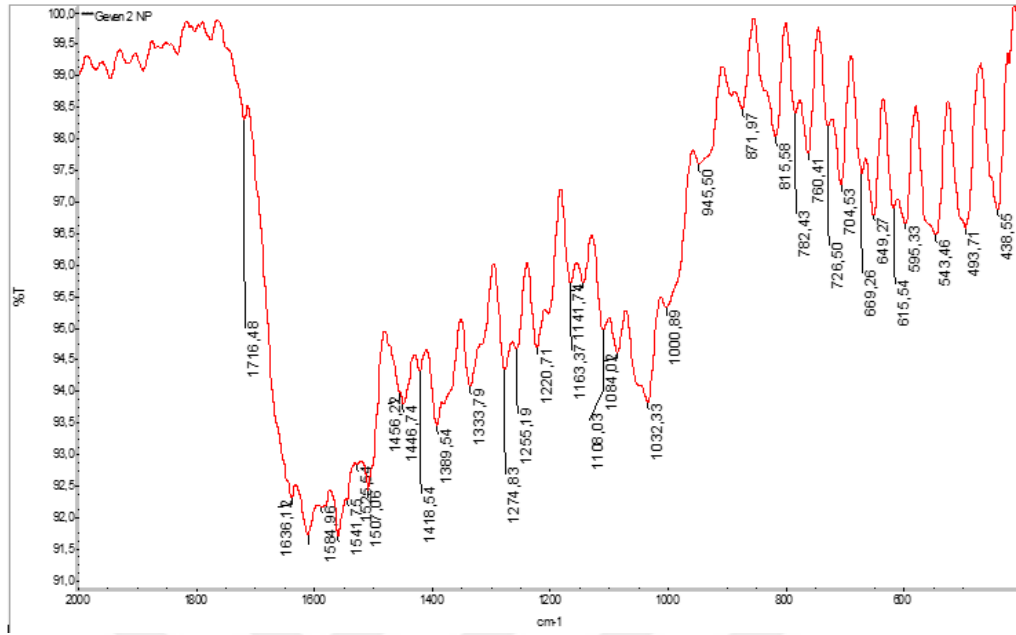
göre Grafik 5-10'da gösterildiği gibi spektrumlarının pik yoğunluklarındaki küçük farklılıklar gözlenirken, pik konumlarında önemli bir değişiklik bulunmadığı gözlemlendi.



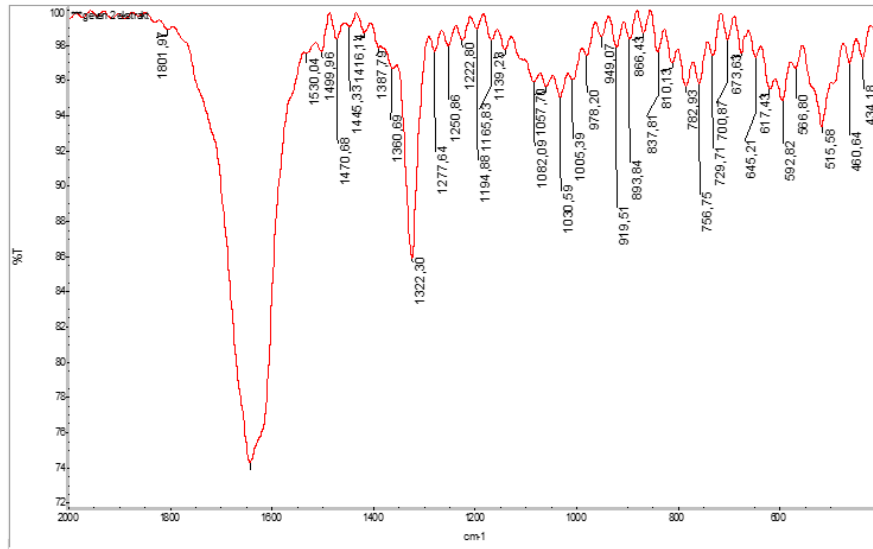
Grafik 5: Geven1 nanopartiküllerinin FT-IR analiz verileri



Grafik 6: Geven1 ekstraktının FT-IR analiz verileri



Grafik 7: Geven 2 nanopartiküllerinin FT-IR analiz verileri

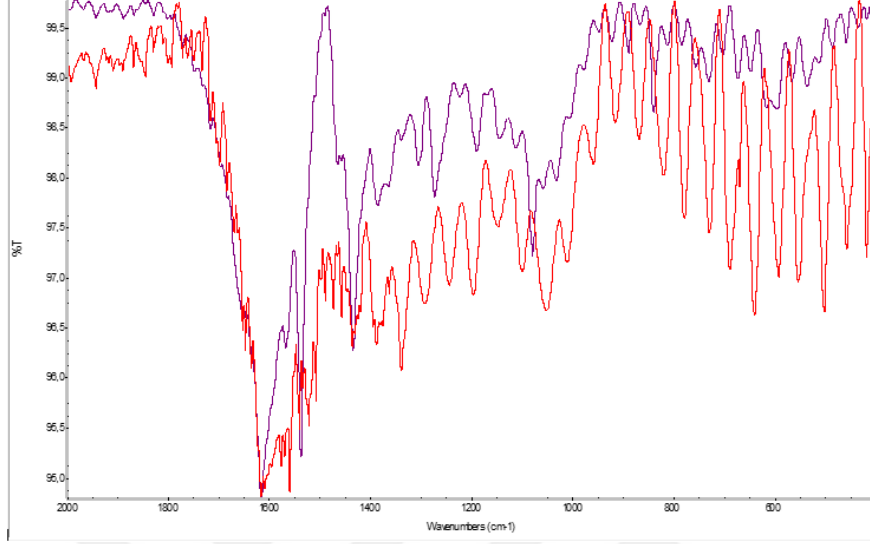


Grafik 8: Geven 2 ekstraktının FT-IR analiz verileri

Geven yaprak ve kök ekstresi ve yeşil sentezlenen AgNP'lerin FTIR spektrumları karşılaştırıldığında, yeşil sentezlenen AgNP'lerin FTIR spektrumunda Geven yaprak ve kök ekstresi için elde edilen bazı piklerin de gözlendiği ancak bölgelerinin farklı olduğu gözlemlenmiştir.

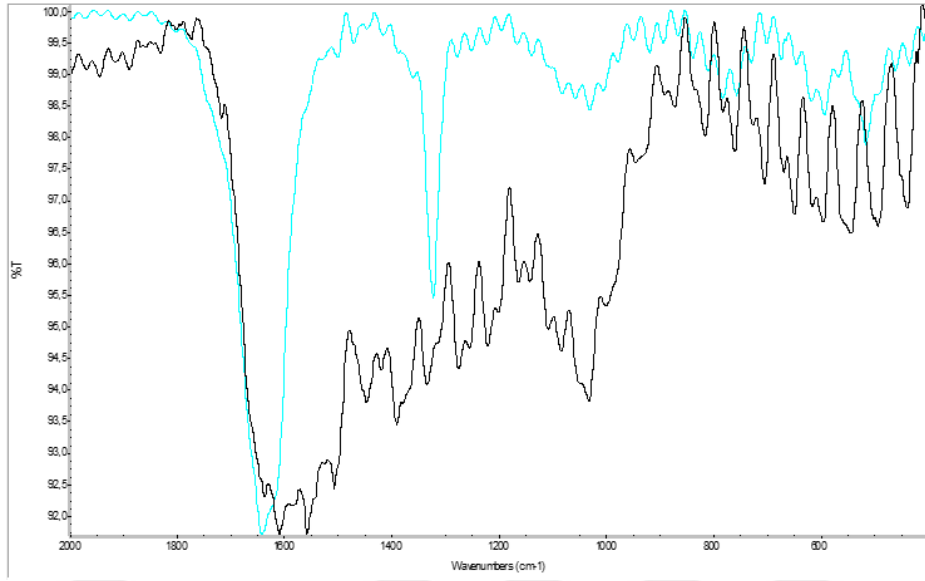
AgNP'lerin FTIR spektrumu, Grafik 9'da gösterildiği gibi Geven yaprak ekstresi spektrumu ile karşılaştırıldığında bazı absorpsiyon tepe noktaları daha yüksek frekans konumlarına kaydırılırken, bazıları daha düşük frekans pozisyonlarına kaydırıldığı gözlenmiştir. Bu

değişiklikler, bu bantlarla ilişkili fonksiyonel grupların, Ag(I) iyonlarının biyoredüksiyonundan ve ortaya çıkan AgNP'lerin stabilizasyonundan sorumlu olduğunu göstermiştir.



Grafik 9: Geven1 ekstrakt ve Geven 1 nanopartikül verilerinin karşılaştırmalı analiz sonuçları

AgNP'lerin FTIR spektrumu Grafik 10'da gösterildiği gibi Geven kök ekstresi spektrumu ile karşılaştırıldığında bazı absorpsiyon tepe noktaları daha yüksek frekans konumlarına kaydırılırken, bazıları daha düşük frekans pozisyonlarına kaydırıldığı gözlenmiştir. Bu değişiklikler, bu bantlarla ilişkili fonksiyonel grupların, Ag(I) iyonlarının biyoredüksiyonundan ve ortaya çıkan AgNP'lerin stabilizasyonundan sorumlu olduğunu göstermiştir.



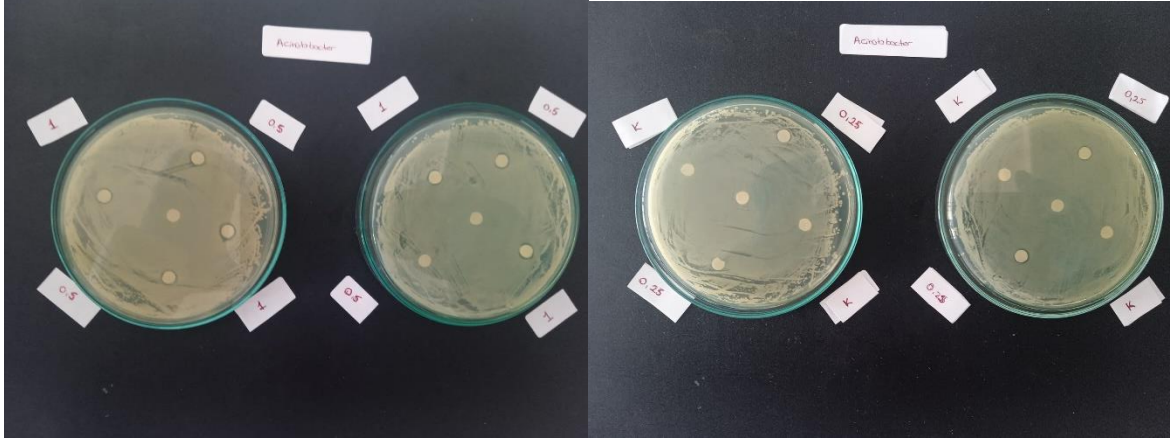
Grafik 10: Geven2 ekstrakt ve Geven2 nanopartikül verilerinin karşılaştırmalı analiz sonuçları

Astragalus yaprak ve köke ait ekstraktlar ile seçilen optimum özelliklerdeki gümüş nanopartiküllerin FTIR analiz sonuçlarının üst üste çakıştırılması sonucu spesifik tepe piklerinin, Ag^+ iyonlarına ait pik görüntülerinin gümüş nanopartiküllere kaydığı ve piklerin daraldığı tayin edilmiş olup, gümüş nanopartiküllerin indirgenme reaksiyonuna bağlı olarak başarılı bir şekilde sentezlendiğini ortaya koymuştur.

3.5 Gümüş Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Test Sonuçları

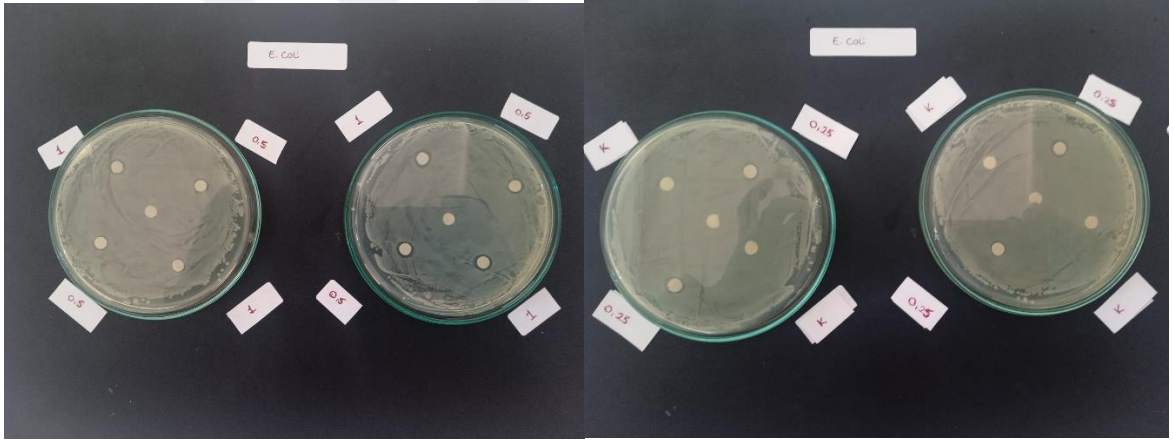
Antimikrobiyal test için disk difüzyon yöntemi kullanılmış olup, çalışma *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus (MRSA)*, *Klebsiella pnömoni*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* olmak üzere 6 farklı mikroorganizma üzerinde yapılmıştır. Kök ve yapraktan ayrı ayrı sentezlenen gümüş nanopartiküllerin 3 farklı konsantrasyonu (1, 0,5 ve 0,25 mg/mL) antimikrobiyal çalışmalar için kullanılmıştır. Gümüş nanopartiküllerin uygulanması sonrası antimikrobiyal etkinlikleri disklerin oluşturduğu zon çaplarının cetvel ile ölçülerek ikili ölçüm sonrası ortalamaları hesaplanarak tayin edilmiştir. 6 farklı mikroorganizma üzerinde Geven 1 ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal test sonuçları aşağıdaki gibidir.

Acineto bacter üzerinde yapılan antimikrobiyal çalışmanın sonuçlarına göre 1 mg/ml konsantrasyonda 7 mm, 0,5 mg/ml de 6,5 mm disk zonu ölçülürken ve 0,25 mg/ml konsantrasyonda ise disk zonu ölçülemedi. Buradan, sadece 1 ve 0,5 mg/ml olan konsantrasyonların az da olsa doza bağlı olarak üremeyi inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır. (Resim 50).



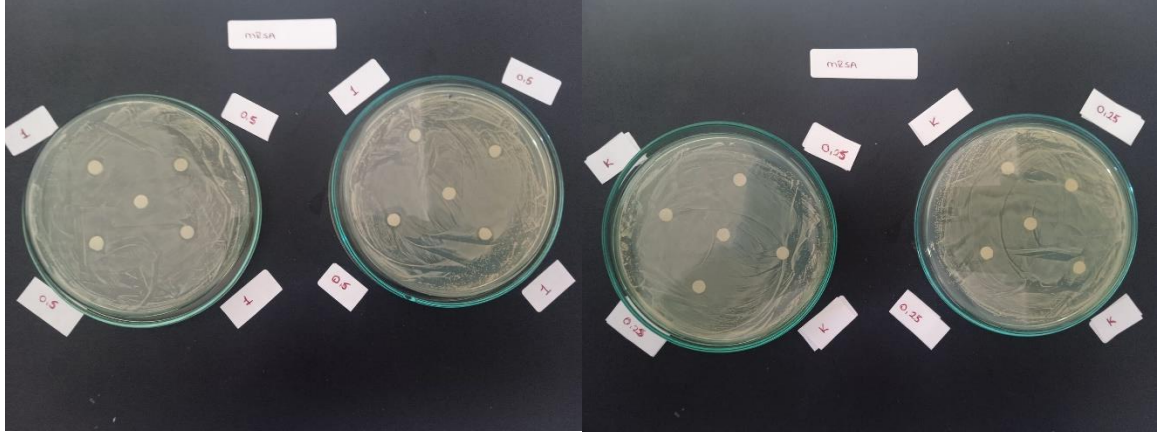
Resim 50: Geven 1 ile sentezlenen nanopartiküllerin Acinetobacter de etkisi

Escherichia coli üzerinde yapılan antimikrobiyal çalışmanın sonuçlarına göre 1 mg/ml konsantrasyonda 9 mm, 0,5 mg/ml konsantrasyonda 8 mm ve 0,25 mg/ml konsantrasyonda ise 7 mm disk zonu ölçülmüştür. Buna göre, nanopartiküllerin doza bağımlı olarak mikroorganizmanın üremesini inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır (Resim 51).



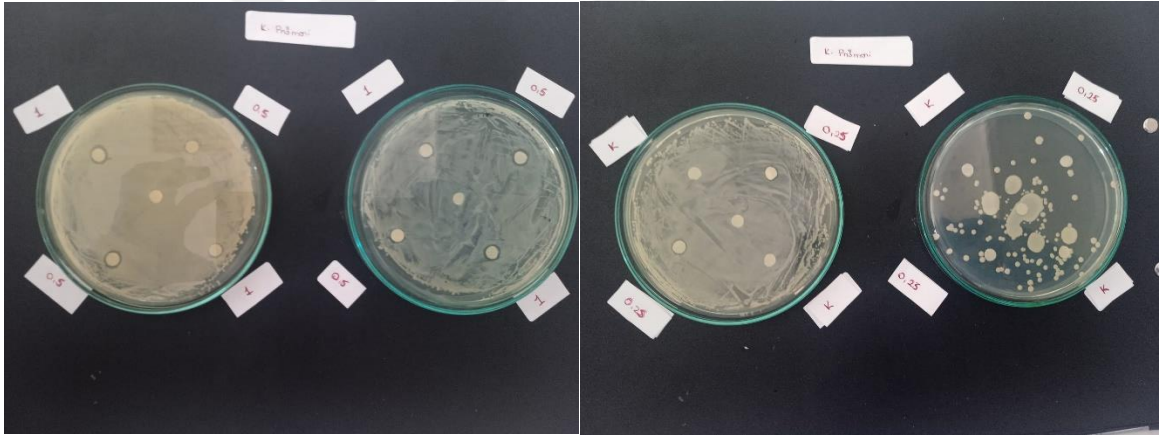
Resim 51: Geven 1 ile sentezlenen nanopartiküllerin Escherichia coli de etkisi

Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus (MRSA) üzerinde yapılan antimikrobiyal çalışmanın sonuçlarına göre sadece bir petride 1 mg/ml konsantrasyonda 8 mm, 0,5 mg/ml konsantrasyonda 7 mm disk zonu ölçülürken, 0,25 mg/ml konsantrasyonda ve paralel petride ise disk zonu ölçülememiştir. Bu sonuca göre örneğin az da olsa mikroorganizma üremesini inhibe ettiği saptanmıştır (Resim 52).



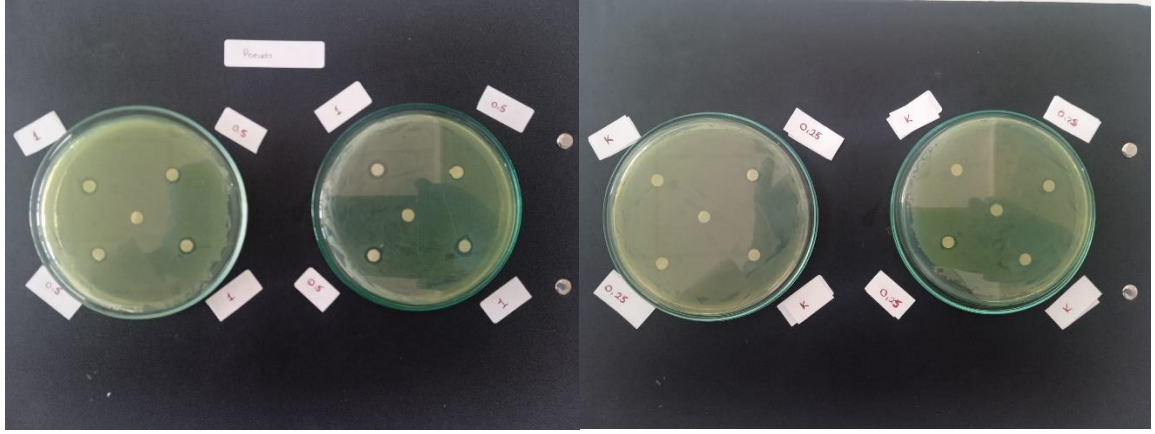
Resim 52: Geven 1 ile sentezlenen nanopartiküllerin Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) da etkisi

Klebsiella pnömoni üzerinde yapılan antimikrobiyal çalışmanın sonuçlarına göre 1 mg/ml konsantrasyonda 8 mm, 0,5 mg/ml konsantrasyonda 7,5 mm ve 0,25 mg/ml konsantrasyonda ise 7 mm disk zonu ölçülmüştür. Buna göre nanopartiküllerin doza bağlı olarak mikroorganizmanın üremesini inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır (Resim 53).



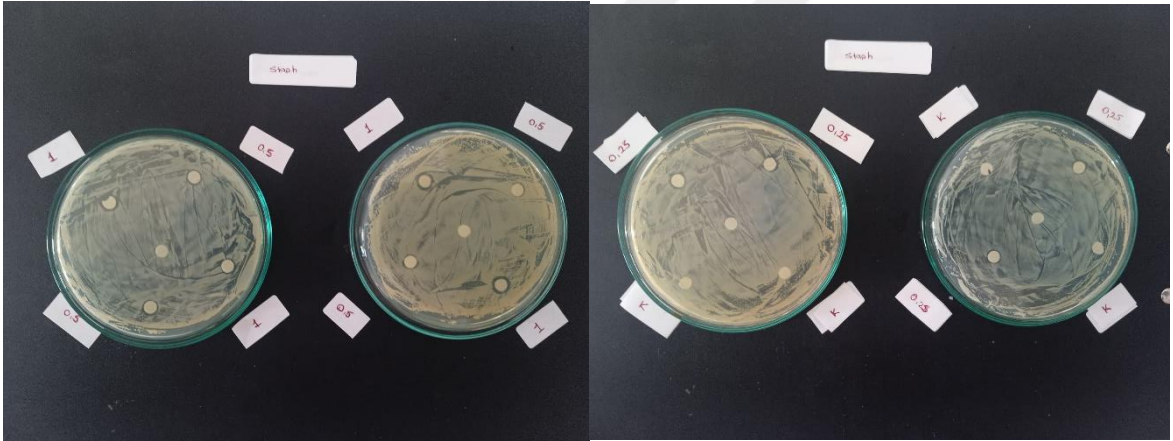
Resim 53: Geven1 ie sentezlenen nanopartiküllerin *Klebsiella pnömoni* de etkisi

Pseudomonas aeruginosa üzerinde yapılan antimikrobiyal çalışmanın sonuçlarına göre 1 mg/ml konsantrasyonda 9 mm, 0,5 mg/ml konsantrasyonda 8,5 mm ve 0,25 mg/ml konsantrasyonda ise 8 mm disk zonu ölçülmüştür. Buna göre nanopartiküllerin doza bağlı olarak mikroorganizmanın üremesini inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır (Resim 54).



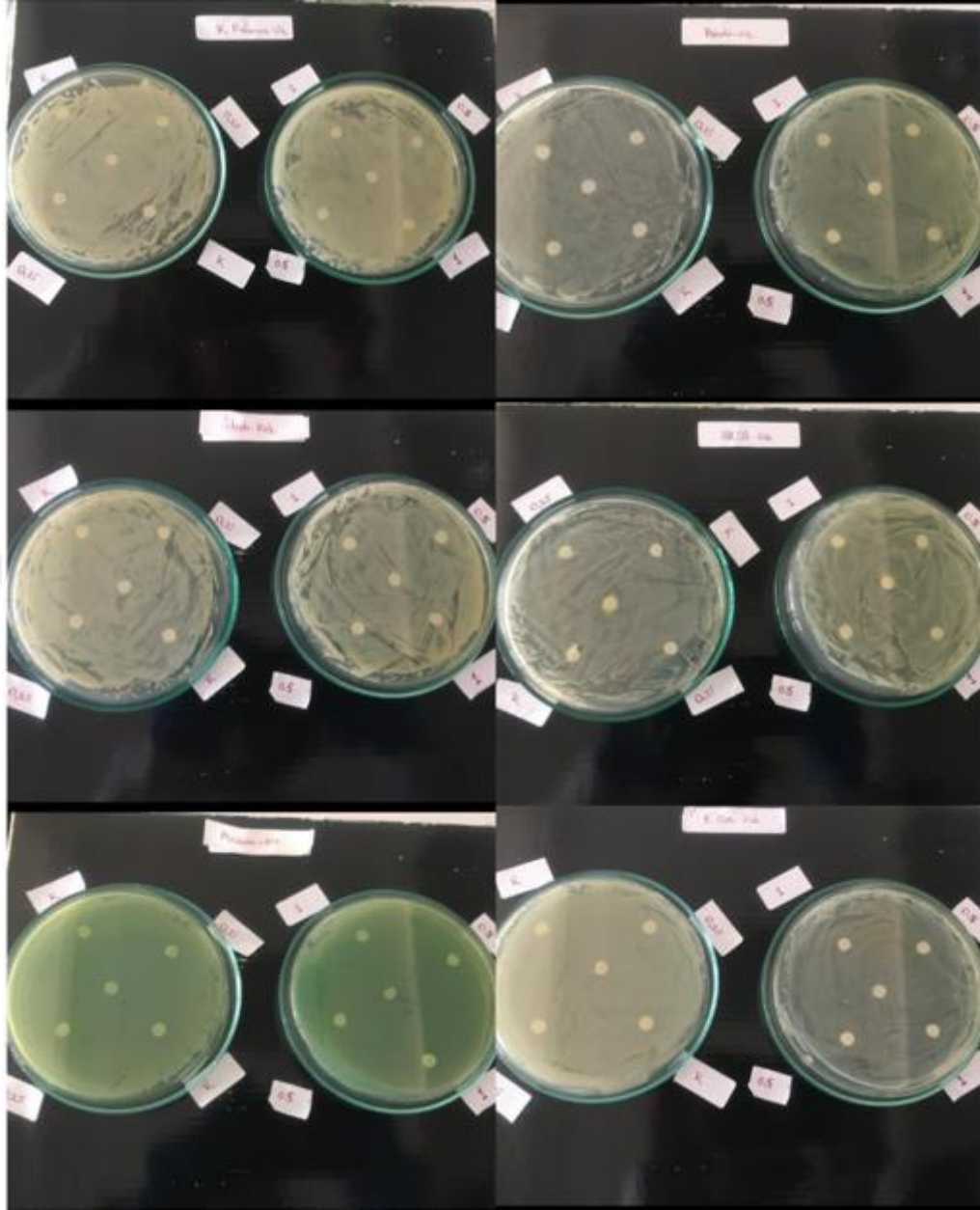
Resim 54:Geven 1 ile sentezlenen nanopartiküllerin *Pseudomonas aeruginosa* da etkisi

Staphylococcus aureus üzerinde yapılan antimikrobiyal çalışmanın sonuçlarına 1 mg/ml konsantrasyonda 8,5 mm, 0,5 mg/ml konsantrasyonda 7 mm ve 0,25 mg/ml konsantrasyonda ise 7 mm disk zonu ölçülmüştür. Buna göre nanopartiküllerin doza bağımlı olarak mikroorganizmanın üremesini inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır (Resim 55).



Resim 55:Geven 1 ile sentezlenen nanopartiküllerin *Staphylococcus aureus* da etkisi

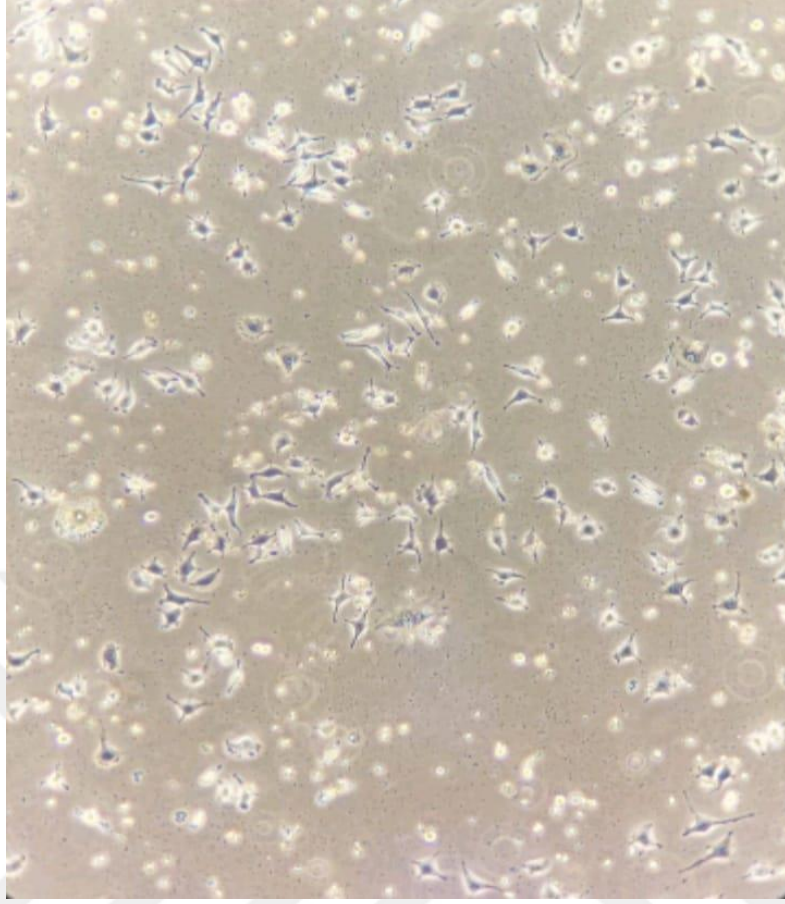
6 farklı mikroorganizma üzerinde Geven 2 ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal test sonuçları incelendiğinde çalışmada hiçbir mikroorganizma üzerinde üremelerini inhibe edici bir etki bulunamamıştır (Resim 56).



Resim 56: Geven 2 gümüş nanopartiküllerinin mikroorganizmalarda antimikrobiyal etkinliği sonucu

3.6 Gümüş Nanopartiküllerin Biyouyumluluk Analiz Sonuçları

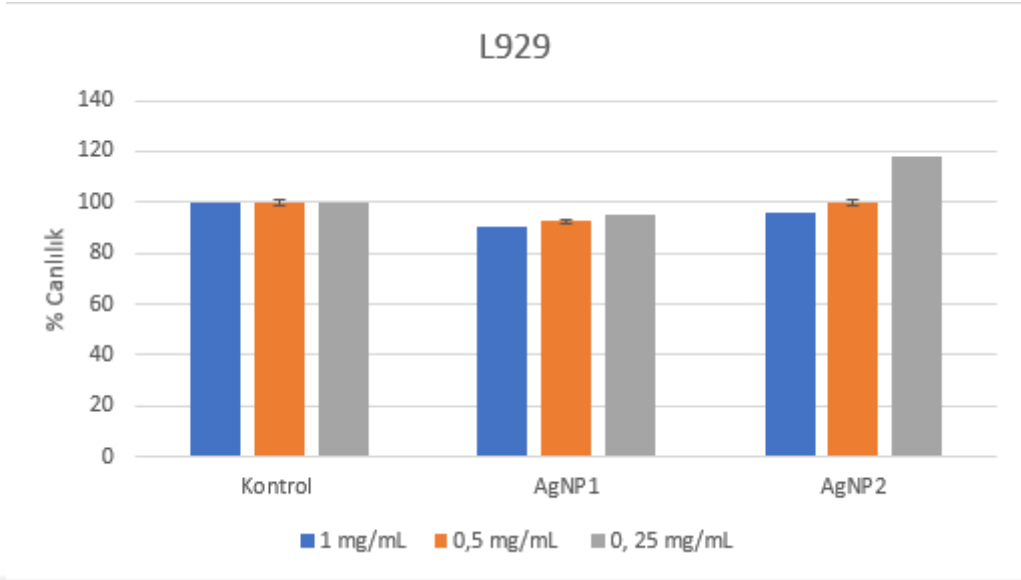
Sentezlenen gümüş nanopartiküllerin canlı hücrelerdeki biyouyumluluğunun tayini için L929 sağlıklı fibroblast hücreleri kullanılmıştır (Resim 57). L929 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen 48 saat sürelik *in vitro* hücre kültürü biyouyumluluk sonuçlarına göre, kök ve yapraktan elde edilen AgNP'lerin tüm konsantrasyonları hücreler üzerinde %90 üzerinde canlılık göstermiş olup, MTT canlılık sonuçları tüm formülasyonların sağlıklı fibroblast hücrelerinde biyouyumlu olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 5, Grafik 11). Ayrıca elde edilen bu sonuçlara göre formülasyonlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark göstermemiştir.



Resim 57: Gümüş nanopartiküllerinin L929 hücrelerindeki etkisinin inverted mikroskop görüntüsü

Tablo 5: Gümüş nanopartiküllerin L929 hücrelerinde 48 saatlik biyoyumluluk analiz sonuç verileri(% olarak ifade edilmiştir).

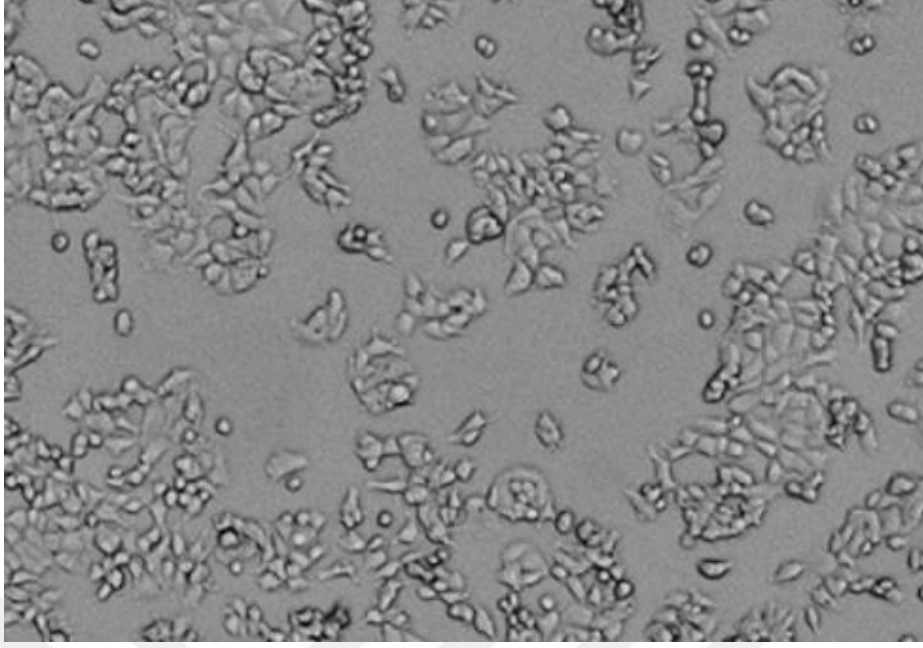
Konsantrasyon			
Formülasyon	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0, 25 mg/mL
Kontrol	100	100	100
AgNP1	90,2±1,3	92,4±1,4	95,2±2,2
AgNP2	96,2±0,3	100±0,4	118±0,1



Grafik 11: L929 hücrelerinde 48 saatlik *in vitro* biyoyumluluk çalışması.

3.7 Gümüş Nanopartiküllerin Antikanser Etkinliğinin Belirlenmesi

Sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antikanser aktivitesi meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücreleri üzerinde çalışılmıştır (Resim 58). MCF-7 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen 48 saat süreli *in vitro* hücre kültürü sonuçlarına göre AgNP1 nanopartikülleri, 1 mg/ml konsantrasyonda %71,8, 0,5 mg/ml konsantrasyonda %78,2 ve 0,25 mg/ml konsantrasyonda ise %82,3 olarak canlılık sergilemiştir. Bu sonuçlara göre nanopartiküllerin doza bağlı olarak artan konsantrasyonlarda hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 6, Grafik 12). Ayrıca bu sonuçlar ile AgNP1 formülasyonlarının 1 mg ve 0,5 mg'lık konsantrasyonları ile kontrol grubu kıyaslandığında anlamlı fark bulunmuştur (* $p < 0,05$).



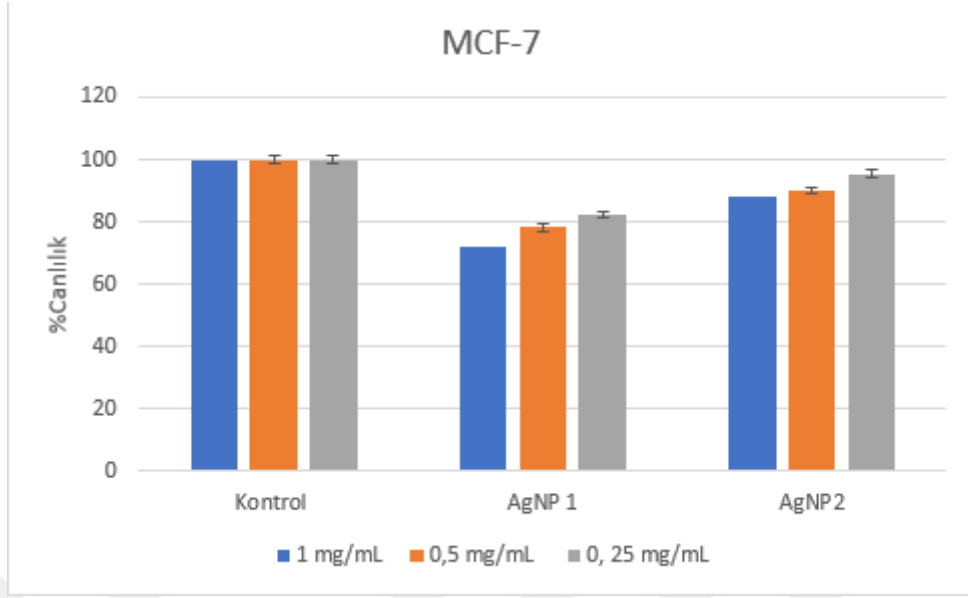
Resim 58: Gümüş nanopartiküllerin MCF-7 hücreleri üzerinde etkisinin Inverted mikroskop görüntüsü

Tablo 6:MCF-7 hücrelerinde 48 saatlik in vitro sitotoksosite sonuçları

Konsantrasyon

Formülasyon	1 mg/mL	0,5 mg/mL	0, 25 mg/mL
Kontrol	100	100	100
AgNP 1	71,8±1,4	78,2±2,0	82,3±2,3
AgNP2	88,2±1,8	90,2±1,6	95,3±2,7

MCF-7 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen in vitro hücre kültürü analiz sonuçlarına göre, doza bağlı olarak canlılıkta azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Yaprak ekstraktlarından elde edilen gümüş nanopartiküllerin meme kanseri hücre hattında en yüksek antikanser etkinlik gösterdiğini ortaya koymuş olup, tezde amaçlanan sonuçlara ulaşıldığı ortaya konulmuştur.



Grafik 12: Gümüş nanopartiküllerinin MCF-7 hücrelerinde 48 saatlik *in vitro* sitotoksosite sonuçları.

4. TARTIŞMA

Astragaluslar, baklagiller (Fabaceae) familyasına ait bir ya da çok yıllık olabilen ancak çoğunlukla odunsu olan bir cinstir. Ülkemizde ise endemik türleri de olmak üzere pek çok türü bulunmaktadır. *Astragalus membranaceus* (Geven) ise Dünyada özellikle Çin tıbbında yüzyıllardır tedavide kullanılan temel bitkilerden birisidir. Bu nedenle birçok çalışmada terapötik etkileri araştırılmıştır.

Son yıllarda çevresel bilincin gelişmesi ile birlikte kimyasal atık madde oluşturmayan, kolay ve güvenilir bir yöntem olan yeşil yöntem ile gümüş nanopartiküllerin sentezi oldukça ilgi çekmektedir. Bu nanopartiküllerin sentezinde çevre dostu ve zararlı kimyasallar kullanılmadığı için tıbbi amaçlı kullanımı yaygındır.

Tek başlarına gümüş ve Astragalus bitkisinin düşük olan biyolojik etkinlikleri sebebiyle bir araya getirilerek biyolojik etkinlikleri çok daha yüksek olan nanomalzemeler üretilmektedir. Böylece bu nanopartiküller kullanılarak pek çok hastalığın tedavisi amaçlanmaktadır.

Bu bilgiler doğrultusunda, tez çalışmamızda kullanımı çok eskiye dayanan gümüş ve tedavi amaçlı kullanılan *Astragalus membranaceus* çevreye zarar vermeyen yeşil sentez yöntemi ile bir araya getirilmiştir. Oral yoldan biyoyararlanımı düşük olan Astragalus bitkisi kullanılarak hem çevreye zarar vermeyen hem de uygun maliyetli olan yeşil sentez ile gümüş nanopartikül sentezi yapılmıştır. Bu şekilde gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu, mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliği tayin edilerek, sağlıklı fibroblast hücreleri üzerinde biyouyumluluğu ve meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinde antikanser etkinliği incelenmiştir. Bu tez çalışması ile literatürde konuya ilişkin var olan açığın kapatılması planlanmış olup, elde edilen sonuçlar ile ilk defa yapılma niteliğinde olan malzemelerin bir araya getirilmesi ile yol gösterici bir kılavuz oluşturulması hedeflenmiştir.

Tez çalışmamızda, soxhlet cihazı ile Astragalus yaprakları ve kökleri kullanılarak başarılı bir şekilde ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen örnekler filtre kağıdı ile süzildükten sonra farklı konsantrasyonlarda (1 M, 5mM ve 3mM) hazırlanan gümüş nitrat ile farklı sürelerde (4, 8 ve 24 saat) karanlık ortamda manyetik karıştırıcıda inkübasyona bırakılarak indirgenme reaksiyonu sonucunda Astragalus kök ve yaprağından gümüş nanopartiküller sentezlenmiştir.

Astragalus kök ve yaprak ekstraktlarından gümüş nanopartiküllerin sentezi sırasında hazırlanan çözeltilerdeki renk değişiklikleri ile fiziksel olarak gümüş nanopartiküllerin varlığı saptanmıştır. Geven1'den sentezlenen gümüş nanopartiküller başlangıçta sarı renkten koyu kahverengi renge dönüşerek nanopartiküllerin sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ve bitki fenolik bileşenlerinin gümüş nitratı başarılı bir şekilde indirgediğini doğrulamıştır. Geven2'den sentezlenen gümüş nanopartikül çözeltisi ise başlangıçta şeffaf renkten açık kahverengine dönüşerek nanopartikül sentezinin başarısı hakkında bilgi vermiştir.

Çalışmamız ile elde edilen sonuçlar literatür ile uyumluluk göstermiştir. Buna göre, Ma ve arkadaşları (2017), *Astragalus membranaceus* ile sentezledikleri gümüş nanopartiküllerin oluşumunu renk değişimine bağlı olarak saptamışlardır (Ma ve ark., 2017). Yine aynı şekilde Kora ve Arunachalam (2012), *Astragalus* ile sentezledikleri gümüş nanopartiküllere ait çözeltinin sentez öncesinde rengi sarı iken sentez sonrasında çözeltinin renginin koyu kahverengine dönüşümü ile gümüş nanopartikül oluşumunu saptamışlardır (Kora ve Arunachalam, 2012).

Nanopartiküller hazırlandıktan sonra sentezlenen nanopartiküllerin oluşumunun tayin edilmesi ve boyut, şekil gibi yapısal özelliklerinin belirlenmesi için UV-spektrofotometre, DLS, SEM ve FT-IR karakterizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmamıza benzer olarak pek çok literatür verisinde *Astragalus* türlerinden sentezlenen gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu için UV- spektrofotometre ve DLS yöntemi kullanıldığı rapor edilmiştir.

Tez çalışmamızda nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılan UV spektrofotometre ile bitkiye özel olan absorbands pikleri taranarak nanopartiküllerin başarılı bir şekilde sentezinin yapıp yapılmadığı tayin edilmiştir. UV-spektrofotometre sonuçlarına göre Geven1'den gümüş nitratin tüm konsantrasyonları ile sentezlenen AgNP'lerin, spektrofotometrede yaklaşık 450 nm'de maksimum absorbands piki verdiği belirlenmiştir. Askari ve arkadaşları (2020)' nın *Astragalus verus* ile yaptığı araştırma sonuçlarına göre yeşil sentez ile üretilen gümüş nanopartiküllerin UV spektrofotometrede maksimum absorbands değeri yaklaşık 450 nm olarak bulunmuştur (Askari ve ark., 2020). Ma ve arkadaşları (2017), tarafından yapılan benzer bir çalışmaya göre *Astragalus membranaceus* kökünden elde edilen gümüş nanopartiküllerin UV spektrofotometredeki maksimum absorbands değeri 445 nm olarak tayin edilmiştir (Ma ve ark., 2017). Kora ve Arunachalam, *Astragalus gummifer* ile hazırladıkları nanopartiküllerin UV spektrofotometrede en yüksek absorbands değerini 450 nm'de saptamıştır (Kora ve Arunachalam, 2012).

Bu sonuçlar referans alınan çalışmalar ile tez çalışmamıza ait sonuçların benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

Çalışmamızda Geven2'den sentezlenen AgNP'lerin ise spektrofotometrede yaklaşık 290 nm'de maksimum absorbands piki vermiştir. Hatipoğlu ve arkadaşları (2022), tarafından yapılan çalışmaya göre *S. cerevisiae*' den sentez edilen gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılan UV spektrofotometre sonuçları en yüksek absorbands değerinin yaklaşık 250 nm' de tayin edildiğini belirtmiş olup, çalışma sonuçlarımızla benzerlik göstermiştir (Hatipoğlu, 2022). Ancak bunun dışında, literatürde benzer dalga boyunda pik tayin edilen güncel bir çalışmaya rastlanmaması bizi gümüş nanopartiküllerin sentezinin başarılı olup olmadığının sonraki karakterizasyon testleri ile belirlenmesine yönlendirmiştir.

Ancak tez çalışmamızdaki UV spektrofotometrik sonuçlar ışığında, Geven1 ekstraktından başarılı bir şekilde gümüş nanopartiküllerin sentezlendiği 450 nm’de maksimum absorbans piki ile tayin edilmiştir.

Geven1’den elde edilen gümüş nanopartiküllerinin boyut, zeta potansiyel ve PDI değerlerinin kullanılan gümüş nitrat konsantrasyonu ve reaksiyon süresi ile değiştiği gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Geven1’den elde edilen gümüş nanopartiküllerin yaklaşık olarak boyutu 100 nm, zeta potansiyeli -22 mV ve PDI değeri ise 0,2 olarak ölçülürken, Geven2’den elde edilen gümüş nanopartiküllerin yaklaşık olarak boyutu 85 nm, zeta potansiyeli -24 mV ve PDI ise 0,2 olarak tayin edilmiştir. Diğer bir karakterizasyon yöntemi olan SEM analizi, nanopartiküllerin boyut ve morfolojisi hakkında bilgi vermektedir. SEM analizi ile elde edilen sonuçlara göre Geven1 kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin boyutu yaklaşık 55 nm, morfolojileri ise küresel agregatlar ve kare şeklindedir. Geven2 ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerin SEM sonuçlarına göre ise partiküllerin boyutları yaklaşık 14 nm ve morfolojilerinin ise küresel agregatlar şeklinde olduğu tayin edilmiştir. Literatür bilgisi ışığında, Ma ve arkadaşları (2017) tarafından yapılan çalışma ile *Astragalus* kökünden sentezlenen gümüş nanopartiküllerin SEM analizine göre, AgNP’lerin boyutu 65 nm, PDI’sı 0,2 ve zeta potansiyeli ise -32,6 mV olarak tayin edilmiştir (Ma ve ark., 2017). Kora ve Arunachalam (2012)’ın *Astragalus gummifer* ile sentezledikleri gümüş nanopartiküllerin boyut karakterizasyonu için kullanılan SEM analizi ile elde edilen sonuçlara göre ise partikül boyutları yaklaşık 14 nm olarak saptanmıştır (Kora ve Arunachalam, 2012). Böylece literatür taraması sonucu elde edilen verilerin, çalışmamızı destekler nitelikte olduğu tayin edilmiştir.

Ayrıca, Geven1 AgNP’lerin zetasizer ile yaklaşık 100 nm boyuta sahip olduğu saptanırken, SEM’de aynı örneğin boyutu 55 nm olarak ölçülmüş, aynı şekilde Geven2 AgNP’sinin ise zetasizer ile partikül boyutu yaklaşık 85 nm iken SEM’e göre boyut analizinde yaklaşık 14 nm olarak ölçülmüştür. Bunun nedeni DLS ile gümüş nanopartiküllerin hidrodinamik çapı ölçülerek nanopartiküllerin boyut analizi yapılırken, taramalı elektron mikroskopunda nanopartiküllerin bulunduğu solvent uçurularak gümüş nanopartiküllerin çekirdek çapı ölçülerek boyut analizi yapılmaktadır. Diğer bir ifade ile, DLS ile yapılan analizlerde hidrodinamik çapa solvent molekül tabakası da dahil edildiği için SEM’e göre daha büyük ölçülmektedir. Bu durum ölçüm yöntem farklılığından dolayı normal kabul edilmektedir (Ünal, 2019).

Çalışmada diğer bir karakterizasyon yöntemi olarak gümüş nanopartiküllerinin oluşumunu doğrulamak adına FT-IR analiz yöntemi kullanılmıştır. FT-IR, sentezlenen gümüş nanopartiküllerin ve ekstrakta bulunan biyomoleküllerin fonksiyonel gruplarının tayini için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem ile bitki ekstraktı ve ekstraktan sentezlenen gümüş nanopartiküller kullanılarak gümüşün indirgenmesinden sorumlu fonksiyonel gruplar tayin edilir. Pek çok araştırmada gümüş nanopartiküllerin varlığını karakterize etmek için FT-IR yönteminin kullanıldığı rapor edilmektedir.

FT-IR ile analiz edilen maddelerin verdiği spektrumlarda her bir absorpsiyon tepe noktası başka bir fonksiyonel grubun karakteristik özelliklerini vermektedir. Buna göre 3435 cm^{-1} bulunan pik O-H gruplarının esneme titreşiminden, 2926 ve 2856 cm^{-1} 'deki pikler sırasıyla metilen gruplarının gerilme titreşimlerinden, 1740 cm^{-1} 'deki keskin pik aldehit, keton ve karbonik asitlerdeki karbonil gruplarının gerilme titreşimlerinden, 1258 cm^{-1} ile 1040 cm^{-1} arasında bulunan piklerin sırasıyla poliollerin, eterin ve alkol gruplarının C-H titreşimlerinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Kora ve Arunachalam, 2012). IR spektrumunda 3600 - 1200 cm^{-1} arasını kapsayan bölge fonksiyonel grup bölgesi, 1200 - 600 cm^{-1} arasını kapsayan bölge ise küçük yapısal değişiklikleri veren parmak izi bölgesi olarak bilinmektedir. AgNP'lerin sentezi için kullanılan bitki ekstraktlarının içerdiği biyomoleküller, metal iyonları sentez süresince indirgeyici, kapaklama ajanı ve stabilizatör olarak önemli rol oynamaktadır. Sentezlenen nanopartiküllerde bu biyomoleküllerin fonksiyonel grupları iç kısımda veya yüzeyde bağlı kalmaktadır. Hem nanopartikülün yapısal özelliklerini, hem de bu biyomoleküllerin özelliklerini tanımlamak, fonksiyonel grupları incelemek amacıyla FTIR spektroskopisi kullanılmıştır (Kütük,2019).

Tez çalışmamızda FTIR cihazı kullanılarak gümüş nanopartiküllerin 400 cm^{-1} ve 4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında KBr yöntemi kullanılarak IR absorpsiyon spektrumları ölçülmüştür. Bunun için kök ve yapraktan elde edilen ekstrakt ve bu ekstraktlardan sentezlenen gümüş nanopartiküller santrifüj edildikten sonra kalan pellet kurutularak FT-IR çalışması için kullanılmıştır. Çalışmamızda FT-IR spektrum sonuçlarına göre Geven1 ekstraktı için sırasıyla 1615 , 1433 , 1078 , 1031 , 815 ve 615 cm^{-1} 'de absorbands pikleri gözlemlenirken; Geven1 AgNP'leri ise sırasıyla 1609 , 1436 , 1053 , 1010 , 839 ve 616 cm^{-1} 'de pikler gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak 1078 cm^{-1} deki titreşim C-O-H titreşimleri ile, 1030 ve 1053 cm^{-1} deki titreşimler C-O-C titreşimleri ile, 1615 ve 1609 cm^{-1} deki titreşimler C=O titreşimleriyle ilişkilidir. Geven1 ekstraktında sırasıyla 1615 , 1078 ve 1031 cm^{-1} Geven1 NP'lerinde 1609 , 1053 ve 1010 cm^{-1} olarak spektrumlarında azalma olduğu gözlemlenirken, diğer ekstrakta 1433 , 815 ve 615 cm^{-1} olan ancak Geven1 NP'lerinde 1436 , 839 ve 616 cm^{-1} spektrumlarında çok az artmalar meydana geldiği bulunmuştur. Ortaya çıkan bu farklılıkların Ag iyonunun biyoredüksiyonu ile ilişkili olabileceği saptanmıştır.

Yine FT-IR sonuçlarına göre Geven2 ekstraktında sırasıyla 1801 , 1470 , 1322 , 1032 , 837 ve 515 cm^{-1} de absorbands pikleri gözlemlenirken Geven2 NP'lerinde sırasıyla 1716 , 1456 , 1333 , 1084 , 815 ve 495 cm^{-1} de absorbands pikleri gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara göre ekstrakta ölçülen 1801 , 1470 ve 515 cm^{-1} NP sentezlendikten sonra 1716 , 1456 ve 495 cm^{-1} spektrumlarında absorbands piki verirken 1322 ve 1032 cm^{-1} spektrumların yerleri değişerek 1333 ve 1084 cm^{-1} konumlarında absorbands piki verdiği gözlemlenmiştir. Ekstrakt ve NP spektrumları arasında oluşan bu artan ve azalan lokasyon değişikliklerinin Ag iyonunun biyoredüksiyonu ile ilişkili olabileceği saptanmıştır.

Askari ve arkadaşları (2020)'nın yaptıkları çalışmaya göre, *Astragalus verus*'dan yeşil sentez ile hazırlanan gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonunda FT-IR spektropisi kullanmışlardır. Yapılan FT-IR çalışmasına göre AgNP'lerin FT-IR spektrumunda, 1030, 1080, 1150, 1370, 1616, 2930 ve 3333 cm^{-1} 'de gözlemlenen absorpsiyon bantları, numune yüzeyinde çeşitli fonksiyonel grupların varlığını açıkça göstermektedir. 1030 ve 1150 cm^{-1} 'deki zirveler, C–O–C titreşimlerine bağlanır. 1080 cm^{-1} 'deki zirve, C–O–H titreşimleriyle ilişkilidir. 1370 ve 2930 cm^{-1} 'deki bantlar, CH_3 ve CH_2 gruplarının titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. 1616 ve 3333 cm^{-1} 'deki pikler, sırasıyla C = O ve O–H titreşimleriyle ilişkilidir. *A. verus Oliver* ve AgNP spektrumlarının pik yoğunluklarında küçük farklılıklar gözlenirken, pik konumlarında önemli bir değişiklik bulunmadığı bildirilmiştir (Askari ve ark., 2020).

Benzer bir çalışmada, Sharifi-Rad ve arkadaşları (2020)'nın *Astragalus tribulodies* kök ekstraktının FT-IR spekturumunda absorpsiyon tepe noktalarına göre 3476, 2924, 2334, 2209, 1605, 1524, 1410, 1085 ve 698 cm^{-1} karakteristik absorbands spektrumu verdiği rapor edilmiştir. Bu verilere dayanarak, sentezlenen AgNP'lerin, *A. tribuloides*'in ikincil metabolitleri (fenolik ve flavonoid bileşikler) ile kaplandığını doğrulamıştır. *A. tribuloides* kök ekstresi ve yeşil sentezlenen AgNP'lerin FTIR spektrumları karşılaştırıldığında, yeşil sentezlenen AgNP'lerin FTIR spektrumunda *A. tribuloides* kök ekstresi için elde edilen bazı piklerin de gözlemlendiği ancak bölgelerinin farklı olduğu gözlemlenmiştir. AgNP'lerin FTIR spektrumunda *A. tribuloides* kök ekstresi spektrumunda 3476, 2334, 1605 ve 1085 cm^{-1} 'de kaydedilen absorpsiyon tepe noktaları daha yüksek frekans konumlarına kaydırılırken, 2924, 1524, 1410, ve 698 cm^{-1} daha düşük frekans pozisyonlarına kaydırılmıştır. Bu değişiklikler, bu bantlarla ilişkili fonksiyonel grupların Ag(I) iyonlarının biyoredüksiyonundan ve ortaya çıkan AgNP'lerin stabilizasyonundan sorumlu olduğunu göstermiştir (Sharifi- Rad ve ark., 2020).

Yine benzer olarak Kora ve Arunachalam'ın *Astragalus gummifer* ile yaptıkları çalışmada hem ekstraktın hem de sentezlenen gümüş nanopartikülün karakterizasyonu için FT-IR spektrofotometrik yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan *Astragalus* ekstraktın spektrumunda bulunan ana absorbands bantları sırasıyla 3435, 2926, 2856, 2150, 1740, 1626, 1429, 1379, 1258, 1153, 1076 ve 1040 cm^{-1} olarak belirlendi. 3435 cm^{-1} 'de gözlemlenen geniş bant, O-H gruplarının esneme titreşimlerine denk gelirken, 2926 ve 2856 cm^{-1} 'deki bantlar sırasıyla metilen gruplarının asimetrik ve simetrik gerilme titreşimlerine karşılık gelir. 2150 cm^{-1} 'deki geniş bant, ekstrakta bulunan çeşitli karbonil türlerinden kaynaklanır. 1740 cm^{-1} 'deki keskin pik, aldehitler, ketonlar ve karboksilik asitlerdeki karbonil gerilme titreşimlerine denk gelmektedir. 1626 cm^{-1} 'de bulunan daha güçlü bant, karboksilat grubunun karakteristik asimetrik gerilmesine denk gelmektedir. Karboksilat grubunun simetrik gerilmesi, 1429 ve 1379 cm^{-1} 'de bulunan bantlara bağlanabilir. 1258 ve 1153'teki zirveler; 1076 ve 1040 cm^{-1} , sırasıyla poliollerin, eterin ve alkol gruplarının C–O gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Liyofilizasyon ile kurutulmuş nanopartiküllerin spektrumu ise sırasıyla 3435, 2922, 2856, 2071, 1726, 1630, 1452, 1375, 1261, 1163 ve 1028 cm^{-1} 'de karakteristik absorbands bantları göstermiştir. Nanoparçacıkların IR spektrumunda, absorbands piklerinde

küçük (1626 ila 1630 cm^{-1} ve 1379 ila 1375 cm^{-1}) ve büyük (1429 ila 1452 cm^{-1}) kaymalar gözlenmiş ve bu da gümüşün bağlanmasını düşündürmüştür. Nanoparçacıkların, FTIR spektrumlarında çeşitli karbonil gruplarına (2150 ila 2071 ve 1740 ila 1726 cm^{-1}) karşılık gelen geniş bir bant kayması gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca poliollerde (1258'den 1261 cm^{-1} 'e ve 1153'ten 1163 cm^{-1} 'e) ve alkollü gruplarda (1040'tan 1028 cm^{-1} 'e) de bir kayma gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, gümüş iyonlarının indirgenmesinin hidroksil ve karbonil gruplarının oksidasyonuna bağlı olduğunu doğrulamaktadır. Bu bant kaymalarına dayanarak, ekstraktın hem hidroksil hem de karbonil gruplarının gümüş nanopartiküllerin sentezinde yer aldığı sonucuna varılabilir (Kora ve arunachalam, 2012).

Tüm çalışmalar göz önüne alındığında çalışmamızda kullandığımız *Astragalus* kök ve yaprağından elde edilen ekstrakt ve bu ekstraktlardan sentezlenen gümüş nanopartiküllerin FT-IR analiz sonuçlarının literatür ile benzer olduğu ortaya konulmuştur. Spesifik noktalardaki bant kaymalarının ve pik şiddetlerindeki değişimlerin bitki yapısında var olan ve indirgeyici ajan olarak gümüş nanopartiküllerin oluşumunda reaksiyona giren gruplar sebebiyle olduğu doğrulanmıştır. Ancak benzer çalışmalardaki sonuçlara ilaveten çalışmamızdaki sonuçlarda ekstra absorbans spektrumları gözlemlenmiştir. Bunun muhtemel nedeni nanopartikül sentezi esnasında oluşan veya ekstraktta bulunan ek maddelerden kaynaklı olabilmektedir. Gümüş nanopartiküllerin sentezi sonrası madde kaybı yaşamamak adına filtreden süzülmeyle kurutma işleminin yapılmasından kaynaklı olabileceği öngörülmüştür. Bu nedenle de örnek çözeltisi içerisinde kalan ve indirgeme reaksiyonuna katılmayan ek fenolik bileşiklerin ekstra piklere neden olduğu düşünülmektedir.

Tez çalışmamızda antimikrobiyal aktivite tayini, disk difüzyon yöntemi ile *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus (MRSA)*, *Klebsiella pnömoni*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* olmak üzere 6 farklı mikroorganizma kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen nanopartiküllerden 1 mg/mL, 0,5 mg/mL ve 0,25 mg/mL olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda örnekler hazırlanmış ve antimikrobiyal çalışmalar için kullanılmıştır. Geven 1'den sentezlenen gümüş nanopartiküller ile yapılan antimikrobiyal etkinlik analiz sonuçlarına göre konsantrasyonların tüm mikroorganizmalarda üremeyi doza bağlı olarak inhibe ettiği saptanmıştır. Ancak Geven2'den sentezlenen AgNP'ler ile yapılan antimikrobiyal etkinlik analizine göre ise mikroorganizmaların hiçbir etki oluşturmadığı tayin edilmiştir. Kora ve Arunachalam(2012)'ın gerçekleştirdikleri antimikrobiyal test sonuçlarına göre, tez çalışmamız ile benzer mikroorganizmalar üzerinde yapılan analiz sonuçları, disk difüzyon yönteminde disklerin zon çaplarının mikroorganizmaların türüne bağlı olarak 5,5 ile 11,5 mm arasında ölçülerek çalışmamız ile benzerlik gösterdiği tayin edilmiştir (Kora ve Arunachalam, 2012).

Ma ve arkadaşları (2017)'nın yaptıkları çalışmada *Astragalus membranaceus* kökünden elde edilen ekstrakt ile ekstrakttan sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitesine bakılmıştır. Tez çalışmamız ile benzer mikroorganizmaların kullanıldığı bu

çalışmada doza bağlı olarak mikroorganizmaların üremesinin inhibe edildiği rapor edilmiştir. Çalışmada sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivite sonucuna göre, gram negatif suşların gram pozitif suşlara göre daha duyarlı oldukları rapor edilmiştir. Sentezlenen AgNP'lerin antibakteriyel etkisinin temel olarak bakterilerde bulunan hücre zarının yapı elemanlarıyla etkileşimine bağlı olarak gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı farklı antibakteriyel etkinliği ile ilişkilendirilmiştir. Gram pozitif bakteriler kalın bir peptidoglikan tabakaya sahipken gram negatif bakterilerin peptidoglikan tabakaları çok daha ince olup, Ag iyonlarının penetrasyonu için daha kolay olan fosfolipidler ve lipopolisakkaritleri içeren bir dış zardan oluşmaktadır. Öte yandan AgNP'lerden salınan gümüş katyonlar, gram negatif bakterilerin negatif yüklü hücre duvarına bağlanma eğilimindedir, bu da zar deformasyonuna, zar hasarına, sitoplazmik zardan kontrolsüz taşınmaya ve bakterilerin tamamen ölümüne neden olabilmektedir (Ma ve ark., 2017). Bu bilgiler ışığında, çalışma sonuçlarımız literatürü destekler niteliktedir. Buna göre, Geven 1'den elde edilen gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitesi her ne kadar tüm mikroorganizmalarda doza bağlı olarak bakterisidal etki gösterse de, Gram negatif bakteriler grubunda olan *Pseudomonas aeruginosa* ve *E.coli* üzerinde daha yüksek zon çapı oluşturmaya bağlı olarak daha etkin bulunmuştur.

Benzer şekilde, Askari ve arkadaşları (2022), *Astragalus verus*'dan yeşil sentez ile hazırladıkları gümüş nanopartiküllerin bakteriler üzerinde zamana bağlı bakterisidal etkisini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre *E. coli*, *Sh. flexneri*, *B. cereus*, and *S. aureus* bakterilerinde sırasıyla 2,1,6 ve 4. saatlerde bakteriler üzerinde bakterisidal etki gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca gram negatif bakteriler üzerinde daha yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği böylece iyi bir antibakteriyel ajan olarak kullanılabileceği saptanmıştır (Askari ve ark., 2022).

Antibakteriyel çalışmalarda, sentezlenen gümüş nanopartiküllerin konsantrasyonu, boyutu, şekli ve bakteri türü bakterilerin inaktivasyonunda etkilidir. Literatüre göre, üçgen, çubuk şeklinde ve küresel şekle sahip nanopartiküllerin en fazla toksisiteye sahip oldukları belirtilmiştir. Toksisitede yüzey yükü ve şeklinin yanı sıra partikül boyutu da önemli rol oynar. Buna göre daha küçük gümüş nanopartiküller büyük partiküllere kıyasla daha fazla gümüş iyonu salınımı yapar. Azalan nanopartikül boyutu ile bakterilerin hücre duvarındaki nanopartikül penetrasyonunu arttırabilir ve böylece daha yüksek antibakteriyel aktivite gösterebilirler (Özeşer, 2023).

Tüm bu bilgilerden yola çıkarak *Astragalus* yapraklarından (Geven1) sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitesinin gram pozitif ve gram negatif bakteri tiplerinde doza bağımlı olarak bakterilerin büyümesini inhibe ettiği bulunmakla birlikte, sonuçlar *Pseudomonas* ve *E.coli* gibi gram negatif bakteriler üzerindeki aktivitesinin gram pozitiflere kıyasla daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Bunun nedeni gram negatif bakterilerin hücre duvarı çok daha ince olup, Ag iyonlarının penetrasyonu için daha kolay olan fosfolipidler ve lipopolisakkaritleri içeren bir dış zardan oluşması ile ilişkilendirilebilir. Ancak

Astragalus'un kökünden (Geven2) sentezlenen gümüş nanopartiküller ise literatüre göre antimikrobiyal aktivite için iyi bir inhibe edici ajan olarak kullanılabilirken, tez çalışmamızda hiçbir bakteri türüne karşı inhibe edici etki göstermediği bulunmuştur. Bunun nedeni Geven2'den gümüş nanopartikül sentezlenirken kök ekstresinin konsantrasyonun yaprak konsantrasyonuna oranla az olmasına bağlı olabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle gümüş iyonlarını indirgeyecek bitki kökünden gelecek biyomoleküllerin miktarı az olduğu için istenen özelliklerde gümüş nanopartikül sentezi gerçekleşmemiş olabileceğini düşündürmüştür.

Antimikrobiyal etkinlik sonuçlarımız özellikle gram negatif bakterilerde artan antibiyotik direncine karşı Geven1 ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerin umut vaat edici ajanlar olabileceğini ortaya koymaktadır.

Yukarıda da ifade edildiği üzere Astragalus bitkisinin ekstraksiyonu ve bu ekstraksiyondan yeşil sentez yöntemi ile elde edilen gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal etkinliğine dair pek çok çalışma bulunmasına rağmen, literatürde aynı bitkiden elde edilen gümüş nanopartiküllerin antikanser etkinliğine dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürdeki *in vitro* hücre kültürü çalışmaları sadece Astragalus bitkisinin çeşitli explantlarına (kök, gövde, yaprak) ait ekstraktların antikanser etkinliğine yöneliktir. Bu sebeple de tez çalışmamız özgün bir değere sahiptir. Örneğin, Liu ve arkadaşları (2019). *Astragalus membranaceus* (APS) ekstraktının üçlü negatif meme kanseri (TNBC) üzerine antikanser ve antiproliferatif etkilerini incelemişlerdir. Hücreler, 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca sırasıyla 0, 0.25, 0.5, 1 ve 2 mg/mL konsantrasyonlarda APS ile inkübe edilmiştir. Sonuçlar proliferatif inhibisyon etkisinin konsantrasyona bağlı olduğunu ortaya koymuştur (Liu ve ark., 2019). Başka bir araştırmada, *Astragalus spp.* türlerinden elde edilen ekstraktların akciğer kanseri ve beyin glioma hücre hatlarında, hücre büyümesini doza bağlı bir şekilde engellediğini ortaya koymuştur. Ayrıca, artan maruz kalma süresi, kanser hücrelerinde hücre büyümesinde önemli bir inhibisyon ile sonuçlanmıştır. İlgili *Astragalus spp.* türleri, kanser hücrelerinin büyüme ve çoğalmasında *in vitro* koşullar altında önemli ölçüde azaltma potansiyeline sahip, antikanser bir ajan niteliği taşımaktadır. MTT analizlerine göre, bitki özütleri doz ve zamana bağlı olarak kanserli hücrelerde hücre büyümesini ve canlılığını azaltmıştır. *A. elongatus* subsp. *nucleiferus* WILLD bitkisine ait toprak altı su özütü, hücre canlılığını en yüksek oranda H1299 hücre hattına karşı azaltırken, bunu sırası ile %28 ve %35 hücre canlılığıyla A549 ve C6 hücre hatları takip etmektedir. Bitkinin toprak üstü aksamından etanol ile elde edilen özüt ise; hücre canlılığı üzerinde en az etkin olan özüt olarak belirlenmiştir (Tanrıöver, 2019).

Bu verilerden yola çıkarak tez çalışmamızda L929 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* hücre kültürü biyoyumluluk sonuçlarına göre, kök ve yapraktan elde edilen gümüş nanopartikülleri tüm konsantrasyonlarda % 90 üzerinde canlılık göstermiştir. Elde edilen MTT canlılık sonuçları tüm formülasyonların sağlıklı fibroblast hücrelerinde biyoyumlu olduğunu ortaya koymuştur.

Tez çalışmamızda MCF-7 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen *in vitro* hücre kültürü analiz sonuçlarına göre, doza bağlı olarak canlılıkta azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Yaprak ekstraktlarından elde edilen gümüş nanopartiküllerinin meme kanseri hücre hattında %71 canlılık oranıyla en yüksek antikanser etkinlik gösterdiği ortaya konulmuştur.

Zhou ve arkadaşları *Astragalus membranaceus* (AM) ekstraktı ile tedavi edilen meme kanseri hücrelerinde, hücre büyümesini inhibe eden ve apoptozu teşvik eden mekanizmaları araştırmak için PI3K/Akt/mTOR sinyal yollarını izlemişlerdir. PI3K/Akt/mTOR, hücre proliferasyonu, büyümesi, göçü, metabolizması ve apoptozunda anahtar rol oynayan önemli bir hücre içi sinyal yolu yoludur. PI3K/Akt/mTOR yolunun anormal aktivasyonu, meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde bulunur. Bu çalışmanın sonucuna göre PI3K/Akt/mTOR yolunu hedeflemenin meme kanseri tedavisi için umut verici bir yaklaşım olduğu sonucuna varılmıştır. Apoptozu yöneten mTOR sinyal yolu, çalışmamız AM ekstresi tarafından PI3K/Akt/mTOR yolunun inhibisyonunun meme kanseri hücrelerinin apoptozunu arttırdığını göstermiştir. Bu sonuçlar, meme kanseri hücrelerinin apoptozu ile indüklenen AM ekstraktının, PI3K sinyal yolunun inhibisyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, AM ekstraktının meme kanseri hücrelerini apoptozu yalnızca PI3K/Akt/mTOR sinyal yolu yoluyla mı yoksa başka yollarla mı indüklediği belirsizdir. (Zhou ve ark., 2018).

Yukarıda belirtilen çalışmalara dayanarak *Astragalus* kökünden sentezlenen ekstraktın meme kanseride dahil olmak üzere çeşitli kanser hücreleri üzerinde toksik etki gösterdiği saptanmıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak *Astragalus* içerisinde bulunan biyomaddelerin kanser ile mücadelede önemli rol oynayan PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunu inhibe ederek etki ettiğini göstermişlerdir. Ancak yapılan *in-vivo* çalışmalar az olmakla birlikte meme kanseri hücrelerini yalnızca PI3K/Akt/mTOR sinyal yolu ile mi yoksa farklı sinyal yollarını indükleyerek mi etki ettiğini hala tam olarak ortaya konulamamıştır.

Tüm bu sonuçlar ele alındığında *Astragalus* yapraklarından ve kökünden elde edilen ekstraktlar ile yeşil yöntem ile sentezlenen gümüş nanopartiküller, UV spektrofotometre, DLS, SEM ve FT-IR gibi yöntemler ile karakterize edilmiştir. Karakterizasyonları tamamlanan gümüş nanopartiküllerinin mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliğinin tayin edilmesi, sağlıklı fibroblast hücreleri (L929) üzerinde biyoyumluluğunun ve meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinde antikanser etkinliğin incelenmesi çalışmaları tamamlanmıştır.

Tez çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre *Astragalus* yapraklarından gümüş nanopartiküllerin başarılı bir şekilde sentezlendiği, belirli mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkinlik sergilediği, biyoyumlu olduğu ve meme kanseri hücreleri üzerinde doza bağlı olarak belirli oranda antikanser etkinlik sergilediği tayin edilmiştir. Bu nedenle antibiyotiklere karşı direnç geliştiren mikroorganizmalara karşı potansiyel bir ajan olmakla birlikte, kanser hücreleri üzerinde toksik etki göstermesiyle de umut vaadeden sonuçlar ortaya koymuştur. Ayrıca literatürde *Astragalus* bitkisi ile ilgili çalışmalar kısıtlı olmakla beraber, var

olan çalışmalar ise Astragalus bitkisinin bitkisel özellikleri ya da sadece ekstraktı ile antimikrobiyal ve antikanser etkinlerinin belirlenmesine yöneliktir. Bununla birlikte literatürde, Astragalus'un kökü ile yapılan çalışmalar ağırlıklı bulunmakta olup yaprakları ile yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bundan dolayı bu tez çalışması ile ilk kez Astragalus bitkisinin hem kök hem yapraklarından yeşil sentez yöntemi ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerle yapılan antimikrobiyal ve antikanser çalışmalarının literatüre özgün ve kapsamlı bir çalışma olarak katkı sunması beklenmektedir.

Bu bilgilerden yola çıkarak tez çalışmamızda kullanımı çok eskiye dayanan gümüş ve tedavi amaçlı kullanılan *Astragalus membranaceus*' u çevreye zarar vermeyen yeşil sentez yöntemi ile bir araya getirmek planlanmıştır. Bu şekilde gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu, mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliğinin tayin edilmesi, sağlıklı fibroblast hücreleri üzerinde biyouyumluluğunun ve meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücrelerinde antikanser etkinliğin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu tez çalışması ile literatürde konuya ilişkin var olan açığın kapatılması planlanmış olup, elde edilen sonuçlar ile ilk defa yapılma niteliğinde olan yol gösterici bir kılavuz oluşturması hedeflenmiştir.

Antimikrobiyal etkinlik sonuçlarımız özellikle gram negatif bakterilerde artan antibiyotik direncine karşı Geven1 ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerin umut vaad edici ajanlar olabileceğini ortaya koymaktadır.

SONUÇ VE ÖNERİ

Doğu tıbbında kullanımı çok yaygın olan *Astragalus membranaceus*'un yaprak ve kökü kullanılarak, doğaya zarar vermeyen bir yöntem olan yeşil sentez yöntemi ile hazırlanan gümüş nanopartikülleri ile antibiyotik kullanımına dayalı olarak gelişen antibiyotik direncinin bitkisel kaynaklı antimikrobiyallerin kullanımı ile aşılabileceğine dair umut vaad edici sonuçlar vermektedir. Benzer şekilde kadın popülasyonunda görülme ve ölüm insidansı yüksek olan meme kanseri, ekonomik, sağlıklı hücrelere zarar vermeyen, kanser hücrelerine sitotoksik etki gösterebilen ve elde edilmesi kolay olan bitkisel kaynaklı ürünlerin varlığı oldukça önemlidir.

Bu fikirden yola çıkarak tez çalışmamızda kullanımı çok eskiye dayanan gümüş ve tedavi amaçlı kullanılan *Astragalus membranaceus*' u çevre dostu yeşil sentez yöntemi ile bir araya getirmek planlanmıştır. Bu doğrultuda gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu, mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkinliğinin tayin edilmesi, sağlıklı fibroblast hücreleri üzerinde biyouyumluluğunun ve meme kanseri hücre hattı olan MCF-7 hücrelerindeki antikanser etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Literatürde *Astragalus* bitkisi ile ilgili çalışmalar kısıtlı olmakla beraber, var olan çalışmalar ise bitkinin bitkisel özellikleri ya da sadece ekstraktı ile antimikrobiyal ve antikanser etkinlerinin belirlenmesine yöneliktir. Ayrıca literatürde, *Astragalus*'un kökü ile yapılan çalışmalar ağırlıklı bulunmakta olup yaprakları ile yapılan çalışmalar sınırlıdır. Literatürdeki *in vitro* hücre kültürü çalışmaları sadece *Astragalus* bitkisinin çeşitli explantlarına (kök, gövde, yaprak) ait ekstraktların antikanser etkinliğine yöneliktir. Bu sebeple de tez çalışmamız özgün bir değere sahiptir.

Elde edilen sonuçlara göre,

1. *Astragalus*'un kök ve yapraklarından sentezlendiği düşünülen gümüş nanopartiküllerin varlığı öncelikle renk değişimi ile doğrulanmıştır. Yaprak ve kökten elde edilen ekstraktlar ile gümüş nitratın indirgenme reaksiyonu sonrasında çözeltide meydana gelen sarıdan kahverengiye dönük renk değişimi gümüş iyonlarının yüksüz gümüş içeren nanopartiküllere indirgendliğini başarılı bir şekilde ortaya koymuştur.
2. Çalışmanın devamında spesifik gümüş nanopartikül piklerinin varlığı UV spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Geven 1'den elde edilen nanopartiküller 450 nm civarında maksimum absorpsiyon piki sergilerken, Geven 2 için bu değer 290 nm'de tayin edilmiştir. İleri karakterizasyon teknikleri ile gümüş nanopartiküllerin varlığı teyit edilmiştir.
3. Zetasizer ile sentezi yapılan gümüş nanopartiküllerin partikül boyut, zeta potansiyel ve polidispersite indeks verileri analiz edilmiş, taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi ile boyut ve morfoloji verileri desteklenmiştir. SEM analizine göre Geven1 den elde edilen gümüş nanopartiküller 55 nm ve küresel morfolojide, Geven2 elde edilen gümüş nanopartiküller ise küresel morfoloji ile 14 nm olarak saptanarak zetasizer cihazı ile elde edilen sonuçlar ile kıyaslandığında düşük bulunmuştur. Bunun sebebi sulu

- çözeltilerdeki ölçüme bağlı olarak nanopartikül hidrodinamik çapının ölçümü ile ilişkilendirilmiştir.
4. Sentezde rol oynayan fonksiyonel grupların tayini için gümüş nanopartiküller ile ekstraktların FT-IR analizi yapılarak gümüş nanopartikül oluşumu doğrulanmıştır. Ek absorpsiyon piklerinin gözlenmemesi adına yapılabilecek ileriki çalışmalarda örnek kaybı olmadan sterilizasyon işlemlerinin yapılması önerilmektedir.
 5. Astragalus yaprağından sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal etkinlik sonucuna göre, gümüş nanopartikülleri doza bağlı olarak özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *E.coli* gibi gram negatif mikroorganizmaların üremesini inhibe etmiştir. Bu sonuç ile gram negatif bakterilerde artan antibiyotik direncine karşı Geven1 ile sentezlenen gümüş nanopartiküllerin umut vaat edici ajanlar olabileceği sonucu literatüre özgün bir değer kazandırmıştır. Ancak ileri düzey çalışmalarda doz aralığı arttırılarak inhibisyon etkisinin artabileceği düşünülmektedir.
 6. Çalışmalar sonucunda Astragalus kökünden elde edilen gümüş nanopartiküller ile antimikrobiyal etkinlik tayin edilmemiştir. Bunun nedeni elde edilen ekstrakta ya da bitkinin formuna bağlı olarak bakterisidal etkinin değiştiği düşünülmektedir. İleri çalışmalarda ekstrakt hazırlanırken örnek miktarının arttırılması önerilmektedir.
 7. *In vitro* hücre kültürü çalışmalarında, Astragalus kök ve yaprağından elde edilen gümüş nanopartiküllerin sağlıklı hücreler olan L-929 hücreleri üzerinde hiçbir sitotoksik etki göstermediği bulunmuştur. Bu sonuçlara dayanarak sağlıklı hücreler için biyouyumlu, kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluşturmak amacıyla kullanılabileceği düşünülmektedir.
 8. Astragalus kök ve yaprağından sentezlenen gümüş nanopartiküllerin MCF-7 meme kanseri hücre hattı üzerinde doza bağlı olarak düşük oranda antikanser etkisine sahip olduğu tayin edilmiştir.
 9. Elde edilen verilere göre, etken maddeye maruziyet süresi ve dozu birbiri ile ilişkili parametrelerdir. Dolayısı ile ileriki çalışmalarda Astragalus bitkisinden hazırlanan gümüş nanopartiküllerinin konsantrasyon aralıkları ve maruz kalma süreleri değiştirilebilir. Çalışmamız verilerine göre, meme kanseri ile mücadelede *Astragalus membranaceus*' un kök ve yapraklarından sentezlenen gümüş nanopartiküllerin daha kapsamlı *in vitro* çalışmalar ve *in vivo* çalışmalar ile desteklenmesi önerilmektedir.
 10. Yeşil sentez yöntemiyle elde edilen gümüş nanopartiküllerin çevre dostu olması sebebiyle ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilmesi önerilebilir.
 11. Çalışma sonucunda elde edilen toksik etkinin nanopartiküller ile mi yoksa Astragalus ekstraktından mı elde edildiğinin anlaşılması için antikanser çalışmalarında kontrol olarak Astragalus ekstraktı ile kanser hücrelerine muamele edilebilir. Böylelikle toksik etki gümüş nanopartiküllerden mi ve Astragalus ekstraktından mı olduğu karşılaştırılabilir.

Yukarıda ifade edildiği şekliyle çeşitli avantajlı özelliklerinden ötürü, tez çalışmamız literatürde konuya ilişkin var olan açığın kapatılmasına hizmet edecek olup, elde edilen sonuçlar ile ilk defa yapılma niteliğinde olan etkili bir referans olacağı düşünülmektedir.



KAYNAKÇA

- Abeşka, Y. Y., (2019). *Green Synthesis Of Silver Nanoparticles By Caulerpa Spp*, (Yüksek Lisans Tezi), Dokuz Eylül University.
- Adesso, S., Russo, R., Quaroni A., Autore, G, Marzocco S., (2018). *Astragalus Membranaceus Extract Attenuates Inflammation And Oxidative Stress İn Intestinal Epithelial Cells Via NF-Kb Activation And Nrf2 Response*. MDPI.
- Ahmad, F., Ashraf, N., Ashraf, T., Zhou, R., B., Yin, D., C., (2019). *Biological Synthesis Of Metallic Nanoparticles (MNPs) By Plants And Microbes: Their Cellular Uptake, Biocompatibility, And Biomedical Applications*. Springer Nature.
- Akkurt, G., (2020). *Astragalus Membranaceus L. Türünün Kök Ekstraktının Allium Cepa L. Ve Vicia Faba L. Bitkileri Üzerinde Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi*, (Yüksek Lisans Tezi), Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Al-Gburı, S., (2018). *Green Synthesis Of Silver Nanoparticles*, (Yüksek Lisans Tezi), T.C. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Altınsoy, B., Şeker Karatoprak, G. & Öçsoy, i., *Gümüş Nanopartiküllerinin Mikrobiyal Sentezi, Yapısal Analizi, Antimikrobiyal ve Antikanser Özelliklerinin Belirlenmesi*, 2016.
- Altuncu, F., K., (2021). *Tarhun Ekstraktı İle Gümüş Nanopartikül Sentezi*, (Yüksek Lisans Tezi), T.C. Bayburt Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.
- Askari, Z., Whabi, M., R., Allafchian, A., Mousavi, S., A., Jalali, S., A., H., (2019). *Biosynthesis of antibacterial silver nanoparticles using Astragalus verus Olivier*. Published in Micro & Nano Letters.
- Aslan, S., (2022). *Anchussa Officinalis Yapraklarından Gümüş Nanopartiküllerin (AgNPs) Sentezi, Karakterizasyonu Ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi*, (Yüksek Lisans Tezi), T.C. Mardin Artuklu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.
- Auyeung, K. K., Han, Q.-B., & Ko, J. K. (2016). *Astragalus membranaceus: A Review of its Protection Against Inflammation and Gastrointestinal Cancers*. The American Journal of Chinese Medicine, 44(01), 1–22.
- Aygün, A., Gülbağça, F., Nas, M., S., Alma, M. H., Harbi, C., Alımlı, M., Ustaoglu, B., Celik Altunoglu, Y., Baloglu, M., C., Cellat, K., Şen, F., (2019). *Biological Synthesis Of Silver Nanoparticles Using Rheum Ribes And Evaluation Of Their Anticarcinogenic And Antimicrobial Potential: A Novel Approach İn Phytonanotechnology*. Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis.

Başbağ M., Kavak B., Fırat M., Çağan e., Sayar M.S., *Türkiye Florasında Yer Alan Endemik Astragalus Taksonları*, 2018.

Başbağ, M., Çağan, E., Sayar, M., S., Fırat, M., (2019). *Güneydoğu Anadolu Bölgesinin Farklı Lokasyonlarından Toplanan Boynuzlu Geven (Astragalus hamosus L.) Otunun Bazı Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi*. Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi (UTYHBD), 2019, 5(2): 346 – 354.

Bayğu G., (2020). *Cimin Üzüm Yaprağı Kullanılarak Yeşil Sentez Yöntemiyle Elde Edilen Gümüş Nanopartikülünün Genotoksik Etkisinin Kanat Benek Testi İle Belirlenmesi*, (Yüksek Lisans Tezi), T.C. Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Beykaya, M., Çağlar.,(2016). Bitkisel Özütler Kullanılarak Gümüş-Nanopartikül (AgNP) Sentezlenmesi ve Antimikrobiyal Etkinlikleri Üzerine Bir Araştırma. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi.

Ceylan, C., (2023). *Yeşil Sentez Metoduyla Zeytin (Olea Europaea L.) Yapraklarından Gümüş Nanopartikül Sentezi, Karakterizasyonu Ve Bazı Biyolojik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi*. (Yüksek Lisans Tezi), T.C. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.

Chen, X., Yan, J., K., Wu, J., Y., (2015). *Characterization And Antibacterial Activity Of Silver Nanoparticles Prepared With A Fungal Exopolysaccharide In Water*. Elsevier.

Dağlıoğlu, Y., (2018). *Nanopartikül Karakterizasyon Yöntemleri Ve Ekotoksisite Deneylerindeki Önemi*. Marmara Fen Bilimleri Dergisi.

Dağlıoğlu, Y., Yılmaz, H., Ö., (2018). *Nanopartikül Karakterizasyon Yöntemleri ve Ekotoksisite Deneylerindeki Önemi*. Marmara Fen Bilimleri Dergisi.

Deepika, S., Selvaraj, C., I., Roopan, S., M., (2020). *Screening Bioactivities Of Caesalpinia Pulcherrima L. Swartz And Cytotoxicity Of Extract Synthesized Silver Nanoparticles On HCT116 Cell Line*. Elsevier.

Doğan, G., (2022). *Tarçın Ve Karanfil Özütleri Kullanılarak Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi Ve Antibakteriyel Aktivitelerinin İncelenmesi*, (Yüksek Lisans Tezi), T.C Gebze Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Doğanyigit, Z., Küp, F., Ö., Kaymak, E., Aslı, O., Burçin, O., Akın, A., T., (2019). *Gümüş Nanopartiküllerin Üzüm Çekirdeği Ekstraktının Endotoksik Kalp Dokusundaki Histolojik Değişikliklere Ve TNF ve BNP Ekspresyonuna Etkisi*. Bozok Tıp Dergisi.

El-Rafie, H., E., El-Rafie, M., H., Zahran, M., K., (2013). *Green Synthesis Of Silver Nanoparticles Using Polysaccharides Extracted From Marine Macro Algae*. Elsevier Carbohydrate Polymers.

Erbay,, N., (2021). *Cyclotrichium Origanifolium L. Bitkisinden Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu Ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Değerlendirilmesi*, (Yüksek Lisans Tezi), Mardin Artuklu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.

Erdoğan, Ö., Abbak, M., Demirbolat, G., M., Birtekocak, F., Aksel, M., Pasa, S., Çevik, Ö., (2019). *Green Synthesis Of Silver Nanoparticles Via Cynara Scolymus Leaf Extracts: The Characterization, Anticancer Potential With Photodynamic Therapy In MCF7 Cells*. Plos One.

Erenler, R., Geçer, E., N., (2022). *Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Astragalus Lagopoides L. Leaves. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 10(6): 1112-1115.

Fu, J., Wang, Z., Huang, L., Zheng, S., Wang, D., Chen, S., Zhang, H., Yang, S., (2014). *Review of the Botanical Characteristics, Phytochemistry, and Pharmacology of Astragalus membranaceus (Huangqi)*. Phytotherapy Research.

Gündoğan, M., (2021). *Onosma Sericeum Willd. Bitkisinin Kök Ekstresinden Ve Ekstreden Sentezlenmiş Gümüş Nanopartikülden Oluşan Yara Kremi Formülasyonlarının Geliştirilmesi*, (Yüksek Lisans Tezi) T.C. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Jain, S., Maheta, M., S., (2017). *Medicinal Plant Leaf Extract And Pure Flavonoid Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles And Their Enhanced Antibacterial Property*. Nature, Scientific Reports.

Kadıoğlu, B., Kadıoğlu, S., Turan, Y., (2008). *Gevenlerin (Astragalus Sp.) Farklı Kullanım Alanları Ve Önemi*. Dogu Anadolu Tarımsal Arastırma Enstitüsü. Erzurum.

Kahraman, O., (2017). *Sarcopoterium Spinosum (L.) Spach Türünün Ekstraktı İle Nanopartikül Sentezi Ve Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Etkisinin İncelenmesi*, (Yüksek Lisans Tezi), Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Karakaya, F., (2021). *Yeşil Sentez Yöntemiyle Ruscus Aculeatus L. Bitkisi Kullanılarak Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi Ve Antibiyofilm, Antimikrobiyal, Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi), T.C. Bartın Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.

Karayel, M., (2020). *Yeşil Ve Ölçeklenebilir Bir Yöntem Kullanılarak Karragenan Kaplı Gümüş Nanoparçacıkların Sentezi Ve Karakterizasyonu*, (Yüksek Lisans Tezi), Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Khan, F., U., Khan, Z., U., H., Ma, J., Khan, A., U., Sohail M., Chen, Y., Yang, Y., Pan X., (2021). *An Astragalus Membranaceus Based Eco-Friendly Biomimetic Synthesis Approach Of Zno Nanoflowers With An Excellent Antibacterial, Antioxidant And Electrochemical Sensing Effect*. Elsevier Material Science And Engineering.

Khan, H., M., Raza, S., M., Anjum, A., A., Ali, M., A., Akbar, H., (2019). *Antiviral, Embryo Toxic And Cytotoxic Activities Of Astragalus Membranaceus Root Extracts*. Pak. J. Pharm. Sci., pp.137-142.

- Khorrami, S., Zarrabi, A., Khaleghi, M., Dnaei, M., Moafari, M., (2018). *Selective Cytotoxicity Of Green Synthesized Silver Nanoparticles Against The MCF-7 Tumor Cell Line And Their Enhanced Antioxidant And Antimicrobial Properties*. International Journal of Nanomedicine.
- Khorrami, S., Zarepour, A., Zarrabi, A., (2019). Green Synthesis Of Silver Nanoparticles At Low Temperature In A Fast Pace With Unique DPPH Radical Scavenging And Selective Cytotoxicity Against MCF-7 And BT-20 Tumor Cell Lines. Elsevier Biotechnology Reports.
- Kim, Y., S., Kim, J., S., Cho, H., S., Rha, D., S., Kim, J., M., Park, J., D., (2018). *Twenty-Eightday Oral Toxicity, Genotoxicity and Gender-Related Tissue Distribution of Silver Nanoparticles in Sprague-Dawley Rats*. Toxicol, 27-575-583
- Koçak, B., (2019). *Gümüş Nanopartiküllerinin Üzüm Çekirdeği (Vitis Vinifera) Ekstraktı İle Biyosentezi Karakterizasyonu Biyolojik Aktiviteleri Ve Endotoksik Karaciğer Üzerine Etkisi*, (Yüksek Lisans Tezi), T.C. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kora, A., J., Arunachalam, J., (2012). *Green Fabrication of Silver Nanoparticles by Gum Tragacanth (Astragalus gummifer): A Dual Functional Reductant and Stabilizer*. Hindawi Publishing Corporation Journal of Nanomaterial.
- Kütük, Y., (2019). *Konsantre Güneş Işığı Ve Mikroalga Yöntemi Kullanılarak Gümüş Nanopartiküllerin Fitosentezi, Karakterizasyonu, Sitotoksikite Ve Antibakteriyel Özelliklerinin Değerlendirilmesi*, (Yüksek Lisans Tezi), T.C. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Li, Q., Wang, D., Bai, D., Cai, C., Li, J., Yan, C., Zang, S., Wu, Z., Hao, J., Yu., G., (2020). *Photoprotective Effect Of Astragalus Membranaceus Polysaccharide On UVA-Induced Damage In Haccat Cells*. Plos One.
- Li, Y., Guo, S., Zhu, Y., Yan, H., Qian, D., Wang, H., Yu, J., Duan, J. (2019). *Flowers Of Astragalus Membranaceus Var. Mongholicus As A Novel High Potential By-Product: Phytochemical Characterization And Antioxidant Activity*. MDPI.
- Lin, L., Wang, W., Huang, J., Li, Q., Sunb, D., Yang, X., Wang, H., He, N., Wang, Y., (2010). *Nature Factory Of Silver Nanowires: Plant Mediated Synthesis Using Broth Of Cassia Fistula Leaf*. Chemical Engineering Journal.
- Liu, C., Wang, K., Zhuang, J., Gao, C., Li, H., Liu, L., Feng, F., Zhou, C., Yao, K., Deng, L., Wang, L., Li, J., Sun, C., (2019). *The Modulatory Properties Of Astragalus Membranaceus Treatment On Triple-Negative Breast Cancer: An Integrated Pharmacological Method*. Frontiers Media.
- Ma, Y., Liu, C., Qu, D., Chen, Y., Huang, M., (2017). *Antibacterial Evaluation Of Silver Nanoparticles Synthesized By Polysaccharides From Astragalus Membranaceus Roots*. Elsevier Biomedicine and Pharmacotherapy.
- Ma, Y., Liu, C., Qu, D., Chen, Y., Huang, M., Liu, Y., (2017). *Antibacterial Evaluation Of Silver Nanoparticles Synthesized By Polysaccharides From Astragalus Membranaceus Roots*. Elsevier.

Ma,Y., Liu, C., Qu, D., Chen, Y., & Huang, M., *Antibacterial evaluation of silver nanoparticles synthesized by polysaccharides from Astragalus membranaceus roots*, 2017.

Manikprabhu, D., Lingappa, K., (2013). *Antibacterial Activity Of Silver Nanoparticles Against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Synthesized Using Model Streptomyces Sp. Pigment By Photo-Irradiation Method*. Elsevier Journal of Pharmacy Research.

Murty, B., S., Shankar, P., (2013). *Textbook Of Nanoscience And Nanotechnology*.

Naghiloo, S., Movafeghi, A., Delazar A., Nazemiyeh, H., Asnaashari, S., Dadpour, M., R., (2012). *Ontogenetic Variation Of Total Phenolics And Antioxidant Activity In Roots, Leaves And Flowers Of Astragalus Compactus Lam. (Fabaceae)*. BioImpacts.

Nanoteknoloji, Nanomalzemeler, 05/06/2018, <https://nanoteknoloji.org/nanomalzemeler/>.

Niu, Y., Wang, H., Xie, Z., Whent, M., Gao, X., Zhang, X., Zou, S., Yao, W., Yu, L., (2011). *Structural Analysis And Bioactivity Of A Polysaccharide From The Roots Of Astragalus Membranaceus (Fisch) Bge. Var. Mongolicus (Bge.) Hsiao*. Elsevier Food Chemistry, 620-626.

Özeşer, T., (2023). *Adaçayı (Salvia Officinalis) Ve Kızılcık (Cornus Mas) Bitkilerinin Yeşil Sentezle Gümüş Nanopartikül Üretiminde Kullanılması, Özellikleri Ve Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi*, (Yüksek Lisans Tezi), T.C. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Sadak, Y. S., (2020). *Aktinobakteri Suşları Kullanılarak Gümüş Nanopartikül Sentezi, Karakterizasyonu Ve Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması*, (Yüksek Lisans Tezi), Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Salem, S., S., Fauda, A., (2021). *Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: an Overview*. Springer Nature.

Semerci., F., A., (2020). *Kuşburnu (Rosa Canina) Ekstraktı Kullanılarak Gümüş Nanopartiküllerin Biyosentezi Ve Mcf-7 Meme Kanseri Hücreleri Üzerine İn Vitro Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi*, (Yüksek Lisans Tezi), T.C. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Shan, H., Zheng, X. & Li, M., *The effects of Astragalus Membranaceus Active Extracts on Autophagy-related Diseases*, 2019.

Shan, H., Zheng, X., Li, M., (2019). *The effects of Astragalus Membranaceus Active Extracts on Autophagy-related Diseases*. International Journal of Molecular Science.

Sharifi-Rad, M., Pohl, P., Epifano, F., Álvarez-Suarez, J, M., (2020). *Green Synthesis Of Silver Nanoparticles Using Astragalus Tribuloides Delile. Root Extract: Characterization, Antioxidant, Antibacterial, And Anti-Inflammatory Activities*. Nanomaterial.

Sharma, V., K., Yngard, R., A., Lin, Y., (2008). *Silver Nanoparticles: Green Synthesis And Their Antimicrobial Activities*. Elsevier advanced in Colloid Interface Science 145(2009)83-96.

Şimşek, A., (2021) *Lavanta (Lavandula Angustifolia) Ekstraktı İle Gümüş Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu Ve İnsan Glioblastoma U87mg Hücreleri Üzerinde Anti Kanser Özelliklerinin Değerlendirilmesi*, (Yüksek Lisans Tezi), Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Tan, X., Xu, M., Liu, F., Xu, M., Yao, Y., Tang, D., (2019). *Antimetastasis Effect of Astragalus membranaceus-Curcuma zedoaria via Beta-Catenin Mediated CXCR4 and EMT Signaling Pathway in HCT116*. Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

Tanrıöver, C., (2019). *Bazı Astragalus Türlerinin Fitokimyasal İçeriklerinin Ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi, Sağlıklı Ve Kanserli Hücre Hatları Üzerinde Antikanser Ve Antiproliferatif Kapasitelerinin Araştırılması*, (Yüksek Lisans Tezi), T.C. Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Ünal, İ., (2019). *Rheum Ribers (Işgın) Ve Paeonia Kesraunensis (Ayıgülü) Bitkilerinin Ekstraktından Gümüş Nanopartikül Sentezi, Karakterizasyonu Ve Sitotoksitesinin Belirlenmesi*, (Doktora Tezi), T.C. Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Xiong, J., Jiang B., Luo, Y., Zou, J., Gao, X., Xu, D., Du, Y., Hao, L., (2020). *Multifunctional Nanoparticles Encapsulating Astragalus Polysaccharide and Gold Nanorods in Combination with Focused Ultrasound for the Treatment of Breast Cancer*. International Journal of Nanomedicine 2020:15 4151–4169.

Yang, Y., Zhao, T., Zhang, T., (2021). *Synthesis Of Silver Nanoparticles Via Traditional Chinese Medicine And Evaluation Of Their Antibacterial Activities*. Rsc Advances.

Yavuz, İ., Yılmaz, E. Ş., (2021). *Biyolojik Sistemli Nanopartiküller*. Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Dergisi.

Yazıcı, B., (2021). *Yeşil Sentez Yöntemi Uygulanarak Primula Vulgaris Ekstraktı Yüklü Gümüş Nanopartiküllerinin Mcf-7 Hücrelerine Etkisinin Araştırılması*. (Yüksek Lisans Tezi), T.C. Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Yin, I., X., Zhang, J., Zhao, I., S., Mei, M., L., Li, Q., Chu., C., H., (2020). *The Antibacterial Mechanism Of Silver Nanoparticles And Its Application In Dentistry*. International Journal Of Nanomedicine.

Yin, Y., Li, H., Chen, Y., Zhu, R., Li, L., Zyang, X., Zhou, J., Wang, Z., Li, X., (2020) *Combination Of Astragalus Membranaceous And Angelica Sinensis Ameliorates Vascular Endothelial Cell Dysfunction By Inhibiting Oxidative Stress*. Hindawi.

Yi-Yi Wang, L. X., Huang, J., Chen, C., Wang, Z., Xie, H., (2020). *Silver Nanoparticles: Synthesis, Medical Applications And Biosafet*. Theranostics.

Zhang, J., Liu, L., Wang, J., Ren, B., Zhang, L., Li, W., (2018). *Cite this article as: Jing Zhang, Likun Liu, Jing Wang, Baoyin Ren, Lin Zhang and Weiling Li, Formononetin, an isoflavone from*

Astragalus membranaceus inhibits proliferation and metastasis of Ovarian Cancer Cells, *Journal of Ethnopharmacology*. *Journal of Ethnopharmacology*.

Zhang, X, F., Liu, Z., G., Shen, W., Guruntham, S., (2016). *Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches*. *International Journal of Nanomedicine*.

Zhou, R., Chen, H., Chen, J., Chen, X., Wen, Y., Xu, L., (2018). *Extract From Astragalus Membranaceus Inhibit Breast Cancer Cells Proliferation Via PI3K/AKT/Mtor Signaling Pathway*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* (2018) 18:83.



