



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



Saponin Yüklü Kitosan Nanoparçacıkların Sentezi, Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi

Yüksek Lisans Tezi

Aşkım Cansel TİRYAKİ

Kimya Anabilim Dalı

İzmir
2023

T.C.

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

**Saponin Yüklü Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi,
Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitelerinin
İncelenmesi**

Aşkım Cansel TİRYAKİ

Danışman: Doç. Dr. Nazlı SARIKAHYA

Kimya Anabilim Dalı
Organik Kimya Yüksek Lisans Programı

İzmir
2023

Ařkıım Cansel Tiryaki tarafından Yůksek Lisans tezi olarak sunulan ‘‘Saponin Yůklů Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi, Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi’’ bařlıklı bu alıřma EŐ Lisansűstű Eėitim ve Őėretim Yůnetmeliėi ile EŐ Fen Bilimleri Enstitűsű Eėitim ve Őėretim Yůnergesi’nin ilgili hűkűmleri uyarınca tarafımızdan deėerlendirilerek savunmaya deėer bulunmuř ve 17/05/2023 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliėi/oyçokluėu ile bařarılı bulunmuřtur.

Jűri Őyeler:**İmza****Jűri Bařkanı : Doç. Dr. Nazlı SARIKAHYA****Raportűr Őye : Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM****Őye : Dr. Őėr. Őyesi Ahmet AYKAÇ**



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Saponin Yüklü Kitosan Nanoparçacıklarının Sentezi, Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

10/05/2023

Aşkın Cansel Tiryaki



ÖZET**Saponin Yüklü Nanoparçacıklarının Sentezi, Karakterizasyonu ve
Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi**

TİRYAKİ, Aşkın Cansel

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nazlı SARIKAHYA

Mayıs 2023, 108 sayfa

Saponinler; yapılarında triterpenik, steroidal veya alkaloidal aglikona sahip glikozitlerdir. Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarda pek çok farklı biyolojik aktivite rapor edilmiştir. Yüksek kompleks oluşturma etkinlikleri nedeniyle, ilaç salımında ve ilaç taşıyıcı sistemlerde de kullanım bulmaktadırlar. Bu çerçevede; bu tez çalışmasında ülkemize endemik saponinlerce zengin *Cephalaria* bitki türleri üzerinde çalışmalar yürütülmüştür. Bu amaçla ilk olarak, hedeflenen biyolojik aktif saponinler farklı ekstraksiyon, izolasyon ve saflaştırma işlemleri ile *Cephalaria* türlerinden elde edilmiş ve gelişmiş spektroskopik yöntemlerle yapıları aydınlatılmıştır. Yapı belirleme çalışmalarında 1 ve 2 boyutlu NMR ile HR-ESIMS gibi gelişmiş spektroskopik teknikler kullanılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında ise saponin yüklü kitosan nanoparçacıkları (SPCSNP), iyonik jelleşme tekniği ile sentezlenerek, saponin yüklü kitosan nanoparçacığının karakterizasyonu FTIR, TEM, XPS, SEM ve DLS yöntemleri ile yapılmıştır. SPCSNP'nin kapsülleme etkinliği ve parçacık boyutu sırasıyla % 38 ve $109,04 \pm 37,80$ nm olarak bulundu. SP, CSNP'ler ve SPCSNP'lerin *in vitro* sitotoksikite çalışmaları SH-SY5Y, HL-60, PANC-1, PC-3 ve CCD34LU hücre hatları üzerinde yapılmıştır. Sonuç olarak, yerel ve yenilenebilir bitki kaynaklarından izole edilen tamamen doğal, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak aktif saponinler içeren saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının, ilaç taşıyıcı sistemlerde taşıyıcı olarak kullanım potansiyelleri vardır.

Anahtar Kelimeler: Triterpen saponinler, *Cephalaria elmaliensis*, *Cephalaria sumbuliana*, kitosan, nanoparçacık



Abstract

Synthesis, Characterization and Investigation of Biological Activities of Saponin-Loaded Chitosan Nanoparticles

TİRYAKİ, Aşkın Cansel

MSc in Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nazlı BÖKE SARIKAHYA

May 2023, 108 pages

Saponins; are glycosides with triterpenic, steroidal or alkaloidal aglycones in their structure. In recent years, many different biological activities of them have been reported in scientific literatures. Due to their high complexing efficiency, they also find usages in drug release and drug delivery systems. In this context; in this thesis, studies were carried out on *Cephalaria* plant species rich in saponins and endemic to our country. For this purpose, firstly, targeted biologically active saponins were obtained from *Cephalaria* species by different extraction, isolation and purification processes and their structures were elucidated by advanced spectroscopic methods. Advanced spectroscopic techniques such as 1D and 2D NMR and HR-ESIMS were used in structural determination studies. In the second stage of the study, saponin-loaded chitosan nanoparticles (SPCSNP) were synthesized by ionic gelation technique, and the characterization of saponin-loaded chitosan nanoparticles was performed by FTIR, TEM, XPS, SEM and DLS methods. The encapsulation efficiency and particle size of SPCSNP were found to be 38% and $109,04 \pm 37,80$ nm, respectively. *In vitro* cytotoxicity studies of SP, CSNPs and SPCSNPs were performed on SH-SY5Y, HL-60, PANC-1, PC-3 and CCD34LU cell lines. In conclusion, saponin-loaded chitosan nanoparticles containing completely natural, biodegradable and biologically active saponins isolated from local and renewable plant resources have the potential to be used as carriers in drug delivery systems.

Key words: Triterpene saponin, *Cephalaria elmaliensis*, *Cephalaria sumbuliana*, chitosan, nanoparticle

ÖNSÖZ

Lisans hayatım boyunca edindiğim bilgiler ve uygulamalı çalışmlar bilimin önemini ve farklı bakış açılarını bana kazandırdı. Kimya alanında edindiğim teorik bilgi ve uygulamaların günlük hayatta daimî kullanılabilir ve önemli oluşu beni bu alanda gelişmeye ve ilerlemeye motive etti.

Tez çalışmam süresince; çözüm odaklı düşünmeyi ve hareket etme becerisini kazandım. Bununla birlikte uygulamada da pek çok deneyim edindim. Laboratuvar ortamında, doğal bileşiklerin saf olarak elde edilmesi kısmında, pek çok farklı kromatografik tekniklerin (kolon, ince tabaka, vakum sıvı kromatografi teknikleri, orta basınçlı sıvı kromatografi cihazı) yanı sıra kimyasal teknikler (türevlendirme, asidik ve bazik hidroliz vb.) üzerine deneyim kazandım.

Bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında; 1 ve 2 boyutlu NMR analizleri, yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (HR-ESIMS), infrared spektrometresi (IR) ve kütle bağlantılı gaz kromatografisi (GK-MS) gibi önemli spektroskopik teknikleri kullandım.

Sentez çalışmalarının ardından yapılan karakterizasyon analizlerinin (FT-IR, DLS, SEM, TEM ve XPS) incelenmesi, yorumlanması ve nanoparçacıkların yapısal karakterlerine dair önemli bilgiler edindim.

Proje süresince teorik ve pratik anlamda edindiğim laboratuvar deneyimlerimden ilerleyen hayatımda yararlanacağıma inanıyor ve bunun için çok değerli danışmanım Doç. Dr. Nazlı SARIKAHYA'ya teşekkürlerimi iletmek istiyorum.

İZMİR

10/05/2023

Aşkım Cansel TİRYAKİ



İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL ONAY SAYFASI.....	v
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	vii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	xi
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ.....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Doğal Bileşikler.....	3
2.2 Saponinler.....	3
2.2.1. Saponinlerin Yapısı.....	5
2.2.1.1 Stereoidal Saponinler	7
2.2.1.2. Triterpenoidal Saponinler	7
2.2.2. Saponinlerin Kullanım Alanları.....	9
2.2.3. Saponin Kaynakları.....	10
2.2.4. Triterpen Saponinlerin Biyolojik Aktiviteleri	11
2.2.4.1.Antifungal Aktivite	11
2.2.4.2.İmmünomodülatör Aktivite	12
2.2.4.3.Antiparazidal Aktivite	13
2.2.4.4.Antitümör Aktivite.....	14
2.2.4.5. Antiviral Aktivite	14
2.2.4.6.Kardiyovasküler Aktivite	15
2.2.4.7.Yaşlanma Karşıtı Etki	16
2.3.Nanoteknoloji	16
2.3.1.Nanoparçacık	17
2.3.2. Nanoparçacıklarının Sentez Yöntemi	18
2.3.2.1 Emülsiyon-Çözücü Buharlaştırma Yöntemi.....	18

İÇİNDEKİLER (devam)

2.3.2.2 Çift Emülsiyon ve Buharlaştırma Yöntemi	18
2.3.2.3. Tuzlama Yöntemi	19
2.3.2.4. Emülsiyonlar-Difüzyon Yöntemi	19
2.3.2.5. Çözücü Yer Değiştirme / Çökeltme Yöntemi	20
2.3.2.6. Nanoparçacık Sentezini Etkileyen Faktörler	20
2.3.3. Nanoparçacıkların Uygulanma Alanları	21
2.3.3.1. Nanoparçacıklar ve İlaç Dağıtım Sistemleri	22
2.3.4. Kitosan Nanoparçacıkları	23
2.3.4.1.Saponin Yüklü Kitosan Nanoparçacıklar	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	28
3.1. Malzemeler ve Cihazlar	28
3.1.2. Bitki Materyali	28
3.2. Analiz Yöntemleri	30
3.3. Ekstraksiyon, İzolasyon ve Saflandırma İşlemleri	31
3.3.1. Ekstraksiyon İşlemleri	31
3.3.2. İzolasyon ve saflandırma işlemleri	32
3.3.2.1. <i>Cephalaria elmaliensis</i>	32
3.3.2.2. <i>Cephalaria sumbuliana</i>	34
3.4. Saponinlerin Yapı Tayini Çalışmaları sırasında Kullanılan Kimyasal İşlemler	36
3.4.1. Bazik Hidroliz	37
3.4.2. Asidik Hidroliz	37
3.5.Saponin Yüklü Kitosan Nanoparçacık Sentezi	38
3.5.1. Uv-vis spektrofotometresi ile optimizasyon çalışmaları	38
3.5.2. Kitosan nanoparçacık sentezi	39
3.5.2.1 Enkapsülasyon verimi (%EE)	40
3.6 <i>In Vitro</i> Sitotoksik Aktivitelerin Belirlenmesi	41
4. SONUÇLAR	43
5. TARTIŞMA	63
6. ÖNERİLER	65
7. EKLER	66
KAYNAKÇA	87

ŞEKİLLER

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Doğal bileşiklerin sınıflandırılması.....	3
Şekil 2.2. Steroidal, triterpenik ve alkaloid saponinlere örnekler	4
Şekil 2.3. <i>Sapindus mukorossi</i> meyvelerinin (A), perikarpların suda çalkalanmasından sonra oluşan bir köpüğün (B) ve saponinlerin yapıları ve aglikonu, hederagenin görseli	5
Şekil 2.4. Monodesmosidik saponin örneği	6
Şekil 2.5. Bidesmosidik saponin örneği.....	6
Şekil 2.6 Tridesmosidik saponin örneği.....	6
Şekil 2.7. Spirostan ve frustan saponin yapısı.....	7
Şekil 2.8. Triterpenoid saponinlerin aglikon türleri	8
Şekil 2.9. Oleanoik asit ve hederagenin aglikon yapısı	8
Şekil 2.10. <i>Quillaja saponaria</i> ve <i>Yucca schidigera</i>	10
Şekil 2.11. <i>Hedera helix</i> L. (Araliaceae) bitkisi ve α -Hederin saponin yapısı	12
Şekil 2.12. <i>Quillaja saponaria</i> bitkisi ve QS-21 yapısı	12
Şekil 2.13. <i>Anemarrhena rhizoma</i> bitkisi ve Timosaponin A-III saponin yapısı.....	13
Şekil 2.14. <i>Gypsophilia</i> ve <i>Gypsophilia</i> saponinin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.15. <i>Calendula arvensis</i> bitkisi ve Triterpen Saponini.....	15
Şekil 2.16 <i>Panax ginseng</i> bitkisi ve ginsenositlerin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.17 Nanoküre ve nanokapsül gösterimi.....	18
Şekil 2.18 Kitosan Yapısı.....	23
Şekil 2.19 Kitosan ve TPP çapraz bağlanması	25
Şekil 2.20 <i>Ginseng</i> ve kitosan çalışmasının grafiksel özeti	26
Şekil 2.21 Glisirizik asidin nanoparçacık çalışması	27
Şekil 3.1. <i>Cephalaria sumbuliana</i> ve bölgesel konumu	29
Şekil 3.2. <i>Cephalaria elmaliensis</i> 'in ve bölgesel konumu	29
Şekil 3.3. <i>C. elmaliensis</i> ve <i>C. sumbuliana</i> bitki ekstraksiyon işlemi.....	32
Şekil 3.4. TF-VSK işlemi.....	33
Şekil 3.5. Tez çalışmasında kullanılan saponinlerin İTK görüntüsü.....	33
Şekil 3.6. <i>C. elmaliensis</i> 'ten elde edilen saf saponinlerin saflaştırma yolu	34
Şekil 3.7. VSK fraksiyonlarının İTK'sı	35
Şekil 3.8. <i>C. sumbuliana</i> 'dan Sumbulianoside A izolasyon işlemleri.....	36

ŞEKİLLER (devam)

Şekil 3.9 UV-Vis spektrometresinde ölçümleri alınan saponinlerin yapıları.....	39
Şekil 3.10 Sentez çalışması şematik gösterimi.....	40
Şekil 4.1 Sumbulianosit A kimyasal yapısı.....	44
Şekil 4.2 Elmalienoside B kimyasal yapısı	46
Şekil 4.3 α -hederin kimyasal yapısı	47
Şekil 4.4 α -hederin saponinin UV spektrumu	49
Şekil 4.5 Vanilin konsantrasyonunun absorbans üzerine etkisi	50
Şekil 4.6 Asit konsantrasyonunun absorbans üzerine etkisi.....	51
Şekil 4.7 SP, CSNP ve SPCSNP için FT-IR spektrumları.....	52
Şekil 4.8 SPCSNP(a-c) ve CSNP(b-d) SEM-EDX analizleri	55
Şekil 4.9 SPCSNP (A) ve CSNP (B) TEM analizleri	56
Şekil 4.10 CSNP'lerin ve SPCSNP'lerin TGA eğrileri	57
Şekil 4.11 CSNP'lerin ve SPCSNP'lerin DTG eğrileri	57
Şekil 4.12 CSNP için XPS spektrumları	58
Şekil 4.13 SPCSNP için XPS spektrumları.....	58
Şekil 4.14 Saf SP, CSNP, SPCSNP için farklı hücre hatlarındaki hücre canlılığı değerleri.....	60
Şekil 7.1 Sumbulianoside A ^1H -NMR spektrumu	66
Şekil 7.2 Sumbulianoside A ^{13}C -NMR spektrumu	67
Şekil 7.3 5 Sumbulianoside A COSY spektrumu.....	68
Şekil 7.4 Sumbulianoside A HSQC spektrumu.....	69
Şekil 7.5 Sumbulianoside A HSQC spektrumu.....	70
Şekil 7.6 Sumbulianoside A HSQC spektrumu.....	71
Şekil 7.7 Sumbulianoside A HMBC spektrumu.....	72
Şekil 7.8 Sumbulianoside A HR-ESIMS spektrumu	73
Şekil 7.9 Elmalienoside B ^1H -NMR spektrumu	74
Şekil 7.10 Elmalienoside B ^{13}C -NMR spektrumu	75
Şekil 7.11 Elmalienoside B NOESY spektrumu	76
Şekil 7.12 Elmalienoside B DEPT spektrumu.....	77
Şekil 7.13 Elmalienoside B COSY spektrumu.....	78
Şekil 7.14 Elmalienoside B HMQC spektrumu.....	79
Şekil 7.15 Elmalienoside B HMBC spektrumu.....	80

ŞEKİLLER (devam)

Şekil 7.16 Elmalienoside B HR-ESIMS spektrumu.....	81
Şekil 7.17 α -hederin ^1H -NMR spektrumu	82
Şekil 7.18 α -hederin ^{13}C -NMR spektrumu	83
Şekil 7.19 α -hederin HMQC spektrumu	84
Şekil 7.20 α -hederin HMBC spektrumu	85
Şekil 7.21 α -hederin HR-ESIMS spektrumu.....	86



TABLOLAR

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1. Saponin içeren bazı bitkiler ve içerdiği saponin miktarları	10
Tablo 2.2. Nanoparçacıkların farklı alanlardaki uygulamaları.....	22
Tablo 4.1. Sumbulianosit A için ^1H ve ^{13}C NMR verileri	43
Tablo 4.2 Elmalienosit B ve α -hederin ^{13}C -NMR ve ^1H -NMR verileri	46
Tablo 4.3 Sıcaklığın α -hederin saponinin absorbansına etkisi	51
Tablo 4.4 CSNP'lerin ve SPCSNP'lerin parçacık boyutları, PDI değerleri ve Zeta potansiyelleri	53
Tablo 4.5 CSNP'lerin ve SPCSNP'lerin T_{maks} °C ve ağırlık kaybı (%) değerleri	58
Tablo 4.6 72 saat sonra çeşitli hücre hatlarında farklı örneklerin IC_{50} değerleri.....	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DCM	Diklormetan
DMSO	Dimetilsülfoksit
<i>n</i> -BuOH	Bütanol
EtOAc	Etil asetat
MeOH	Metanol
CHCl ₃	Kloroform
Hz	Hertz
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
İTK	İnce tabaka kromatografisi
OBSK	Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi
CS NP	Kitosan Nanoparçacığı
SP	Saponin
CS	Kitosan
NP	Nanoparçacık
s	Singlet
d	Dublet
t	Triplet
m	Multiplet
VSK	Vakum Sıvı Kromatografisi
KK	Kolon Kromatografisi
PİTK	Preparatif ince tabaka kromatografisi
SPCSNP	Saponin-kitosan nanoparçacığı
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskopu
UV	Ultraviyole
1D	Tek boyutlu
2D	İki boyutlu
¹³ C-NMR	Karbon-13 Nükleer Manyetik Rezonans
¹ H-NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
HR-ESIMS	Yüksek çözünürlüklü elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi

1. GİRİŞ

Cephalaria cinsi ülkemizde 24'ü endemik, 41 tür ile yayılım gösteren saponinlerce zengin bitki türlerindendir (Sarıkahya vd., 2018; Sarıkahya ve Kırmızıgül, 2012). Saponinler, yapılarında steroidal, triterpenoid veya alkaloid aglikon ile şeker zinciri içeren glikozitlerdir (Guclu-Ustundag ve Mazza, 2007; Natori vd, 1981). Triterpen aglikonlu saponinler bu türler içerisinde, özellikle bitki kaynaklarında en fazla gözlenen saponin türüdür. Literatür çalışmalarında triterpen saponinlerin antioksidan, hemolitik, sitotoksik, immünolojik (Sarıkahya vd., 2018), antifungal, antiparazidal, antiviral (Mahato ve Garai, 1998) aktiviteler gibi pek çok farklı biyolojik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir. Saponinlerin çeşitli biyolojik aktivite potansiyelleri olmasına rağmen; kullanımlarında, yüksek hemoliz değerleri, büyük molekül yapıları ve çözünürlük problemleri gibi dezavantajları nedeniyle, özellikle damar içi kullanımlarında kısıtlamalar oluşmaktadır (Sarıkahya vd., 2018; Mahato ve Garai, 1998). Bu çerçevede; son yıllarda, ilaç etken madde olarak kullanılan saponinlerin yukarıda sözü edilen istenmeyen etkilerini azaltmak, biyoyararlılığını ve stabilitesini arttırmak ve istenilen bölgeye hedeflendirmek için farklı ilaç taşıyıcı sistemler kullanılmıştır. Kamçı ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, *Saponaria officinalis* kök ekstreleri ile bakırdan nanoparçacıklar sentezlenmiştir. Çalışmanın amacı antibakteriyel etkisi ile bilinen bakır nanoparçacıkları (CuNP) ile sabun otundan elde edilen biyoaktif fitokimyasalların antibakteriyel etkilerini birleştirmektir. *Saponaria officinalis* kök ekstreleri ile sentezlenen CuNP'ler, iki yaygın bakteri olan *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı dikkate değer antibakteriyel aktivite göstermiştir. (Kamçı vd., 2022). Rejinold ve ark. tarafından 2011 yılında yapılan bir diğer çalışmada kitosan ile antikanser aktivite gösteren saponin için bir nanoformülasyon geliştirilmiştir. Saponin yüklü nanoparçacıkların sitotoksitesi L929, NIH-3T3, KB ve PC3 hücre hatlarında analiz edilmiş ve PC3 ile KB hücre hatlarında spesifik toksisite gözlenmiştir. Bu çalışma, saponin yüklü kitosan nanoparçacıkların kanser için etkili bir terapötik ajan olabileceğini desteklenmiştir (Rejinold vd., 2011). İlaç taşıyıcı sistemler arasında biyoyumlu ve biyobozunur avantajları ile öne çıkan biyopolimerler son dönemlerde dikkat çekmektedir. Biyopolimerler içerisinde ise kitosanlar en yaygın kullanılan polimerlerdir (Jayakumar vd., 2010). Kitosan ve kitosan türevleri ile bitkisel kaynaklar üzerinde yapılan çalışmalarda, bakterilere (Rabea ve Steurbaut, 2010), mantarlara (Trotel-Aziz vd., 2006) ve nematodlara (Khalil ve Badawy, 2012, Nunes vd., 2014) karşı biyolojik aktivite potansiyelleri rapor edilmiştir. Bu çalışmalardan bir tanesinde, kitosan ve Cu-kitosan nanoparçacıklarının *in vitro* antifungal aktiviteleri

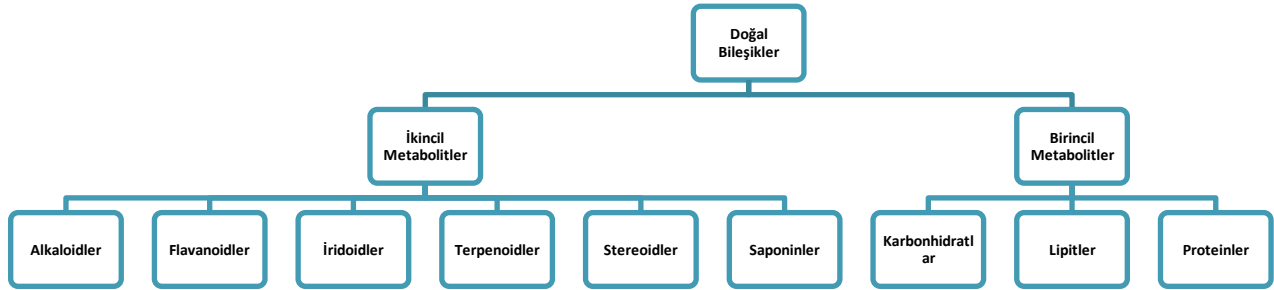
değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda; kitosan ve Cu-kitosan nanoparçacıklarının daha düşük protein disülfid izomeraz (PDI) değeri, daha yüksek zeta potansiyeli ve *in vitro* çalışmalarda *A. alternata*, *M. phaseolina* ve *R. solani*'ye mantarlarına karşı yüksek etkili antifungal aktivite potansiyeline sahip oldukları kanıtlanmıştır (Saharan vd., 2013). Bir diğer çalışmada ise; kitosan-saponin nanoparçacığı sentezlenmiştir. Bu sentezlenen nanoparçacığın DNA'yı enzimatik bozulmadan koruma yeteneği, termostabilitesi ve sitotoksitesi değerlendirilmiştir. Kitosan-saponin nanoparçacığı, plazmid DNA'yı enzimatik bozulmadan korurken, sentezlenen nanoparçacığın farklı konsantrasyonlarda yapılan hücre canlılığı deneylerinde düşük sitotoksite sergilediği doğrulanmıştır. Bu sonuçlar ele alındığında, kitosan-saponin nanoparçacığı DNA dağıtım sistemi potansiyeli göstermiştir (Bande vd., 2015). Saponinlerin nicel analizlerinin yapılması, biyolojik aktivite potansiyellerinin ön görülmesi açısından oldukça önemlidir. Büyük ve karmaşık molekül yapısına sahip olan saponinlerin yapı belirleme çalışmalarında, ileri spektroskopik yöntemlere (FTIR, 1 ve 2 boyutlu NMR teknikleri, kütle spektrometrisi) başvurulmaktadır. Tez çalışmamızda; saponinlerin miktar tayinlerinin yapılmasında da UV spektrofotometresi kullanılmıştır. Bu analizlerde, saponinler UV bölgede gözlemlenemediğinden vanilin ve asidik ortamda kolorimetrik yöntem kullanılarak görünür hale getirilmektedir. Birçok çalışmada kullanılan bu yöntem 1976 yılında farklı saponinlerin analizleri için geliştirilmiştir (Hiai vd.,1976).

Çalışmamızda; *Cephalaria elmaliensis* ve *Cephalaria sumbuliana* bitki türlerinden sırasıyla elmalienoside B, α -hederin ve sumbulianoside A saponinleri izole edilip, saflandırılmış ve NMR teknikleri (1B, 2B NMR), yüksek çözünürlüklü kütle yöntemi (HR-ESIMS) analizleri ile yapı tayinleri gerçekleştirilmiştir. İzole edilen üç saponinin nicel analizleri UV spektrofotometrede kolorimetrik yöntem ile optimize edilerek en uygun analiz koşullarında çalışılmıştır. Analiz ve optimizasyonlar sonucu kalorimetrik yöntemle nicel analizi yapılabilen α -hederin sentez için uygun saponin olarak seçilmiştir. Seçilen saponin α -hederin ile saponin yüklü kitosan nanoparçacığı sentezlenmiş ve enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır. DLS, SEM, TG, TEM, ZETA Potansiyeli analizleri ile saponin yüklü nanoparçacıkların kimyasal yapıları, morfolojik özellikleri ve termal davranışları karakterize edilmiştir. Karakterizasyon sonrasında saf saponin, kitosan nanoparçacığı ve saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının *in vitro* sitotoksite çalışmaları SH-SY5Y, HL-60, PANC-1, PC-3 ve CCD34LU hücre hatları üzerinde yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Doğal Bileşikler

Doğal bileşikler, doğal kaynaklardan elde edilen ve çoğunlukla önemli biyoaktiviteye sahip bileşiklerdir. Her türlü doğal kaynaklardan izole edilen doğal ürünler, çoğunlukla laboratuvarlarda sentezlenen sentetik maddelerden daha yüksek farmakolojik potansiyellere sahiptirler. Bu bileşikler, hastalıkları iyileştirmek ve yeni tıbbi bileşikler üretmek veya sentezlemek için bir ilham kaynağı olarak kullanılmıştır (Xie vd., 2015). Yaşam için temel kimyasallar olarak tanımlanan “birincil metabolitler” ve organizmalar için çevrelerine karşı evrimsel avantaj sağlayan “ikincil metabolitler” adı altında iki alt gruba ayrılırlar (Şekil 2.1). Birincil metabolitler şekerler, yağ asitleri ve amino asitlerdir. Bunlar sırasıyla karbonhidratların, lipidlerin ve proteinlerin monomerleridir. İkincil metabolitler ise, terpenoidler, steroidler, fenolikler, saponinler, flavonoidler, alkaloidler vb. gibi birçok farklı bileşik sınıfından oluşurlar. İkincil metabolitler, canlının iklim, topraktaki kimyasallar ve/veya bitki böcekleri vb. çevresel faktörlere karşı doğrudan veya dolaylı olarak direnç kazanmasını sağlarlar (Hill ve Connolly, 2015; Panche vd., 2016; Patel ve Savjani, 2015).

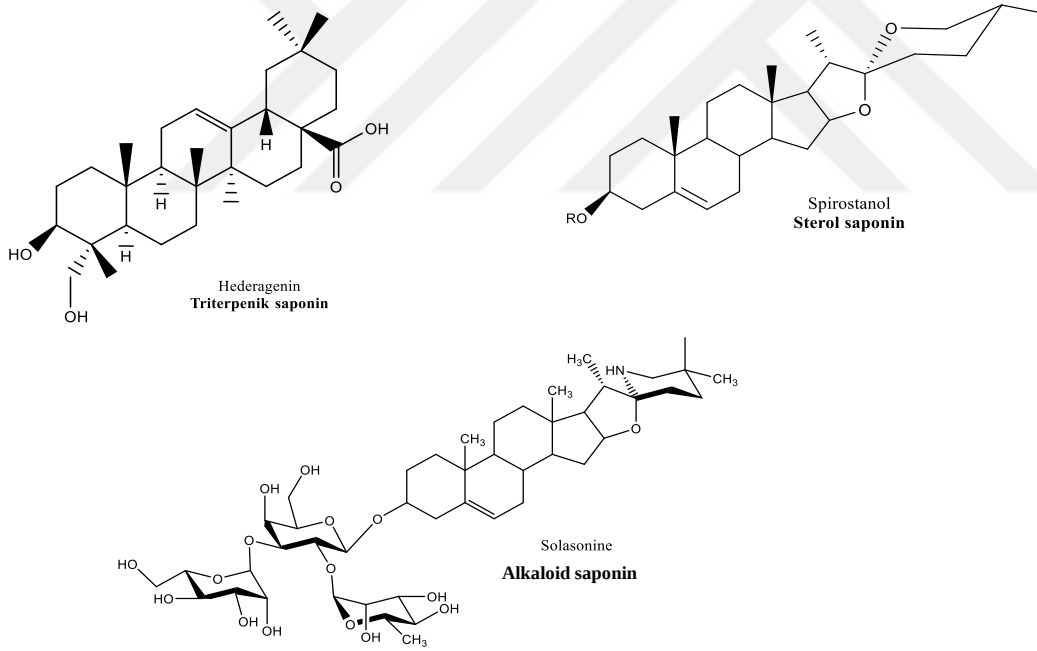


Şekil 2.1. Doğal bileşiklerin sınıflandırılması

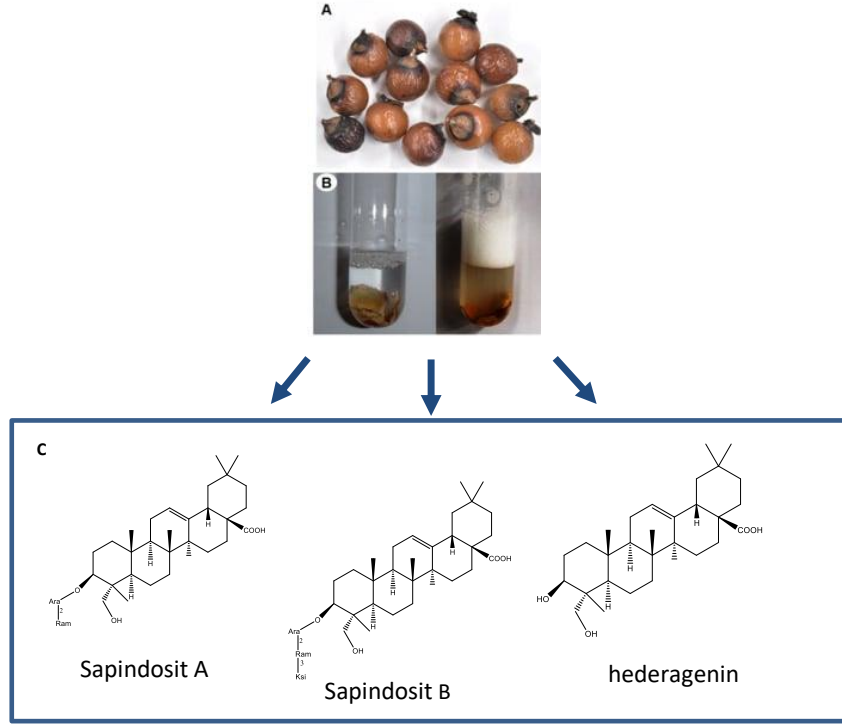
2.2. Saponinler

Saponinler bitkilerde yaygın olarak bulunan, yapılarında steroidal, triterpenoid veya alkaloid aglikon ile farklı sayılarda şeker zinciri içeren glikozitlerdir. Saponinin aglikon kısmı “sapogenin ya da aglikon” olarak adlandırılır. Şeker kısımları, aglikonun eter veya ester gruplarından yapıya bağlanabilir ve sapogeninde bağlandığı bölge sayısına göre adlandırılırlar.

Aglikonun bir yerinden şeker bağlı olduğunda monodesmosidik, iki farklı yerinden şeker bağlı olduğunda bidesmosidik veya nadiren de olsa üç şeker bağlı olduğunda tridesmosidik saponin olarak belirtilmektedir (Guclu-Ustundag ve Mazza, 2007; Natori vd, 1981) (Şekil 2.2). Saponin ismi Latince de sabun anlamına gelmekte olan “sapo” kelimesinden türemiştir. Saponinin sulu çözeltileri çalkalandığında köpürme özelliği gösterir (Şekil 2.3). Bunun sebebi molekül yapılarının yüzey aktif maddelere benzemesidir. Saponinlerin yapılarında bulunan aglikon kısmı hidrofobik iken, şekerlerin oluşturduğu kısımlar ise hidrofiliktir. Bu iki uç kısmın varlığı yüzey aktif maddeler için klasik bir molekül yapısı oluşturur (Faizal ve Geelen, 2013; Hosamath, 2011). Saponinler bazı içecekler içerisinde köpük eldesinde, kozmetik ve ilaç sanayisinde, fotoğrafçılık ve madencilik gibi çeşitli alanlarda kullanılabilir (Cheeke, 1999). Ayrıca ağaç küflerinin giderilmesinde veya bitkilerin böceklere karşı korumasında etkin rol oynamaktadırlar (Milgate ve Roberts, 1995; Osbourn, 2003).



Şekil 2.2 Steroidal, triterpenik ve alkaloid saponinlere örnekler



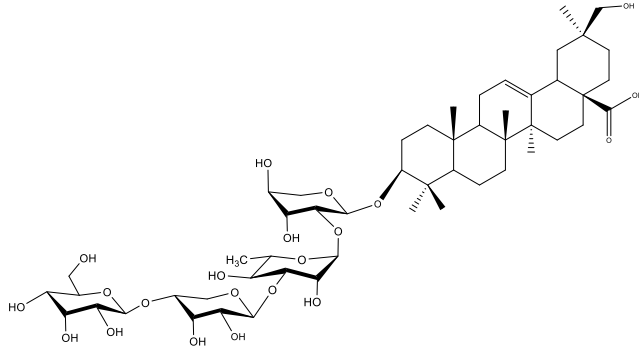
Şekil 2.3. *Sapindus mukorossi* meyvelerinin (A), perikarpların suda çalkalanmasından sonra oluşan köpüğü (B) ve saponinlerin aglikon yapıları (C) (Rai vd.,2021).

2.2.1 Saponinlerin yapısı

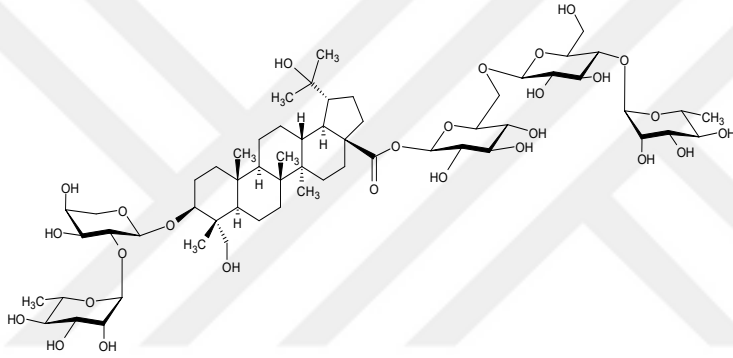
Saponinlerin, sapogenin kısmına bağlı olan fonksiyonel gruplar ve glikan kısmını oluşturan şeker zincirlerinin dizilişi, dallanma özellikleri ve substitüsyon tipleri birbirinden farklı saponin çeşitlerinin oluşumunu sağlamaktadır (Oleszek, 2002). Bugüne kadar 100'ün üzerinde steroidal ve ondan çok daha fazla sayıda triterpenoidal saponin varlığı bilinmektedir. Ayrıca tek bir bitkide, birden fazla tipte aglikonu olan saponinlerin bulunabildiği de gözlemlenmiştir (Mahato vd, 1988; Milgate ve Roberts,1995; Oleszek, 2002).

Saponinler aglikonlarına göre gruplara ayrılırlar bunlar, steroidal aglikonlar, alkaloidal aglikonlar veya triterpenoidal aglikonlardır (Moses vd., 2014) (Şekil 2.2). Glikozit bağları ise esterik ve eterik olabilmektedir (Press vd., 2000). Bu bağlar asidik veya bazik hidroliz ile koparılıp aglikonlar elde edilebilir. Ayrıca aglikonların sahip oldukları şeker zinciri sayısına göre de sınıflandırılabilirler. En yaygın olanları monodesmosidik (Şekil 2.4) ve bidesmosidik (Şekil 2.5)

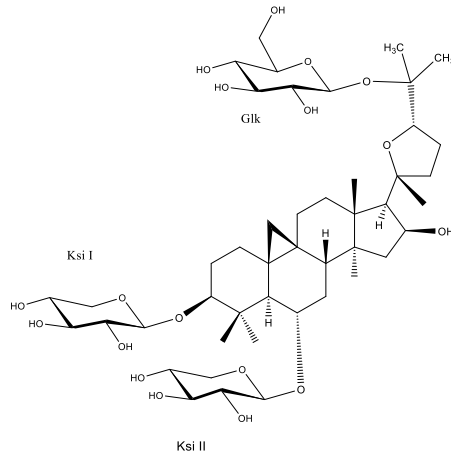
saponinlerdir. Nadir görülse de tridesmosidik (Şekil 2.6) saponinler de bulunmaktadır (Semmar vd., 2010).



Şekil 2.4 Monodesmosidik saponin örneği



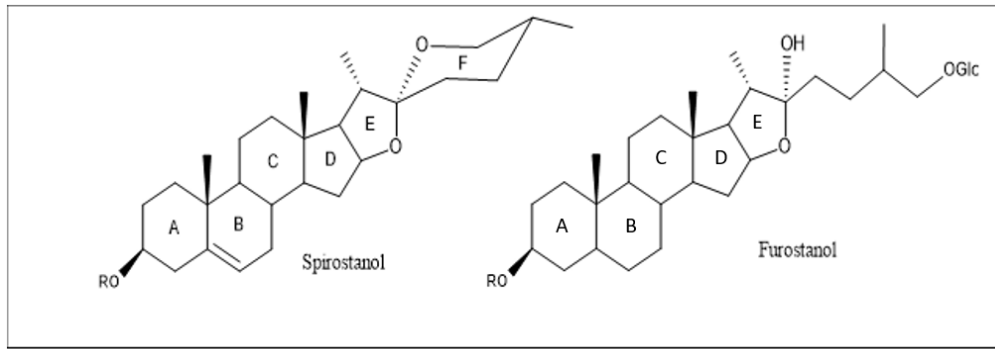
Şekil 2.5 Bidesmosidik saponin örneği



Şekil 2.6 Tridesmosidik saponin örneği

2.2.1.1 Steroidal saponinler

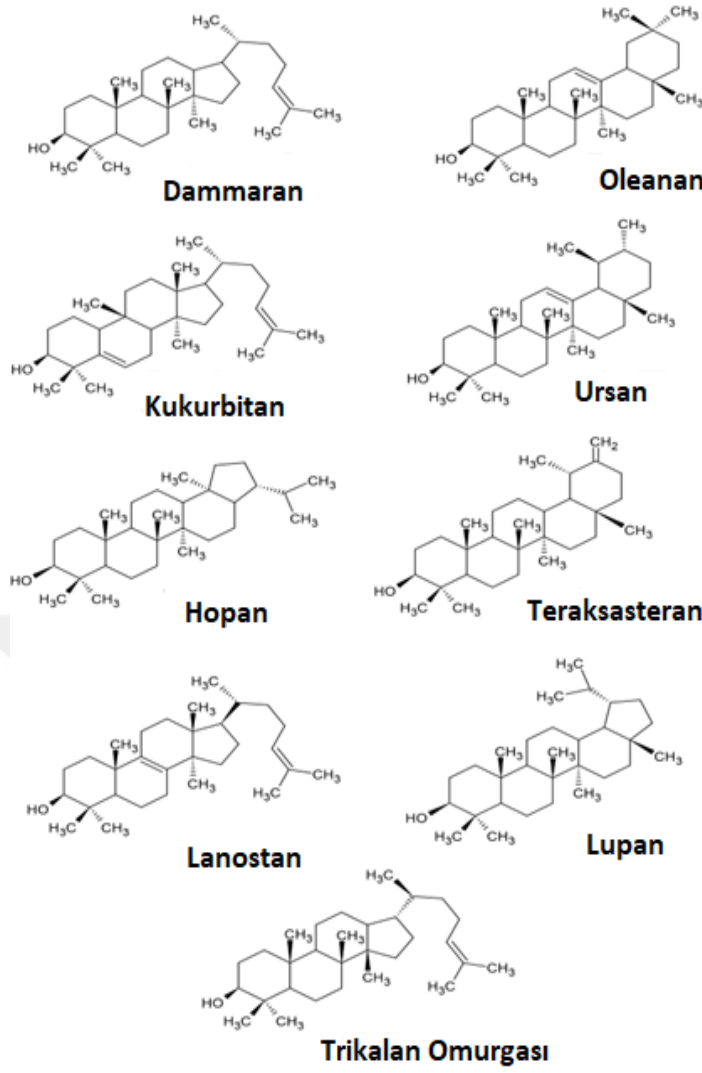
Steroidal saponinler, aglikon iskeletlerinde 27 karbon bulunduran ikincil metabolitlerdir. Spirostan, furostan ve kolestan saponinler olmak üzere üç alt grup altında inceleyebilirler (Challinor ve De Voss, 2013). Spirostan saponinler, altı ve/veya iki beş üyeli halkadan oluşan aglikon içermektedir. Bu halkalar A, B, C, D, E ve F halkaları olarak adlandırılır (Şekil 2.7). Furostan saponinlerin ise aglikonları sadece A, B, C, D ve E halkalarına (üç altı üyeli ve iki beş üyeli halka) sahipken, kolestan saponinlerin aglikonları sadece tetrasiklik A, B, C ve D sistemine sahiptir (üç altı üyeli ve bir beş üyeli halka).



Şekil 2.7 Spirostan ve furostan saponin yapısı

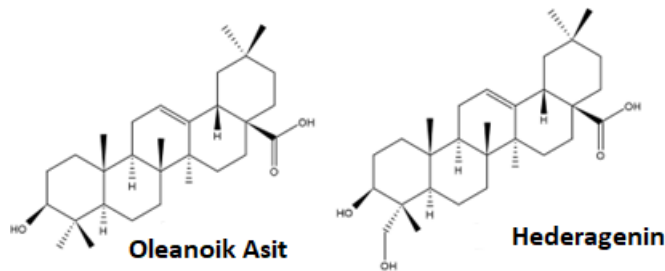
2.2.1.2 Triterpenoidal saponinler

Triterpenoid saponinler, aglikondaki halkalanmalarına, dallanmalarına, fonksiyonel gruplarına ve konumlarına göre yaklaşık 20 gruba ayrılmaktadırlar. Doğada bulunan triterpenoid saponinlerin aglikon kısmında genellikle dammaran, oleanan, kukurbitan, ursan, hopan, teraksasteran, lanostan, lupan, trikalen yapısı ve türevlerine rastlanmaktadır (Şekil 2.8) (Moses vd., 2014). Prosapogenin veya diğer bir deyişle aglikon kısmına ek olarak, glikozilasyon bölgeleri, glikozilasyon sayısı ve şeker türleri, triterpenoid saponinlerin biyoaktivitesini etkilemektedir (Desai vd., 2009; Yoshiki vd., 1998).



Şekil 2.8 Triterpenoid saponinlerin aglikon türleri (Moses vd, 2014)

Oleanan tipi saponinler, hederagenin tipi ve oleanoik asit tipi (Şekil 2.9) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Aşağıda görüldüğü gibi hederagenin ve oleanoik asit, yirmi üçüncü karbon üzerinde sadece bir hidroksil grubunda farklılık göstermektedir.



Şekil 2.9 Oleanoik asit ve hederagenin aglikon yapısı

Triterpen saponinler, *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda yapılan çalışmalarda hipokolesterolemik ve antikanserojenik özellikler göstermektedir (Shi vd., 2004). Ayrıca literatürde ginsenosit etken maddesi kullanılarak uygulanan tedaviler ve ön tedavilerde, farelerin antijen-reaktif T hücrelerinde ve T-yardımcı hücre yüzdesinde önemli bir artış görülmektedir (Kenarova vd., 1990).

Literatürde triterpenoid saponinler, bitkisel ürünler (Balandrin, 1996) ve immünolojik adjuvan (Wang, 2021) olma potansiyelleri gibi farmasötik özellikleri nedeniyle ticari olarak önemli bir kullanıma sahiptir. Diğer uygulamaları duş jelleri, şampuanlar, köpük banyoları, saç kremleri ve losyonları, banyo/duş deterjanları, sıvı sabunlar, bebek bakım ürünleri, ağız gargaraları ve diş macunları gibi kişisel bakım sektöründeki temizlik ürünlerinde doğal iyonik olmayan yüzey aktif maddeler olarak kullanılmalarıdır (Rai vd., 2021). Triterpen saponinler, düşük saponin konsantrasyonlarında emülsifikasyon etkinliği, köpürme özellikleri, yüksek yüzey aktivitesini gösteren kritik misel konsantrasyonu sonuçları ve iyi köpük oluşturma kapasiteleri nedeniyle ticari emülsifiyen ve köpürme ajanlarına karşı doğal bir alternatiftir (Schreiner vd., 2021). Saponinler ayrıca, yemlerde, sebze büyüme düzenleyicilerinde, metal kontaminasyonları ve biyosüpfaktanlar arasındaki etkileşimler yoluyla toprak iyileştirilmesinde önemli bir potansiyele ve avantaja sahiptir. (Mulligan, 2021).

2.2.2. Saponinlerin kullanım alanları

Saponinlerin çeşitli fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri bunların, gıda, kozmetik, tarım ve ilaç sektörlerindeki bir dizi ticari uygulamada başarıyla kullanılmasını sağlamıştır. Doğal bileşenlerin kullanımına yönelik pazar eğilimleri ve bunların biyolojik aktivitelerine dair artan kanıtlar, saponinlere olan talebi artırmıştır (Brown, 1998). Saponinler ve saponin içeren bitkilerin diğer araştırılan ve/veya önerilen uygulamaları arasında yem katkı maddeleri (Cheeke, 1999; Jensen ve Elgaard, 2001; Zhan, 1999), bakteri ve sebze büyüme düzenleyicileri (Henderson, 2001) ve toprak ıslahı yer almaktadır (Roy vd., 1997). Ayrıca saponinlerin farmasötik uygulamaları da bulunmaktadır. Bunlar hormon üretimi için hammaddeler (Blunden vd., 1975), immünolojik adjuvanlar (Kensil vd., 2004) ve ilaçlardır. Dünyada saponinlerin iki ana ticari kaynağı *Quillaja saponaria* ve *Yucca schidigera* bitkileridir (Balandrin, 1996; Martin ve Briones, 1999). Saponinlerin yoğun olarak bulunduğu diğer kaynaklar at kestanesi (Indena, 2005), soya fasulyesi, nohut, çay tohumu (Zhan, 1999) gibi diğer bazı bitki materyalleridir (Roopashree ve Naik, 2019).

2.2.3. Saponin kaynakları

Saponinler doğada deniz organizmaları, mantarlar, hayvanlar ve bitkiler gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilirler (El Barky vd., 2017). En yaygın ise bitkiler aleminde görülmektedirler. Yaklaşık 100 bitki familyasının çoğunda, insanlar ve hayvanlar tarafından besin olarak kullanılan saponinlere rastlanmıştır (Tablo 2.1) (Fenwick ve Oakenfull, 1983). *Yucca schidigera* ve *Quillaja saponaria*, gibi çöl bitkileri saponinler açısından zengindir ve saponinlerin elde edildiği önemli ticari kaynaklardandır. *Yucca* saponinlerinin çoğunlukla bir steroid aglikona sahip olduğu, *Quillaja* saponinlerinin ise bir triterpenoid aglikona sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca *Yucca* saponinlerinin çoğunlukla monodesmozidik saponinler olduğu, *Quillaja* saponinlerinin ise bidesmosidik saponinler olduğu bildirilmiştir (Cheeke, 1999).



Şekil 2.10 *Quillaja saponaria* ve *Yucca schidigera* bitkileri

Tablo 2.1 Saponin içeren bazı bitkiler ve içerdiği saponin miktarları

Latince ismi	Yaygın ismi	Görseli	g/kg kuru madde	Kaynaklar
<i>Medicago sativa</i> L.	Yonca yaprakları		56 20-30 2-17	Fenwick ve Oakenfull, 1983 Hanson vd.,1963 Livingston vd.,1979
<i>Medicago sativa</i> L.	Yonca filizi		87 79	Fenwick ve Oakenfull, 1983 Livingston vd.,1979
<i>Arachis hypogaena</i> L.	Fıstık (yağsız)		13 16	Fenwick ve Oakenfull, 1983 Applebaum vd.,1969
<i>Lens culinaris</i>	Mercimek		3.7-4.6 66	Fenwick ve Oakenfull, 1983 Hanson vd.,1963
<i>Pisum sativum</i> spp.	Yeşil bezelye (yağsız yemek)		11 42 0.1	Fenwick ve Oakenfull, 1983 Applebaum vd.,1969 Livingston vd.,1979
<i>Cicer arietinum</i> L.	Nohut		60 60	Fenwick ve Oakenfull, 1983 Applebaum vd.,1969

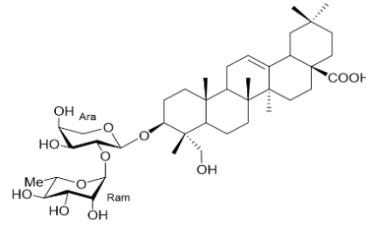
<i>Avena sativa</i> L.	Yulaf		47 1.3	Fenwick ve Oakenfull, 1983 Tschesche ve Wulff, 1973
<i>Spinacea oleracea</i> L.	Ispanak		1.0 0.7	Fenwick ve Oakenfull, 1983 Livington vd., 1979

2.2.4 Triterpen saponinlerin biyolojik aktiviteleri

Saponinler birçok hayvan yeminde ve ayrıca bazı insan gıdalarında bulunmaktadır. Birçok saponin, hayvanlara damardan verildiğinde oldukça toksik olmasına rağmen, ağızdan verildiklerinde toksisite çok daha düşüktür. Bunun nedeni, bağırsaklarda emilme ve kan dolaşımına girme konusunda neredeyse tamamen başarısız olmaları ve plazma varlığında hemolitik etkinin çok azalmasıdır. Literatür çalışmalarında saponinlerin yapılarına göre pek çok farklı biyolojik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Favel vd., 1994; Furniss vd., 1989; Stevens vd., 1966a; 1966b).

2.2.4.1 Antifungal aktivite

Birçok saponin, antifungal aktivite sergilemektedir. Poligalasik asit glikozitlerinin antifungal etkisi bilinenler arasındadır (Furniss vd., 1989). *Solidago virgaurea* ve *Bellis perennis*'ten izole edilen bisdesmosidik saponinler olan virgaurea saponinleri 1-2, bellis saponin 1 ve onların mono-desmosidik prosapogeninlerinin, *Candida* ve *Cryptococcus* bakteri türlerinin büyümesini *in vitro* ortamda inhibe ettiği bilinmektedir. Başka bir çalışmada ise *Hedera rhombea* kaynaklı hederin bileşiğinin hemolitik ve antifungal aktivite potansiyeli terminal ramnozun olmadığı ve karboksil grubunun metillendiği türevlerin aktivite potansiyeli ile karşılaştırılarak, yapı-aktivite ilişkileri de tartışılmıştır. Sonuçlar, terminal ramnozun antifungal aktivitede daha önemli olduğunu, serbest karboksilik asit varlığının ise hemolitik aktivite de daha önemli olduğunu göstermiştir (Stevens vd., 1966a). *Asparagus officinalis*'in köklerinden elde edilen saponin fraksiyonunda da antifungal aktivite saptanmıştır (Stevens vd., 1966b). Yapılan çalışmalarda *Hedera helix* L. (Araliaceae) bitkisinden elde edilen α -hederin saponin saponin (Şekil 2.11) bileşiği de antifungal aktivite göstermiştir.

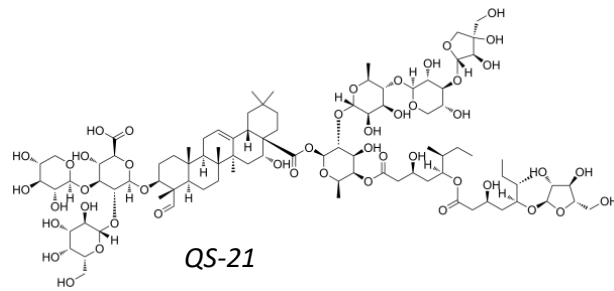


α -hederin

Şekil 2.11 *Hedera helix* L. (Araliaceae) bitkisi ve α -hederin saponin yapısı (Favel vd., 1994).

2.2.4.2 İmmünomodülatör aktivite

Quillaja saponaria'dan (sabun kabuğu ağacı) elde edilen saponinler (Şekil 2.12), güçlü adjuvanlar olarak tanımlanmıştır. Bu bitkinin saponin ekstresi, veteriner aşılarında kullanılmıştır (Freudenberg ve Plankenhorn, 1940) ve ağacın kabukları %10 gibi çok yüksek bir yüzdede saponin içermektedir. Bu saponinler, son yıllarda insan aşıları için adjuvan olma potansiyeli taşımakta ve bu konuda çalışmalar devam etmektedir. *Q. saponaria*'dan yüksek oranda saflaştırılmış bir saponinin adjuvan aktivitesi, şapa adsorbe edilmiş rHIV-1 zarf proteini (HIV-1 160D) içeren deneysel bir aşıda bileşen olarak kullanımı değerlendirilmiştir (Ward ve Kaller, 1994).

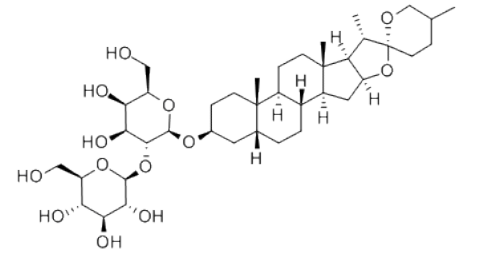


QS-21

Şekil 2.12 *Quillaja saponaria* bitkisi ve QS-21 yapısı (Ward ve Kaller, 1994)

2.2.4.3 Antiparazidal aktivite

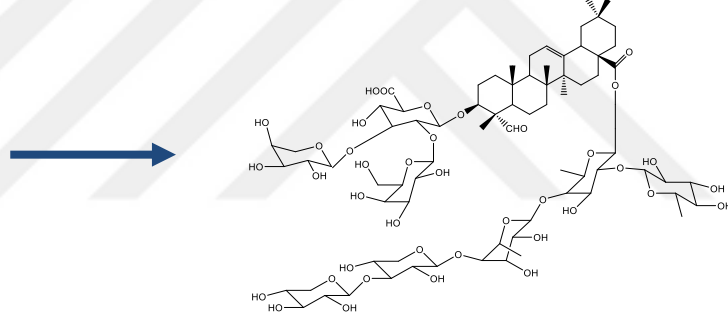
Schistosomiasis, parazite ara konak olarak yaşama imkânı veren, belirli su salyangoz türleri ile bağlantılı bir hastalıktır. Bu hastalık Asya, Afrika ve Güney Amerika'daki birçok ülkede milyonlarca insanı etkiler. Saponin içeren bitkilerin schistosomiasis bulaştıran salyangoz *Biomphalaria glabrata*'ya karşı toksik olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Bitkilerin parazit öldürücü aktiviteleri, sentetik bileşiklerden daha ucuz oldukları için çok önemlidir. Daha önce yapılan incelemelerde, çeşitli bitki türlerinden izole edilen bir dizi monodezmosidik ve bisdezmosidik saponinin parazit öldürücü aktivitesi tanımlanmıştır (Ali ve Richardson, 1967; Sharon ve Lis, 1993). Tanak ve arkadaşları Japon *Schistosoma japonicum* türünün ara konakçısı olan *Oncomelania nosophora*'ya karşı otuz dört ham ilaç ve tıbbi bitki özütünü taramıştır. *Anemarrhena rhizoma*'nın MeOH ekstresinde güçlü antiparazidal aktivite bulunmuştur. Bitkinin ana saponinlerinden biri olan timosaponin A-III (Şekil 2.13) çok güçlü öldürücü aktivite göstermiştir. *Phytolacca dodecandra*'dan elde edilen monodesmosidik saponinler, bitki kökenli en umut verici parazit öldürücüdürler (Brimacombe, 1971; Foster vd., 1962). Ayrıca *Sapindus rorak*'tan elde edilen asetillenmiş saponinlerin güçlü aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Reist, 1959). Bir ova çalısı veya ağacı olan *Catunarelgum nilotica* bitkisinin su ve etanol ekstraktlarının sırasıyla 100 ve 50 ppm konsantrasyonlarda %100 salyangoz ölümüne neden olduğu görülmüştür.



Şekil 2.13 *Anemarrhena rhizoma* bitkisi ve Timosaponin A-III saponin yapısı
(Brimacombe, 1971; Foster vd., 1962)

2.2.4.4 Antitümör aktivite

Saponinlerin antienflamatuvar ve antitümör aktiviteleri arasında genel bir korelasyon vardır. Bu aktiviteler üzerine literatürde pek çok farklı çalışmaya rastlanmaktadır. Murin makrofajın K562 tümör hücrelerine karşı aktivitesi, lipopolisakarit (LPS) ve ginseng saponin varlığında incelenmiştir. LPS ve ginseng total saponin, tümörisidal aktiviteyi tek başına LPS'ye göre daha fazla artırmıştır (Coleman vd., 1992). Hasegawa ve arkadaşları triterpenoid saponinlerin tümör hücrelerinde glikoz taşınması üzerine etkisini ve bunun *in vitro* sitotoksik ve antiviral aktivitelerini çalışmışlar ve olumlu sonuçlar gözlemlemişlerdir (Paulsen vd., 1992). Bir başka çalışmada ise soya fasulyesi ve *Gypsophila* saponinlerinin (Şekil 2.14) kolon tümörü (HCT-15) hücrelerinin büyümesi ve canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu saponinlerin, uzun süreli tedavide doza bağlı bir şekilde hücre büyümesini inhibe ettiği ve hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca hücrelerin kısa süreli tedavi ile de öldüğü görülmüştür (Malik, 1992).

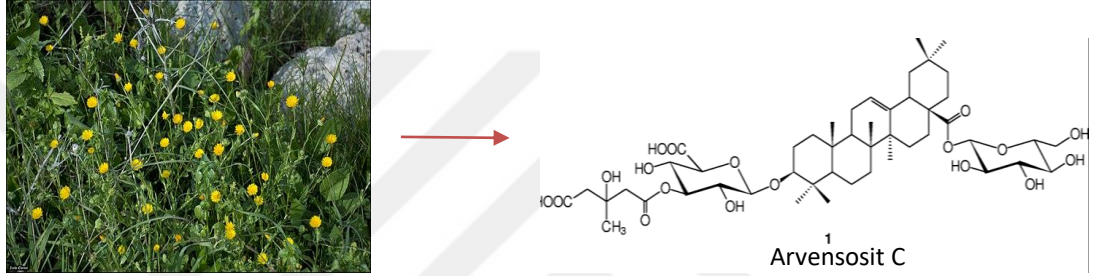


Şekil 2.14 *Gypsophila* bitkisi ve ondan izole edilen saponinin kimyasal yapısı (Weng vd., 2009)

2.2.4.5 Antiviral aktivite

Saponinler üzerine yapılan pek çok çalışmada antiviral aktiviteye dikkat çekilmiştir. Bu çalışmalardan birinde Çin ve Amerikan Ginseng sapı ve yaprağından elde edilen saponinler, insanlarda oral HSV-1 enfeksiyonunda *in vitro* ve *in vivo* olarak herpes simpleks 1 virüsüne (HSV-1) karşı koruyucu etki göstermiştir (Gupta, 1974). Bir başka çalışmada ise *Calendula arvensis* kaynaklı triterpenoid saponinlerin (Şekil 2.15) *in vitro* antiviral aktivitesi araştırılmıştır (Lee vd., 1975). Test edilen tüm bileşikler veziküler stomatit virüsü (VSV) ve rinovirüse (HRV) karşı bir inhibitör etki gözlenmiştir.

Saponinlerin sürfaktan aktivitesi, SARS-CoV-2'ye karşı kullanılmaktadır. Gargara ve burun solüsyonları, virüslerin boğaza ve burna yapışarak ilaçla doğrudan temasını tetikleyerek SARS-CoV-2 enfeksiyonlarına karşı daha iyi bir koruma sağlayabilmektedir (Hargreaves, 2003; Mamedov ve Egamberdieva, 2019). Saponinlerin ağız, burun ve boğazın mukozal astarlarına SARS-CoV-2 saldırısının önlenmesine karşı son derece güçlü olduğu öne sürülmüştür. Ayrıca bağışıklık tepkilerini artırmak için cansız ve alt birim aşılarında adjuvan olarak kullanılmaktadırlar (Wang vd., 2019; Lacaille-Dubois, 2019).



Şekil 2.15 *Calendula arvensis* bitkisi ve arvensoside C (Kırmızıbekmez vd.,2006).

2.2.4.6 Kardiyovasküler aktivite

Saponinlerin kalp ve damar sistemi üzerinde koruyucu etkisi de vurgulanmıştır. Bildiricilerde kolesterolle beslenen damar sertliği üzerine yapılan bir araştırmada, *Smilax glabra*'nın damar sertliğini önleyici etkilerinin saponin kaynaklı olabileceği düşünülmüştür (Zhang vd., 1991). Ayrıca *P. notoginseng* saponinlerinin tavşanlarda miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon hasarı üzerindeki etkisi araştırılmış ve (Huang vd., 1991) sonuçta miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu anlaşılmıştır.

2.2.4.7 Yaşlanma karşıtı aktivite

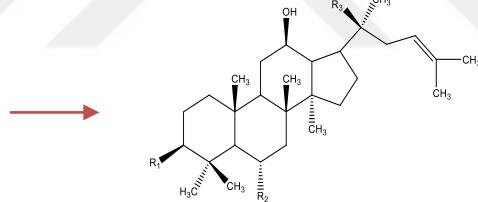
Çok sayıda dammaran ve oleanolik asit saponinleri içeren Ginseng (*Panax ginseng* c.A. Meyer) ekstresi, yaşlanma karşıtı özelliği ile tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkinin kök ekstresi doğu ülkelerinde yüzyıllardır zihinsel etkinliği artırmak, fiziksel dengeyi sağlamak ve metabolik işlevi canlandırmak için kullanılmaktadır. Halk arasında çay formunda kök ekstrenin sürekli kullanımının, insanda kilo kaybına neden olduğu ve ömrü uzattığı düşünülmektedir. Ticari olarak Ginseng köklerinin çoğu Çin, Kore ve Japonya'da yetiştirilen ürünlerdir. *P. ginseng*'in yanı sıra başka *Panax* türleri de bilinmektedir, bunlar değişen derecelerde potansiyel göstermektedir ve sıklıkla kullanılmaktadır. *Panax notoginseng*'in sap ve yaprağından elde edilen saponinler (Şekil 2.16), yaşam süresini uzatmış ve lipofüzyon içeriğini düşürmüştür. Saponinler, dokularda lipid peroksit oluşumunu ve yüksek kan ile beyin süperoksit dismutaz aktivitesini inhibe etmiştir. Bu sonuçlar, saponinin yaşlanma karşıtı aktivitesinin, serbest radikal süpürücü etkisi ile ilişkili olduğunu göstermiştir.



Panax ginseng bitkisi
yapısı



Bitkinin kökü



Ginsenositlerin genel yapısı

Şekil 2.16 *Panax ginseng* bitkisi ve ginsenositlerin kimyasal yapısı (Apaydın ve Aydın,2018)

2.3 Nanoteknoloji

"Nano" ön eki, Latince *nanus* kelimesinden gelir ve çok küçük anlamına gelmektedir. Uluslararası Birimler Sisteminde (SI) 10^9 kez bir azaltma faktörünü belirtmek için kullanılmaktadır. 1 nm, 10^{-9} m'ye karşılık gelir ve boyutu moleküler boyutların üzerinde ve makroskobik boyutların altında (genellikle >1 nm ve <100 nm) olan sistemleri kapsamaktadır.

Nanoteknoloji ve nanobilim çalışmaları, son yıllarda hız kazanmış ve geniş bir ürün yelpazesi ile ortaya çıkmıştır. Nanoteknoloji, yalnızca belirli alanları etkileyen tek bir teknik olarak görülmeyip, yeni nano boyutlu malzemeler üretmek için atomik, moleküler ve makromoleküler ölçekte malzemelerin tasarımı, üretimini ve uygulamasını ifade etmektedir (Hahens vd, 2007).

2.3.1 Nanoparçacık

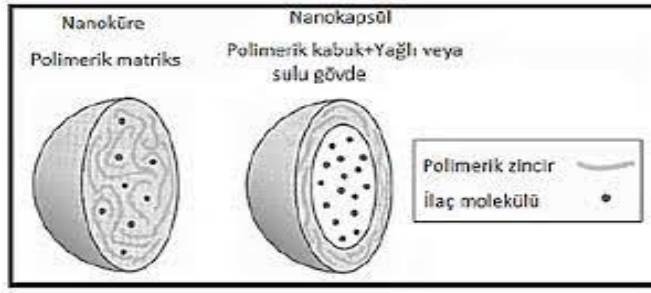
Nanoparçacıklar şaşırtıcı derecede uzun bir geçmişe sahiptir. Hazırlanmaları sadece modern araştırmaların özel bir sonucu ortaya çıkmadığı gibi insan yapımı malzemelerle de sınırlı değildir. Nanoparçacıklar doğal olarak hava koşulları, volkan patlamaları, orman yangınları veya mikrobiyal süreçler tarafından üretilirler ve bu nedenle kullanımları eski zamanlara kadar gider. (Hough vd., 2008; Lead ve Wilkinson, 2006).

Farmasötik nanoparçacıklar ise, biyolojik olarak parçalanabilen katı, mikron altı boyutlu (çapı 100 nm'den küçük) ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Nanoparçacık terimi hem nanoküreler hem de nanokapsüller için birleşik bir addir. Nanoküreler, ilacın düzgün bir şekilde dağıldığı matris sistemidir, nanokapsüller ise ilacın bir polimerik zarla çevrili olduğu sistemdir (Şekil 2.17) (Couvreux P vd., 1995).

Nanokapsül ve Nanoküre Nanopartiküller boyutları 10-1000 nm arasında değişen submikronik kolloidal sistemlerdir. Hazırlanma yöntemlerine göre nanoküre ya da nanokapsül oluştururlar. Nanokapsüller etken maddenin sıvı iç çekirdeğe hapsedildiği polimerik bir duvarla çevrili veziküler sistemlerdir (Mora-Huertasa vd.,2010).

Nanokapsüller yağlı çekirdekleri nedeniyle hidrofobik yapıda ilaçlar için polimerzomlar ise sulu çekirdekleri nedeniyle hidrofilik ilaçların taşınması için uygun sistemlerdir (Letchford ve Burt, 2007).

Nanoküreler, matriks tipi katı kolloidal partiküllerdir. Nanokapsüllerin aksine yapılarında yağlı veya sulu çekirdek bulundurmazlar. İlaç ve taşıyıcının fizikokimyasal özelliklerine ve hazırlama yöntemine bağlı olarak, ilaç taşıyıcı içerisine alınır ve/veya yüzeye adsorpsiyon ile hapsedilir. İlacın ve taşıyıcının elektriksel yükleri de yükleme kapasitesini etkileyebilmektedir. Gözenekli olmayan 46 nanokürelere ilacın hapsedilebilmesi ilacın adsorpsiyonu yolu ile gerçekleşmektedir.



Şekil 2.17 Nanoküre ve nanokapsül gösterimi (Rao ve Geckeler, 2011.)

İlacın kolloidal taşıyıcılardan salımı, taşıyıcının cinsine ve yükleme mekanizmasına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bu sistemlerin spesifik yüzey alanları çok geniş olduğu için, mikroküre ve mikrokapsül gibi sistemlere oranla ilaç salımı çok daha hızlı olmaktadır (Gürkaynak, 2006).

2.3.2 Nanoparçacıkların sentez yöntemleri

Nanoparçacıkların hazırlanması için uygun yöntemin seçimi, polimerin ve yüklenecek ilacın fizikokimyasal karakterine bağlıdır. Polimer nanoparçacıkların birincil üretim yöntemlerinden beş tanesi aşağıda detaylı bir şekilde verilmiştir.

2.3.2.1 Emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi

Nanoparçacıkların hazırlanmasında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi iki adım içermektedir. İlk adım, polimer çözeltisinin sulu bir faza emülsiyon haline getirilmesi ile başlar. İkinci adım sırasında polimer çözücüsü buharlaştırılır ve nanoküreler polimer halinde çöker. Nanoparçacıklar, ultrasantrifüjleme ile toplanılır ve stabilizör kalıntısını veya herhangi bir serbest ilacı uzaklaştırmak için su ile yıkanılarak depolanır (Song vd., 1997).

2.3.2.2 Çift emülsiyon ve buharlaştırma yöntemi

Emülsiyon ve buharlaştırma yöntemi, hidrofilik ilaçların zayıf tutunmasının yarattığı sınırlandırılmalarından dolayı dezavantaj oluşturmaktadır. Bu nedenle, hidrofilik ilacı kapsüllemek için, su/yağ emülsiyonları oluşturmak üzere şiddetli karıştırma altında sulu ilaç çözeltilerinin organik polimer çözeltisine eklenmesini içeren ikili emülsiyon tekniği kullanılmaktadır. Bu su/yağ emülsiyonu, su/yağ/su emülsiyonu oluşturmak için sürekli karıştırılarak ikinci sulu faza ilave

edilmektedir. Emülsiyon daha sonra buharlaştırma yoluyla çözücü giderme işlemine tabi tutulmakta ve nanoparçacıklar yüksek hızda santrifüjleme ile izole edilebilmektedir. Oluşan nanoparçacıklar liyofilizasyondan önce yıkanmaktadır (Vandervoort ve Ludwig, 2002). Eklenen hidrofilik etken maddenin miktarı, kullanılan stabilizatörün konsantrasyonu, polimer konsantrasyonu, sulu fazın hacmi sentezlenen nanoparçacıkların karakterizasyonunu etkileyen değişkenlerdir (Ubrich vd., 2004).

2.3.2.3 Tuzlama yöntemi

Suyla karışabilen bir çözücünün sulu çözeltiden tuzlama etkisi yoluyla ayrılmasına dayanan bir yöntemdir (Catarina PR vd., 2006). Polimer ve ilaç başlangıçta bir çözücü içinde çözülürken, daha sonra uygun bir tuz ile (magnezyum klorür ve kalsiyum klorür gibi elektrolitler veya sukroz gibi elektrolit olmayanlar) polivinilpirolidon veya hidroksietil selüloz gibi bir koloidal stabilizatörü içeren sulu bir jel halinde emülsifiye edilmektedir. Bu yağ/su emülsiyonu, çözücünün sulu faza difüzyonunu arttırmak için yeterli hacimde su veya sulu çözelti ile seyreltilmekte, böylece nanokürelerin oluşumu indüklenmektedir. Karıştırma hızı, iç/dış faz oranı, organik fazdaki polimer konsantrasyonu, sulu fazdaki elektrolit konsantrasyonu ve stabilizatör tipi dahil olmak üzere çeşitli sentez parametreleri değiştirilebilmektedir (Allemann vd., 1993). Polilaktik asit (PLA), Poli(metakrilik) asitler ve etil selüloz nanokürelerin hazırlanması, yüksek verimliliğe yol açmaktadır (Quintanar-Guerrero vd., 1998; Jung vd., 2000). Isıya duyarlı maddelerin işlenmesi gerektiğinde tuzlama, sıcaklık artışı gerektirmedikinden daha avantajlı bir yöntemdir (Lambert vd., 2001). En büyük dezavantajları, lipofilik ilaca özel uygulamalar ve kapsamlı nanoparçacık yıkama adımlarıdır.

2.3.2.4 Emülsiyon-difüzyon yöntemi

Emülsiyon-difüzyon yöntemi nanoparçacıkları hazırlamak için yaygın olarak kullanılan başka bir yöntemdir. Polimer; propilen karbonat, benzil alkol gibi kısmen suyla karışabilen bir çözücü içinde çözülürken ve her iki sıvısında termodinamik dengesini sağlamak için suyla doyurulmaktadır. Daha sonra, polimer-su ile doymuş çözücü fazı, stabilizatör içeren sulu bir çözelti içinde emülsifiye edilmekte, bu da çözücünün dış faza difüzyonuna ve yağ-polimer oranına göre nanokürelerin veya nanokapsüllerin oluşumuna yol açmaktadır. Son olarak çözücü, kaynama noktasına göre buharlaştırma veya süzme yoluyla

uzaklaştırılmaktadır. Bu teknik, yüksek kapsülleme verimlilikleri (~%70), homojenleştirmeye gerek olmaması, ölçek büyütme kolaylığı, basitlik ve dar boyut dağılımı gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır. Dezavantajları, süspansiyondan uzaklaştırılacak yüksek su hacimleri ve emülsifikasyon sırasında suda çözünen ilacın doymuş-sulu dış faza sızması ve enkapsülasyon veriminin azalmasıdır (Takeuchi ve Yamamoto, 2001).

2.3.2.5 Çözücü yer değiştirme-çökeltme yöntemi

Çözücü yer değiştirme, bir polimerin organik bir çözeltilerden çöktürülmesini ve organik çözücünün sulu ortamda difüzyonunu içermektedir. Polimerler, ilaç ve/veya lipofilik yüzey aktif madde, aseton veya etanol gibi suyla karışabilen bir çözücü içinde çözülmemektedir. Çözeltiye daha sonra manyetik karıştırma altında stabilizatör içeren sulu bir çözelti dökülmekte veya enjekte edilmektedir. Nano parçacıklar, hızlı çözücü difüzyonu ile anında oluşturulmaktadır. Çözücü daha sonra indirgenmiş basınç altında süspansiyonlardan çıkarılmaktadır. Organik fazın sulu faza eklenme oranları parçacık boyutunu etkilemektedir. İki fazın karışma hızı arttıkça hem parçacık boyutunda hem de ilaç tutulmasında azalma meydana geldiği gözlenmiştir (Fessi vd., 1989). Nano çökeltme yöntemi, az çözünen ilaçların çoğu için çok uygundur. Bu yöntemde nanoküre boyutunun, ilaç salımının ve veriminin, hazırlama parametreleri ayarlanarak etkili bir şekilde kontrol edildiği gösterilmiştir. Organik fazdaki polimer konsantrasyonunun ayarlanmasının, belirli bir polimer-ilac oranı aralığıyla sınırlandırılarak daha küçük boyutlu nanoparçacıkların sentezinde faydalı olduğu bulunmuştur (Chorney vd., 2002).

2.3.3 Nanoparçacık sentezini etkileyen faktörler

Sentezlenen nanoparçacıkların kararlılığı ve dağılımına en fazla sıcaklık, pH, reaksiyon süresi ve basınç gibi ortam özellikleri etki eder (Shah vd., 2015).

Sıcaklık: Sentezlenen nanoparçacıklar farklı boyut ve şekillerdedir. Bazılarının nano ölçek boyutları diğerlerine göre çok daha küçüktür. Bununla birlikte, bazı nanoparçacıklar ise mikro ölçek boyutundadır. Araştırmacıların bir kısmı bu boyut farklılıklarının reaksiyonların sıcaklık farklılıklarına bağlı olduğunu düşünmektedir. Sneha ve arkadaşlarına göre, *Piper betel* yaprak ekstraktları kullanılarak yapılan sentezde altın nanoparçacıkları 30°C ile 40°C de sırasıyla 5 nm ve 500 nm boyutlarında oktahedral şeklinde sentezlenmiştir (Sneha

vd., 2010). Dolayısıyla sıcaklık artıkça nanoparçacık boyutunun da arttığı görülmüştür.

pH: pH'nın nanoparçacıkların boyut stabilitesinde rol aldığı belirlenmiştir. pH da sıcaklık gibi metallerin ve indirgeyici faktörlerin, indirgenme reaksiyonları sırasında çekirdeklenmelerini düzenlemektedir. Yapılan çalışmalarda gümüş nanoparçacıklarının sentezinde daha küçük nanoparçacıklar pH 3 ve 4 değerlerinde gözlenirken, daha büyük nanoparçacıklar pH 2'de gözlemlenmiştir (Armendariz vd., 2004; Okitsu vd., 2009).

Reaksiyon süresi: Karade ve ark. yaptığı çalışmada, Fe_3O_4 manyetik nanoparçacıkları (MNP'ler), modifiye yeşil sentez yöntemi kullanılarak hazırlanmış ve reaksiyon süresinin MNP'lerin yapısal ve manyetik özellikleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada; MNP'lerin oda sıcaklığında süperparamanyetik özelliklerinin olduğunu, 60 K'de ise süperparamanyetik özelliklerinin yanı sıra ferromanyetik özelliklere sahip olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca reaksiyon zamanı arttıkça partiküllerin boyutlarının da arttığı gözlemlenmiştir (Karade vd., 2018).

Basıncı: Tran ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada reaksiyon ortamına uygulanan basıncın sentezlenen nanoparçacıkların şekil ve boyutları üzerinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte kullanılan metal iyonlarının indirgeme reaksiyon hızlarının ortam basıncı altında daha hızlı olduğu gözlemlenmiştir (Tran vd., 2013).

2.3.4 Nanoparçacıkların Uygulama Alanları

Nanoparçacıkların farklı alanlardaki uygulamaları Tablo 2.2'de özetlenmiştir (Pangi vd., 2003).

Tablo 2.2 Nanoparçacıkların farklı alanlardaki uygulamaları (Pangi vd., 2003)

Uygulama Alanı	Uygulama
Tıp	Nano ilaçlar, tıbbi cihazlar, doku mühendisliği
Kimya ve Kozmetik	Nano ölçekli katkı kimyasalları ve nano bileşikler, boyalar, kaplamalar vb.
Malzeme Bilimi	Nanoparçacıklar, karbon nanotüpler, biyopolimerler, kaplamalar
Gıda Bilimleri	İşlenmiş gıdalarda katkı malzemesi, paketleme ve gıda güvenliğinde nanokapsüller
Çevre ve Enerji Alanları	Hava arıtma filtreleri, yakıt hücreleri, fotovoltaiik hücreler
Askeri ve Enerji Alanları	Biyosensörler, silahlar, duyuusal güçlendirme sistemleri
Elektronik Mühendisliği	Yarı iletken çipler, hafıza depolama sistemleri vb.
Tarım Alanı	Su ve toprak arıtma, gübre ve pestisit kontrollü salımı

Bu uygulama alanlarında nanoparçacıkların kullanılması günümüzde oldukça önem kazanmıştır. Özellikle ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde yapılan çalışmalarda pek çok farklı nanoparçacık sentezine rastlanmaktadır. Nanoparçacıkların bu sentez çalışmalarında kaynak oluşturması; artan biyoyararlanım, doz orantılılığı, daha küçük doz formu, daha az toksisite, artan yüzey alanı, aktif maddenin insan vücudu gibi sulu bir ortamda daha hızlı çözünmesi ve absorplanması gibi pek çok avantaja sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Lal Pal vd.,2011).

2.3.5 Nanoparçacıklar ve ilaç dağıtım sistemleri

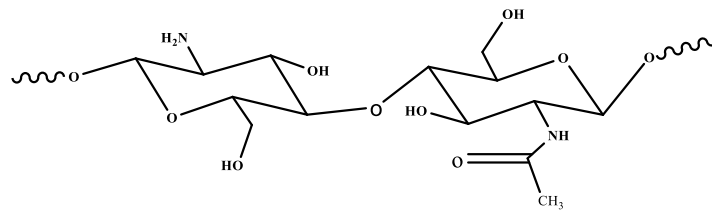
İlaç dağıtım sistemleri, ilaçları vücudun içine ve hedef bölgelere taşıyan teknolojileri tanımlamaktadır. İlaç dağıtım sistemleri ayrıca, ilacı bozunmaya karşı koruyan ve vücutta hedef bölgeye gitmesini sağlayan, bir misel veya nanoparçacık gibi ilaçların "paketlenme" şeklini de tanımlayabilmektedir. İlaç dağıtım sistemleri alanı son yıllarda önemli ölçüde ilerlemekte ve bu alanda önümüzdeki yıllarda daha da büyük ilerlemeler beklenmektedir. Günümüzde birçok hastalık tedavisinde süre gelen ilerlemelere rağmen tedavilerin hala kabul edilemez yan etkileri vardır. Yan etkiler, ilaçların sağlıklı organ veya dokularla etkileşime girmesi nedeniyle ortaya çıkmaktadır ve bu, kanser, nörodejeneratif

hastalıklar ve bulaşıcı hastalıklar gibi birçok hastalığı tedavi etmeyi sınırlamaktadır. İlaç taşıma sistemleri alanındaki devam eden çalışmalar, ilaçların yan etkilerini azaltırken hedeflenen bölgeye iletilmesini kolaylaştırmaya yardımcı olacaktır (Allen ve Cullis, 2013; Bamrungsap vd.,2012; Couvreur,2013; Kopeček ve Yang, 2007; Lee vd.,2015;).

İlaç dağıtım sistemlerinde kullanılan sistemlerin sınıflandırılması; katı lipit nanoparçacıklar, miseller, lipozomlar, niozomlar, dendrimerler, nanojeller, nanoemülsiyonlar, nanokristaller, karbon nanotüpler ve moleküler baskılama şeklinde yapılabilmektedir (Sayiner ve Çomoğlu,2016). Bu sistemler içerisinde bulunan nanojel taşıyıcılardan birine örnek olarak kitosan-TPP çapraz bağlanması ile oluşan nanojel formu verilebilmektedir.

2.3.5.1 Kitosan nanoparçacıkları

Kitinin deasetillenmiş bir türevi olan kitosan, katyonik bir aminopolisakkarittir. Kitosan yapısında N-asetil-D-glikoz amin ve D-glikoz amin monomerlerini içermektedir (Şekil 2.18). Kitosanın tipik molekül ağırlığı 300-1000 kDa arasında olup elde edildiği kitinin kaynağına göre değişmektedir. Kitosan kitinin deasetillenmesi ile farklı deasetilasyon yüzdelinde elde edilebilmesinin yanı sıra kısıtlı da olsa mantarlar gibi doğal kaynaklardan direkt olarak elde edilebilir. Kitosan biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve toksik değildir, bu nedenle antimikrobiyal ve yara iyileştirici biyomalzemeler gibi tıbbi uygulamalarda kullanılabilir. Kolesterol, yağlar, proteinler ve metal iyonları ile bağlanma kabiliyeti nedeniyle şelatlama maddesi olarak da kullanılır (İbrahim ve El-Zairy, 2015).



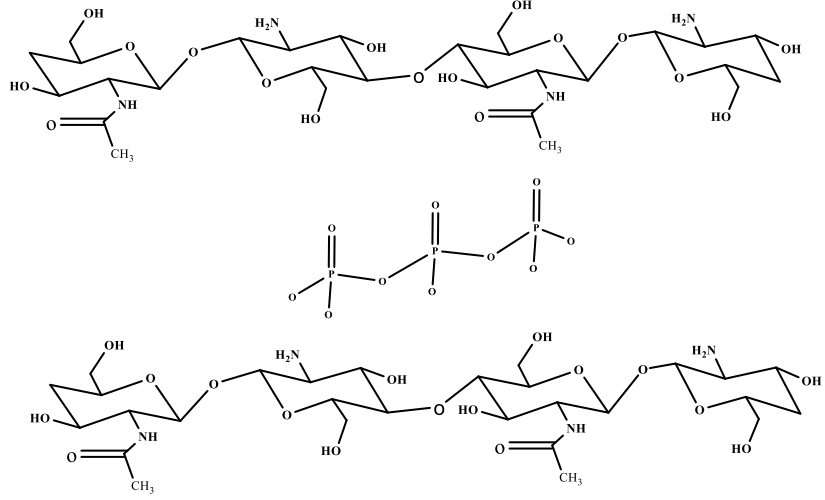
Şekil 2.18 Kitosan Yapısı (Singha vd.,2022)

Kitosanın tarihi, Rouget (Rouget,1859)'in 1859'da kitosanın deasetillenmiş formunu tartıştığı geçen yüzyıla kadar uzanmaktadır. Son 20 yılda, bu polimer ve onun çeşitli uygulamalarında potansiyel kullanımı hakkında önemli miktarda çalışma yayınlanmıştır. Son zamanlarda, kitosan, absorpsiyonu arttırıcı, kontrollü

salım ve biyo-uyumlu özelliklerine odaklanılan farmasötik formülasyon ve ilaç salım uygulamaları için birçok çalışmada kullanılmıştır (Hirano vd.,1990). Mukozal yol, oral, nazal, pulmoner veya vajinal yollarla ilaç iletimi dikkat çekmektedir (Rampino vd.,2013).

Kitosan bazlı nanoparçacık üretim yöntemleri kolayca ölçeklenebilmekte ve geniş bir ilaç yelpazesine uygulanabilmektedir. Tüm nanoparçacık ilaç dağıtım yaklaşımları arasında, polimerik nanoparçacıklar, biyolojik olarak parçalanabilir, biyoyumlu olduklarından ve formülasyon yöntemlerinin daha yaygın olarak bulunmasından dolayı önem kazanmıştır; uygulama yelpazesi, çeşitli kimyasal ilaç sınıflarını ve dozaj formlarını içerecek şekilde genişletilebilmektedir (Nagpal vd.,2010). Kanseri, mide-bağırsak hastalıkları, akciğer hastalıkları, beyne ilaç taşınması ve göz enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılırlar. (Mohammed vd.,2017).

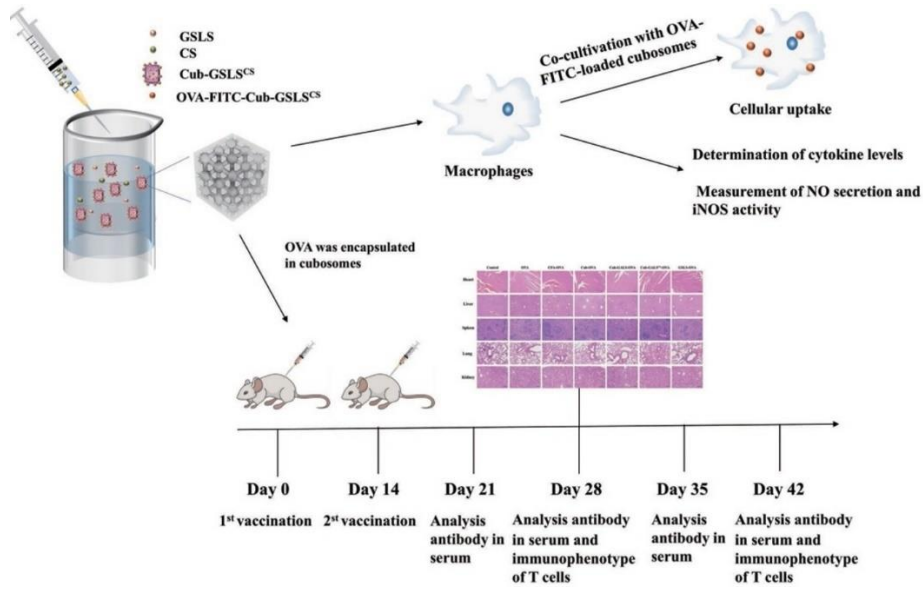
Kitosan-TPP çapraz bağlanması: Polimer bazlı nanoparçacıkların hazırlanması, polimer zincirlerinin kovalent bağlarla çapraz bağlanmasıyla hidrojen bağları, elektrostatik kuvvetler veya hidrofobik bağlanma gibi fiziksel etkileşimlerden yararlanılarak gerçekleştirilir (Jonassen ve Kjøniksen, 2011). Yararlanabilecek çekici kuvvetler parçacıkların hazırlanma aşamasında zaman içinde hem büzülmesine hem de topaklaşmasına neden olabilmektedir. Kitosan, amin gruplarının protonlanması nedeniyle asidik bir ortamda kolayca çözünmektedir. Ortaya çıkan pozitif yük, tripolifosfat (TPP) gibi çok değerlikli anyonlarla iyonotropik jelleşme yoluyla nanoparçacıklarının hazırlanmasını mümkün kılmaktadır (Şekil 2.19). Kitosan-TPP nanoparçacıkları hem küçük hem de büyük moleküler ağırlıklı ilaçların ilaç salımının iyileştirilmesi için çalışılmıştır (Dash vd.,2011; Park vd.,2010). Bu nanoparçacıkların özelliklerini etkilediği gösterilen önemli faktörler, kitosan konsantrasyonu, TPP-kitosan oranı, kitosanın moleküler ağırlığı, pH ve parçacık hazırlamada kullanılan çözünme ortamının iyonik gücüdür (Jonassen vd.,2012).



Şekil 2.19 Kitosan ve TPP çapraz bağlanması (Sullivan vd.,2018)

2.3.4.1 Saponin Yüklü Kitosan Nanoparçacıkları

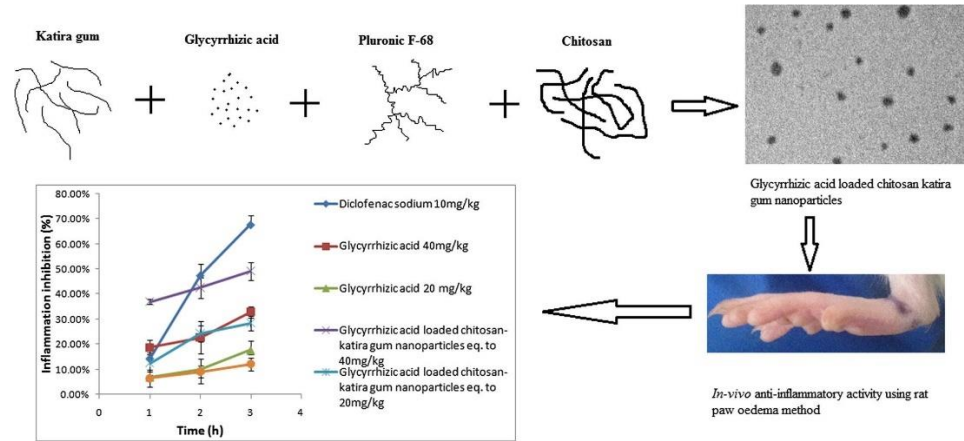
Polimerik ve biyobozunur taşıyıcı sistem araştırmalarına konu olan popüler kaynaklardan biri de saponin yüklü kitosanlardır. Literatürde bitki ekstraktları ile yapılan birçok çalışma olmasına karşın (Bajić vd., 2019; El-Aziz vd., 2018; Bhatia vd., 2011), saponinlerin bitkilerden saflandırılmasının zorluğu ve ticari satış fiyatlarının oldukça pahalı olması gibi sebepler ile saponin yüklü kitosan nanopartükülleri üzerine çalışmalar görece kısıtlıdır (Qiu vd.,2021; Rejinold vd., 2011; Kunjumona vd., 2021). Bu çalışmalardan birinde; kitosan ve saponin üzerine kapsülleme sistemi geliştirilmiştir. Bu amaçla kitosan (CS) ile modifiye ginseng saponin karışımı ile (GSLs) kapsüllenmiş kübozomlar (Cub-GSLSCS) oluşturulmuş ve bu kapsüllerin immünolojik aktivite ve adjuvan potansiyelleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda kitosan, nanoparçacıkları modifiye etmek için kullanılmış ve antijen dağıtım sistemi için pozitif yüklü bir nanokafes görevi görmüştür (Şekil 2.20) (Qiu vd.,2021).



Şekil 2.20 Ginseng ve kitosan çalışmasının grafiksel özeti (Qiu vd.,2021)

Başka bir çalışmada; *Sapindus emarginatus* bitki ekstresinden izole edilen saponin ile, saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının kanser hücre hatlarına gelişmiş, kontrollü ve sürekli dağıtımını sağlamak amacıyla TPP ile basit bir çapraz bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda; saponin yüklü kitosan nanoparçacıkları, sağlıklı hücreler için toksik değilken kanser hücreleri üzerinde spesifik toksisite göstermiştir (Rejinold vd., 2011).

2016 yılında Bernela ve arkadaşları *Glycyrrhiza glabra* bitkisinden elde edilen ve çeşitli farmakolojik özelliklere sahip bir triterpen saponin olan glisirizik asidin, biyoyumlu, biyopolimerik nanoparçacıklar içinde kapsüllenmesi yoluyla biyoyararlanımını ve etkinliğini artırmak için bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışmada polikasyonik kitosan ve polianiyonik zatk, iyonik kompleksleştirme yöntemiyle nanoparçacık hazırlamak için kullanılmıştır. Yapılan *in vivo* çalışmalarda, oral olarak uygulanan glisirizik asit yüklü kitosan-katıra sakız nanoparçacıklarının anti-enflamatuvar etkinliğinin, glisirizik asit çözeltilerinden önemli ölçüde daha yüksek olduğu ve dolayısıyla glisirizik asidin biyoyararlanımının arttığı ortaya konulmuştur (Şekil 2.21) (Bernela vd.,2016).



Şekil 2.21 Glisirizik asidin nanoparçacık çalışması (Bernela vd.,2016)

Kuş enfeksiyöz bronşitinden korunma amacıyla geliştirilen bir rekombinant DNA aday aşısı çalışmasında immünolojik etki ve koruyucu kapasite için bir kitosan ve saponin formüle edilmiş, kapsülleme ile nanoparçacık sentezlenmiştir. Çalışma sonucunda aşının kitosan-saponin nanoparçacık ile kapsüllemesinin bağışıklık tepkilerini daha da arttırdığı ve aşının birden fazla destekleyici uygulamasına olan ihtiyacı ortadan kaldırdığı görülmüştür (Bande vd., 2020).

2021 yılında Kunjumona ve arkadaşları nöroprotektif aktivitesi ile bilinen ve *Centella asiatica* bitkisinden izole edilen ursan tipi bir triterpenoid saponinin olan asiaticosit (ASI) ile çalışmışlardır. ASI kapsüllenmiş aljinat kitosan nanoparçacıklarının (ACNP'ler) anti-eksitotoksikite ve nöro koruyucu etkileri değerlendirilmiştir. ACNP'ler iyonik jelleşme polielektrolit kompleks yöntemi ile hazırlanmıştır. Biyolojik aktivite çalışmaları, ACNP'lerin fare nöral kök hücreleri (mNSC'ler) için toksik olmadığını ortaya çıkarmış ve farelerin nöbet sayısında azalma görülmüştür (Kunjumona vd., 2021).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1 Malzemeler ve cihazlar

Bu çalışmada, çeşitli kromatografik teknikler, spektroskopik cihazlar, uygun adsorbanlar ve çözücü ve/veya çözücü karışımlarından faydalanılmıştır. İnce tabaka kromatografisi (İTK), izolasyon ve saflaştırma çalışmaları sırasında bileşenlerin belirlenmesi, sürecin izlenmesi ve son ekstrelerin taranması için laboratuvar çalışmalarında kullanılmıştır. İnce tabaka kromatografisi için silika jel F254 (Merck 5554) ve RP-18 F254S (Merck 5560) ön kaplamalı plakalar kullanılmıştır. İTK plakalarında farklı çözücü sistemleri kullanılmıştır. İTK'deki spotlar %20'lik H₂SO₄'in sulu çözeltisi püskürtülerek ve ardından 120 °C'de ısıtılarak görünür hale getirilmiştir. UV aktif bileşenler 254 ve 366 nm'de UV ışığı altında tespit edilmiştir. Orta Basıncılı Sıvı Kromatografisi (OBSK), Büchi sistemi (Büchi/kontrollü pompa ve C-615; Büchi/pompası C-605; Büchi/UV Fotometri C-635; Büchi/Fraksiyon kollektörü C-660) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hem açık kolon kromatografisi (KK) hem de OBSK çalışmaları için Lichroprep RP-18 (25-40 µm, Merck 9303) ve silika jel 60 (0.063-0.200 mm, Merck 7734) adsorbanları kullanılmıştır. OBSK ve diğer saflaştırma prosedürleri için kullanılan çözücüler metanol (Honeywell chromasolv™, ≥99,9%, Lot No. K048S) ve kloroformdur (Carlo Erba V0M075260M). Ekstrelerin süzülme ve diğer filtrasyon işlemleri için Sartorius Quantitative Grade 388 filtre kâğıdı kullanılmıştır. Açık kolon kromatografisi işlemleri için fraksiyonları toplamak üzere Spectra/Chrom® CF-1 fraksiyon kolektörü kullanılmıştır. Uçurma işlemleri için Büchi vakumlu evaporatör cihazı (Büchi Rotator kontrolörü/Rotavapor RII, Büchi Vakum Kontrolörü/V-850, Büchi Vakum Pompası/V-700) kullanılmıştır. *In vitro* sitotoksik aktivite çalışmalarında dulbecco modifiye eagle medium F-12 (DMEM/F12), roswell park memorial institute medium (RPMI-1640), tripsin-EDTA, penisilin/streptomisin, fetal sığır serumu (FBS) ve fosfat tamponlu salin (PBS) kullanılmıştır. Gibco (ABD). doksorubisin, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) ve dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma Aldrich'ten (ABD) temin edilmiştir.

3.1.2 Bitki Materyali

Türkiye'de Güney Doğu Anadolu'ya özgü, *Cephalaria* Schrad. ex Roem. et Schult. (Caprifoliaceae) türlerinden biri olan *Cephalaria sumbuliana* bitkisi (Caprifoliaceae) Eylül 2017'de 1435 m rakımdan Konya-Seydişehir, Seydişehir-

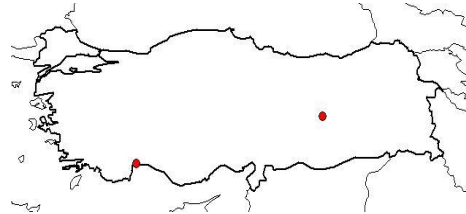
Akseki karayolundan 21 km uzaklıktan yol kenarından toplanmıştır (Şekil 2.1). *Cephalaria elmaliensis* (Hub.-Mor. & Matthews), Temmuz 2017'de Antalya-Elmalı, Çiğlikara'da yaklaşık 1750 m rakımdan toplanmıştır (Şekil 2.2). Bitkilerin botanik tanımlaması H. Sümbül ve R. S. Göktürk (Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından yapılmıştır ve Akdeniz Üniversitesi Herbaryum Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde depolanmıştır (*C. sumbuliana*: H. Sümbül 3217; *C. elmaliensis*: R. S. Göktürk 6097).

Cephalaria sumbuliana; sert, dikenli ve rizom köklere sahip çok yıllık bir bitkidir. Uzunluğu 1,3 m sert, çiçekleri yoğun yıldız şeklinde çizgilidir. İnvolukral brahte boyutu $6-9 \times 5-9$ mm, alt yaprakları geniş ve oval orbiküler, tepe şekli açık, meyvesi 1,5-2,5 cm çapında, rengi ise tamamen saman renginde, taç yaprakları ise krem ya da açık sarı rengindedir (Şekil 3.1) (Göktürk ve Sümbül, 2012).

Cephalaria elmaliensis; Hub.-Mor. & Matthews (Şekil 3.2), ağırlıklı olarak güneybatı Anadolu bölgesinde yaklaşık 1700 m rakımda yaygın olan endemik bir türdür (Davis, 1972). Yıldızsı tüylerle kaplı ince uzun ömürlü, 50 cm'ye kadar gövdeler mızrakı, tam veya tırtıklı-dişli; gövde yaprakları küçüktür.



Şekil 3.1 *Cephalaria sumbuliana* bölgesel konumu ve bitki fotoğrafı



Şekil 3.2 *Cephalaria elmaliensis* bölgesel konumu ve bitki fotoğrafı

3.2 Analiz Yöntemleri

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR)

1 ve 2 boyutlu NMR ölçümleri, DMSO- d_6 'da Varian AS 400 MHz ve Varian ASP 600 MHz NMR cihazları ile yapıldı. Dahili standart olarak TMS kullanıldı ve J değeri Hz cinsinden alındı.

Kütle Spektrometrisi (HR-ESIMS)

Kütle spektrometrisi analizi HR-ESIMS, Bruker LC mikro-Q-TOF kütle spektrometresi ile ölçüldü, GK/MS analizi, Shimadzu GK-MS QP 2010 plus cihazı ile yapıldı.

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

FTIR spektroskopi analizi, hazırlanan saf SP, saf CS, CSNP'ler ve SPCSNP'lerin fonksiyonel gruplarının tespit için, iki spektrometre (Perkin Elmer, UK) üzerinde 4000 ila 500 cm^{-1} aralığında bir FTIR spektrum da numune başına 12 tarama ve 4 cm^{-1} çözünürlüğe sahip KBr peletleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

Hazırlanan CSNP'lerin ve SPCSNP'lerin ortalama partikül boyutunu, polidispersite indeksini (PDI) ve zeta potansiyelini (ζ) belirlemek için bir Malvern Panalytical ZetaSizer Ultra'da (Malvern, UK) DLS yöntemi kullanıldı. Dağıtıcı ortam olarak saf su kullanıldı. Kırılma indeksleri 1,330'a ayarlandı (viskozite (CP) 0,8872). Belirli miktarda numune 5 ml saf su içinde süspansiyon haline getirildi ve 1 dakika vortekslendi. Her numune, 25°C'de 90°'lik bir saçılma açısında (yan saçılma açısı) üçlü olarak analiz edildi.

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

CSNP'lerin ve SPCSNP'lerin yüzey morfolojisini incelemek için Taramalı Elektron Mikroskobu kullanıldı. Numuneler, kritik nokta kurutması (CPD, Emitech) ile kurutuldu ve alüminyum tabaka üzerine monte edildi ve ardından bir Sputter kaplayıcı model E-1010 (Emitech) kullanılarak altınla kaplandı.

Numuneler, 15 kV hızlandırma voltajı ile taramalı elektron mikroskobu Thermo Scientific Apreo S (Hitachi, Japonya) kullanılarak incelendi.

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Sentezlenen nanopartiküllerin morfolojisi, 100 kV hızlandırma voltajına sahip HT7800 (Hitachi, Japonya) kullanılarak transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile analizlendi. Numuneler formvar kaplı gride damlatılıp havada kurutulduktan sonra incelendi.

Termal Gravimetrik Analiz (TGA)

CSNP'lerin ve SPCSNP'lerin termal davranışı, Thermogravimetric Analyzer, PYRIS Diamond TG-DTA (Perkin Elmer, UK) kullanılarak belirlendi. 5-10 mg numuneler, 20 ml/dk akış hızında nitrojen atmosferinde 10°C/dk hızında 30°C ila 600°C'ye ısıtıldı.

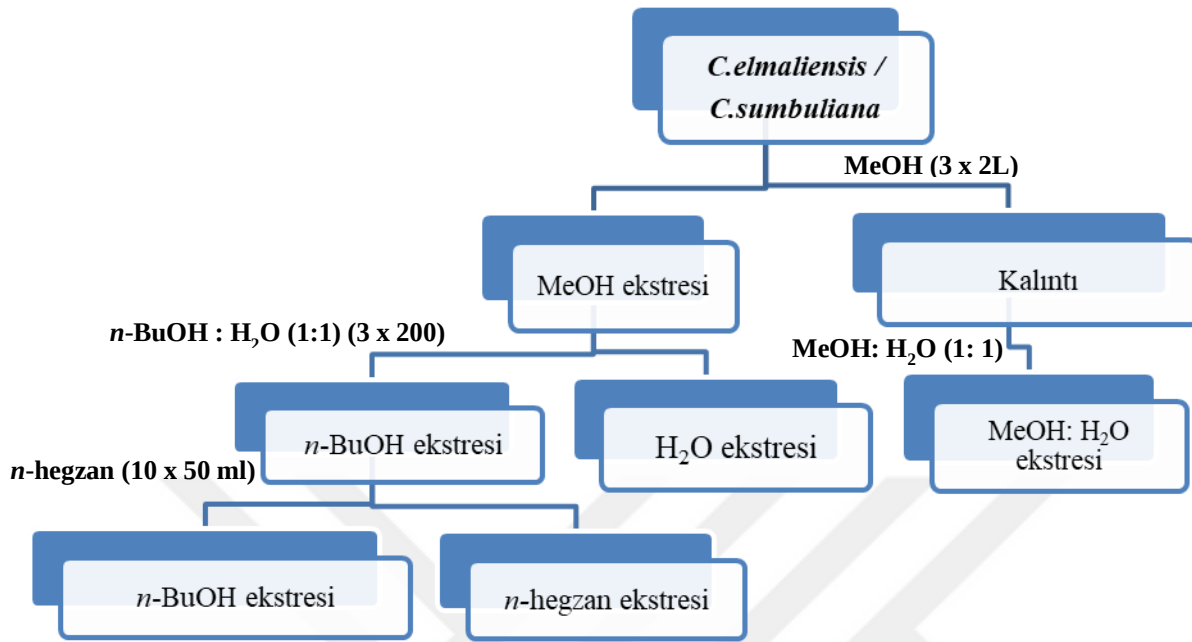
X-Ray Fotoelektron Spektrometresi (XPS)

CSNP'lerin ve SPCSNP'lerin kristal davranışlarının tanımlanması, radyasyon kaynağı olarak Al Ka (1486.68 eV) kullanılarak Thermo Scientific K-Alpha (Hitachi, Japonya) ile X-Ray Fotoelektron Spektrofotometresi (XPS) kullanılarak yapıldı. C1s, N1s, O1s ve P2p için tam tarama algılanır.

3.3. Ekstraksiyon, İzolasyon ve Saflandırma İşlemleri

3.3.1 Ekstraksiyon işlemleri

Tüm *Cephalaria* türlerinin taze bitki materyalleri oda sıcaklığında gölgede, bir hafta süreyle kurutuldu. İki ayrı bitkinin havadar bir ortamda kurutulan ve toz haline getirilen toprak üstü kısımlarına, oda sıcaklığında bir gece MeOH (3 x 2L) içinde bekletilerek üç kez ekstraksiyon yapıldı. Elde edilen iki farklı bitki ekstresi süzülükten sonra, ~40°C'de vakum altında konsantre edildi. Konsantre ekstre, *n*-BuOH:H₂O (1:1) (3 x 200 mL) ile sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Bu işlemten sonra *n*-BuOH fazı evaporasyon ile kuruluğa getirildi. Ardından bu fazın klorofil ve yağsı kısımları *n*-hegzan dekantasyonu (10 x 50 mL) ile ayrıldı (Şekil 2.3). Son olarak saponince zengin *n*-BuOH ekstresi elde edildi. Şekil 3.3'de ekstraksiyon işlemlerinde izlenen yol ve detaylar görülmektedir.



Şekil 3.3 *C. elmaliensis* ve *C. sumbuliana* bitki ekstraksiyon işlemi

3.3.2 İzolasyon ve Saflandırma İşlemleri

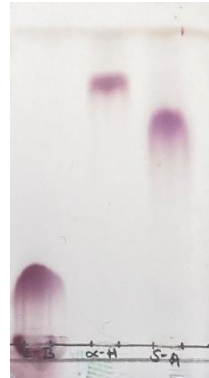
3.3.2.1 *Cephalaria elmaliensis* üzerindeki izolasyon ve saflandırma işlemleri

42.5 gram *n*-BuOH ekstresi vakum sıvı kromatografisi (VSK) ile ters faz (RP) silika jel dolgu maddesi ve %10: %90 MeOH: H₂O'den başlayarak %100 MeOH'e giden çözücü sistemi kullanılarak 11 fraksiyona ayrıldı. Bu yöntemden elde edilen 7 ve 8 fraksiyonlarının karışımı, açık kolon kromatografisinde (KK) toplamda 30 fraksiyon verecek şekilde CHCl₃: MeOH: H₂O (80:20:2 → 61:32:7) çözücü sistemi yardımıyla kademeli olarak bileşenlerine ayrıldı. Elmalienoside B saponini (1.3 g), 15-17 fraksiyonların birleştirilmesi sonucu saf olarak elde edilmiştir.

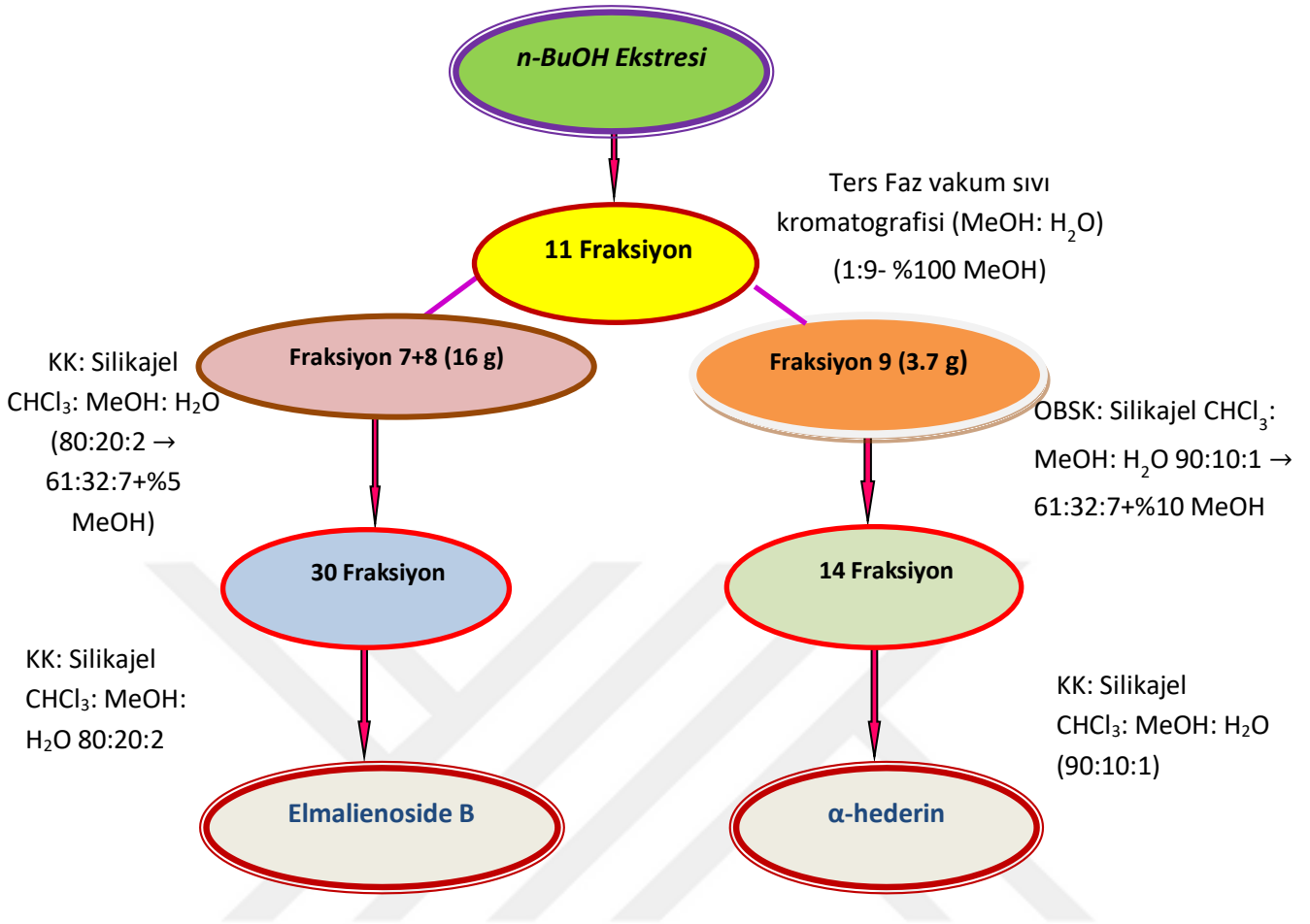
VSK'den elde edilen başka bir fraksiyon (Fr. 9), orta basınçlı sıvı kromatografisi (OBSK) cihazına verilerek (Adsorban: silika jel, 36 mm x 460 mm buchi cam kolon, solvent sistemleri CHCl_3 : MeOH: H_2O 90:10:1 $\rightarrow$ 61:32:7+%10 MeOH, akış hızı: 30 mL/dk, maks. basınç: 30 bar) kromatografik işleme tabi tutuldu ve 14 fraksiyon elde edildi. 6. fraksiyon silikajel KK ve uygun çözücü sistemi ile (CHCl_3 : MeOH: H_2O 90:10:1) saflandırılarak, α -hederin (200 mg) saponini elde edildi.



Şekil 3.4. TF-VSK işlemi



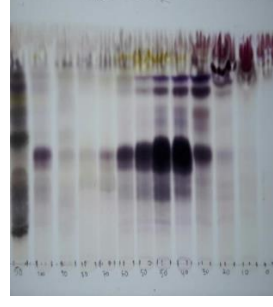
Şekil 3.5 Tez çalışmasında kullanılan saponinlerin İTK görünümü



Şekil 3.6 *C. elmaliensis*'ten elde edilen saf saponinlerin saflaştırma yolu

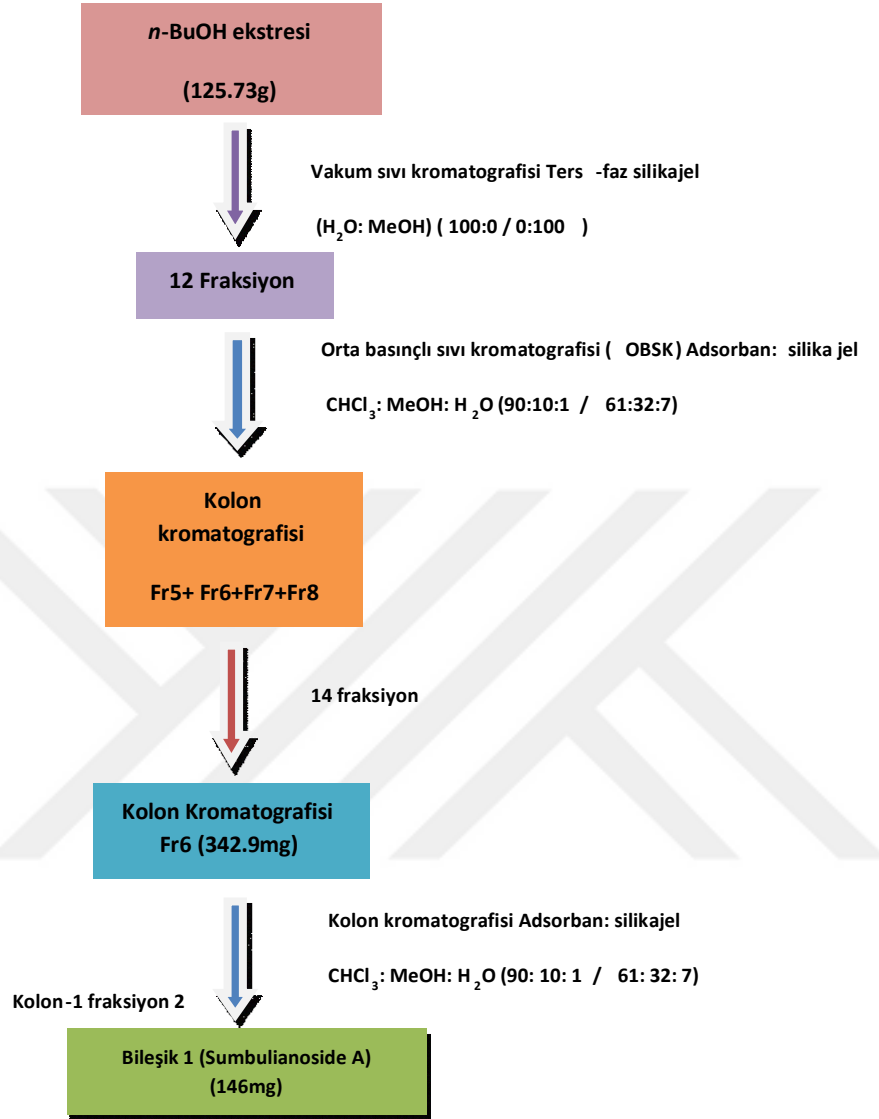
3.3.2.2. *Cephalaria sumbuliana* üzerindeki izolasyon ve saflandırma işlemleri

Bölüm 2.3.1 ekstraksiyon işlemlerindeki şekilde hazırlanan hegzan ekstresinden sonra kalan *n*-BuOH ekstresi 125.73 g'dır. Bu kalan ekstrenin hepsi, ters faz-vakum sıvı kromatografisi ile (TF-VSK) (Şekil 3.4) H₂O: MeOH (100:0 → 0:100) çözücü sistemi yardımı ile 12 adet kaba fraksiyona (Şekil 3.7) ayrıldı.



Şekil 3.7 VSK fraksiyonlarının İTK'sı

Şekil 3.7'deki ince tabaka üzerinde yoğun mor renge sahip saponince zengin fraksiyonlardan %60, %50, %40 ve %30 MeOH ters faz-vakum sıvı kromatografi fraksiyonları birleştirildi (18.18 g). Birleştirilen fraksiyonlar orta basınçlı sıvı kromatografisi ile 36 x 460 mm Buchi cam kolon ve uygun program [akış hızı: 25 mL/dk., maksimum basınç: 30 bar, CHCl₃: MeOH: H₂O (90:10: 0.5 → 61:32:7)], 14 fraksiyon verecek şekilde alt-fraksiyonlara ayrıldı. OBSK'nın 6. fraksiyonundan CHCl₃: MeOH: H₂O (90:10:1 → 61:32:7) çözücü sistemi kullanılarak açık kolon kromatografisi ile 6 fraksiyon elde edildi ve 2. fraksiyondan sumbulianoside A (146 mg) saf olarak elde edildi (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 *C. sumbuliana*'dan sumbulianoside A saponinin izolasyon işlemleri

3.4 Saponinlerin Yapı Tayini Çalışmaları Sırasında Uygulanan Kimyasal İşlemler

Saflandırılan saponinlerin yapılarının tayin çalışması sırasında yapıları kesinleştirmek adına birtakım kimyasal çalışmalar yapılmıştır. Şekerlerin esterik ve eterik bağlantılı olup olmadıkları sırasıyla asidik ve bazik hidroliz yapılarak

tespit edilmiştir. NMR analizlerinde birbirlerinin epimeri olan şekerlerin benzer değerler vermesi nedeniyle; asidik hidroliz sonrası saponinlerde bulunan tüm şekerler ayrılarak sililleme reaksiyonu sonrasında standart şekerler ile karşılaştırmalı olarak, saponindeki şekerler GK-MS yöntemi ile kesin olarak belirlenmiştir.

3.4.1. Bazik Hidroliz

Bis-dezmosidik triterpen glikozitlerde bulunan şeker parçalarının esterik bağlı olup olmadıklarını netleştirmek ve hangi şekerlerin esterik bağlı olduğunu belirlemek için aşağıdaki yöntemle saponinler bazik hidrolize tabi tutulmuştur.

Bu yöntemde tüm glikozitler (her biri 10-20 mg) %5 KOH'in sulu çözeltisi ile (pH 12-13) ile 80°C'de 1 saat geri soğutulmuştur. Daha sonra reaksiyon karışımları %5'lik HCl'in sulu çözeltisi ile nötralize edildi ve kuruyana kadar konsantre edildi (Çalış vd., 1996). Kalıntılar, *n*-BuOH:H₂O karışımı ile ekstre edilerek ayrıldı ve saf prosapogeninleri içeren *n*-butanol ekstresi NMR ve HR-ESIMS spektroskopisi ile tekrar analiz edildi.

3.4.2. Asidik Hidroliz

Glikozitlerin birimlerinin kesin bir şekilde belirlenmesi için asidik hidroliz yapıldı. Glikozitlerin şeker analizi iki yöntemle gerçekleştirilmiştir; İTK plakasında mikro hidroliz tekniği ve standart şeker örnekleri ile GK-MS analizi (Su vd., 2001; Kırmızıgül vd., 1996).

Mikro-hidroliz tekniğinde, saf bileşikler bir İTK tabakası (silika jel HF 254) üzerine uygulandı ve asidik buhara doymuş kapalı bir kapta 60 °C'de 40 dakika süreyle derişik HCl buharı ile muamele edildi. Kap soğutulduktan ve fazla HCl plakadan uzaklaştırıldıktan sonra, şeker referansları bir İTK tabakasına uygulandı. İTK tabakası CHCl₃: MeOH: H₂O: gAcOH /16:9:2:2 çözücü sistemi kullanılarak yürütüldü. Bileşiklerin tespiti için; α -naftol-H₂SO₄ (%2) çözeltisi tabakaya püskürtüldü ve yaklaşık 120 °C'de ısıtıldı. İTK tabakasında heksozlar mor spot, 6-deoksi şekerler turuncu spot ve pentozlar mavi spot verdi. Ayrıca spotların R_f değerleri monosakkaritler ile karşılaştırılarak saponinlerin şeker türleri kesin olarak belirlenmiştir (Su vd., 2001).

GK-MS analizleri için öncelikle her bir bileşik (5 mg) 2 mL HCl ile 90 °C'de 6 saat hidrolize edildi. CHCl₃ (3 x 5 mL) ile ekstraksiyondan sonra, su fazı kuruyana kadar buharlaştırıldı. Şeker kalıntılarını içeren su ekstresi susuz piridin (1 mL) içinde çözüldü ve ardından 1 mL HMDS-TMCS (heksametildisilazan-trimetilklorosilan, 1:1) ilave edildi ve karışım 70 °C'de 1 saat geri soğutma işlemine tabi tutuldu. Elde edilen karışım, N₂ gazı altında uçuruldu ve daha sonra *n*-heksan (1 µL) ile çözüldü ve son olarak standart silillenmiş şekerler ile karşılaştırmalı analiz GK-MS ile yapıldı (Kırmızıgül vd., 1996).

3.5 Saponin Yüklü Kitosan Nanoparçacık Sentezi

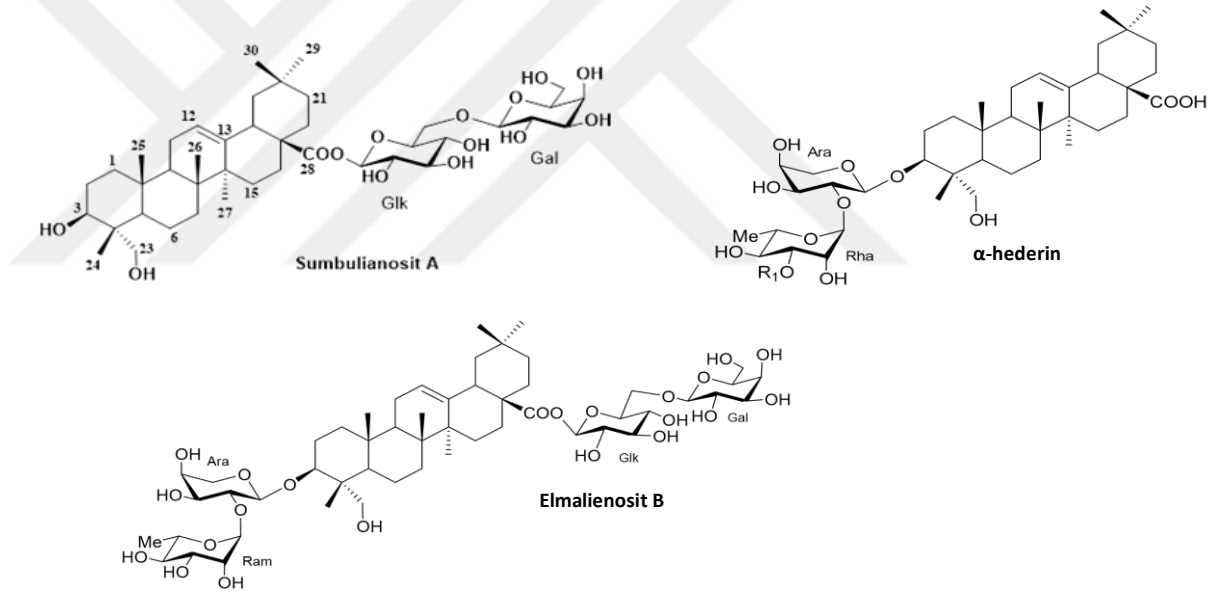
Nanoparçacık sentez çalışmalarında kullanılan üç farklı saponin bileşiğinin yapıları Şekil 3.9'da gösterilmiştir. Kullanılan ilk saponin α -hederin; literatürde farklı hücre hatlarında sitotoksik aktivitesi tespit edilen (Rooney ve Ryan, 2005) monodesmosidik yapıda bir saponin olup, şeker bağlı olmayan ucunda serbest bir karboksilik asit grubu bulunmaktadır. Bu saponin *Cephalaria elmaliensis* bitkisinden izole edilip, saflandırılmış ve yapısı tayin edilmiştir (Sarıkahya ve Kırmızıgül, 2012). Sentez çalışmalarında kullanılan ikinci saponin sumbulianoside A, *Cephalaria sumbuliana* bitkisinden elde edilmiş ve kesin yapısı karakterize edilmiş, monodesmosidik yapıda bir saponin olup, şekerler karboksil grubuna esterik bağlıdır ve serbest hidroksil grubu vardır. Literatürde sitotoksik aktivite potansiyeli kanıtlanan bu saponinde nadir olarak sekonder alkol grubu serbest olarak bulunmaktadır (Abacı vd., 2022). Nanoparçacık sentez çalışmalarında üçüncü olarak kullanılan elmalienoside B bileşiği ise; bisdesmosidik yapıda ve yapılan çalışmalarla immunomodülatör etkinliği tespit edilen dört şekerli bir saponindir (Sarıkahya vd., 2018). Elmalienoside B saponini ilk kez *Cephalaria elmaliensis* bitksinden elde edilmiş, kesin yapısı belirlenmiş ve ismini bu bitkiden almıştır (Sarıkahya ve Kırmızıgül, 2012). Bu saponinin yapısında ise diğerlerinden farklı olarak serbest bir karboksil ve alkol grubu bulunmamaktadır. Seçilen üç farklı saponinin UV-Vis spektrofotometrik analizleri ve optimizasyon çalışmaları yapıldı. Saponinler UV aktif olmadığından, aktif hale getirilmesi için kolorimetrik yöntemden yararlanıldı (Hiai vd.,1976).

3.5.1 UV-Vis Spektrofotometresi ile Optimizasyon Çalışmaları

İlk aşamada saponinin etanol çözeltisinden 0,5 ml alınarak, 0,5 ml %8 (a/h) vanilin çözeltisi ve ardından 5,0 ml %72 (h/h) sülfürik asit ilave edilerek karıştırıldı. Karışım, 60°C'de 18 dakika süreyle su banyosunda ısıtıldı, ardından

soğuk suda 5 dakika bekletildi. Vanilin ve sülfürik asit ile birlikte saponin güçlü bir sarı renk verdi. (Hiai vd.,1976).

Reaksiyona etki eden parametreler (sıcaklık, zaman, vanilin ve asit oranları) değiştirilip absorban miktarındaki değişim gözlemlendi. Üç farklı sıcaklık 60°C, 40°C ve 25°C sıcaklığında UV analizleri sırasında saponinlerin absorban değerlerini nasıl etkilediği gözlemlendi. Daha sonra reaksiyon süreleri ve UV analizinden önce bekletilme süreleri (10 dak., 20dak., 30 dak.) değiştirilerek en uygun zaman aralığı belirlendi. Vanilin miktarı için %4, %8, %12 oranlarında çalışılarak absorban değerlerindeki değişimler incelendi. Vanilin oranlarına ek olarak farklı oranlardaki asit (%12, %36, %50, %72) ile reaksiyon gerçekleştirildi ve absorban değerlerine olan etkileri gözlemlendi. Yapılan çalışmalar sonucunda üç farklı saponin absorban değerleri karşılaştırıldı. Sentez için kullanılacak saponin bu absorban değerleri göre belirlendi.



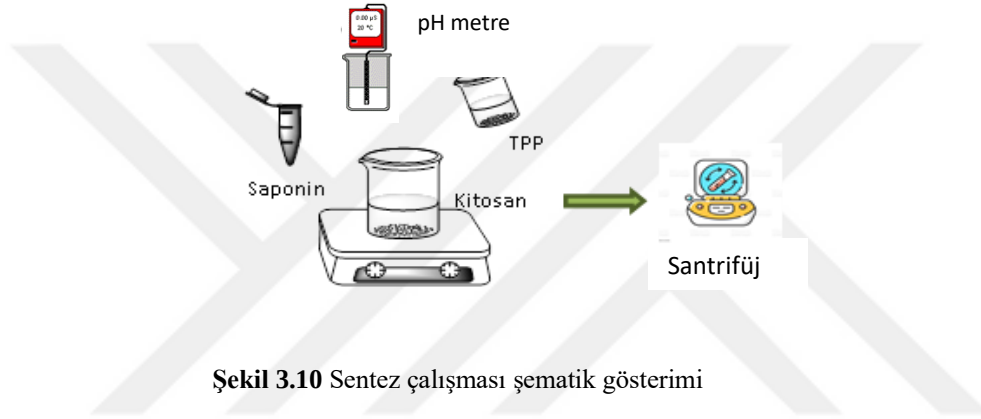
Şekil 3.9 UV-Vis spektrometresinde ölçümleri alınan saponinlerin yapıları

3.5.2 Kitosan nanoparçacıkların sentezi

Kitosan nanoparçacıkların (CSNP) hazırlanmasında iyonik jelleşme yöntemi kullanıldı. Literatürde farklı konsantrasyonlarda çalışılmış kitosan (CS) konsantrasyonu % 0.2 olarak belirlenmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan tripolifosfat (TPP)'nin ise % 0,75'lik çözeltisi hazırlanmıştır. Kitosan tartılıp, %1'lik asetik asit çözeltisi ile çözünüldü. Kitosan çözeltisinin istenilen 4.6-4.8

aralığında pH değerine getirilmesi için 5M NaOH kullanıldı. Konsantrasyonu 7.5 mg/ml TPP çözeltisi hazırlandı. Daha sonra, çözünmüş TPP, kitosan çözeltisine manyetik karıştırıcı altında yavaşça damlalık ile damlatıldı (Şekil 3.10).

Alfa-hederin saponini 5 mg tartılıp etanol ile çözelti hazırlandıktan sonra kitosan-TPP çözeltisine eklendi. Bu çözelti manyetik bir karıştırıcıda 900 rpm'de üç saat karıştırıldı. Çözelti 30 dakika (14.800 rpm, 25 °C) santrifüjlendi. Santrifüj işlemi sonucunda süpernatant ve pellet oluşumu gözlemlendi. Üst faz ayrı bir flakona alındı ve pelletin saf su ile yıkaması gerçekleştirildi. Pelletler vakum etüvünde 25°C de kurutuldu.



3.5.2.1 Enkapsülasyon verimi (%EE)

Enkapsülasyon verimi, SPCSNP'lerin sentezinde santrifüjlemeden sonra elde edilen süpernatant kullanılarak UV-Vis spektrofotometre ile belirlendi. Optimize edilmiş kalorimetrik yöntemi ile süpernatandaki SP'ler aktive edildi. CSNP'lerin süpernatantı referans çözeltisi olarak kullanıldı. SPCSNP'lerin süpernatantından elde edilen absorbans değerinin kapsüllenmemiş SP değerini vereceğinden hareketle enkapsülasyon verimi aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$EE (\%) = \frac{\text{Başlangıçtaki saponin miktarı} - \text{Serbest saponin miktarı}}{\text{Başlangıçtaki saponin miktarı}} \times 100$$

3.6 *In vitro* Sitotoksik Aktivitenin Belirlenmesi

Ham ekstreden izole edilip, saflaştırılan ve yapı tayini yapılan alfa-hederin saponini, sentezlenen kitosan nanoparçacığı ve saponin yüklü kitosan nanoparçacığının *in vitro* sitotoksik aktivitesi MTT yöntemi ile belirlendi. Örneklerin kanser olmayan ve kanser hücre hatları üzerine olan etkisi MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] hücreproliferasyon testi ile yapılmıştır. Bu yöntem E.Ü. Biyomühendislik Bölümü, “İmmunobiyoteknoloji ve Biyoaktivite Tarama Laboratuvarında” uzun yıllardır kullanılan bir yöntem olup XTT, XTS, WST-1 gibi daha önce denenilen metodolojilere göre daha ekonomik olması, ayrıca ölçüm aralığının geniş olması (104 hücre/ml gibi düşük canlı hücre sayısını tespit edebilmesi) nedeniyle tercih edilmektedir. Sitotoksikite testlerinde kullanılacak hücre hatları; sağlıklı insan hücre hattı 34LU (sağlıklı insan akciğer fibroblast hücreleri) ve insan kanser hücre hatları PC-3 (insan prostat adenokarsinoma), MDA-MB-231 (insan göğüs adenokarsinoma), SHSY5Y (nöroblastoma hücre hattı), PANC1 (pankreatik kanser hücresi) hücreleridir. Kültürlerin sürekliliğinin sağlanması için hücreler, DMEM/F12 besiyeri, %10 FBS, 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin ile kültüre edilmiştir. Hücreler %5 CO₂ içerisinde, nemli atmosferde, 37 °C’de 25 cm²’lik ve 75 cm²’lik T-flasklarda inkübe edilerek, haftada iki kez Tripsin-EDTA ile tripsinize edilerek pasajlanmıştır. Logaritmik fazda aktif olarak çoğalan hücreler testlerde kullanılmıştır.

MTT, hücre canlılık ve proliferasyon testi

Örneklerin sitotoksikitesi, süksinat dehidrojenaz (canlı hücreler için bir mitokondriyal enzim) aktivitesini saptayan kolorimetrik bir teknik olan MTT testi ile belirlendi (Nalbantsoy ve diğerleri, 2011; Mossman, 1983). Bu amaçla, SH-SY5Y, PC-3, PANC-1, HL-60 ve CCD-34Lu, başlangıç konsantrasyonu 1x10⁵ hücre/ml olan 96 oyuklu mikrolakalara ekilmiştir. Daha sonra hücreler nemli ortamda 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler, 37 °C’de 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda numune molekülleri (CsNp ve CsNpSp: 200, 100 ve 50 µg/ml; Saponin: 50, 5, 0.5 µg/ml) ile muamele edildi. Pozitif kontrol olarak doksorubisin kullanıldı (20, 2 ve 0.2 µg/ml). İşlem konsantrasyonu, saf bileşikler için µM olarak verildi. Formazan kristallerinin optik yoğunluğu, UV görünür spektrofotometre (Thermoscientific Microplate Reader, Singapur) ile 570 nm’de (referans filtre, 690 nm) ölçülmüştür. Hücre canlılığı (%) aşağıdaki formülle hesaplandı:

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{\text{Test örneği ile muamele edilen hücre absorbanısı} - \text{boş kuyucuğun absorbanısı}}{\text{kontrol hücre absorbanısı} - \text{boş kuyucuğun absorbanısı}} \times 100$$

IC₅₀ değerleri $\pm$ %95 güven aralıklarında bildirildi. Bu analiz Graph Pad Prism 9 ile yapılmıştır. Morfolojik gözlemler ters çevrilmiş bir mikroskopla yapılmıştır.



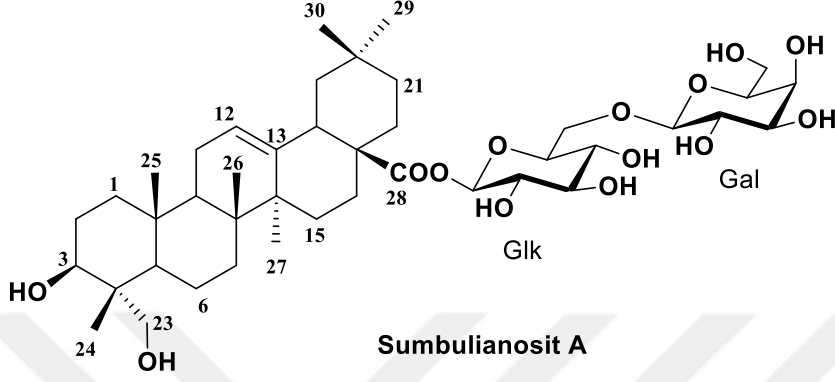
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1.1 Sumbulianosit A Saponini için Yapı Tayini Sonuçları

Cephalaria sumbuliana bitkisi üzerinde gerçekleştirilen izolasyon ve saflandırma çalışmasında elde edilen sumbulianosit A (Abacı, vd., 2020) maddesinin yapı belirleme çalışmaları sırasında ileri spektroskopik tekniklerden 1 ve 2 boyutlu NMR analizleri, yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (HR-ESIMS) yöntemlerinden yararlanıldı. Sumbulianosit A'nın NMR spektrumları ekler kısmında verilmiştir (Şekil 7.1-7.7).

Kütle spektrumu (HR-ESIMS) analizinde (pozitif iyon), m/z değeri 1567.7137 $[M+Na]^+$ olarak bulundu. Bu değer kapalı formül $C_{71}H_{116}O_{36}$ ve hesaplanan değer ile uyumlu bulundu. Bileşik beyaz amorf toz halde elde edilmiştir. Bileşiğin yapısı bir boyutlu (1H -NMR, ^{13}C -NMR) ve iki boyutlu (HSQC, HMBC) NMR teknikleri ile belirlendi. ^{13}C -NMR ve 1H -NMR değerleri Tablo 4.1 de verildiği gibidir. ^{13}C -NMR spektrumunda toplam 42 karbon olduğu görüldü. δ_C 13.0 (C-24), 16.0 (C-25), 17.2 (C-26), 26.0 (C-27), 33.2 (C-29) ve 23.8 (C-30) aglikonda altı adet metil karbonu, δ_C 65.0 (C-23) de hidroksimetil karbonu, δ_C 70.9 (C-3) de oksijenli metil karbonu ve δ_C 175.7 (C-28) de ise ester karbonil grubu olduğu gözlemlendi. C-3 ve C-28 değerleri bize yapının monodesmozidik olduğunu gösterdi. δ_C 122.1 (C-12) ve 143.9 (C-13) aglikona bağlı olan bu değerler bize olefinik çifte bağ karbonlarına ait olduğunu gösterdi. Bununla birlikte 1H -NMR spektrumunda çifte bağın C-12 'de δ_H 5.14 değeri de görüldü. Yukarıda verilen veriler ile bileşiğin aglikonun 30 karbonlu bir triterpen olduğu ve özellikle ^{13}C -NMR'de gözlenen C-23'e ait δ_C 65.0 değerinden yapının bir hederagenin aglikon olduğu kanıtlandı. 1H -NMR spektrumundaki δ_H 5.20 (d, $J = 8.0$ Hz, Glikoz) ve 4.45 (d, $J = 7.6$ Hz, Galaktoz) değerlerinin iki adet şekere ait anomerik proton olduğu görüldü. Bu protonların HMQC spektrumunda değerleri sırası ile δ_C 94.6 ve 101.6 anomerik karbonları ile bağlantılı olduğu görüldü. Bu şeker birimlerinin yapılan iki boyutlu analizler yardımı ile bir adet β -glikopiranozil (Glc) ve bir adet β -galaktopiranozil (Gal) olduğu belirlendi. Bu şekerlerin mutlak konfigürasyonları, bazik hidroliz ve sonrasında yapılan sillilemenin ardından yapılan GK-Kütle analizleri ile belirlendi. Bu çalışmalar, iki monosakkarit grubunun (bir glikoz ve bir galaktoz), ester bağı ile aglikona C-28 üzerinden bağlandığını gösterdi. Şekerlerin aglikonuna bağlantısı, iki boyutlu NMR tekniği HMBC ile de kanıtlandı. HMBC spektrumunda görülen δ_H 5.20 değeri glikozon anomerik protonu ile δ_C 175.7 (C-28) karbonil karbonu arasındaki

ilişki ve δ_H 4.45 galaktozun anomerik protonu ile δ_C 68.5 glikozun C-6 arasındaki belirli bağlantısı; glikoz ile galaktoz şeker birimlerinin birbirine ve glikoz şekerinin aglikona bağlandığı karbonları gösterdi. Bu değerler ile bileşiğin IUPAC adının hederagenin 28-O- β -D-galaktopiranozil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glikopiranozil ester olduğu bulundu (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Sumbulianosit A'nın kimyasal yapısı

Tablo 4.1. Sumbulianosit A için ^1H ve ^{13}C NMR verileri ^{a-d}

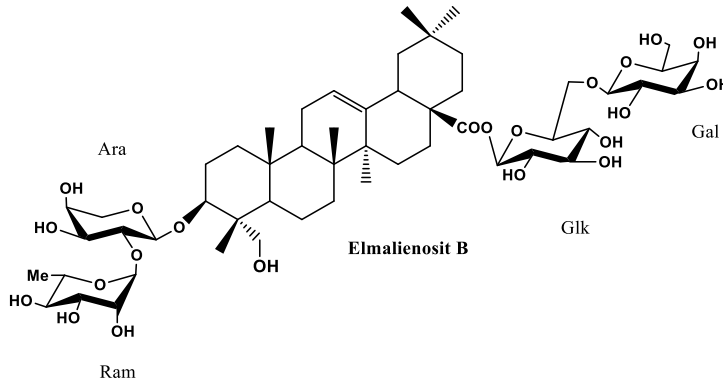
No	Aglikon	
	^{13}C -NMR	^1H -NMR
1	38.5	0.80; 1.44; m
2	26.9	1.43; nd*; m
3	70.9	3.40; m
4	42.3	-
5	47.0	1.05; m
6	17.9	1.08; 1.35; m
7	32.3	1.08; 1.16; m
8	39.4	-
9	47.6	1.46; m
10	36.7	-
11	23.0	1.56; 1.97; m
12	122.1	5.14; brs
13	143.9	-
14	41.8	-
15	27.7	0.91; 1.72; m
16	23.4	1.76; nd*; m
17	46.4	-
18	41.2	2.70; m
19	46.0	1.03; 1.59; m
20	30.7	-
21	33.7	1.12; 1.33; m
22	32.1	1.42; 1.57; m
23	65.0	3.05; 3.30; m
24	13.0	0.51; s
25	16.0	0.84; s
26	17.2	0.66; s
27	26.0	1.05; s
28	175.7	-
29	33.2	0.84; s
30	23.8	0.84; s
Glk at C-28		
1	94.6	5.20, d (8.0)
2	72.8	3.10, m
3	76.8	3.30, m
4	69.5	3.21, m
5	76.9	3.20, m
6	68.5	3.52, 3.91, m
Gal		
1	101.6	4.45, d (7.6)
2	71.1	3.08, m
3	71.6	3.80, m
4	67.9	3.26, m
5	74.8	3.44, m
6	61.8	3.42, 3.60, m

*nd: belirlenememiş pikler

4.1.2 Elmalienosit B ve α -hederin Saponinleri için Yapı Tayini Sonuçları

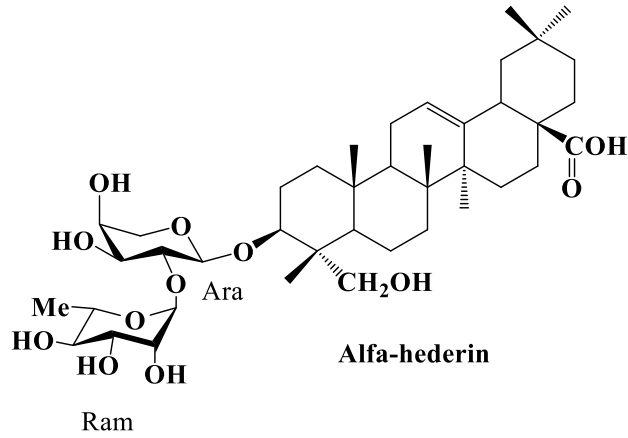
Cephalaria elmaliensis bitkisinin izolasyon ve saflaştırma çalışmalarında iki ayrı saponin elde edildi. Elmalienosit B ve α -hederin bileşikleri bu çalışmalar sonucunda elde edilen saponinlerdir (Sarıkahya ve Kirmizigül, 2012). Saponinlerin kesin yapısının tayini için FT-IR, bir boyutlu ve iki boyutlu NMR teknikleri ve yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (HR-ESIMS) tekniği ve Bölüm 3’de Gereçler ve yöntemlerde sözü edilen kimyasal yöntemler kullanıldı. Elmalienosit B (Şekil 7.8-7.15) ve α -hederin (Şekil 7.16-7.20) için NMR spektrumları ekler kısmında verilmiştir.

Elmalienosit B saponini kütle spektrumu (HR-ESIMS) analizinde (pozitif iyon), m/z değeri 1097.5487 $[M+Na]^+$ olarak bulundu. Bu değer hesaplanan değer ve kapalı formül $C_{53}H_{86}O_{22}$ ile uyumlu bulundu. Elmalienoside B’nin aglikonunun NMR verileri (Tablo 4.2) verilmiştir. 1H -NMR spektrumu, δ_H 5,20 (d, $J = 8,0$ Hz, Gli), 5,04 (brs, Ram), 4,44 (d, $J = 7,6$ Hz, Gal) ve 4,31 (d, $J = 5,6$ Hz, Ara) dört anomerik proton sinyali ile HMQC spektrumunda sırasıyla δ_C 94,8, δ_C 100,6, δ_C 101,8 ve δ_C 103,6 dört anomerik karbon ile korelasyon verdi. HMBC spektrumunda gözlemlenen korelasyonlarda δ_H 4,31 (Ara) ve δ_C 80,0 (C-3), δ_H 5,20 (Gli) ve δ_C 176,0 (C-28) bağlantıları bize şekerlerin aglikona bağlandığı noktaları gösterdi. δ_H 5,04 ve δ_C 74,9 arasındaki ilişki bize (1 $\rightarrow$ 2) bağlantısı ile ramnoz ve arabinozun hangi karbondan bağlı olduğunu gösterdi. Ayrıca δ_H 4,44 ve δ_C 68,8 ile galaktoz ve glukozun arasındaki bağın (1 $\rightarrow$ 6) olduğu belirlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda yapı, 3-O- α -L-ramnopiranozil-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-arabinopiranozil hederagenin 28-O- β -D-galaktopiranozil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glukopiranozit ester olarak belirlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Elmalienosit B’nin kimyasal yapısı

Alfa-hederin saponini beyaz amorf toz halde elde edilmiştir. Bileşiğin yapısı bir boyutlu ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) ve iki boyutlu (HSQC, HMBC) NMR teknikleri ile aydınlatıldı. $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda bileşiğe ait 41 karbon atomu belirlendi (Tablo 4.2). Yapısında δ_{C} 179,3 (C-28) karboksilik asit karbonu, δ_{C} 144,6 (C-13), δ_{C} 122,2 (C-12) olefinik karbon atomları, δ_{C} 80,0 (C-3) oksijen içeren metin karbonu, δ_{C} 103,6 ve δ_{C} 100,6 iki adet şeker birimi anomerik karbonu olduğu görüldü. Bunun yanı sıra gözlemlenen δ_{C} 33,5, δ_{C} 26,3, δ_{C} 24,1, δ_{C} 17,6, δ_{C} 16,2, δ_{C} 13,7 sinyallerine göre yapıda altı adet metil grubu olduğu anlaşıldı. $^1\text{H-NMR}$ spektrum verileri δ_{H} 5,13 (H-12) olefinik protonu, δ_{H} 3,47 (H-3) oksijen içeren metil protonu, δ_{H} 0,55 (s), δ_{H} 0,69 (s), δ_{H} 0,85(s), δ_{H} 1,07(s) metil protonlarının varlığını gösterdi. $^1\text{H-NMR}$ spekturumunda, δ_{H} 4,32 (H-1', d, $J=5,2$) alfa şeker olan arabinoz ve δ_{H} 5,03(H''-1, brs) ramnoz anomerik protonlarına aittir. $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumundaki δ_{C} 18,4 ve $^1\text{H-NMR}$ spektrumundaki δ_{H} 1,06(d, $J=6,8$) sinyalleri sırasıyla ramnoz metil karbon ve proton değerlerini gösterdi. HSQC ile yapıdaki protonların bağlı olduğu karbon atomları belirlendi. HMBC'de gözlemlenen uzak korelasyonlara göre δ_{C} 80,0 (C-3) ile δ_{H} 0,55 (H-24) ve δ_{H} 3,27 (H-23) etkileşimi yapının hederagenin aglikon yapısında olduğunu, δ_{C} 80,0 (C-3) ile δ_{H} 4,32 (H-1', d, $J=5,2$) etkileşimi arabinozun hederagenin aglikona üçüncü karbondan bağlı olduğunu, δ_{C} 100,6 ile δ_{H} 3,53 (H-2') etkileşimi ramnozun arabinoz birimine ikinci karbondan bağlı olduğunu, δ_{C} 18,4 (C-6'') ile δ_{H} 3,16 (H-4'') ve δ_{H} 3,66 (H-2'') etkileşimi ramnoz metilini gösterdi. Tüm veriler α -hederinin (Şekil 4.3) literatürdeki değerleri ile uyum sağlamaktadır (Aliev ve Movsumov, 1976).

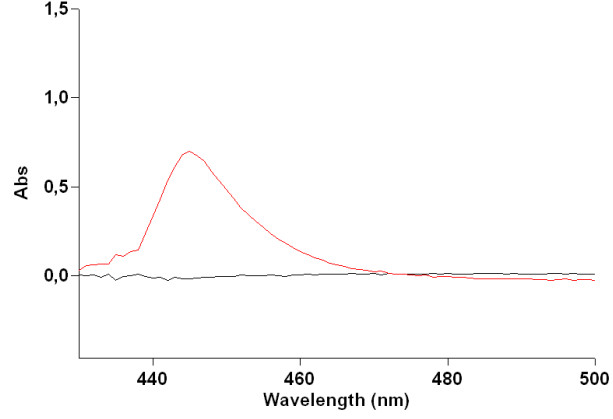


Şekil 4.3 α -hederin'in kimyasal yapısı

Tablo 4.2 Elmalienosit B ve α -Hederin için ^{13}C -NMR ve ^1H -NMR verileri

^{13}C -NMR			^1H -NMR		
No	Elmalienoside B	α -hederin	No	Elmalienoside B	α -hederin
1	39.0	38.9	3	3.48, m	3.47, m
2	26.0	26.0	5	1.15, m	1.15, m
3	80.1	80.0	9	1.47, m	1.47, m
4	43.0	43.0	12	5.13, brs	5.13, brs
5	46.9	46.9	23	3.10, 3.23, m	3.11, 3.27, m
6	17.8	17.8	24	0.54, s	0.55, s
7	32.5	32.8	25	0.84, s	0.85, s
8	n.d	39.0	26	0.65, s	0.69, s
9	47.9	47.8	27	1.05, s	1.07, s
10	36.6	36.7	29	0.84, s	0.85, s
11	23.7	23.6	30	0.84, s	0.85, s
12	122.4	122.2		Ara at C-3	Ara at C-3
13	144.2	144.6	1	4.31, d (5.6)	4.32, d (5.2)
14	42.0	42.1	2	3.50, m	3.53, m
15	27.9	27.9	3	3.48, m	3.51, m
16	23.2	23.4	4	3.56, m	3.56, m
17	46.7	46.4	5	3.28, 3.66, m	3.31, 3.64, m
18	41.4	41.5		Ram	Ram
19	46.3	46.1	1	5.04, brs	5.03, brs
20	31.0	31.1	2	3.68, m	3.66, m
21	33.9	34.1	3	3.44, m	3.45, m
22	32.4	32.6	4	3.15, m	3.16, m
23	63.1	63.2	5	3.66, m	3.69, m
24	13.7	13.7	6	1.05, d (6.0)	1.06, d (6.8)
25	16.3	16.2		Glk at C-28	
26	17.4	17.6	1	5.20, d (8.0)	
27	26.2	26.3	2	3.10, m	
28	176.0	179.3	3	3.30, m	
29	33.4	33.5	4	3.20, m	
30	24.1	24.1	5	3.21, m	
			6	3.66, 3.91, m	
	Ara at C-3			Gal	
1	103.6	103.6	1	4.44, d (7.6)	
2	74.9	75.0	2	3.80, m	
3	73.5	73.4	3	3.10, m	
4	68.5	68.4	4	3.26, m	
5	65.0	65.0	5	3.41, m	
	Ram	Ram	6	3.39, 3.59, m	
1	100.6	100.6			
2	71.0	71.0			
3	71.2	71.2			
4	72.7	72.7			
5	68.8	68.8			
6	18.4	18.4			
	Glk at C-28				
1	94.8				
2	71.3				
3	77.0				
4	69.8				
5	77.1				
6	68.8				
	Gal				
1	101.8				
2	71.9				
3	73.0				
4	68.1				
5	75.0				
6	62.0				

4.2 Saponinlerin UV Spektrofotometresi ile Analizi ve Optimizasyon Sonuçları



Şekil 4.4 α -hederin saponinin UV spektrumu (Abs: Absorbans, Wavelength: Dalga boyu)

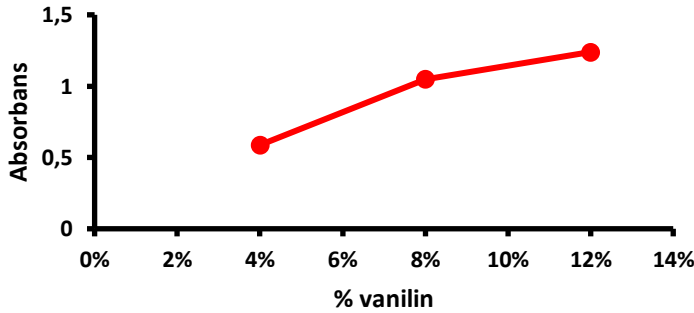
Saponin miktarını belirlemek için Hiai ve ark. 1976'da UV spektrometresi ile kalorimetrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bir molekül, yalnızca bağ yapan veya bağ yapmayan yörüngedeki elektronun, antibağ yapan yörüngeye uyarılmasıyla UV-aktif olabilir (Yadav, 2005). Saponin molekülünün yapısındaki bağlayıcı veya bağlayıcı olmayan orbitallerde elektron bulunmaması nedeniyle, elektronlar antibağ orbitaline uyarılamaz ve UV-aktivitesi göstermezler. Bu nedenle ilk defa saponinler için Hiai ve ark. tarafından geliştirilen vanilin-sülfürik asit yöntemi kullanılarak saponinler UV görünür bölgede aktif hale getirilmektedir. (Hiai vd., 1976). UV spektrometri çalışmalarında, sumbulianosit A, elmalienosit B ve α -hederin olmak üzere üç farklı saponin molekülü üzerinde deneyler yapılmıştır. Saponinlerin moleküllerine bakıldığında, α -hederin yapısında karbonile bağlı hidroksil grubu olduğunu ve monodesmosidik yapıda olduğu bilinmektedir. Yapı tayini sonuçlarının desteği ile aglikona eterik kısımdan bağlı arabinoz ve arabinoza bağlı ramnoz şekeri olduğu görülmüştür (Şekil 3.3). Diğer bir saponin sumbulianosit A ise sekonder alkol grubuna sahiptir ve esteriz bağ ile bir şeker zincirini yapısında bulundurmaktadır (Şekil 3.1). Bu iki yapıdan farklı olarak elmalienosit B saponinin bidesmosidik yapıda olduğu görülmektedir. Hem esterik hem de eterik uçlarında şeker zinciri barındırıp dört şekerli bir yapıya sahiptir (Şekil 3.2).

Sumbulianosit A bileşiğinde serbest sekonder alkol (-OH) grubunun molekül yapısında sayısının fazla olması, vanilin-sülfürik asit karışımın molekül yapısını etkilerken her bir reaksiyonda farklılık göstermesine ve absorbans

değerinde her ölçümde farklı sonuç vermesine neden olmuştur. Yapısında serbest bir karboksilik asit grubu ($-\text{COOH}$) bulunan α -hederin saponini için ise diğer saponinlerin aksine, absorbans değeri istenilen aralıkta olup, tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmiştir. Bu yüzden saponin-kitosan sentez çalışmalarında başlangıç maddesi olarak α -hederin saponini seçilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda; karbonil grubuna bağlı hidroksil grubunun ($-\text{COOH}$) serbest hidroksil grubuna göre ($-\text{OH}$), vanilin-sülfürik asit karışım içersinde daha kararlı moleküler arası etkileşimler oluşturduğu ve buna bağlı olarakda UV spektrofotometresi ile okunan absorbans değerlerinin de tekrarlanabilir ve Lambert-Beer yasasına uygun sonuçlar verdiği görülmüştür.

Vanilin Konsantrasyonunun Etkisi

Bu çalışmada reaksiyon ortamı 3 farklı yüzdede vanilin-etanol çözeltisi (%4-%8-%12) ile gerçekleştirilmiştir. α -hederin saponinin %4 vanilin ortamında 0,587, %8 vanilin ortamında 1,49 ve %12 vanilin ortamında 1,239 absorbansa sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4).

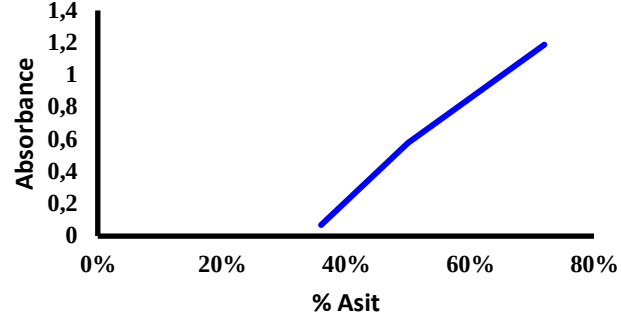


Şekil 4.5 Vanilin konsantrasyonunun absorbans üzerine etkisi.

Şekil 4.4'teki bu veriler dikkate alındığında, % vanilin oranı için uygun koşulun %4 vanilin ortamı olduğu belirtilmiştir.

Asit Konsantrasyonunun Etkisi

Vanilin çalışmalarına benzer şekilde, seçilen üç saponin üzerinde farklı % asit oranları (%36, %50 ve %72) hazırlanarak deneyler yapılmıştır. α -hederin saponin ile yapılan çalışmada %36 asit ortamda 0,069, %50 asit ortamda 0,58 ve %72 asit ortamda 1,188 absorbans değeri gözlenmiştir. Bu veriler ile % asit oranı için uygun oranın %72 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.6 Asit konsantrasyonunun absorbans üzerine etkisi

Ölçüm Süresinin Etkisi

Farklı zaman aralıklarında (10 dk, 20 dk, 30 dk) yapılan çalışmada α -hederin saponin 10. dakikada ölçümde 1.957, 20. dakikada ölçümde 1.967 ve 30. dakikada ölçümde 2.09 absorbans olarak gözlenmiştir.

Bu veriler dikkate alınarak zaman aralığının 10 dakika ile 20 dakika arasında olması gerektiği belirtilmiştir.

Sıcaklığın Etkisi

Sıcaklığa bağlı çalışmalarda, 25°C, 40°C ve 60°C sıcaklıklarda deneyler yapılmıştır. Bu çalışmada α -hederin saponin 25°C'de 0,404 ve 40°C'de 1,957 absorbans değeri vermiştir. Saponin, 60°C'de bozunma göstermiştir. Bu çalışmadan yola çıkılarak optimum sıcaklık koşulu 40°C olarak belirlenmiştir (Tablo 4.3).

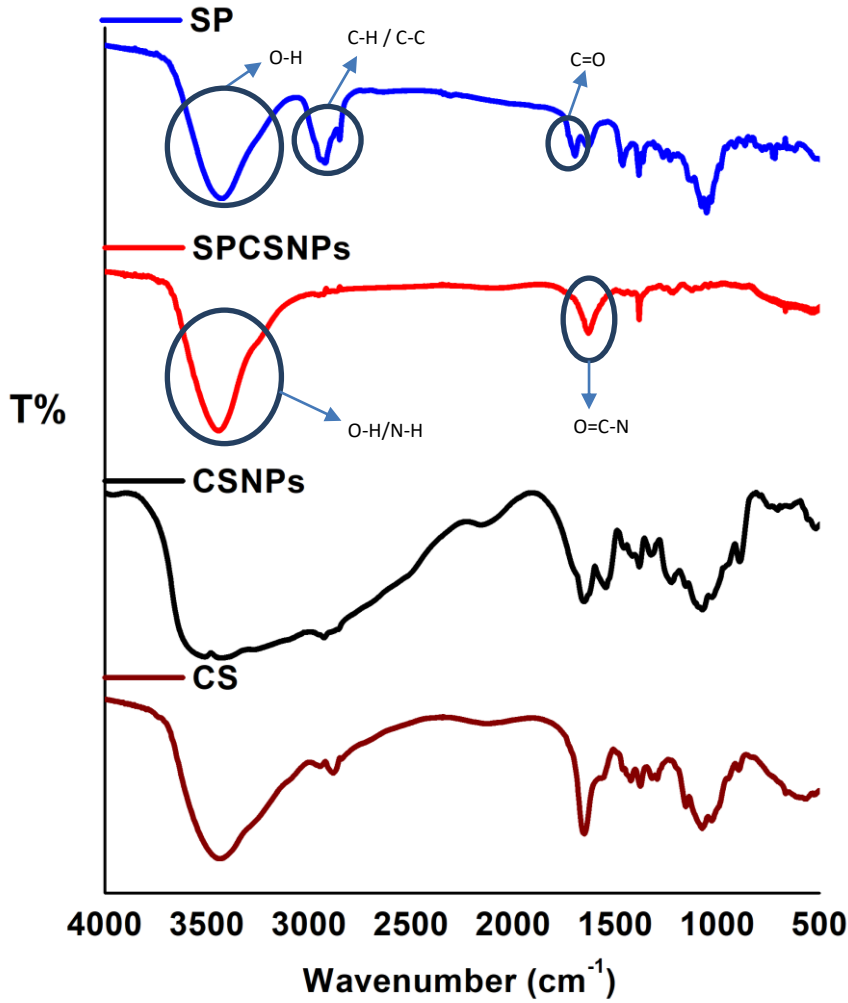
Tablo 4.3 Sıcaklığın α -hederin saponinin absorbansına etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans
25	0.404
40	1.957
60	bozunma

4.3 Saponin Yüklü Kitosan Nanoparçacık Sentezi Analiz Sonuçları

4.3.1 FT-IR Spektroskopisi

Saf saponin (SP), saf kitosan (CS), kitosan nanoparçacıkları (CSNP) ve saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının (SPCSNP) kimyasal karakterizasyonu, FT-IR spektrum cihazı kullanılarak analiz edildi. Elde edilen spektrumlar Şekil 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.7 Saponin (SP), kitosan nanoparçacığı (CSNP) ve saponin yüklü kitosan nanoparçacığı (SPCSNP) için FT-IR spektrumları

Saf kitosan (CS)'nin FT-IR spektrumundaki ana bantlar şu şekildedir; 3432 cm⁻¹ merkezli güçlü ve geniş bant, N-H ve O-H gerilme titreşimleri gözlenmiştir. Kitosan örneklerinde hidrojen bağları nedeniyle O-H ve N-H grupları için aynı

bölgede geniş bir bant gözlenmiştir (Thandapani vd., 2017). 2947 ve 2876 cm^{-1} 'deki bantlar, asimetrik C-H gerilme ve simetrik C-H gerilme titreşimine karşılık gelmektedir. Amid I-II-III bantlarında (C=O gerilme), 1650 cm^{-1} piki amid I N-H, 1557 cm^{-1} piki amid II -CH₃ ve -CH₂'nin simetrik bozunmasını ve 1377 cm^{-1} 'de ise amid III piki CH₃CONH'ın C-N değerini temsil etmektedir (Nguyen vd., 2017). 1154 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bantları, glikoz halkasında anti-simetrik ve simetrik C-O gerilmesine ve C-O-C gerilmesine karşılık gelirken, 898 cm^{-1} , CS'de β -(1,4) glukozit bağına karşılık gelmektedir.

Saf saponin (SP) spektrumunda 3600-3100 cm^{-1} arasında bir hidroksil gerilme titreşimi gözlenirken, 2942 cm^{-1} 'de metil ve alifatik C-H gerilme titreşimleri kaydedilmiştir. Ekstre edilen bileşikte yaklaşık olarak 2500 cm^{-1} ~1900 cm^{-1} gözlenen herhangi bir absorpsiyon piki yoktur. Bu, Yuan ve diğ. (2018). -CH- grubunun asimetrik ve simetrik titreşim pikleri sırasıyla 1463 cm^{-1} ve 1385 cm^{-1} 'de kaydedilmiştir. Spektrumda C-O-C gerilme titreşimi 1053 cm^{-1} 'de gözlemlenmiştir. 1233-953 cm^{-1} civarındaki geniş absorpsiyon piki, izole edilen bileşikte O-CH₃ grubunun varlığına bağlanmaktadır (Sharma ve Paliwal, 2013).

Kitosan-nanoparçacıklarının (CSNP) FT-IR spektrumunda, hidrojen bağı nedeniyle CSNP spektrumunda daha keskin olan N-H ve O-H gerilme titreşimleri artmıştır. 1650 cm^{-1} ve 1557 cm^{-1} 'deki pikler, CS'nin NH₃⁺ grupları ile TPP'nin P₃O₁₀⁵⁻ grupları arasındaki etkileşim nedeniyle hipokromik olarak 1607 ve 1546 cm^{-1} 'e kaymıştır. Bu etkileşim 1607 cm^{-1} 'de amid I bandındaki azalma ile de desteklenmektedir (Lustriane vd., 2018). Çapraz bağlayıcı olarak sodyum TPP kullanan kitosan nanoparçacık sentezi için benzer sonuçlar, Behl ve ark. tarafından yapılan çalışmada rapor edilmiştir. (Behl vd., 2016).

Saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının (SPCSNP) FT-IR spektrumunda, 3432 cm^{-1} merkezli keskin bir pik gözlenmiş, bu da Rejinold ve diğerleri tarafından yürütülen araştırmaya göre, saponinin kitosan ile etkileşiminin iyonik etkileşimlerden daha fazla hidrojen bağı etkileşimi olduğunu göstermektedir. (Rejinold vd.,2011). Ayrıca, 1633 cm^{-1} 'de saponin ve kitosan nanoparçacıkları arasında bir amid bağlantısına atfedilebilecek yeni bir pikin varlığı görülmektedir.

4.3.2 Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

Kitosan (CSNP) ve saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının (SPCSNP) parçacık boyutu, PDI ve Zeta Potansiyeli sonuçları Tablo 4.4'te sunulmuştur.

Tablo 4.4 CSNP'lerin ve SPCSNP'lerin parçacık boyutları, PDI değerleri ve Zeta potansiyelleri

Örnek	Parçacık boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyeli (mV)
<i>CSNP</i>	62,91±9,40	0,3923	-16,45±0,86
<i>SPCSNP</i>	109,04±37,80	0,4422	-25,61±3,31

CSNP'ler 62,91 ± 9,40 nm aralığında parçacık boyutu gösterirken, SPCSNP'ler 109,04 ± 37,80 nm boyutunda olup artış göstermişlerdir.

Zeta potansiyeli, nanomalzemenin yüzey yükünü temsil eden bir karakterizasyon yöntemidir. Bu analiz için çok önemli olan iki parametre, nanopartiküllerin ve dispersiyon ortamının elektrik potansiyelidir. Zeta potansiyelleri +30 mV'den fazla veya -30 mV'den küçük olan nanosistemler kararlı bir koloidal süspansiyon sistemi olarak kabul edilir ve agregasyon eğilimi göstermezken, -30 mV ile +30 mV arasında kalan zeta potansiyel değerlerine sahip nanopartiküller zayıf koloidal özellik gösterir ve topaklanma olasılıkları vardır (Raval, 2019). CSNP'ler ve SPCSNP'ler için zeta potansiyelleri -16,45±0,86 mV ve -25,61±3,31 mV olarak ölçülmüştür (Tablo 4.4).

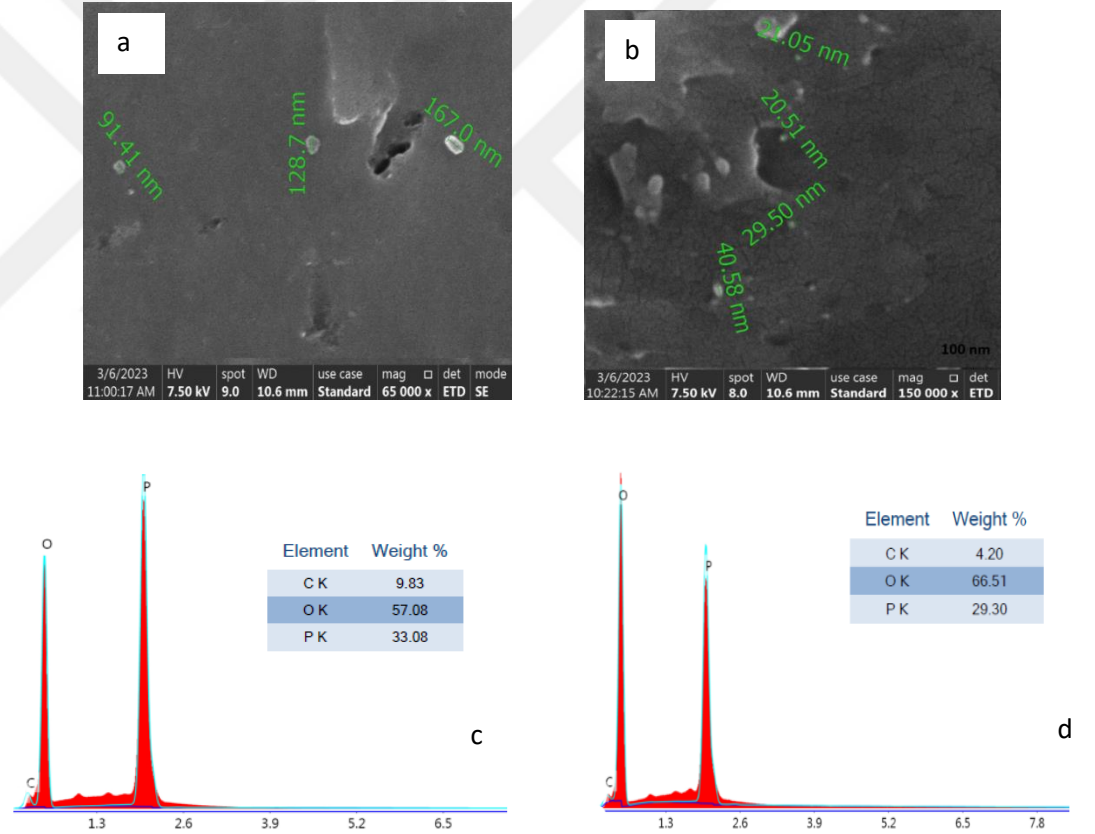
4.3.3 SEM

Kitosan nanoparçacıklarının (CS) ve saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının (SPCSNP) SEM ve EDX analizi, Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Boş ve Saponin yüklü CSNP'lerin morfolojisi küresel şekilli yapılar göstermektedir. SEM analizi ile nanomalzemenin morfolojik görünümünü belirlemenin yanı sıra, nanomalzemenin boyut dağılımı hakkında da bilgi elde edilebilmektedir. Augado ve diğerleri (2022) tarafından yapılan çalışmada, nanoselüloz süspansiyonlarının boyut dağılımı hem FESEM hem de DLS analizleri ile belirlenmiştir. DLS ile elde edilen boyut dağılımlarının, SEM analizi

ile elde edilen boyut dağılımlarından daha yüksek olduğu analizlerle belirlenmiştir (Tarrés, 2022).

DLS yöntemi, süspansiyondaki nanomalzemenin Brownian hareketine dayalı olarak, büyük parçacığın yavaş hareket prensibi ile nanoparçacığın boyut dağılımı hakkında bilgi vermektedir. Analiz sırasında, nanopartikül askıda durumdadır ve bir çözme tabakası ile çevrilidir. Bu nedenle partikül boyutları gerçek boyutlarından daha yüksek belirlenmektedir (Mineva, 2017).

SEM sonuçları saponin yüklü kitosan nanoparçacıkları ile ilgili literatür ile uyumlu bulunmuştur (Bande vd., 2015; Rejinold vd., 2011; Saharan vd., 2013).

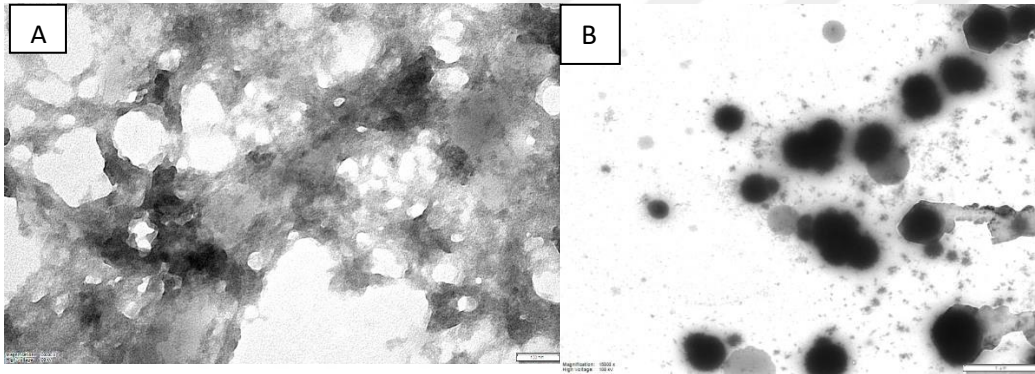


Şekil 4.8 SPCSNPs (a-c) ve CSNPs (b-d) SEM-EDX analizleri

EDX analizinde, C, O, N ve P elementlerinin varlığı, NP'lerin, CSNP'ler ve SPCSNP yapısında TPP ve SP kapsülleme varlığında iyonik jelleşme ile başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermiştir (Şekil 4.7).

4.3.4 TEM

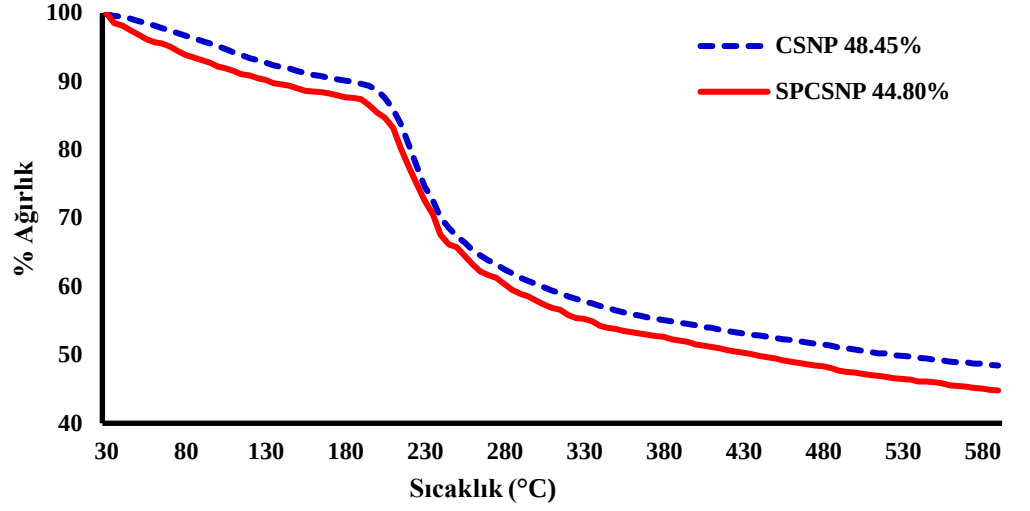
Kitosan nanoparçacıklarının (CS) ve saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının (SPCSNP) TEM analizinden elde edilen sonuçlar, değişen boyutlarda küresel yapılı kitosan nanoparçacığını ve saponin yüklü kitosan nanoparçacığını (Şekil 4.9-A ve 4.9-B) ortaya çıkarmıştır. Bu küresel yapı görüntüsü literatürler ile de uyumludur (Bande vd., 2015; Chandra Hembram vd., 2016). Saponin yüklü olan nanoparçacıklarının kitosan nanoparçacıklarına göre değişimi görülmüş ve bu da saponinin yüklendiğini ispatlamıştır. Sentezlenen nanoparçacık, doğası gereği nispeten homojen olsada kapsüllendikten sonra topaklanma eğilimindedir. TEM analizinde gözlenebilen bu sonuç bize Zetasizer ölçüm sonucunu da destekleyici bilgi vermektedir.



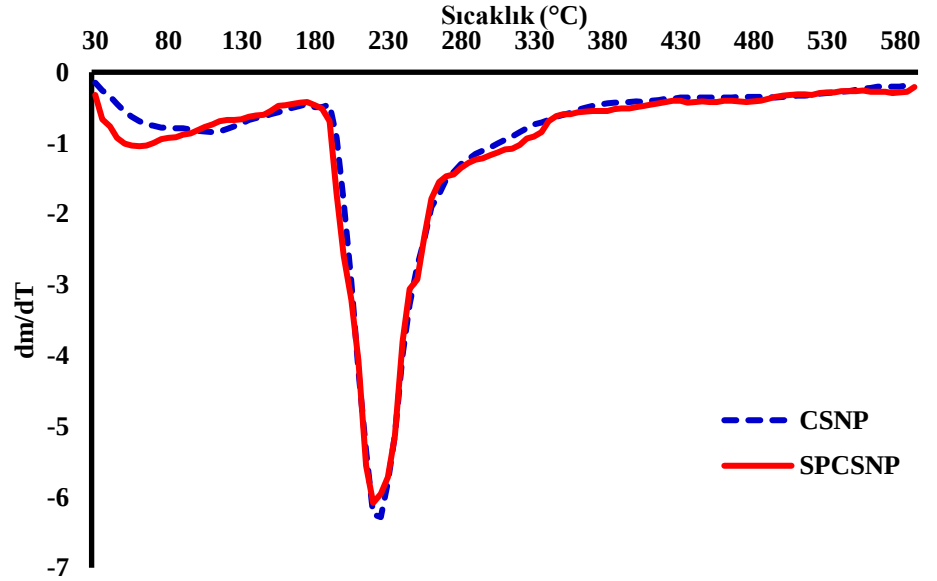
Şekil 4.9 SPCSNP (A) ve CSNP (B) TEM analizleri

4.3.5 Termal Gravimetrik Analiz (TGA)

Kitosan nanoparçacıklarının (CS) ve saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının (SPCSNP) termal karakteri, azot atmosferi altında 30 ila 600°C sıcaklık aralığında ve 10°C min⁻¹ ısıtma hızında TGA tekniği ile incelenmiştir. Bu analizde, % kütle kaybı sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçülmüş ve numunenin ayrışma sıcaklıkları elde edilmiştir. Şekil 4.8, CSNP'ler ve SPCSNP'ler için TGA termogramını göstermektedir. Grafiklerden de görülebileceği gibi, her iki numunenin ısıl ayrışması iki aşamalı olmuştur. CSNP'ler için ilk bozunma adımı, 50°C ile 180°C arasında numunelerden nem kaybına bağlı olarak yaklaşık %12'lik bir kütle azalmasıdır. İkinci aşamada, 180 °C ila 380 °C arasında meydana gelen uzun süreli ve keskin bir bozunma (yaklaşık %35 ağırlık kaybı), sakkarit halkalarının dehidrasyonuna, depolimerizasyona ve asetillenmiş ve deasetillenmiş birimlerin ayrışmasına bağlanmaktadır (Vaezifar vd., 2013).



Şekil 4.10 CSNP'lerin ve SPCSNP'lerin TGA eğrileri



Şekil 4.11 CSNP'lerin ve SPCSNP'lerin DTG eğrileri

SPCSNP'lerin TG termogramında iki ayrışma aşaması da gözlenmiştir. Gözlemlenen %11'lik ilk kütle kaybı, adsorbe edilen su moleküllerinin uzaklaştırılması olan 30–180 °C'dedir. İkinci bozunmanın ise 175°C civarında başladığı ve 225°C'de (tablo 4.5'te) maksimum hız (T_{max}) ile yaklaşık 430°C'de durduğu görülmektedir. Kalıntı ağırlığının 580°C'de SPCSNP'ler için %44,80 ve CSNP'ler için %48,45 olduğunu görülmektedir. SPCSNP'lerin termal stabilitesi de

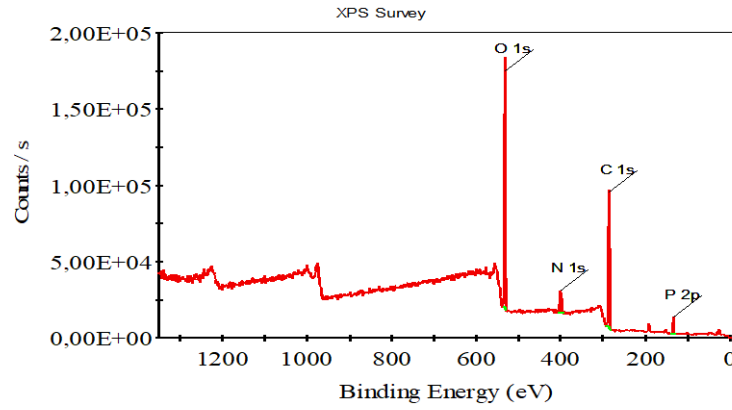
CSNP'lerinkine kıyasla biraz daha düşüktür. Bu sonuçlara göre polar grupların artması ve kristallığın azalması nedeniyle ısı kararlılığın azaldığı bildirilebilmektedir (Rejinold vd.,2011).

Tablo 4.5 CSNP'lerin ve SPCSNP'lerin T_{maks} °C ve ağırlık kaybı (%) değerleri.

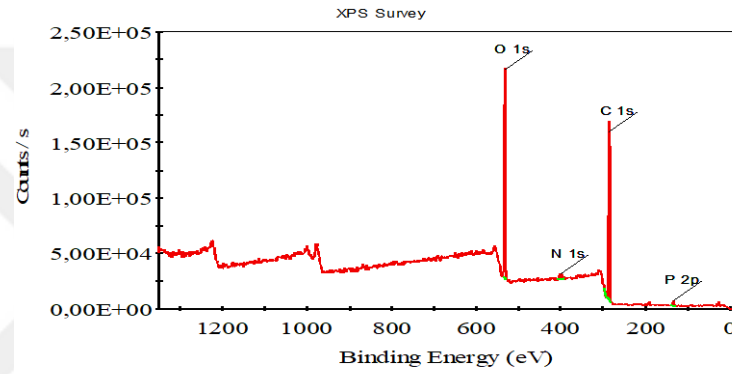
Örnek	T_{maks} (°C)	Ağırlık kaybı (%) 50-130°C	Ağırlık kaybı (%) 180-380°C
CSNP	225	9.88	35.04
SPCSNP	225	12.28	34.09

4.3.6 XPS

Kitosan nanoparçacıklarının (CS) ve saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının (SPCSNP) XPS spektrumları, Şekil 4.10-11'de gösterilmektedir. Bu analiz, CSNP'lerde ve SPCSNP'lerde C, O, N ve P atomlarının varlığını göstermiştir. C 1s bağlanma enerjilerine ilişkin pikler CSNP için 284,74, 286,26 ve 287,73 eV ve SPCSNP için 284,53, 286,22 ve 287,73 eV'de görülürken, O 1s 530,66 ve 532,51 (CSNP) ve 530,59 ve 532,51 (SPCSNP için) eV'dedir. N 1s gösteriminde CSNP için 399,4/401,38 eV'de ve SPCSNP için 399,58/401,61 eV'deki piklere karşılık gelen amin/amid ve P 2p piki CSNP için 133,37 eV ve SPCSNP için 133,44 eV'dir. Hem CSNP hem de SPCSNP aynı fonksiyonel gruplara (C-C, C-H, C-O, N-C, N-H, P-O, P=O) sahip olduğundan, bağlanma enerjilerinin değerleri ile molekül yapıları arasında ayırım yapmak mümkün değildir. Bununla birlikte, P 2p ve N 1s yoğunluklarındaki değişiklik, SPCSNP'lerde görülen düşük yüzde ile orantılı daha küçük görülen P 2p ve N 1s piki ile CSNP'lerde yüzdenin artması ile artan P 2p ve N 1s piki saponinin yüklenmiş olduğunu kanıtlamaktadır.



Şekil 4.12 CSNP için XPS spektrumları



Şekil 4.13 SPCSNP için XPS spektrumları

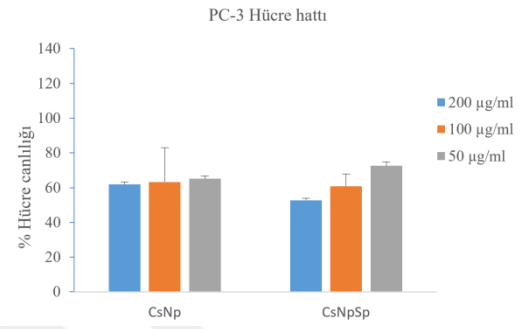
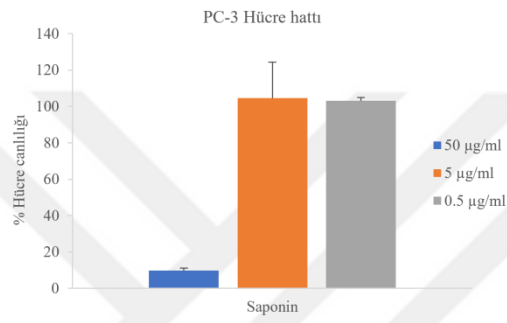
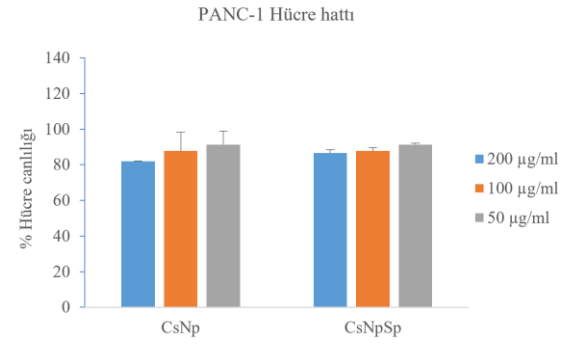
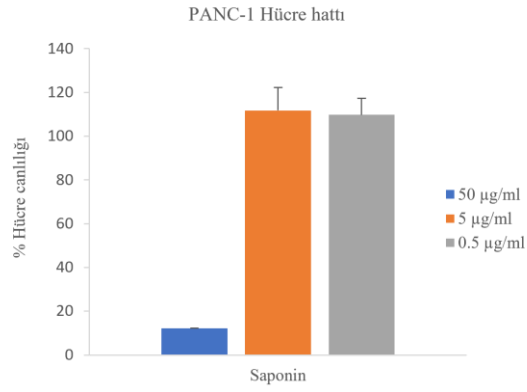
4.3.7 Sitotoksik Aktivite Sonucu

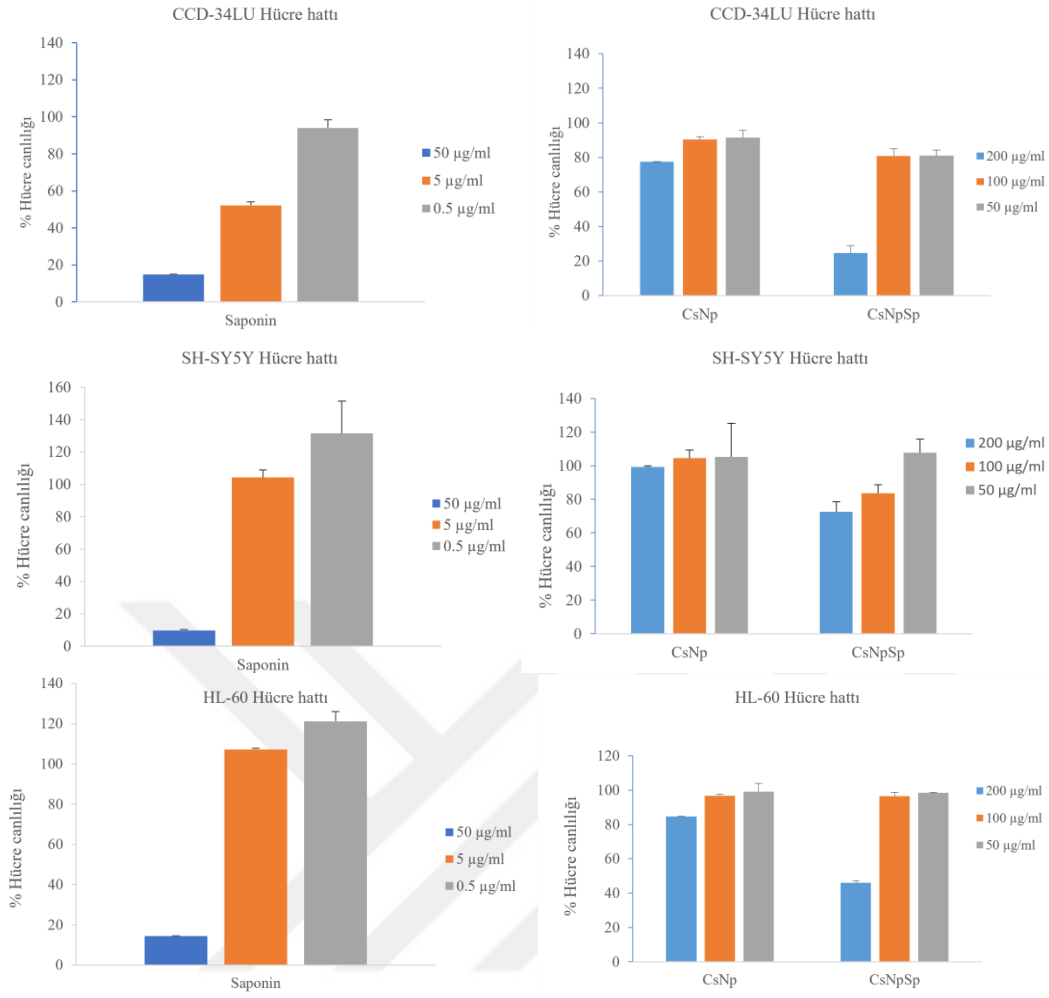
Saf saponinin (SP), kitosan nanoparçacığının (CSNP) ve saponin yüklü kitosan nanoparçacığının (SPCSNP) insan nöroblastoma hücre dizisi (SH-SY5Y), insan prostat adenokarsinomu hücre dizisi (PC-3), insan lösemi hücreleri hücre dizisi (HL-60), insan pankreas karsinomu hücre dizisi (PANC-1) ve sağlıklı hücre dizileri (CCD-34LU) üzerinde sitotoksik aktiviteleri MTT yöntemi ile test edilmiştir. α -hederin tüm hücre hatlarında belirgin bir sitotoksikite göstermiştir. Alfa-hederin için, SH-SY5Y, PANC-1, PC-3, HL-60, CCD-34LU hücre hatlarında sitotoksik aktivitelerine bakılmış ve değerleri sırasıyla 21.5 ± 2.46 , 23.85 ± 3.53 , 20.38 ± 6.48 , 20.995 ± 1.76 , 5.96 ± 0.14 olarak bulunmuştur. Serbest karboksil grubu içeren bu tip monodesmosidik saponinlerde literatürde daha önce pek çok kez farklı hücre hatlarında da benzer bulgulara rastlanmıştır (Abacı vd.,2022; Sarıkahya vd., 2018; Sarıkahya ve Kırmızıgül 2012). Kitosan nano parçacığında ise tüm hücre hatlarında bir IC_{50} değerine ulaşamamıştır. Saponin yüklü kitosan nanoparçacığında ise insan prostat adenokarsinomu (PC-3)

ve insan lösemi (HL-60) hücre dizilerinde yüzde canlılık çok daha yüksek inhibe edilirken ve IC_{50} değerleri sırası ile $175,35 \pm 27,51$ ve $193,55 \pm 3,75$ olduğu görülürken, insan nöroblastoma (SH-SY5Y) ve pankreas adenokarsinomu (PANC-1) hücrelerinde nanoparçacık etkinliği daha düşük bulunmuştur (Tablo 4.6). Ancak yüzde canlılık inhibisyonu PANC-1 hücrelerine göre, SH-SY5Y hücrelerinde daha yüksek gözlenmiş buna rağmen IC_{50} değerine ulaşılammıştır. Bu durum kitosan molekülünün daha seçici aktiviteyi desteklediğini göstermektedir. Kitosan nanoparçacığına yüklenen saponin miktarı düşünüldüğünde (% verim: 3,65 mg SP /100 mg SPCSNP) serbest saponinden çok daha yüksek IC_{50} değerine ulaşılmıştır. Tüm hücre hatlarında yüzde verimliliğe bakıldığında (%3,65) kitosana yüklenen saponin miktarına göre, SPCSNP'nin sitotoksik aktivitesi saf saponinden çok daha yüksek bulunmuştur. Sitotoksik aktivite çalışmasında 200, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$ uygulama konsantrasyon aralığında hücreye uygulanan kitosan nanoparçacığı içerisindeki saponin miktarları sırasıyla 7.3, 3.65, 1.825 μg olarak hesaplanmıştır. Tablo 4.6' daki saponin yüklü kitosan nanoparçacığı için IC_{50} değerlerine çok düşük miktardaki saponin ile ulaşılmıştır. Serbest saponinin aktivite de uygulanan konsantrasyon aralığı (50, 5, 0.5 $\mu\text{g/mL}$) düşünüldüğünde saponin yüklü kitosan nanoparçacığı için çok daha iyi bir sitotoksite görülmektedir. Bu sonuçlara bakıldığında; kitosanın çok iyi bir aktif molekül taşıyıcı sistem olduğu ve sitotoksik aktiviteyi artırdığı sonucuna varılmaktadır. Bu sonuç literatürdeki, *S. emarginatus* bitkisinden elde edilen saponin yüklü kitosan nanoparçacık ile yapılan sitotoksik aktivite çalışmalarında L929 (fare fibroblast hücresi), NIH-3T3 (fare Embriyonik fibroblast hücre), PC3 (prostat kanseri hücresi) ve KB (ağız Kanseri hücresi) hücrelerinde elde edilen sonuçlarla uyumludur (Rejinold vd.,2011).

Tablo 4.6 72 saat sonra çeşitli hücre hatlarında farklı örneklerin IC_{50} değerleri ($\mu\text{g/mL}$).

	SH-SY5Y	PANC-1	PC-3	HL-60	CCD-34LU
Saponin	21.5 ± 2.46	23.85 ± 3.53	20.38 ± 6.48	20.995 ± 1.76	5.96 ± 0.14
CSNP	nd	nd	nd	nd	nd
SPCSNP	≥ 200	nd	175.35 ± 27.51	193.55 ± 3.75	185.9 ± 9.33
Doksorubisin	2.65 ± 0.27	29.66 ± 2.74	0.92 ± 0.17	0.074 ± 0.002	5.88 ± 0.01





Şekil 4.14 Saf SP, CSNP ve SPCSNP için farklı hücre hatlarındaki hücre canlılığı

5. TARTIŞMA

Kitosan; farmasötik kimyada formülasyonlarında ve ilaç salım uygulamalarında sıklıkla tercih edilen doğal yollarla elde edilen hem biyouyumlu hem de biyolojik olarak parçalanabilir bir polimerdir (Hirano vd.,1990). Ülkemize endemik *Cephalaria* türlerinden izole edilip saflandırdığımız 3 farklı yapıdaki saponin molekülleri de yenilenebilir bir kaynaktan elde edilen tamamen biyobozunur ve ayrı ayrı biyolojik aktivite potansiyelleri kanıtlanmış bileşiklerdir. Saponinler güçlü biyolojik aktivitelerine rağmen yüksek hemoliz değerleri ve sitotoksiteleri nedeniyle tedavilerde intravenöz yolla kullanılamamaktadırlar (Sarıkahya vd, 2018). Bunun gibi çeşitli dezavantajları gidermek amacıyla yola çıkılan bu tez çalışmasında; biyobozunur bir polimer olan kitosan molekülleri kaplayarak hazırlanan nanoyapılı formülasyonların, biyolojik olarak aktif saponinler için taşıyıcı sistem olarak kullanılması hedeflenmiştir.

Tez çalışması kapsamında, saponinlerin ekstraksiyon, izolasyon ve saflandırma işlemleri yapıldı ve elde edilen saf saponinlerin yapı tayinleri 1 ve 2 boyutlu NMR analizleri (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, NOESY, HMQC, HMBC) ve kütle spektrometresi (HR-ESIMS) analizleri ile belirlendi. Üç farklı yapıdaki saponinlerin UV spektrometresi ile kolorimetrik yöntem kullanılarak miktar tayini yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri kolorimetrik yöntem ile nicel analize uygun saponinin α -hederin olduğu belirlendi ve nanopartiküle yüklenecek saponin olarak seçildi. Seçilen saponinin, kitosan nanoparçacığına (CSNP) yüklenmesi, iyonik jelleşme yöntemi kullanılarak %38 enkapsülasyon verimi ile gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen nanoparçacığın yapısal, termal ve yüzey morfolojik özellikleri, ileri karakterizasyon teknikleri (FT-IR, DLS, TGA, SEM-EDX, TEM, XPS) ile belirlendi. Saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının (SPCSNP) FT-IR spektrumunda, 3432 cm^{-1} 'de gözlenen keskin pik, kitosan nanoparçacıklarında çok daha geniş bant şeklinde gözlenmiştir. Bu pikin keskinleşmesi, saponin ile kitosan arasındaki hidrojen bağları etkileşimlerinden kaynaklı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, 1633 cm^{-1} 'de saponin ve kitosan nanoparçacıkları arasında amit bağı olduğunu gösteren yeni bir pikin varlığı görülmüştür. Nanoparçacık boyutu için ise DLS analizi yapıldı ve kitosan nanoparçacığının boyutu $62,91\pm 9,40$ iken saponin yüklü kitosan nanoparçacığının boyutu $109,04\pm 37,80$ olarak bulundu. Bu değerlere bakıldığında, saponin yüklenmesi halinde kitosan nanoparçacık boyutunun arttığı ve yüklemenin başarı ile gerçekleştiği görüldü. Bununla birlikte CSNP için zeta potansiyeli $-16,45\pm 0,86$ iken bu değer SPCSNP için $-25,61\pm 3,31$ olarak bulunmuştur. SEM ve TEM analiz

sonuçlarına bakıldığında saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının küresel yapıda olduğu gözlenmiş ve ilgili literatürle uyumlu bulunmuştur (Bande vd., 2015; Rejinold vd.,2011; Saharan vd., 2013). EDX analizi sonucunda gözlenen C, O, N ve P elementleri, kitosan nanoparçacıklarının (CSNP) ve saponin yüklü kitosan parçacıklarının (SPCSNP) iyonik jelleşme ile başarılı bir şekilde sentezlendiğini gösterdi. SPCSNP'lerin termal karakteri TG analizi ile bulundu. SPCSNP'lerin TG termogramında iki bozunma basamağı gözlemlendi. İlki su moleküllerinin uzaklaştırılması iken, ikinci bozunmanın ise maddenin ana yapısında olduğu şeklinde yorumlandı. Kalıntı ağırlığının 580°C'de SPCSNP'ler için %44,80 ve CSNP'ler için %48,45 olarak bulundu. Sonuçlar kıyaslandığında; SPCSNP'lerin termal stabilitesinin CSNP'lerinkine kıyasla biraz daha düşük olduğu kanıtlandı. Bu sonuçlara göre; polar grupların artması ve kristalliliğin azalması nedeniyle ısıl kararlılığın da azaldığı sonucuna varıldı (Rejinold vd.,2011). TG analizi verilerinden yararlanılarak (saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının, kitosan nanoparçacıklarından daha fazla bozunması ile ortaya çıkan farkdan yararlanılarak) yapılan hesaplamalar ile nanoparçacığa yüklenen ilaç etken madde (α -hederin) verimi bulundu. Yükleme verimi %3,65 (3,65 mg/ 100 mg) olarak hesaplandı. Kitosan nanoparçacıklarının (CSNP) ve saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının (SPCSNP), XPS analiz sonucuna göre C, O, N ve P atomlarının varlığı görüldü. Hem kitosan nanoparçacığı hem de saponin yüklü kitosan nanoparçacığı aynı fonksiyonel gruplara sahiptir. Bu da bağlanma enerjilerinin değerleri ile molekül yapıları arasında ayırım yapılmasını zorlaştırır ancak SPCSNP'lerde görülen düşük yüzde ile orantılı daha küçük görülen P 2p ve N 1s piki ile CSNP'lerde yüzdenin artması ile artan P 2p ve N 1s piki saponinin yüklenmiş olduğunu kanıtlamaktadır. Yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda; saponin molekülünün kitosan nanoparçacığına başarılı bir şekilde yüklendiği sonucuna varılmıştır.

Kitosan ve saponin yüklü kitosan nanoparçacıklarının sitotoksik aktivite sonuçları MTT yöntemi ile PC-3, PANC-1, HL-60, SH-SY5Y ve CCD-34LU hücre hatları kullanılarak saf saponin ile kıyaslandı. Elde edilen sonuçlara göre; kitosan nanoparçacığının IC50 değerlerine ulaşamazken, saponin yüklü kitosan parçacıklarının IC50 değerleri PC-3 ve HL-60 hücre hatlarında önemli ölçüde artış gösterdi. Yapılan hesaplamalar sonucunda, saf saponin ile karşılaştırıldığında saponin yüklü kitosan nanoparçacığının sitotoksik aktivitesinin daha yüksek olduğu belirlendi. Sitotoksik aktivite sonuçlarına göre de oldukça iyi inhibisyon gösteren α -hederin saponini için kitosanın uygun bir taşıyıcı sistem olduğu ve aktiviteyi artırdığı görülmüştür. Tamamen doğal, yerli ve yenilenebilir bir bitki

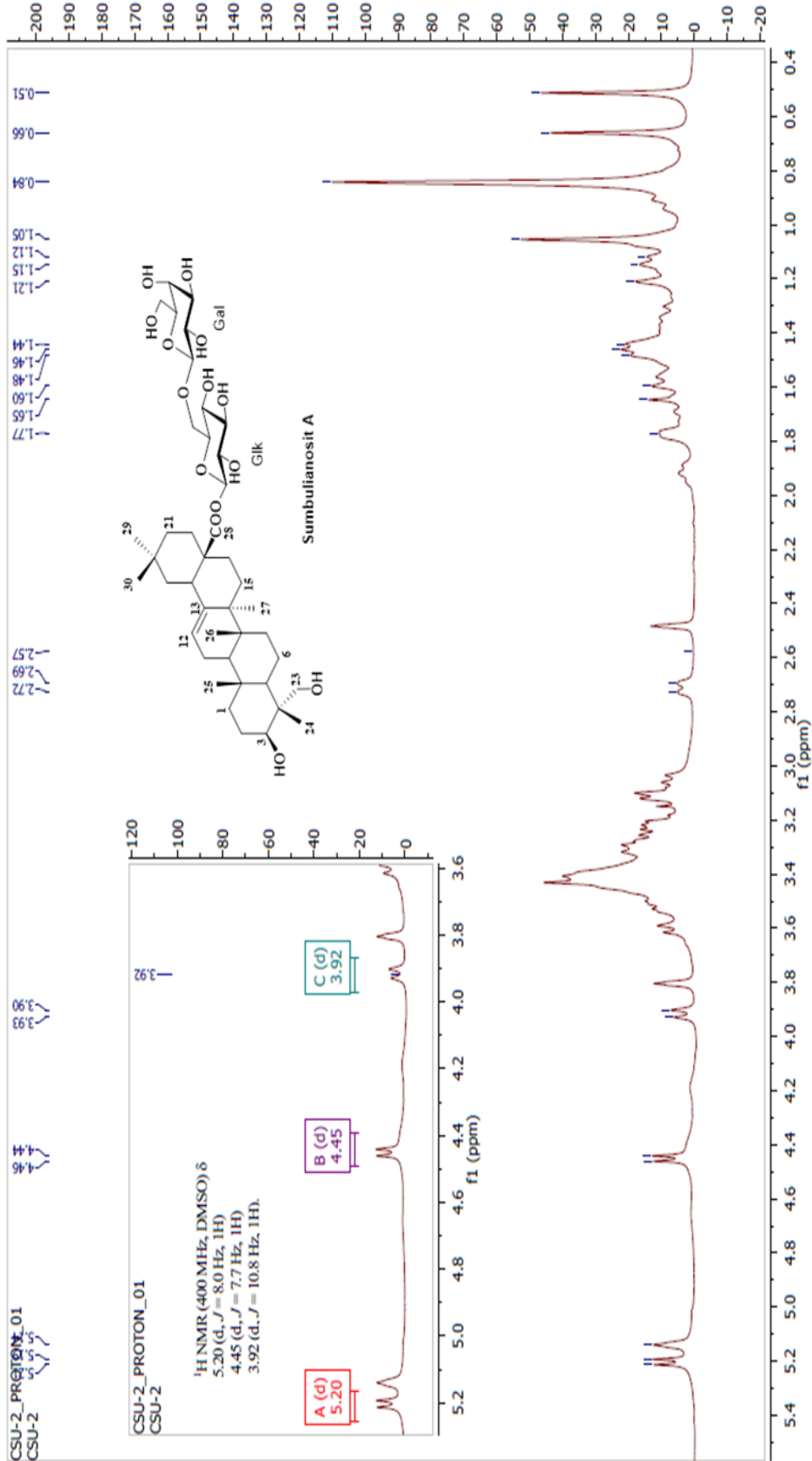
kaynağından elde edilen, biyobozunur ve biyolojik aktif saponin molekülünün kitosan nanoparçacıklarına yüklenmesi ve saponinlerin ilaç taşıyıcı sistemler aracılığı ile biyolojik sistemlerde kullanılabilecek olması bu tez çalışmasından elde edilen en önemli çıktıdır.

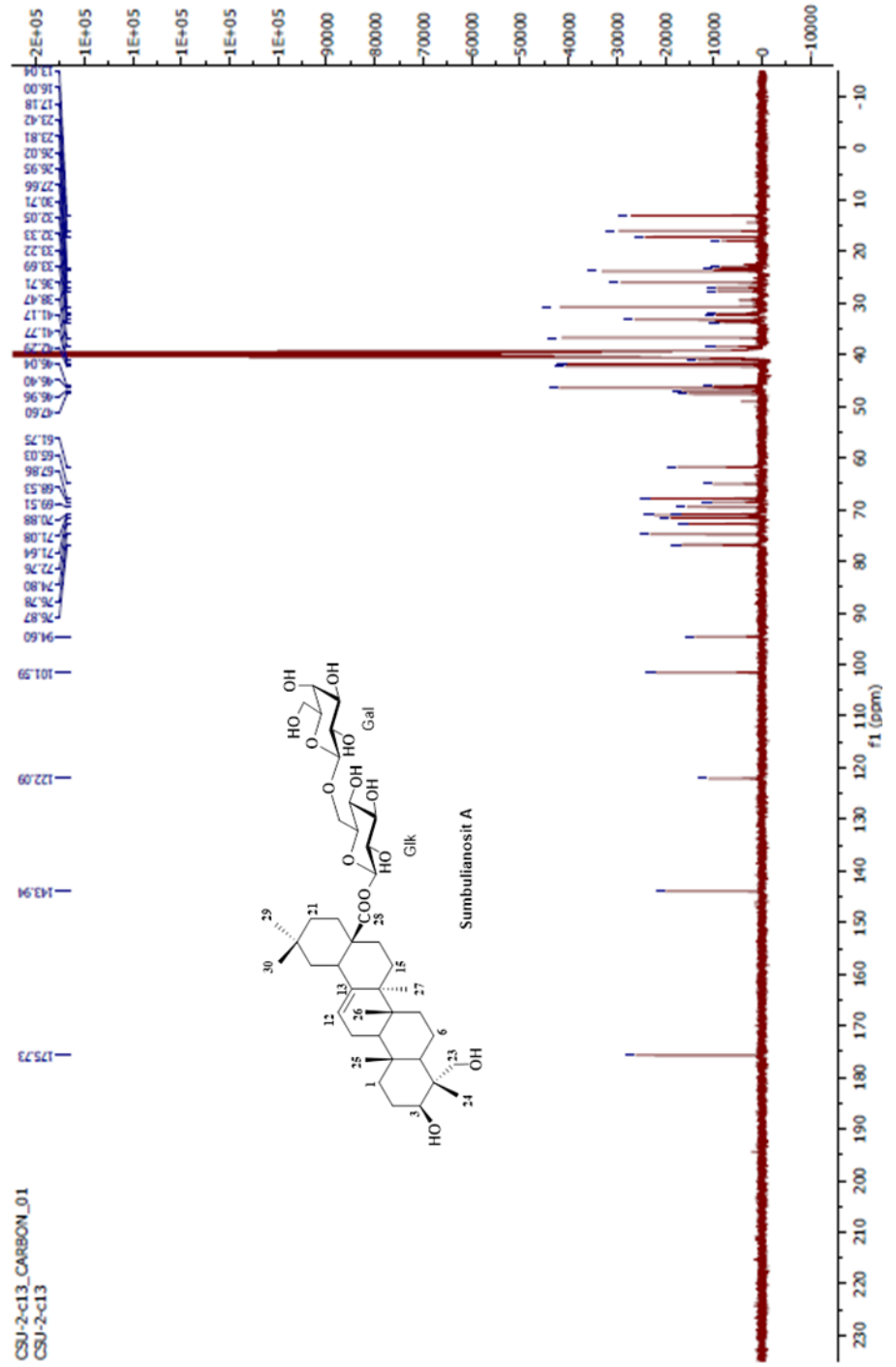
6. ÖNERİLER

Çalışma sonucu gözlemlenen enkapsülasyon veriminin düşüklüğünü gidermek için, kitosan yerine ilaç yüklü polimerik sistemlerin hazırlanmasında sıklıkla tercih edilen polietilen glikol, PLGA, polikaprolakton (PKL), polietilen glikol (PEG), dekstran gibi farklı polimer çeşitlerine saponinnin yüklenmesi çalışmaları gerçekleştirilebilir (Hayta, 2014; Zang vd.,2022).

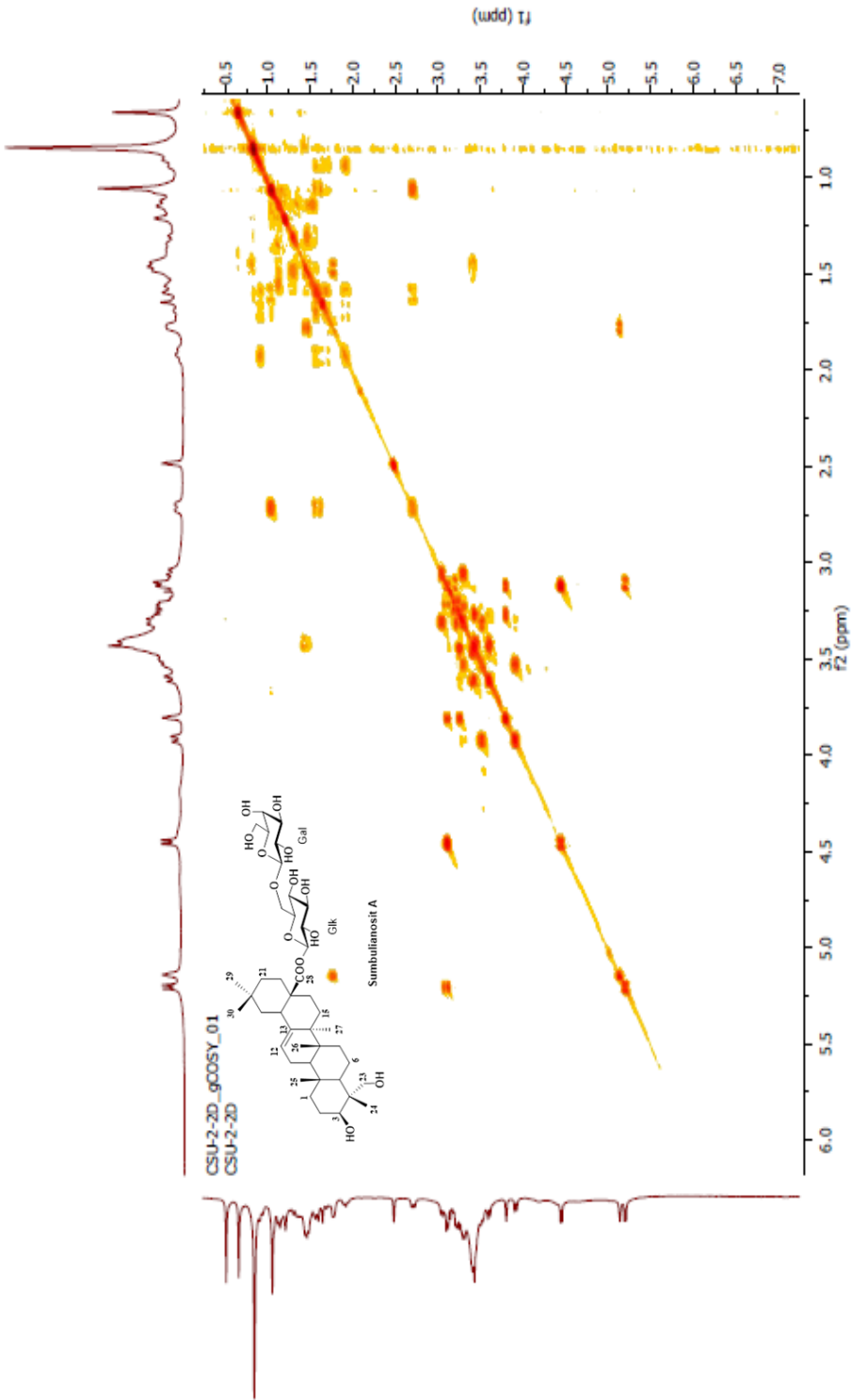
Alfa-hederin yüklü kitosan nanoparçacığı başarılı bir şekilde sentezlenmiş ve insan prostat adenokarsinomu hücre hatları (PC-3) ile insan lösemi hücre hatlarında (HL-60) artan sitotoksik aktiviteleri görülmüştür. Bu sonuçlara dayanarak hazırlanan Alfa-hederin yüklü kitosan nanoparçacığının stabilite, farklı pH ortamlarında in vitro salım çalışmaları ve kanserli hayvan modellerinde biyodağılım ve tedavi potansiyelinin incelenmesi gibi in vivo çalışmalar yapılması gelecekte yapılacak çalışmalar olarak planlanmaktadır.

7. EKLER

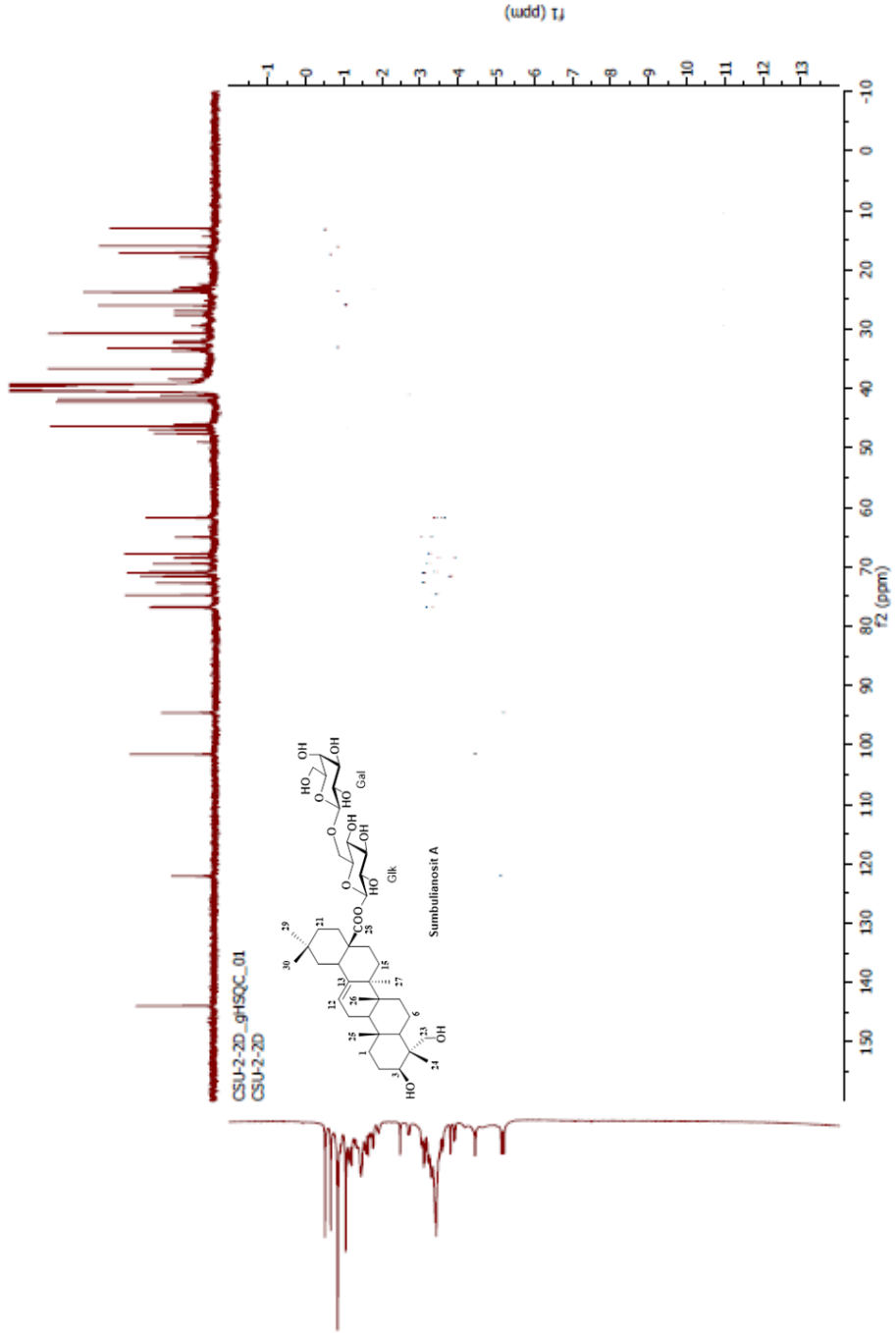
Şekil 7.1 Sumbulianosit A bileşiğinin ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) spektrumu



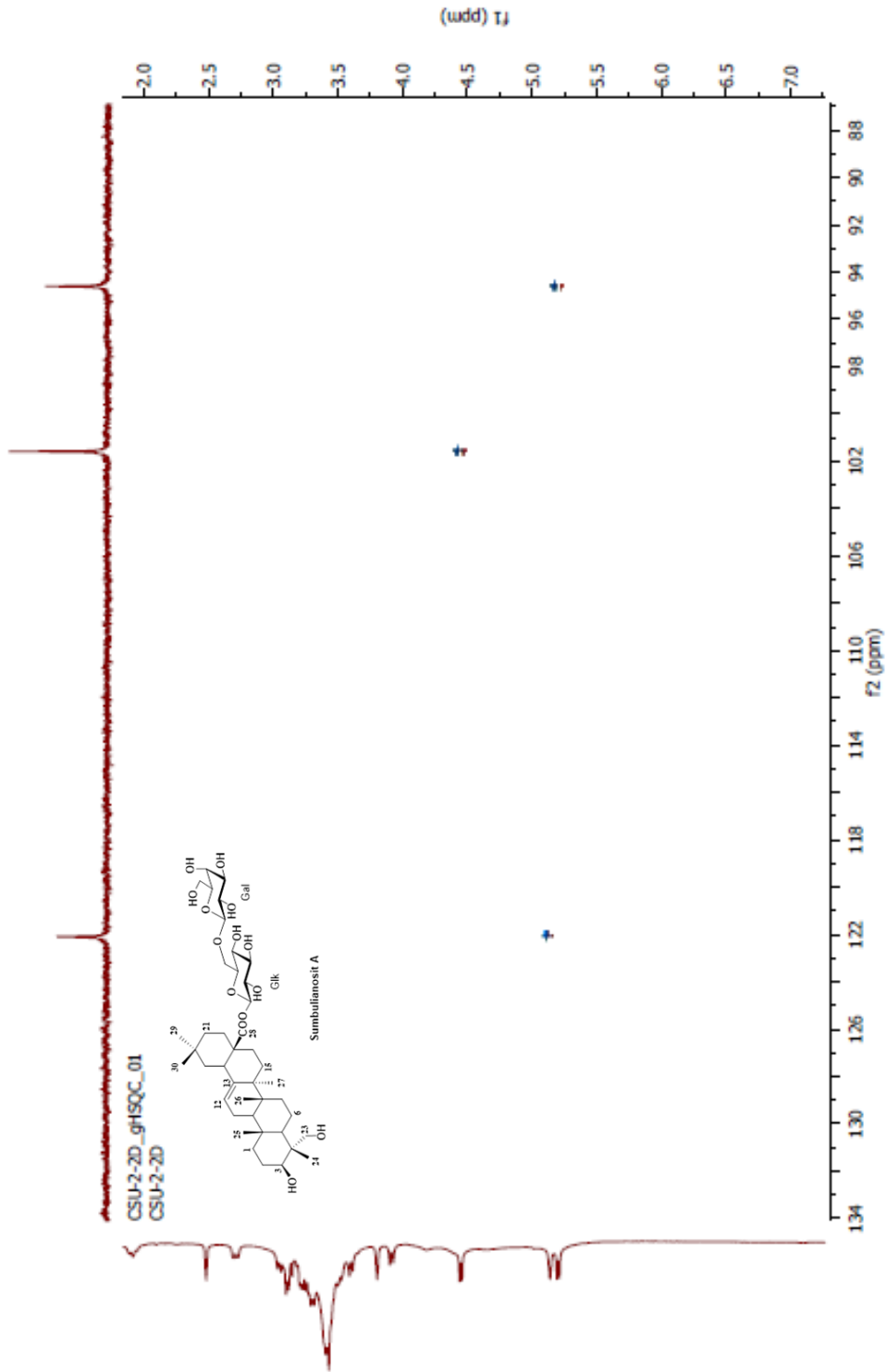
Şekil 7.2 Sumbulianosit A bileşiğinin ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) spektrumu



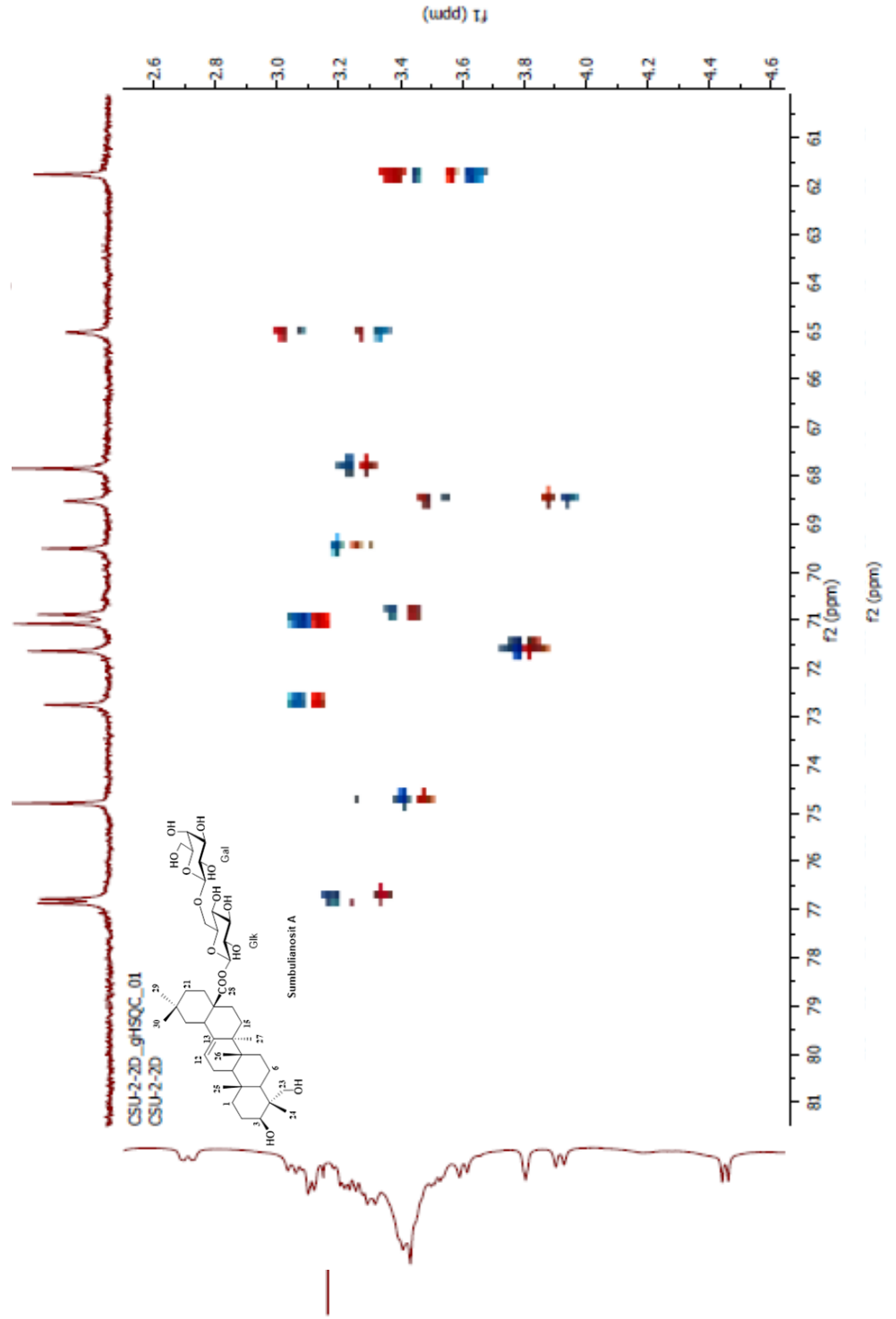
Şekil 7.3 Sumbulianosit A bileşiğinin COSY (400 MHz) spektrumu



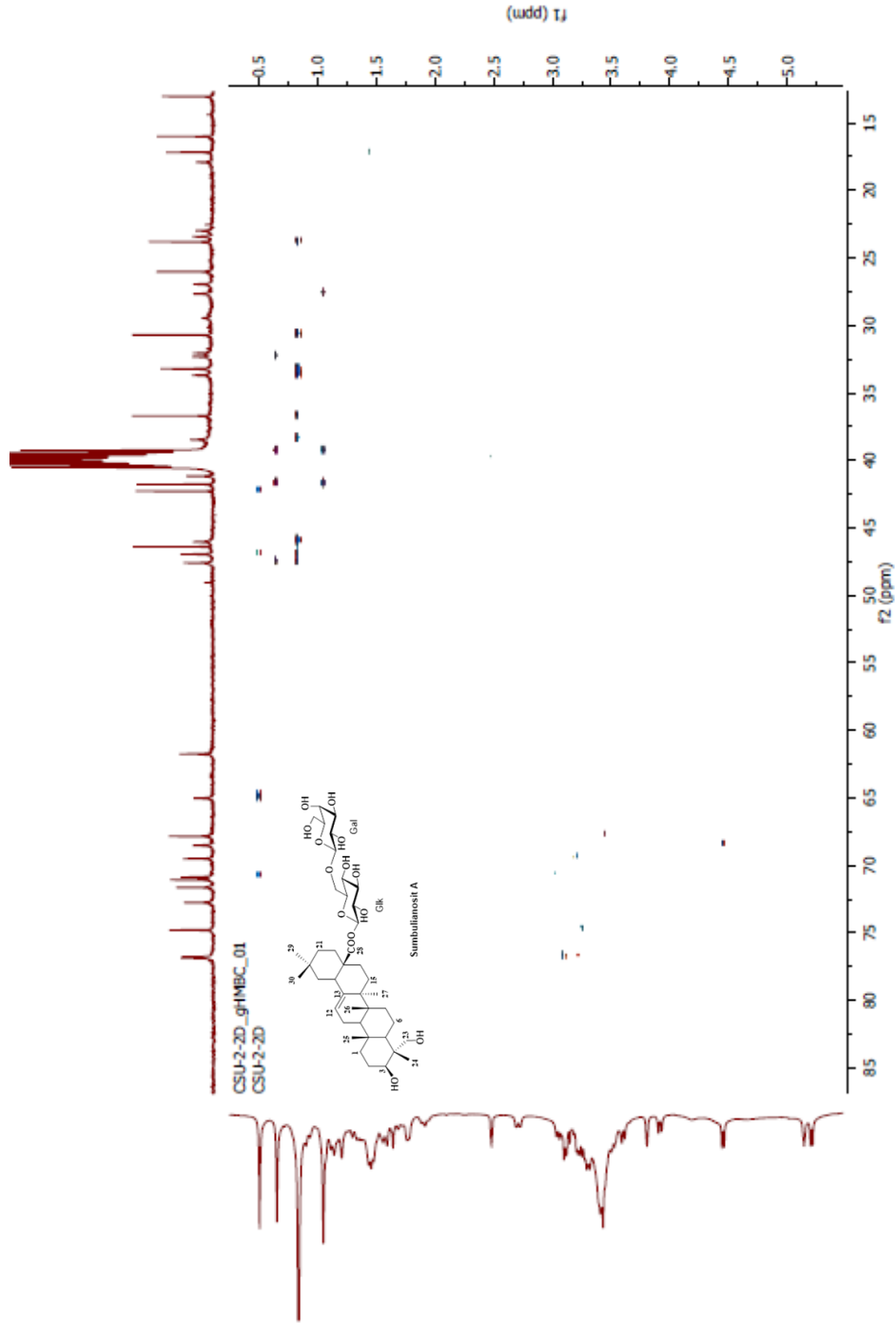
Şekil 7.4 Sumbulianosit A bileşiğinin HSQC (400 MHz) spektrumu



Şekil 7.5 Sumbulianosit A bileşiğinin HSQC (400 MHz) spektrumu

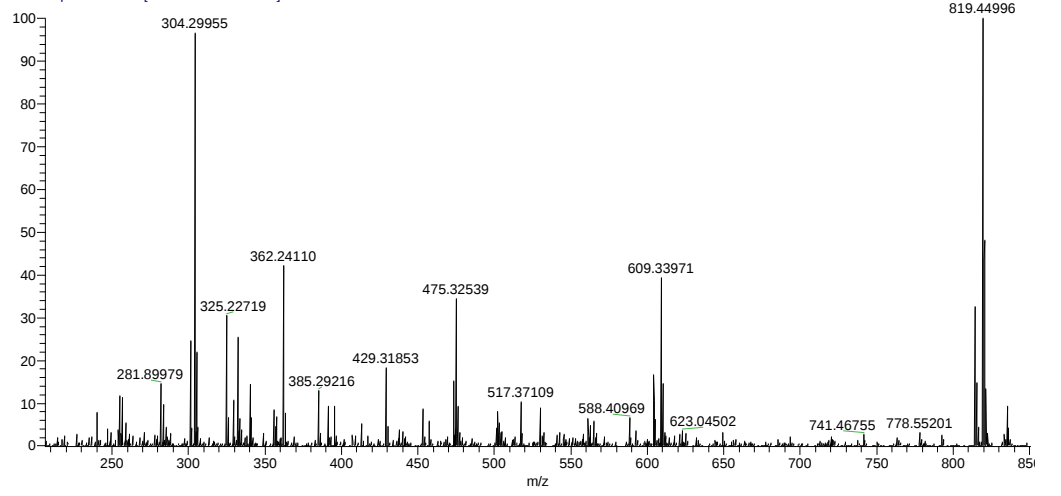


Şekil 7.6 Sumbulianosit A bileşiğinin HSQC (400 MHz) spektrumu

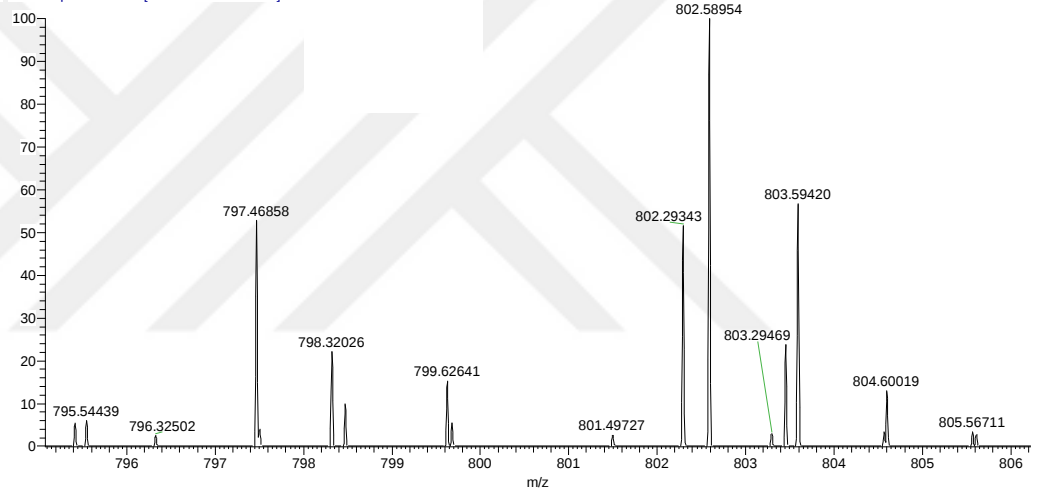


Şekil 7.7 Sumbulianosit A bileşiğinin HMBC (400 MHz) spektrumu

CSU 2 #53-58 RT: 0.71-0.78 AV: 6 NL: 3.92E7
T: FTMS + p ESI Full ms [200.0000-1500.0000]

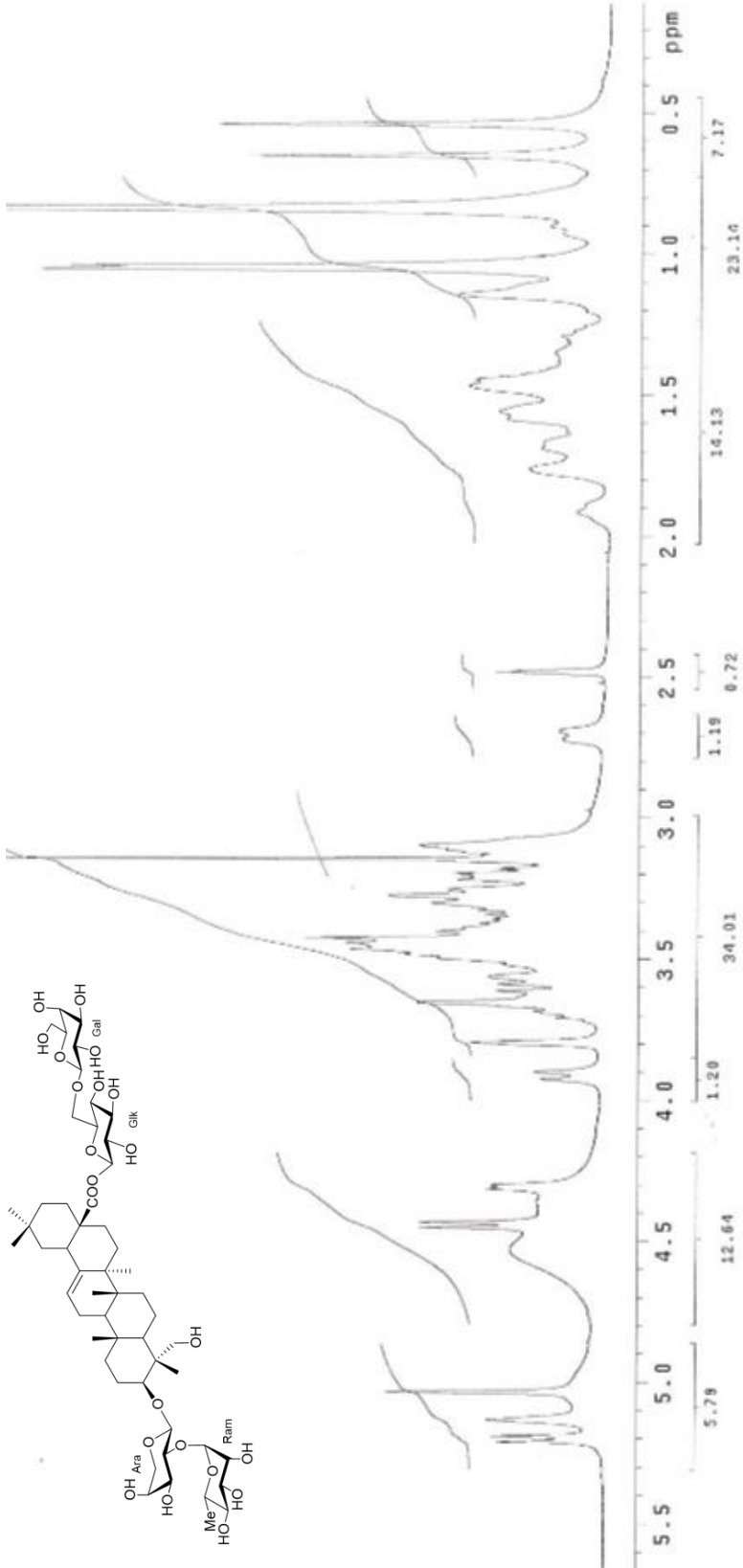


CSU 2 #53-58 RT: 0.71-0.78 AV: 6 NL: 2.36E5
T: FTMS + p ESI Full ms [200.0000-1500.0000]

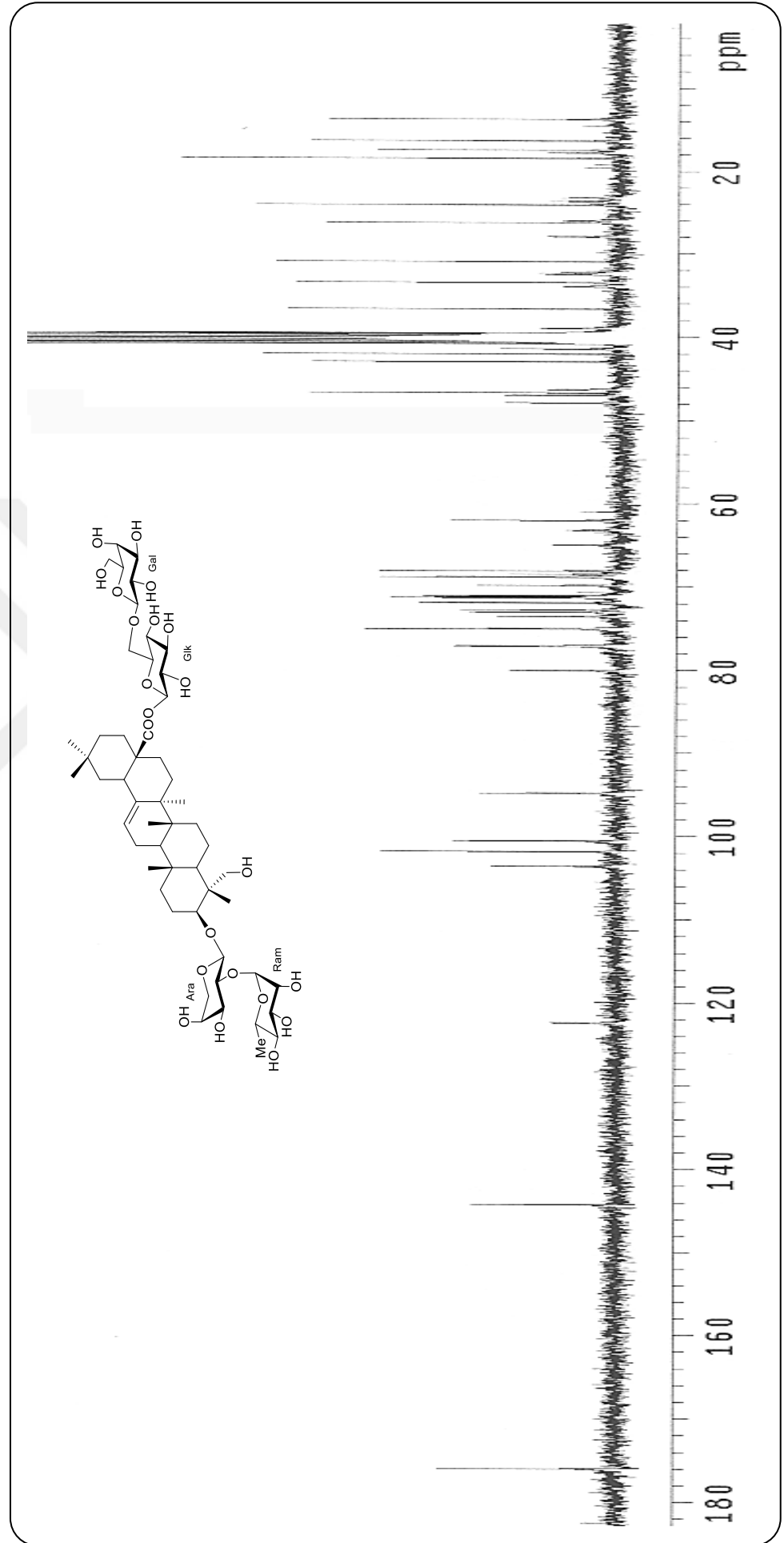


m/z	Teo. Kütle	Delta (ppm)	RDB denk.	Bileşik
797.46858	797.46818	0.50	8.5	C42 H69 O14

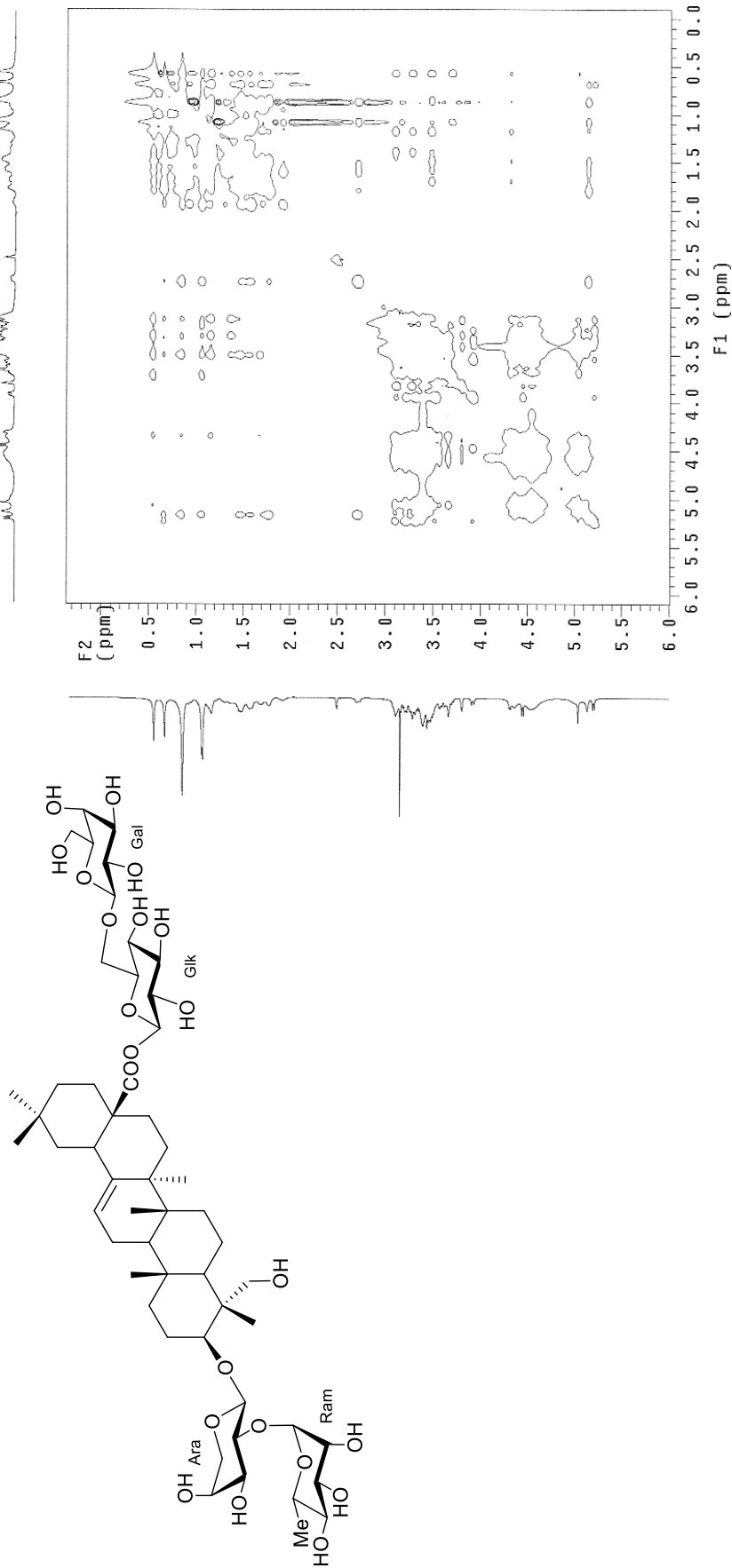
Şekil 7.8 Sumbulianosit A bileşiğinin HR-ESIMS spektrumu



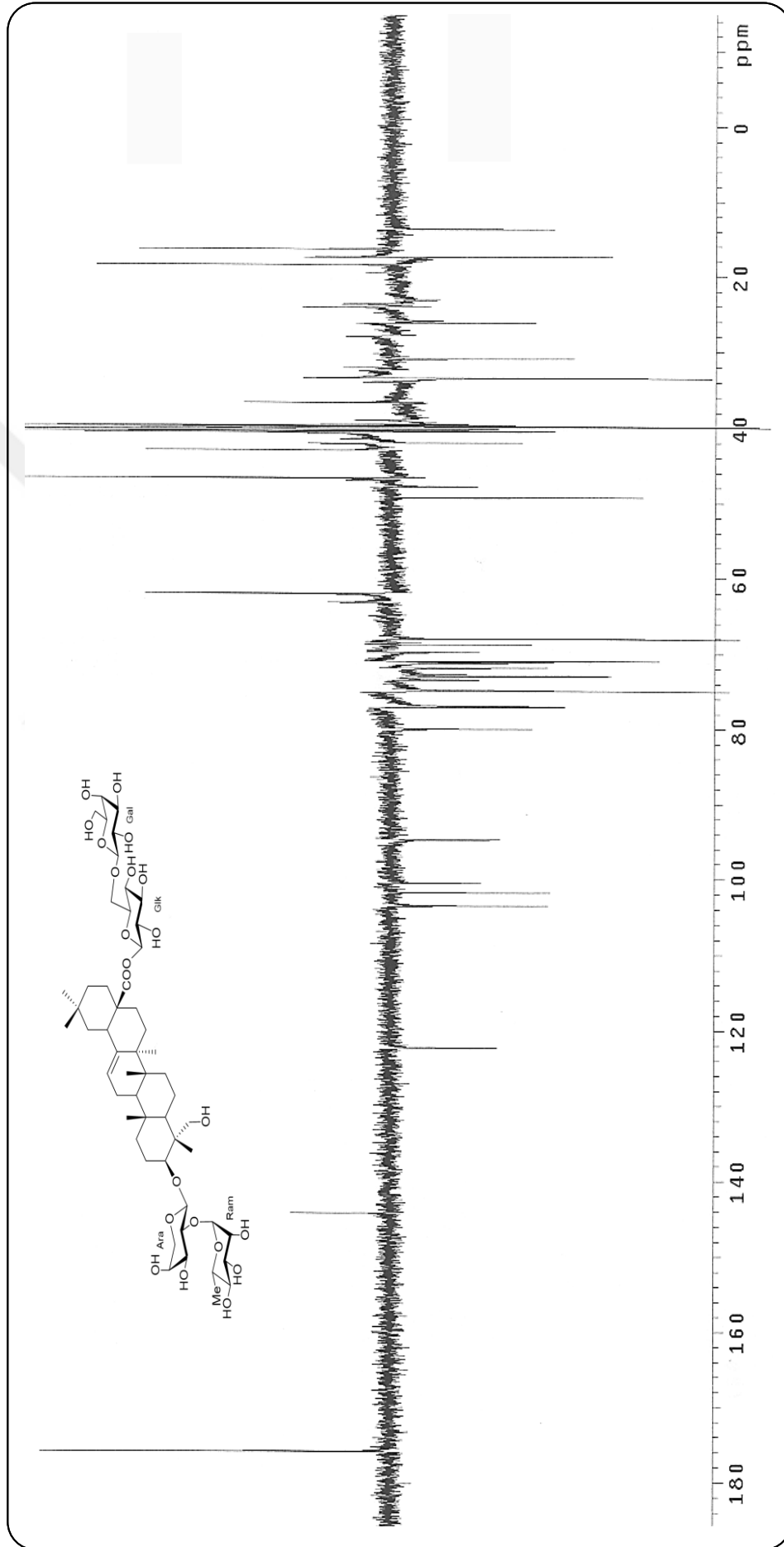
Şekil 7.9 Elmalienosit B bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



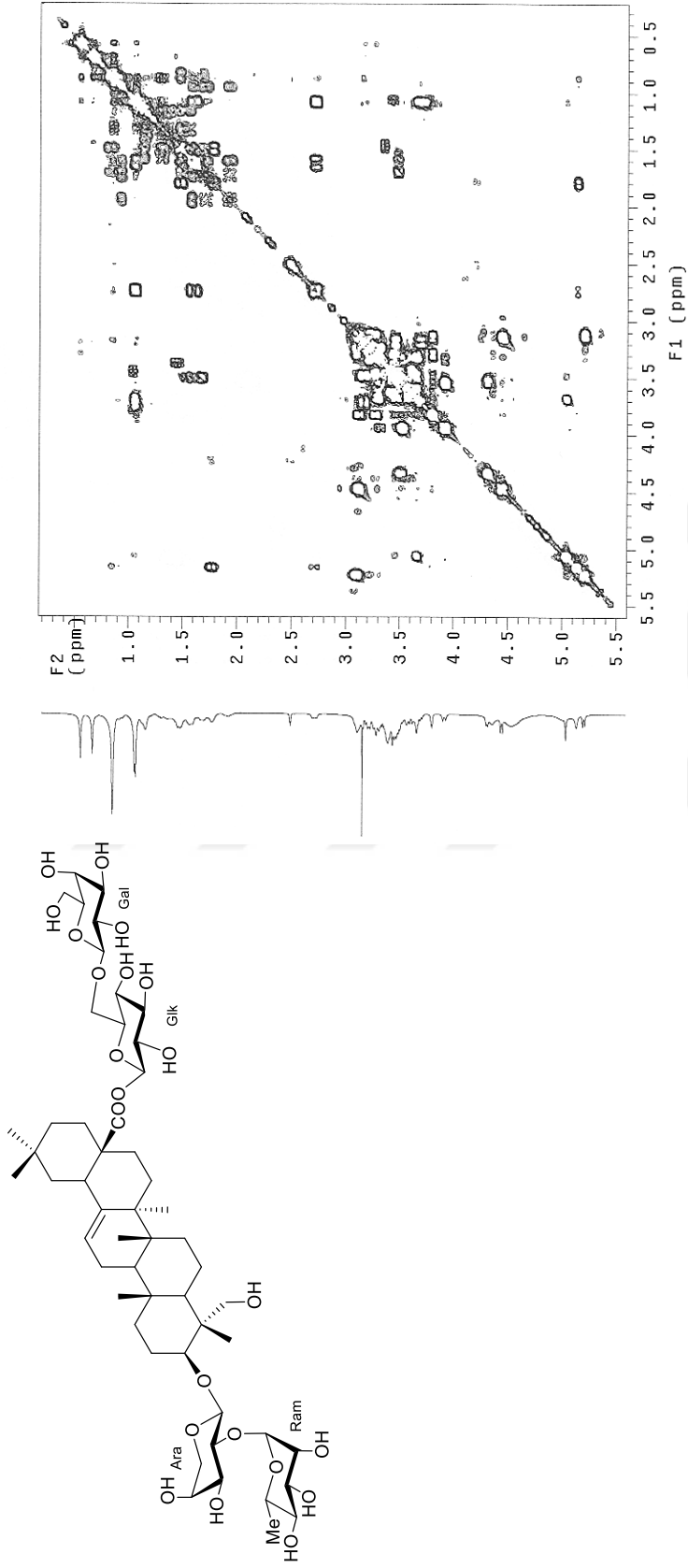
Şekil 7.10 Elmalienosit B bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



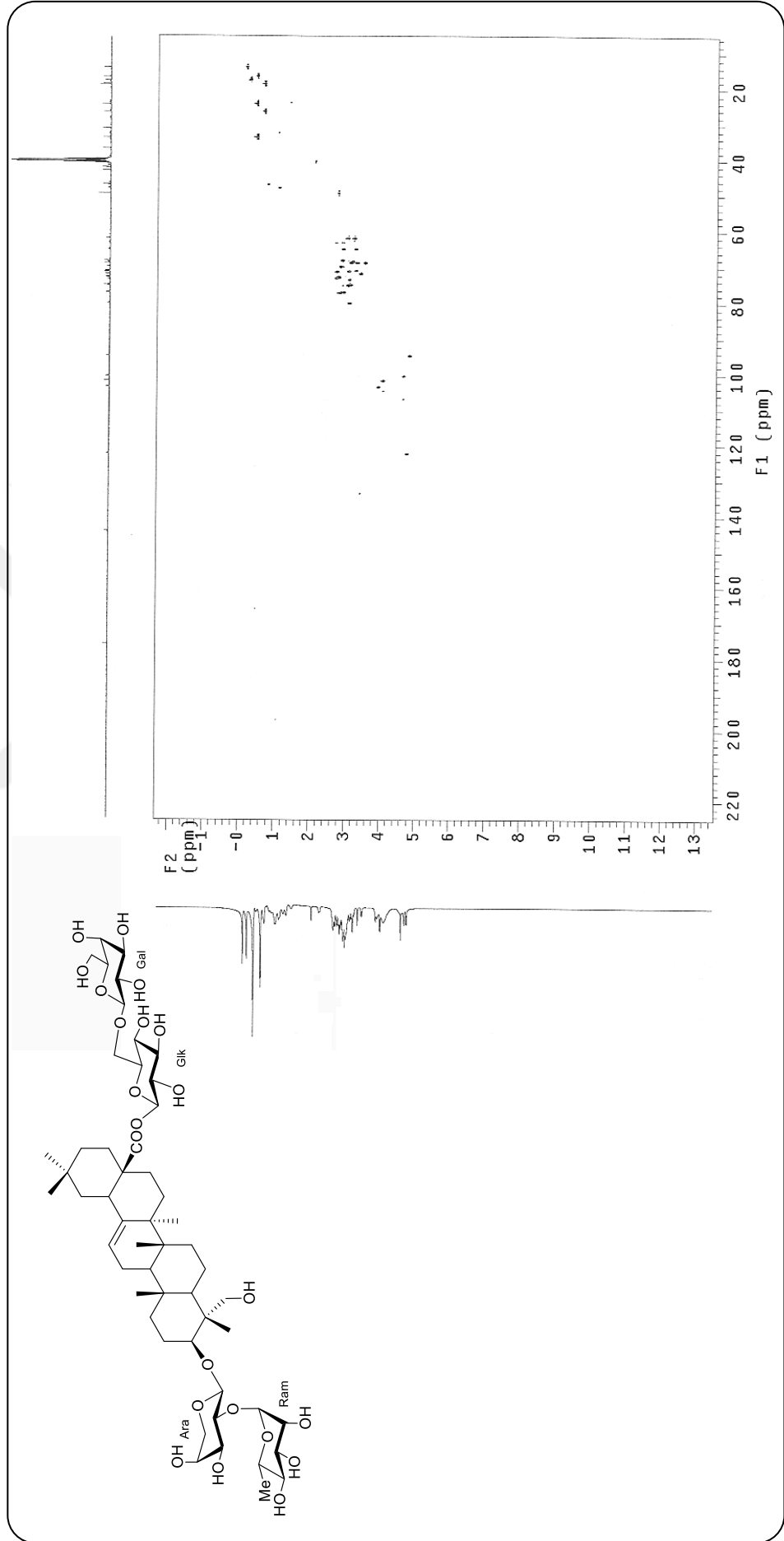
Şekil 7.11 Elmalienosit B bileşiğinin NOESY spektrumu



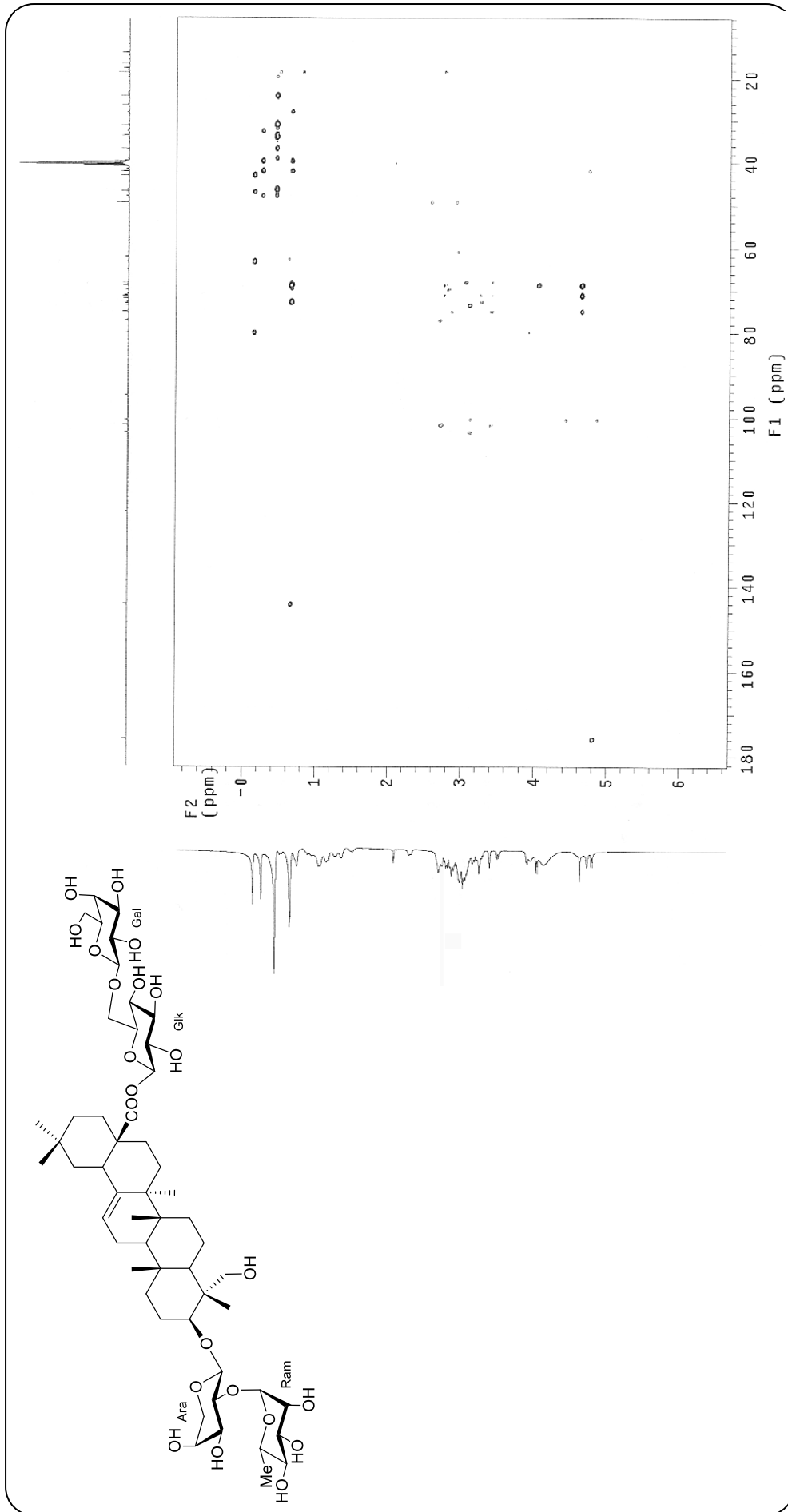
Şekil 7.12 Elmalienosit B bileşiğinin DEPT spektrumu



Şekil 7.13 Elmalienosit B bileşiğinin COSY spektrumu



Şekil 7.14 Elmalienosit B bileşiğinin HMQC spektrumu



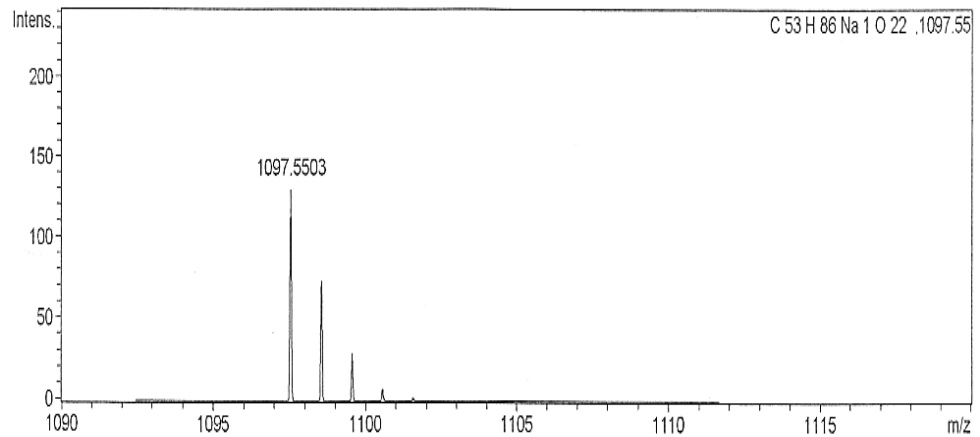
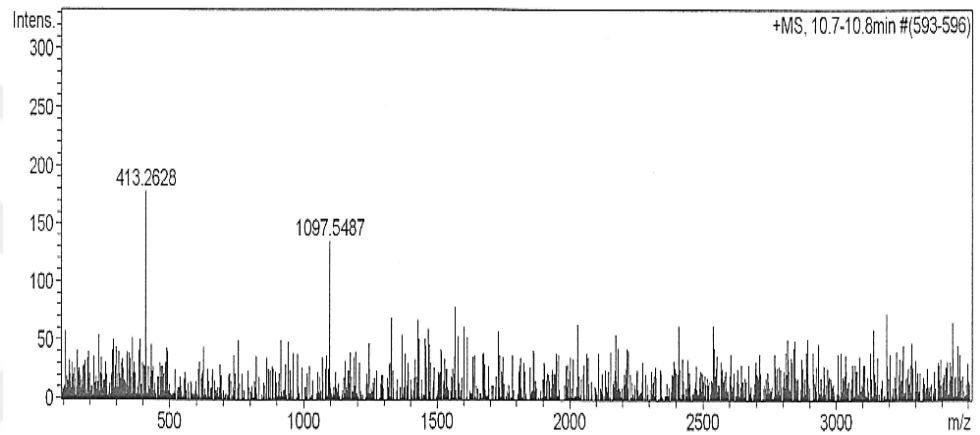
Şekil 7.15 Elmalienosit B bileşiğinin HMBC spektrumu

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4500 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3500 m/z	Set Collision Cell RF	500.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

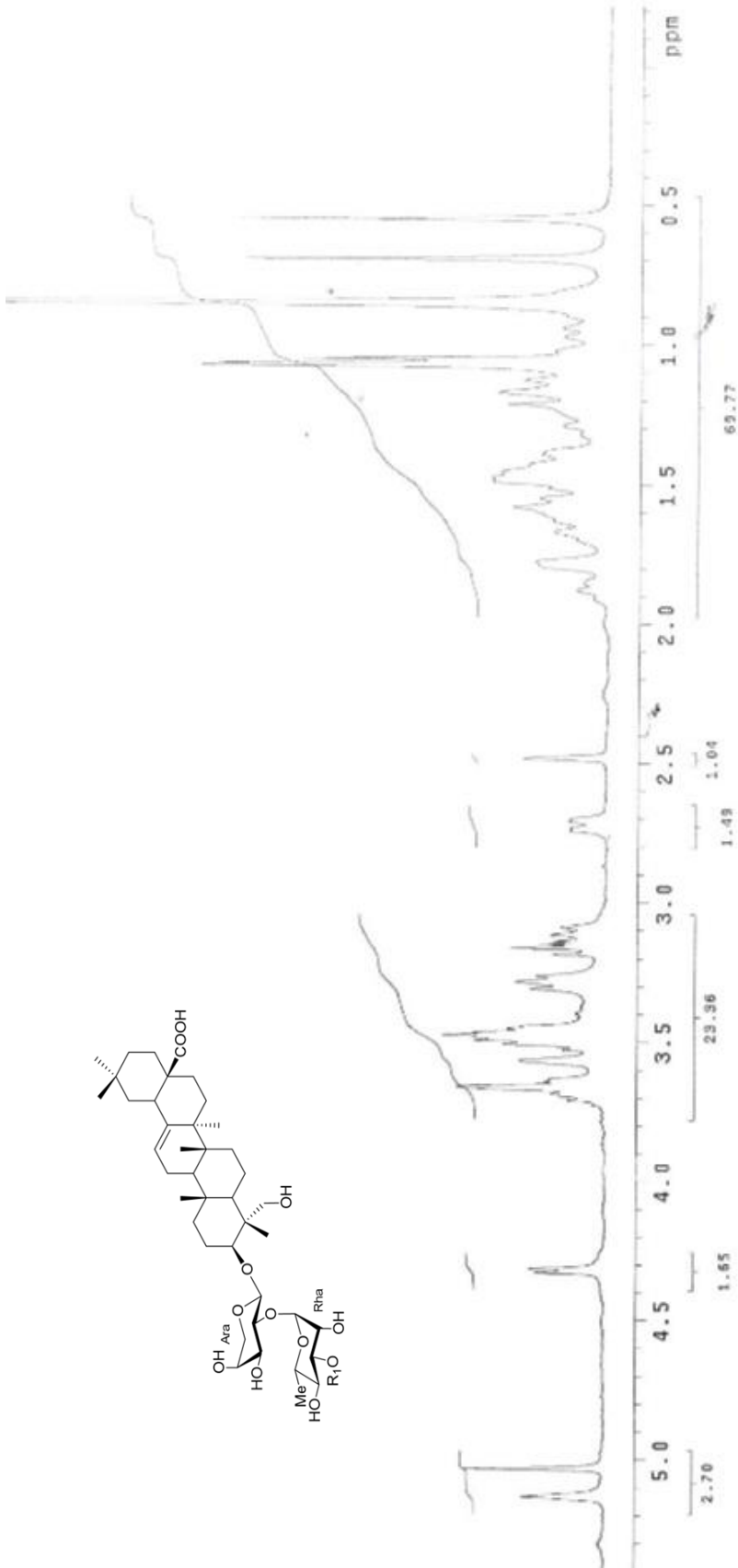
Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C53O22H86Na				
Formula, max.	C53O22H86Na				
Measured m/z	1097.55	Tolerance	4 mDa	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration both			
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	yes				

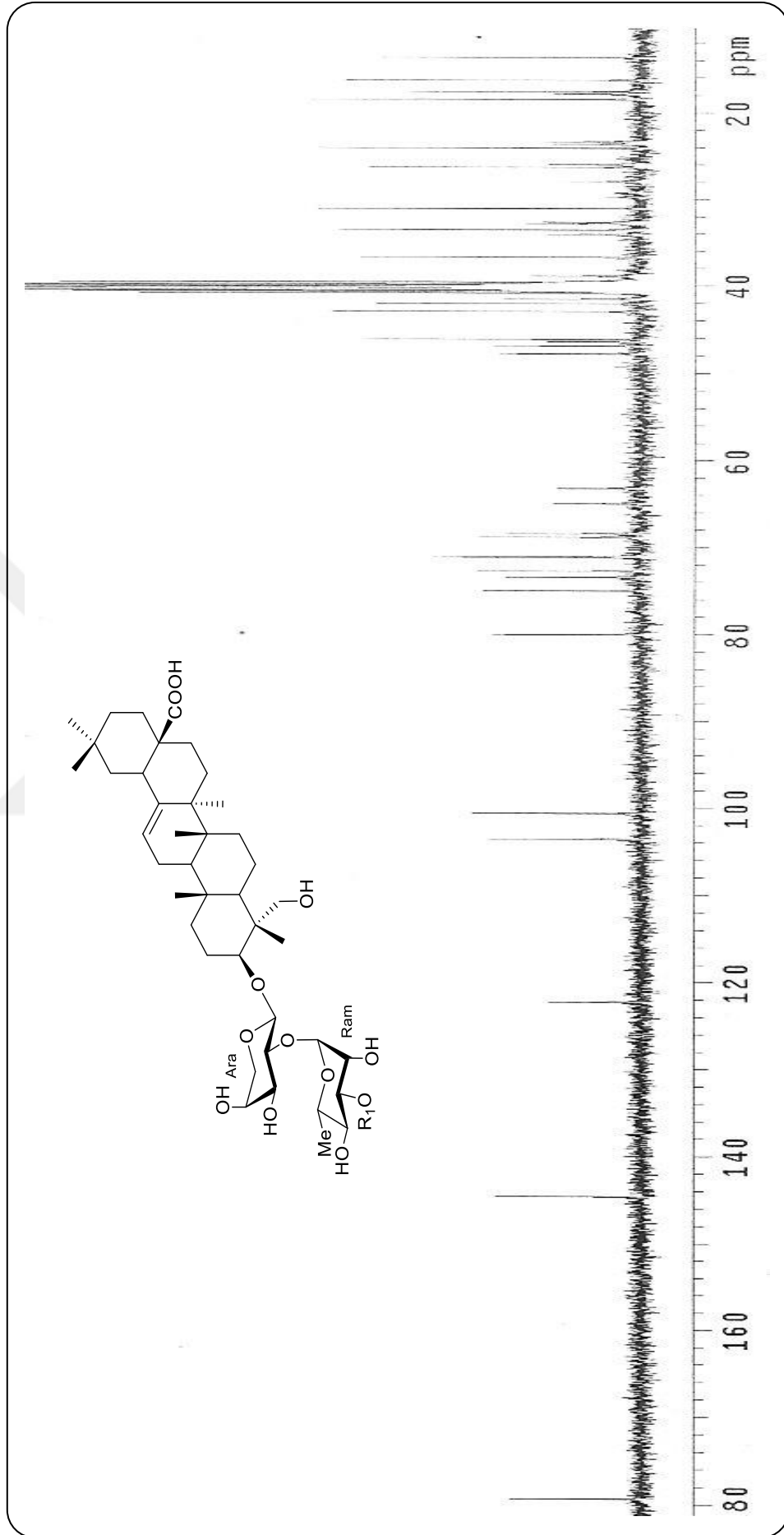


Sum Formula	Sigma	m/z	Err [ppm]	Mean Err [ppm]	Err [mDa]	rdb	N Rule	e ⁻
C 53 H 86 Na 1 O 22	0.283	1097.5503	1.49	1.44	1.63	10.50	ok	even

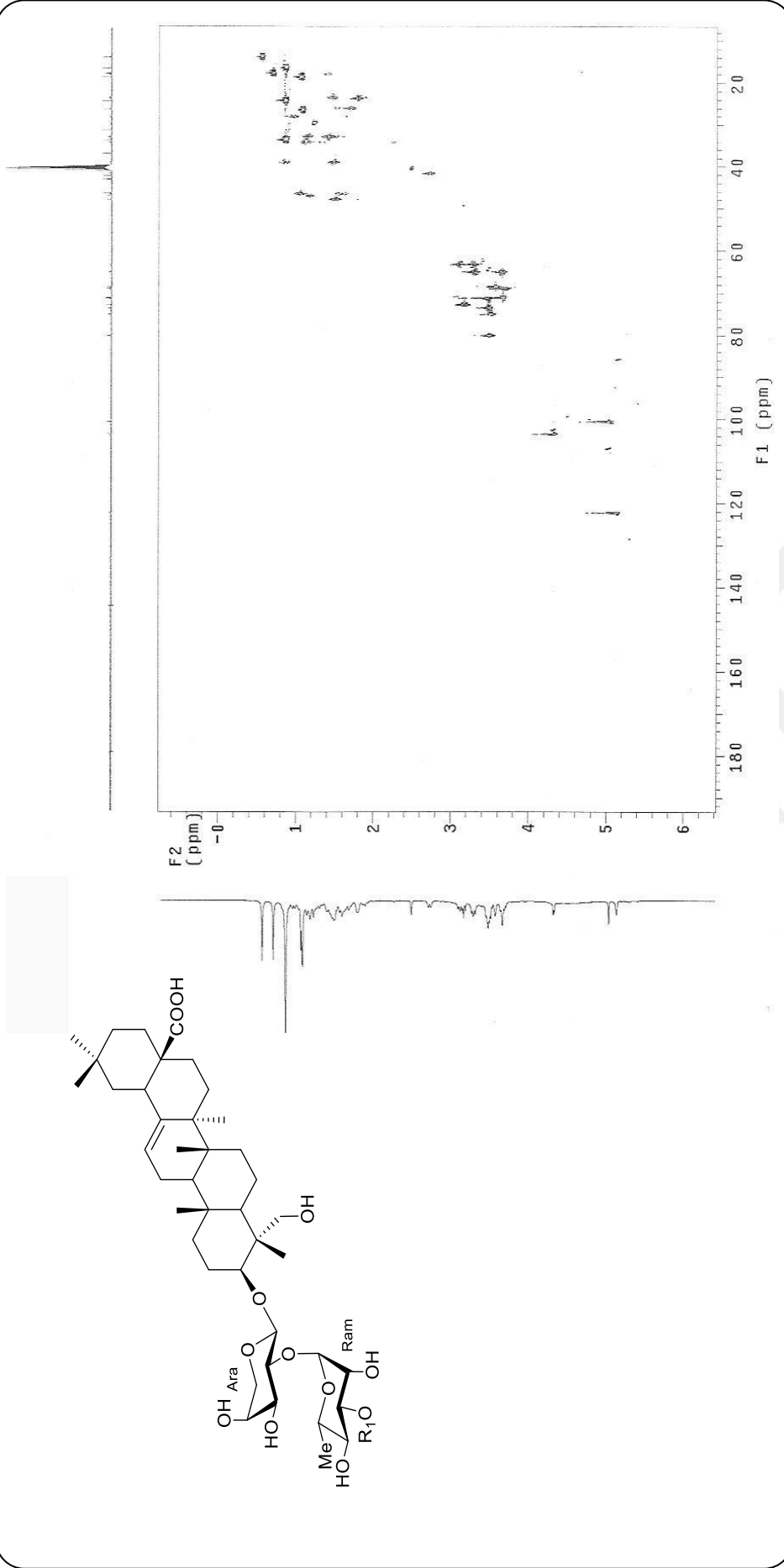
Şekil 7.16 Elmalienosit B bileşiğinin HR-ESIMS spektrumu



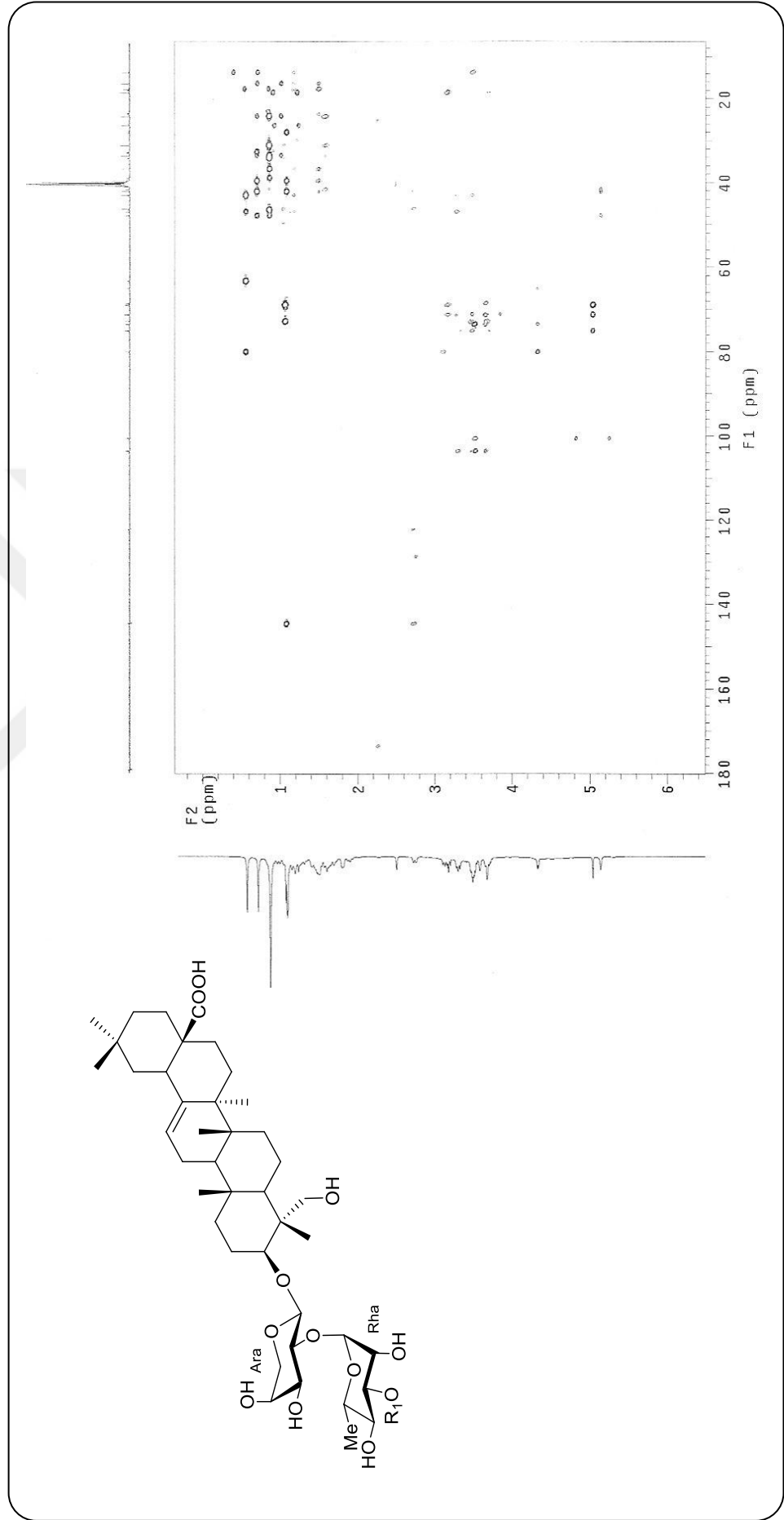
Şekil 7.17 α -hederin bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



Şekil 7.18 α -hederin bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 7.19 α -hederin bileşiğinin HMQC spektrumu



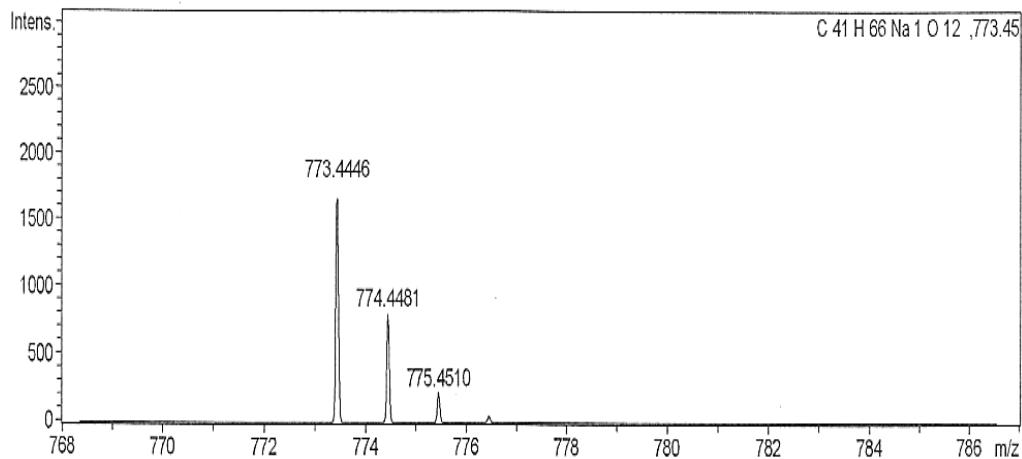
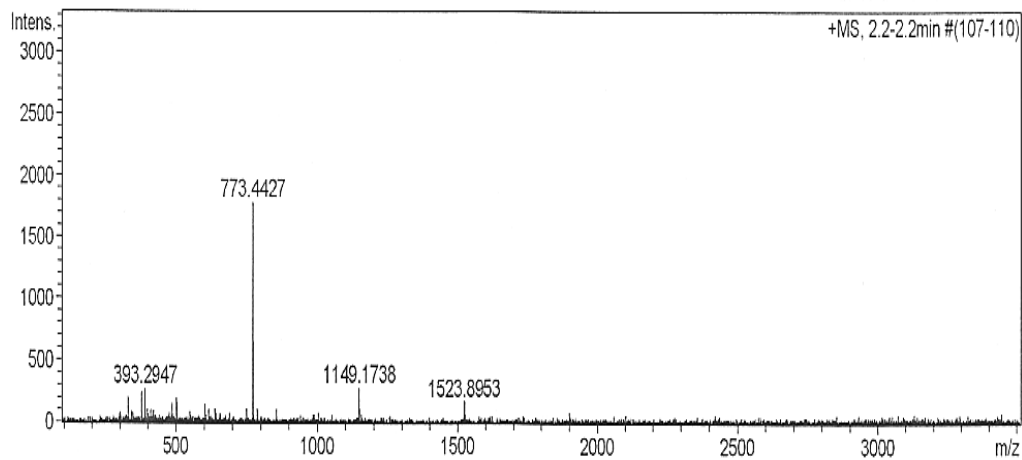
Şekil 7.20 α -hederin bileşiğinin HMBC spektrumu

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Negative	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Active	Set Capillary	4000 V	Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	3500 m/z	Set Collision Cell RF	500.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.	C ₂₆ H ₆₆ Na ₁ O ₁₂				
Formula, max.	C ₄₁ O ₁₂ H ₆₆ Na				
Measured m/z	773.443	Tolerance	4 mDa	Charge	1
Check Valence	no	Minimum	0	Maximum	0
Nitrogen Rule	no	Electron Configuration	both		
Filter H/C Ratio	no	Minimum	0	Maximum	3
Estimate Carbon	yes				



Sum Formula	Sigma	m/z	Err [ppm]	Mean Err [ppm]	Err [mDa]	rdB	N Rule	e ⁻
C ₄₁ H ₆₆ Na ₁ O ₁₂	0.059	773.4446	2.49	1.60	1.92	8.50	ok	even

Şekil 7.21 α-hederin bileşiğinin HR-ESIMS spektrumu

KAYNAKÇA

Abacı H., Akagac G., Nalbantsoy A., Sarikahya N. B., 2022, A hederagenin-type triterpene saponin, sumbulianoside a from *Cephalaria sumbuliana* and its potent immunomodulatory activity against seasonal flu virus H3N2. *Natural Product Research*, 36(10), 2495-2503.

Aguado, R., Tarrés, Q., Mutjé, P., Pèlach, M. À., & Delgado-Aguilar, M., 2022, Non-covalently cationized nanocellulose from hemp: Kinetics, key properties, and paper strengthening. *Industrial Crops and Products*, 188, 115582.

Ali Y., Richardson A.C., 1967 The Reduction of Azides with Sodium Borohydride: A Convenient Synthesis of Methyl 2-Acetamido-4,6-O-benzylidene-2-deoxy- α -D-allopyranoside. *Carbohydr. Res.*, 5, 441.

Aliev A.M. and Movsumov I.S., 1976, Triterpenoid glycosides from *Cephalaria kotchyi* flowers, *Khim. Prir. Soedin*, 2:264-265.

Allemann E., Gurny R., Doekler E., 1993, Drug-loaded nanoparticles preparation methods and drug targeting issues. *Eur J Pharm Biopharm*, 39:173-91.

Allen TM, Cullis PR., 2013, Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* ;65:36–48.

Apaydın I., Aydın S., 2018, Panax ginseng C.A. Meyer'in Etkinliği ve Güvenliliği Üzerine Derleme, Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy Review Article, Volume 38, Number 1, pp. 11-23

Applebaum, S. W., Marco, S., Birk, Y., 1969, Saponins as possible factors of resistance of legume seeds to the attack of insects. *J. Agric. Food Chem*, 17, 618-622.

Armendariz V., Herrera I., Peralta-videa J.R. et al. 2004, Size controlled gold nanoparticle formation by *Avena sativa* biomass: use of plants in nanobiotechnology. *Journal of Nanoparticle Research* **6**, 377–382.

Bajić M., Ročnik T., Oberlintner A., Scognamiglio F., Novak U., Likozar B., 2019, Natural plant extracts as active components in chitosan-based films: A comparative study. *Food packaging and shelf life*, **21**, 100365.

Balandrin M.F., 1996, Commercial Utilization of Plant-Derived Saponins: An Overview of Medicinal, Pharmaceutical, and Industrial Applications. In: Waller, G.R., Yamasaki, K. (eds) *Saponins Used in Traditional and Modern Medicine*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 404.

Bamrungsap S, Zhao Z, Chen T, Wang L, Li C, Fu T. et al., 2012, Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Nanomedicine*; **7**:1253–71.

Bande, F., Arshad, S. S., Bejo, M. H., Kamba, S. A., & Omar, A. R. 2015, Synthesis and characterization of chitosan-saponin nanoparticle for application in plasmid DNA delivery. *Journal of Nanomaterials*, **16**(1), 207-207.

Bande, F., Arshad, S. S., Bejo, M. H., Omar, A. R., Moeini, H., Khadkodaie, S., ... & Anka, I. A. 2020, Development and immunogenic potentials of chitosan-saponin encapsulated DNA vaccine against avian infectious bronchitis coronavirus. *Microbial pathogenesis*, **149**, 104560.

Behl, G., Iqbal, J., O'Reilly, N. J., McLoughlin, P., & Fitzhenry, L. 2016, Synthesis and characterization of poly (2-hydroxyethylmethacrylate) contact lenses containing chitosan nanoparticles as an ocular delivery system for dexamethasone sodium phosphate. *Pharmaceutical research*, **33**, 1638-1648.

Bernela, M., Ahuja, M., & Thakur, R. 2016, Enhancement of anti-inflammatory activity of glycyrrhizic acid by encapsulation in chitosan-katira gum nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **105**, 141-147.

Bhatia A., Shard P., Chopra D., Mishra T., 2011, Chitosan nanoparticles as carrier of immunorestoratory plant extract: synthesis, characterization and immunorestoratory efficacy. *International journal of drug delivery*, 3(2), 381.

Blunden G., Culling M.C., Jewers K., 1975, Steroidal sapogenins: a review of actual and potential plant sources. *Trop. Sci.*, 17:139–154.

Bodmeier R., Chen H., 1990, Indomethacin polymeric nanosuspensions prepared by micro- fluidization. *J Control Release*, 12:223-33.

Borghino D., 2014, Quantum dot breakthrough could lead to cheap spray-on solar cells, June 10.

Brimacombe J.S., 1971, Synthesen von Antibiotica-Zuckern. *Angew. Chem.*, 83, 261.

Brown R., 1998, The natural way in cosmetics and skin care. *Chemical Market Reporter*, 254(2):FR8–9.

Bujnakova, Z., Dutkova, E., Zorkovska, A., Balaz, M., Kovac, J., Kello, M., Mojzis, J., Briancin, J., Balaz, P., 2017, Mechanochemical synthesis and in vitro studies of chitosan-coated InAs/ZnS mixed nanocrystals. *J. Mater. Sci.* 52 (2), 721e735.

Bwatanglang, I.B., Mohammad, F., Yusof, N.A., Abdullah, J., Hussein, M.Z., Alitheen, N.B., Abu, N., 2016, Folic acid targeted Mn:ZnS quantum dots for theranostic applications of cancer cell imaging and therapy. *Int. J. Nanomed.* 11, 413e428.

Catarina PR., Ronald JN., Antonio JR., 2006, Nano capsulation 1. Method of preparation of drug – loaded polymeric nanoparticles: *Nano technology, Biology and medicine*, 2:8-21.

Challinor VL, De Voss JJ., 2013, Open-chain steroidal glycosides, a diverse class of plant saponins. *Nat Prod Rep*; 30:429–54. DOI: 10.1039/c3np20105h

Chandra Hembram K., Prabha S., Chandra R., Ahmed B., Nimesh S., 2016, Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 44(1), 305-314.

Cheeke PR., 1999. Actual and potential applications of Yucca schidigera and Quillaja saponaria saponins in human and animal nutrition. Proceeding of the American Society of Animal Science, 1-10.

Cheng Y., Wang J., Rao T., He X., Xu T., 2008, Pharmaceutical applications of dendrimers: promising nanocarriers for drug delivery. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 13(4), 1447-1471.

Chorney M., DANEUBERG H., Golomb G., 2002, Lipophilic drug loaded nanospheres by nano precipitation: effect of the formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *J Control release*, 83: 389- 400.

Clogston J. D., Patri A. K. 2011, Zeta potential measurement. *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*, 63-70.

Coleman R.S., Dang Y., Carpenter AJ., 1992, A Convenient Preparation of Terminally Differentiated, Selectively Protected Six-Carbon Synthons from D-glucosamine. *J. Org. Chem.*, 57, 3732.

Colomban P., 2009, The Use of Metal Nanoparticles to Produce Yellow, Red and Iridescent Colour, from Bronze Age to Present Times in Lustre Pottery and Glass: Solid State Chemistry, Spectroscopy and Nanostructure, *Journal of Nano Research*, Volume 8, sayfa 109-132.

Colomban P., Schreiber H. D., 2005, Raman signature modification induced by copper nanoparticles in silicate glass, *Volume 36*, sayı 9, sayfa 884-890.

Couvreux P., 2013, Nanoparticles in drug delivery: past, present and future. *Advanced Drug Delivery Reviews* ;65:21–3.

Couvreur P., Dubernet C., Puisieux F., 1995, Controlled drug delivery with Nano particles:current possibilities and future trends. *Eur J Pharm Biopharm.*; 41:2-13.

Çalış İ., Zor M., Saracoğlu İ., Işimer A. and Rügger H., 1996, Four novel cycloartane glycosides from *Astragalus oleifolius*, *J. Nat. Prod.* 59:1019-1023.

Davis, P. H., 1972, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*; University of Edinburgh Press: Edinburgh, 1972; Vol. 4, sayfa 585-592.

Desai, S., Desai, D. G., Kaur, H., 2009, “Saponins and their biological activities”, *Pharma Times*, 41, p13-16.

Dong, W., Farooqui, A., Leon, A. J., & Kelvin, D. J., 2017, Inhibition of influenza A virus infection by ginsenosides. *PLoS One*, 12(2), e0171936.

El Barky A. R., Hussein S. A., Alm-Eldeen A. E., Hafez Y. A., Mohamed T. M., 2017, Saponins and their potential role in diabetes mellitus. *Diabetes Manag*, 7(1), 148-58.

El-Aziz A. R. M. A., Al-Othman M. R., Mahmoud M. A., Shehata S. M., Abdelazim N. S., 2018, Chitosan nanoparticles as a carrier for *Mentha longifolia* extract: synthesis, characterization and antifungal activity. *Current Science*, 2116-2122.

Elzatahry, A. A., & Eldin, M. M., 2008, Preparation and characterization of metronidazole-loaded chitosan nanoparticles for drug delivery application. *Polymers for Advanced Technologies*, 19(12), 1787-1791.

Faizal A, Geelen D., 2013, Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochem Rev.*; 12:877–893.

Favel A., Steinmetz M. D., Regli P., Vidal-Ollivier E., Elias R., Balansard G., 1994, In Vitro Antifungal Activity of Triterpenoid Saponins, *Planta Med*; 60(1): 50-53

Fenwick D.E., Oakenfull D., 1983. Saponin content of food plants and some prepared foods, *J Sci Food Agric.*, 34; 186-191.

Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J-P., Ammoury N., Benita S., 1989, Nano capsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *Int J Pharm.*, 55: R1-R4.

Foster A.B., Inch T.D., Lehmann J., Stacey M., Webber J.M., 1962, Carbohydrate Components of Antibiotics. Part III. Synthesis of 3,6-Dideoxy-3-dimethylamino-B-D-glucose Hydrochloride Monohydrate: the Absolute Configuration of Mycaminose. *J. Chern. Soc.*, 2116.

Freudenberg K., Plankenhorn E., 1940, Zur Kenntnis der teilweise methylierten Glucose. *Ber.*, 73B, 621.

Furniss B.S., Hannaford A.J., Smith P. W.G., Tatchell A.R., 1989, *Vogels Textbook of Practical Organic Chemistry*, 5th edn., 644. Essex: Longman Scientific and Technical.

Göktürk R. S., Sümbül H., Çelebi A., Açıık L., 2012, "Two new species of *Cephalaria* (Caprifoliaceae) from Turkey," *Turkish Journal of Botany*: Vol. 36: No. 4, 2

Guclu-Ustundag, O., Mazza, G., 2007. Saponins: properties, applications and processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 231-258.

Gupta S.K.,1974, The Synthesis of Methyl 3-Amino-2,3,6-trideoxy-ex-L-arabino-hexo pyranoside, a Structural Analog of Daunosamine. *Carbohydr. Res.*, 37,381.

Gürkaynak O., 2006. Paklitakselin Siklodekstrin Bazlı Sistemlerle Formülasyon Geliştirme ve Değerlendirilmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.

Hahens Wl., Oomen AG., deJong WH., Cassee FR., 2007, What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*.; 49:217-229.

Hanson, C. H., Kohler, G. O., Dudley, J. W., Sorensen, E. L., Van Atta, G. R., Taylor, K., Pedersen, M. W., Carnahan, H. L., Wilsie, C. P., Kehr, W. R., Lowe, C. C., Standford, E. H., Yungen, J. A., 1963, US Dep. Agric. Agric. Res. Ser., 34-44.

Hargreaves T., 2003, Surfactants: The ubiquitous amphiphiles. Chem Br;39(7):38-41

Hayta E.N., 2014, Polikaprolakton-polietilen glikol-kitosan bazlı mikrokürecik üretimi ve kontrollü ilaç salınımında kullanılması için ön çalışma (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Henderson L., 2001, Alien weeds and invasive plants, Plant Protection Research Institute, Agricultural Research Council, sayfa 300.

Hiai S., Oura H., Nakajima T., 1976, Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sülfürik acid, Research Institute for Wakan-yaku (Oriental Dnrgs), Toyama University, japan, Planta medica Vol. 29.

Hill, R. A., Connolly, J. D., 2015, “Triterpenoids”, Natural Product Reports, 32(2), p273–327.

Hirano, S., Gebelein, G.G. and Dunn, R.L., 1990, in Progress in Biomedical Polymers, pp. 283–289, Plenum Press

Hosamath PV., 2011, Evaluation of antibacterial activity of Litsea glutinosa. Int J Pharmaceut Appl.; 2(1):105-114.

Hough R.M., Noble R.R.P., Hitchen G.J., Hart R., Reddy S.M., Saunders M., Clode P., Vaughan D., Lowe J., Gray D.J., Anand R.R., Butt C.R.M., Verrall M., 2008, Naturally occurring gold nanoparticles and nanoplates. Geology ;36 (7): 571–574.

Huang C., Gu T., Guean Y., Wang 1., 1991, Effects of Panax notoginseng Saponins on Myocardial Ischemia and Reprefusion Injury in Conscious Rabbit. Zhongguo Yaolixue Tongbao, 7, 190.

Ibrahim H. M. ve El-Zairy E. M. R., 2015, Chitosan as a biomaterial—structure, properties, and electrospun nanofibers. *Concepts, compounds and the alternatives of antibacterials*, 1(1), 81-101.

Indena, 2005. Horse chestnut saponins. <http://www.indena.com/pdf/cosmleaf>.

Jayakumar, R., Menon, D., Manzoor, K., Nair, S. V., & Tamura, H., 2010, Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials—A short review. *Carbohydrate polymers*, 82(2), 227-232.

Jensen, J., ve Elgaard T., 2001. Natural feed additive, a method of preparing said feed additive, a feed mixture containing the feed additive as well as a method of breeding farm animals. EP Patent 129,627 A1.

Jonassen H., Kjøniksen A.L., Hiorth M., 2012, Stability of Chitosan Nanoparticles Cross-Linked with Tripolyphosphate Biomacromolecules, 13, 3747–3756.

Jonassen, H., Kjøniksen, A.-L., 2011, Phys. Rev. E , 84, 022401.

Jung T., Kamm W., Breitenbach A., Kaiserling E., Xiao JK., Kissel T., 2000, Biodegradable nano particles for oral delivery of peptides: is there a role for polymer to affect mucosal uptake? *Eur J Pharm Biopharm.*, 50:147-60.

Kamçı, H., Recep, T. A. Ş., & Çelebioğlu, H. U., 2022, Antibacterial Activity of Copper Nanoparticles Synthesized by Using Peumus boldus Leaf Extract. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (36), 139-142.

Karade V.C., Dongale T.D., Sahoo S. C., Kollu P., Chougale A.D., Patil P.S., Patil P.B., 2018, Effect of reaction time on structural and magnetic properties of green-synthesized magnetic nanoparticles, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, Volume 120, Pages 161-166.

Kenarova, B., Neychev, H., Hadjiivanova, C., Petkov, V. D., 1990, “Immunomodulating activity of ginsenoside Rg1 from Panax ginseng”, *Japan J. Pharmacol*, (54), p447–454.

Kensil C. R., Mo A. X., Truneh A., 2004, Current vaccine adjuvants: an overview of a diverse class. *Frontiers in Bioscience*, 9:2972–2988.

Khoza, P., Nyokong, T., 2015, Photocatalytic behaviour of zinc tetraamino phthalocyanine-silver nanoparticles immobilized on chitosan beads. *J. Mol. Catal. Chem.* 399, 25e32.

Kırmızıbekmez H, Bassarello C, Piacente S, Pizza C, Calis I., 2006, Triterpene Saponins from *Calendula arvensis*. *Zeitschrift für Naturforschung B.* 61. 10.1515/znb-2006-0920.

Kırmızıgül, S., Anıl, H., Uçar, F. and Akdemir, K., 1996, Antimicrobial and antifungal activities of three new triterpenoid glycosides, *Phytother. Res.*, 10:274-276.

Kofuji, K., Ito, T., Murata, Y., & KAWASHIMA, S., 2001, Biodegradation and drug release of chitosan gel beads in subcutaneous air pouches of mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(2), 205-208.

Kopeček J, Yang J., 2007, Hydrogels as smart biomaterials. *Polymer International*; 56:1078–98.

Kumar, P. S., Abhilash, S., Manzoor, K., Nair, S. V., Tamura, H., & Jayakumar, R., 2010, Preparation and characterization of novel β -chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 761-767.

Kunjumon, R., Viswanathan, G., & Baby, S., 2021, Biocompatible madecassoside encapsulated alginate chitosan nanoparticles, their anti-proliferative activity on C6 glioma cells. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100106.

Lacaille-Dubois MA., 2019, Updated insights into the mechanism of action and clinical profile of the immunoadjuvant QS-21: A review. *Phytomedicine* 2019; 60:152905

Lal Pal S., Jana U., Manna P.K., Mohanta G.P., Manavalan R., 2011, Nanoparticle: An overview of preparation and characterization, *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01 (06): 228-234

Lambert G., Fattal E., Couvreur P., 2001, Nanoparticulate system for the delivery of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev.*, 47:99-112.

Lead J. R., Wilkinson K. J., 2006, Aquatic Colloids and Nanoparticles: Current Knowledge and Future Trends. *Environmental Chemistry* 3, 159-171.

Lee BK, Yun YH, Park K., 2015, Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities. *Chemical Engineering Science*; 125:158–64.

Lee w.w., Wu H.Y., Marsh U., Mosher e.w., Acton E.M., Goodman L., Henry D.W., 1975, Confirmation by Synthesis of Ristosamine as 3-Amino-2,3,6-trideoxy-L-ribo hexose. 1. *Med. Chern.*, 18,767.

Letchford K. ve Burt H., 2007, A Review of The Formation and Classification of Amphiphilic Block Copolymer Nanoparticulate Structures: Micelles, Nanospheres, Nanocapsules And Polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 65: 259–269.

Livingston, A. L., Knuckles, B. E., Edwards, R. H., de Fremery, D., Miller, R. E., Kohler, G. O., 1975, Distribution of saponin in alfalfa protein recovery systems. *J. Agric. Food Chem.* 1979, 27, 362-365. Brouk, B. *Plants Consumed by Man* Academic Press, London.

Lustriane, C., Dwivany, F. M., Suendo, V., & Reza, M., 2018, Effect of chitosan and chitosan-nanoparticles on post-harvest quality of banana fruits. *Journal of Plant Biotechnology*, 45(1), 36-44.

Mahato S. B. Ve Garai S., 1998, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products: Triterpenoid saponins, Springer-Verlag Wien GmbH, sayfa 173-196.

Mahato SB., Serkar SK., Poddar G., 1988, Triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 27(10): 3037-3067

Malik A., Kasmi S.N.-H., Ahmad Z., 1992, A Regioselective One-pot Synthesis of N, N-Dialkylarnino Sugars via Arninosilanes. 1. *Chern. Res. (S)*, 124.

Mamedov N.A., Egamberdieva D., 2019, Phytochemical Constituents and Pharmacological Effects of Licorice: A Review. In: Ozturk, M., Hakeem, K. (eds) *Plant and Human Health*, Volume 3. Springer, Cham.

Martín R.S., Briones R., 1999 Industrial uses and sustainable supply of *Quillaja saponaria* (Rosaceae) saponins. *Econ Bot* 53, 302–311.

Milgate J., Roberts DCK., 1995 The nutritional & biological significance of saponins. *Nutrition Research.*, 15(8): 1223-1249

Mineva, B. A., 2017, Characterization of size of polydisperse nanoparticles of various shape: Comparative study of AFM and DLS methods. Unpubl Undergrad Diss Czech Tech Univ Prague.

Mohammed vd. (Global Burden of Disease Cancer Collaboration), 2017, Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol* ;3(4):524–548.

Mora-Huertasa C.E., Fessi H., Elaissari A., 2010, Polymer-based Nanocapsules for Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 385:113–142

Moses T., Papadopoulou K.K., Osbourn A., 2014, Metabolic and functional diversity of saponins, biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives, Pages 439-462

Mulligan, C. N., 2021, “Sustainable remediation of contaminated soil using biosurfactants”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 195.

Muzzarelli, R. A. A., & Muzzarelli, C., 2009, Chitin and chitosan hydrogels. In *Handbook of hydrocolloids* (pp. 849-888). Woodhead Publishing.

Muzzarelli, R. A., 1988, Carboxymethylated chitins and chitosans. *Carbohydrate polymers*, 8(1), 1-21.

Muzzarelli, R. A., 2010, Chitins and chitosans as immuna immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Marine drugs*, 8(2), 292-312.

Nagpal K., Singh S.K., Mishra D.N., 2010, Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Volume 58, Sayı 11, Sayfa 1423-1430.

Natori S, Ikekawa N, Suzuki M., 1981, Extraction and isolation of biologically active compounds. Tokyo: Japan. *Advances in Natural Products Chemistry*; p. 275–287.

Nguyen N. T., Hoang D. Q., Nguyen N. D., Nguyen Q. H., Nguyen D. H., 2017, Preparation, characterization, and antioxidant activity of water-soluble oligochitosan. *Green Processing and Synthesis*, 6(5), 461-468.

Okitsu K., Sharyo K., Nishimura R., 2009 One-Pot Synthesis of Gold Nanorods by Ultrasonic Irradiation: The Effect of pH on the Shape of the Gold Nanorods and Nanoparticles, *Langmuir*, 25 (14), 7786-7790

Oleszek W., 2002, Chromatography determination of plant saponins. *J Chromatography A.*, 967: 147-162.

Osborn AE., 2003. Saponins in cereals. *Phytochemistry*, 62(1): 1-4.

Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R., 2016, “Flavonoids: an overview”, *Journal of Nutritional Science*, 5.

Pangi Z., Beletsi A., Evangelatos K., 2003, PEG-ylated nanoparticles for biological and pharmaceutical application. *Adv Drug Del Rev.*; 24: 403- 419

Park, J. H. Saravanakumar G. Kim K. Kwon I. C., 2010, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 62, 28–41.

Patel, S. S., Savjani, J. K., 2015, “Systematic review of plant steroids as potential antiinflammatory agents: Current status and future perspectives”, *The Journal of Phytopharmacology*, 4(2), p121-125.

Paulsen H., Rutz V., Brockhausen I., 1992, Synthese von modifizierten Derivaten der 2-Acetamido-2-desoxy-D-galactose zur Untersuchung der Substratspezifität der Core-1- β -Gal-Transferase und der Core-1- β -GlcNAc-Transferase der Biosynthese von O-Glycoproteinen. *Liebigs Ann. Chem.*, 735.

Press, J. B., Reynolds, R. C., May, R. D., Marciani, D. J., 2000, "Structure/Function Relationships of Immunostimulating Saponins", *Studies in Natural Products Chemistry*, p131–174.

Qiu, T., Gu, P., Wusiman, A., Ni, H., Xu, S., Zhang, Y., ... & Wang, D., 2021, Immunoenhancement effects of chitosan-modified ginseng stem-leaf saponins-encapsulated cubosomes as an adjuvant. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 204, 111799.

Quintanar-Guerrero D., Allemann E., Fessi H., Doelker E., 1998, Preparation techniques and mechanism of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev Ind Pharm.*, 24:1113-28.

Rai S, Acharya-Siwakoti E, Kafle A, Devkota HP, Bhattarai A., 2021, Plant-Derived Saponins: A Review of Their Surfactant Properties and Applications. *Sci.*; 3(4):44. <https://doi.org/10.3390/sci3040044>

Rampino A., Borgogna M., Blasi P., Bellich B., Cesàro A., 2013, Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability, *International Journal of Pharmaceutics*, V-455, sayı 1-2, sayfa 219-228.

Rao J.P. ve Geckeler K.E., 2011, "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and sizecontrol parameters", *Progress in Polymer Science*, 36, 887-913.

Reist E.J., Spencer R.R., Baker B.R., 1959, Potential Anticancer Agents. XXIX. Inversion of a Ring Carbon of a Glycoside. *J. Org. Chem.*, 24, 1618.

Rejinold, N. S., Muthunarayanan, M., Muthuchelian, K., Chennazhi, K. P., Nair, S. V., & Jayakumar, R., 2011, Saponin-loaded chitosan nanoparticles and their cytotoxicity to cancer cell lines in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 407-416.

Richardson, S. W., Kolbe, H. J., & Duncan, R., 1999, Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. *International journal of pharmaceutics*, 178(2), 231-243.

Rooney S, Ryan MF., 2005, Effects of alpha-hederin and thymoquinone, constituents of *Nigella sativa*, on human cancer cell lines. *Anticancer Res.* 25: 2199- 204.

Roopashree K., Naik D. H. A. N. A. N. J. A. Y., 2019, Saponins: properties, applications and as insecticides: a review. *Biosci. Trends*, 8, 1-14.

Rouget, C.R., 1859, Acad. Sci. Ser. III, 48, pp. 792-795

Roy D., Kommalapati R.R., Mandava S.S., Valsaraj K.T., Constant W. D., 1997, Soil Washing Potential of a Natural Surfactant, *Environmental Science & Technology*, 31 (3), 670-675.

Saharan, V., Mehrotra, A., Khatik, R., Rawal, P., Sharma, S. S., & Pal, A., 2013, Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. *International journal of biological macromolecules*, 62, 677-683.

Sarikahya N.B., Nalbantsoy A., Top H., Gokturk R.S., Sumbul H., Kirmizigul S., 2018, Immunomodulatory, hemolytic and cytotoxic activity potentials of triterpenoid saponins from eight *Cephalaria* species, *Phytomedicine*, Volume 38, Sayfa 135-144.

Sarikahya, N. B., Kirmizigül, S., 2012, “Antimicrobially Active Hederagenin Glycosides from *Cephalaria elmaliensis*”, *Planta Medica*, 78(8), p828–833.

Sayiner Ö., Çomoğlu T., 2016, Nanotaşıyıcı sistemlerde Ankara Ecz. Fak. Derg., 40(3): 62-79.

Schreiner, T. B., Colucci, G., Santamaria-Echart, A., Fernandes, I. P., Dias, M. M., Pinho, S. P., Barreiro, M. F., 2021, “Evaluation of saponin-rich extracts as natural alternative emulsifiers: A comparative study with pure Quillaja

Bark saponin”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 623.

Semmar, N., Tomofumi, M., Mrabet, Y., Lacaille-Dubois, M.-A., 2010, “Two New Acylated Tridesmosidic Saponins from *Astragalus armatus*”, *Helvetica Chimica Acta*, 93(5), p870–876.

Servat-Medina, L., Gonzalez-Gomez, A., Reyes-Ortega, F., Sousa, I. M. O., de Cássia Almeida Queiroz, N., Zago, P. M. W., ... & Foglio, M. A., 2015, Chitosan–tripolyphosphate nanoparticles as *Arrabidaea chica* standardized extract carrier: Synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity. *International journal of nanomedicine*, 3897-3909.

Shah M, Fawcett D, Sharma S, 2015, Tripathy SK, Poinern GEJ. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities. *Materials* ; 8(11):7278-7308.

Sharma, V., & Paliwal, R., 2013, Isolation and characterization of saponins from *Moringa oleifera* (moringaceae) pods. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 179-183.

Sharon N., Lis H., 1993, Carbohydrates in Cell Recognition. *Scientific American*, 74.

Shi J, Arunasalam K, Yeung D, Kakuda Y, Mittal G, Jiang Y., 2004, “Saponins from edible legumes: chemistry, processing, and health benefits”, *Journal of Medicinal Food*, Spring, 7(1), p67-78.

Singha N.R., Deb M., Chattopadhyay P.K., 2022, Chitin and chitosan-based blends and composites, *Biodegradable Polymers, Blends and Composites*, Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering, Sayfa 123-203

Sneha K., Sathishkumar M., Sok Kim S., Yun Y.S., 2010, Counter ions and temperature incorporated tailoring of biogenic gold nanoparticles, *Process Biochemistry*, Volume 45, Sayı 9, Sayfa 1450-1458.

Song C. X., Labhasetwar V., Murphy H., Qu X., Humphrey W. R., Shebuski R. J., Levy R. J., 1997, Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 43(2-3), 197-212.

Stevens, c.L., Blumbergs P., Daniher P.A., Onerbach D.H., Taylor KG., 1966b, Synthesis and Chemistry of 4-Amino-4,6-Amino-4,6-dideoxy Sugars. II. Glucose. *J. Org. Chern.*, 31, 2822.

Stevens, c.L., Blumbergs P., Onerbach D.H., 1966a, Synthesis and Chemistry of 4-Amino-4,6-Amino-4,6-dideoxy Sugars. I. Galactose. *J. Org. Chern.*, 31, 2817.

Su Y., Guo, D., Guo, H., Liu, J., Zheng, J., Koike, K. and Nikaido, T., 2001, Four new triterpenoid saponins from *Conyza blinii*, *J. Nat. Prod.*, 64:32-36.

Sullivan D.J., Collins M.C.R.T., Cummins E., Kerry J.P., Morris M.A., 2018, Synthesis of monodisperse chitosan nanoparticles, *Food Hydrocolloids*, Volume 83,, Pages 355-364

Tabata J., Ikada Y., 1989, Protein pre-coating of polylactide microspheres containing a lipophilic immunopotentiator for enhancement of macrophage phagocytosis and activation. *Pharm Res.*, 6:296-301.

Takeuchi H., Yamamoto Y., 2001, Mucoadhesive nanoparticulate system for peptide drug delivery. *Adv Drug Del Rev.*, 47: 39-54.

Tarrés, Q., Aguado, R., Zoppe, J. O., Mutjé, P., Fiol, N., & Delgado-Aguilar, M., 2022, Dynamic Light Scattering Plus Scanning Electron Microscopy: Usefulness and Limitations of a Simplified Estimation of Nanocellulose Dimensions. *Nanomaterials*, 12(23), 4288..

Tekade, R. K., 2018, Basic Fundamentals of Drug Delivery. In Raval, N., Maheshwari, R., Kalyane, D., Youngren-Ortiz, S. R., Chougule, M. B., & Tekade, R. K.(Eds) *Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development.* (pp. 369-400). Academic Press.

Thandapani, G., Prasad, S., Sudha, P. N., & Sukumaran, A., 2017, Size optimization and in vitro biocompatibility studies of chitosan nanoparticles. *International journal of biological macromolecules*, 104, 1794-1806.

Thanou, M., Verhoef, J. C., & Junginger, H. E., 2001, Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Advanced drug delivery reviews*, 52(2), 117-126.

Tran H.V., Piro B., Reisberg S., Tran L.D., Duc H.T., Pham M.C., 2013, Label-free and reagentless electrochemical detection of microRNAs using a conducting polymer nanostructured by carbon nanotubes: Application to prostate cancer biomarker miR-141, *Biosensors and Bioelectronics*, Volume 49, Pages 164-169.

Tschesche, Von R.; Wulff, G., 1973, Chemie und biologie der saponine. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products Vol. 30* (Hertz, W.; Grisebach, H.; Kirby, G. W., Eds), Springer-Verlag, Vienna.

Ubrich N., Bouillot P., Pellerin C., Hoffman M., Maincent P., 2004, Preparation and characterization of propranolol hydrochloride nano particles: A comparative study. *J Control release*, 291-300.

Vaezifar, S., Razavi, S., Golozar, M. A., Karbasi, S., Morshed, M., & Kamali, M., 2013, Effects of some parameters on particle size distribution of chitosan nanoparticles prepared by ionic gelation method. *Journal of Cluster Science*, 24, 891-903.

Vandervoort J., Ludwig A., 2002, Biodegradable stabilizers in the preparation of PLGA nano particles: a factorial design study. *Int J Pharm.*, 238:77-92.

Wang P, Ding X, Kim H, Škalamera Đ, Michalek SM, Zhang P., 2019, Vaccine Adjuvants Derivatized from Momordica Saponins I and II. *J Med Chem* ;62(21):9976-9982

Wang, P., 2021, “Natural and Synthetic Saponins as Vaccine Adjuvants”, *Vaccines*.

Ward D.E., Kaller B.P., 1994 Diastereoselective Synthesis of Actinobolin from D-Glucose by Application of a Novel [3 + 3] Annulation. 1. Org. Chern., 59, 4230.

Weng A, Bachran D, Görick C, Bachran C, Fuchs H, Melzig MF., 2009, A simple method for isolation of Gypsophila saponins for the combined application of targeted toxins and saponins in tumor therapy. *Planta Med.*;75(13):1421-2.

Xie, T., Song, S., Li, S., Ouyang, L., Xia, L., Huang, J., 2015, “Review of natural product databases”, *Cell Proliferation*, 48(4), p398–404.

Yadav, L. D. S., & Yadav, L. D. S., 2005, Organic spectroscopy. *Ultraviolet (UV) and visible spectroscopy*. (pp 7-51). Springer Dordrecht, Berlin, Heidelberg.

Ya-Zheng, Z. H. A. O., Zhang, Y. Y., Han, H. A. N., Rui-Ping, F. A. N., Yang, H. U., Zhong, L., ... & Bo-Yang, Y. U., 2018, Advances in the antitumor activities and mechanisms of action of steroidal saponins. *Chinese journal of natural medicines*, 16(10), 732-748.

Yoshiki, Y., Kudou, S., Okubo, K., 1998, “Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean”, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 62(12), p2291-2299.

Yu, Z., Wu, X., & He, J., 2022, Study on the antifungal activity and mechanism of tea saponin from *Camellia oleifera* cake. *European Food Research and Technology*, 1-13.

Yuan, C., Li, Y., Li, Q., Jin, R., & Ren, L., 2018, Purification of tea saponins and evaluation of its effect on alcohol dehydrogenase activity. *Open life sciences*, 13(1), 56-63.

Zhan Y., 1999, Animal feed compositions and uses of triterpenoid saponin obtained from *Camellia* L. Plants, US Patent 6,007,822.

Zhang K., Zou Y., Zhou C., 1991, Preventive Effects of Crude Saponins of Glabrous Greenbrier (*Smilax glabra*) on the cholesterol-Fed Atherosclerosis of Quails. Zhoncaoyao, 22, 411.



TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisansım boyunca bilgisi, tecrübesi, olumlu ve anlayışlı tavırları ile bana kattıkları için danışman hocam Doç. Dr. Nazlı BÖKE SARIKAHYA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisi sayesinde kaydettiğim ilerlemeler ve edindiğim bilgi ve tecrübelerin ilerleyen hayatımda bana hep yardımcı olacağından eminim.

Tez çalışmasının bir bölümünü oluşturan nanoparçacık sentezi ve karakterizasyonu ile ilgili kısımlarda bana yol gösterip bilgilerini benimle paylaşan ve projenin ilerlemesinde büyük katkıları olan çok değerli hocam Doç. Dr. Yeliz YILDIRIM'a çok teşekkür ederim.

Sitotoksik ve immünomodülatör aktivite çalışmaları için Prof. Dr. Ayşe NALBANTSOY ve ekibine teşekkür ederim.

Laboratuavarda bulunduğum her an sorduğum sorulara sabırla cevap veren ve tecrübelerini benimle her daim paylaşan değerli hocam Arş. Gör. Gaye SÜMER OKKALI'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmam süresince bana yardımcı olan ve sentez çalışmalarında bana yol gösteren Arş. Gör. Özge VARDAR'a teşekkür ederim.

Yapılarımı aydınlatmamda gerekli olan NMR analizlerindeki tüm katkılarından dolayı Doç. Dr. Salih GÜNNAZ'a teşekkür ederim. Karakterizasyon çalışmalarında gerekli olan analizler için katkılarından dolayı Dr. Raif İLKTAÇ'a ve Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne teşekkür ederim. Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (FM-YLT-2022-23741) maddi desteği için teşekkür ederim.

Son olarak sevgili aileme, annem Bircan Tiryaki, babam Dursun Tiryaki, ablam Cansu Tiryaki ve kardeşim Şimal Tiryaki'ye eğitim hayatım boyunca emekleri, sabırları ve bana verdikleri bütün destekleri için çok teşekkür ederim.

A. Cansel Tiryaki

Mayıs/2023

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Aşkım Cansel TİRYAKİ

Eğitim bilgileri

2021- Ege Üniversitesi (Lisans), Kimya Bölümü

2021/2023- Ege Üniversitesi (Yüksek Lisans), Organik Kimya

Yabancı dil

İngilizce

Bilgisayar

Microsoft Office Uygulamaları, Windows, Photoshop, Prezi

Akademik Çalışmalar

Poster ve Sunum

Ekim 2022, Synthesis, Characterization and Biological Features of Saponin Based Nanoparticles (Chemical Research in Flanders – Chemistry Conference for Young Scientists 2022) – Sunum

Ekim 2022, Optimization of Sulforaphane Extraction from Cabbage Seeds by Ultrasound and Microwave Extraction Methods (Chemical Research in Flanders – Chemistry Conference for Young Scientists 2022) – Poster

Tecrübeler

GC/FID – MPLC – FT-IR – HPLC – Viskozimetri – UV/VİS Spektrometre

Staj

BASF (Badische Anilin- & Soda-Fabrik)- 2019 (kısa dönem)

Seminer/ Sertifika

Seminer: Bitkisel kaynaklarımızdan katma değeri yüksek fitokimyasallara ve ilaç adayı bileşiklere uzun soluklu bir yolculuk- Prof. Dr. Erdal Bedir / 25.10.2018

Workshop: Collaborative meeting at multidisciplinary studies - Assoc. Prof. Dr. Safiye Emirdağ-Öztürk Prof. Dr. Masami OTSUKA / 22.05.2019

Referans

Doç. Dr. Nazlı Sarıkahya / Ege Üniversitesi, Kimya Bölümü

