



T.C.

**BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**ALTIN VE GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN İNSAN GİNGİVAL
FİBROBLAST HÜCRELERİNE SİTOTOKSİK ETKİSİNİN İNVİTRO
OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt. Didar TORLAK

**PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Özge GÖKTÜRK**

**EKİM 2020
BOLU**



ÖZET

ALTIN VE GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN İNSAN GİNGİVAL FİBROBLAST HÜCRELERİNE SİTOTOKSİK ETKİSİNİN İNVİTRO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Biyosentez ile elde edilen metalik nanopartiküller; mantar, virüs, bakteri, bitki gibi canlı organizmaların kullanılarak metal tuzlarının indirgenmesi sonucu elde edilir. Gümüş ve altın nanopartiküllerin antimikrobiyal, antienflamatuar, yanık yara iyileşmesini hızlandırmak gibi etkileri olduğu bilinmektedir. Bu özelliklerinden dolayı altın ve gümüş nanopartiküllerin periodontal tedavilerde de güvenle kullanılabilirliğini değerlendirmek için 48 saatlik sitotoksite, proliferasyon ve migrasyon gibi hücresel etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Nar kabuğu ekstraktı kullanılarak biyosentez ile altın ve gümüş nanopartiküller elde edildi. Sentezlenen nanopartiküllerin ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi (UV-Vis) analizi, fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR) analizi, taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri yapıldı. Altın ve gümüş nanopartiküller en yüksek konsantrasyonları sırasıyla 5,23 µg/ml ve 13,06 µg/ml olmak üzere yedi farklı dilüsyonda insan gingival fibroblast hücrelerine eklenerek sitotoksisite deneyleri yapıldı. Ayrıca en düşük iki konsantrasyondaki altın ve gümüş nanopartiküllerin İGF hücreleri üzerinde oluşturulan yara modeline etkisi değerlendirildi.

Bulgular: Nar kabuğu ekstraktından elde edilen altın nanopartiküller SEM sonuçlarına göre ~ 25 nm, gümüş nanopartiküller ise ~ 60 nm olduğu görülmüştür. Altın nanopartiküller 24 ve 48 saatlik kullanılan tüm konsantrasyonlarda İGF hücrelerine karşı %95 ve üzeri canlılık oranları elde edilmiştir. Gümüş nanopartiküllerde ise 24 ve 48 saatlik kullanılan tüm konsantrasyonlarda İGF hücrelerine karşı %80 ve üzeri canlılık oranları elde edilmiştir. Benzer konsantrasyonlarda altın ve gümüş nanopartiküllerin İGF hücreleri üzerine etkileri karşılaştırıldığında gümüş nanopartiküllerin daha sitotoksik olduğu görülmüştür ($p<0,05$). İGF hücrelerinde oluşturulan yara modeli üzerindeki iyileşmenin 24 saatlik sonuçları değerlendirildiğinde kapanmadan kalan yara miktarları negatif kontrol grubuna göre tüm nanopartikül eklenen gruplarda daha başarılı bulunmuştur ($p<0,05$). 24 saatlik sonuçlar değerlendirildiğinde iki nanopartikülde de yüksek olarak kullanılan konsantrasyon daha

başarılı bulunmuştur ($p<0,05$). 48. saatlik sonuçlara göre oluşturulan tüm yaralar %100 kapanmıştır.

Sonuç: Çalışmamızın sonuçları altın ve gümüş nanopartiküllerin İGF hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermediği ve periodontal yara iyileşmesi için terapötik bir ajan olarak tercih edilebileceğini göstermektedir. Gümüş nanopartiküller proliferasyon ve migrasyonda altın nanopartiküllere göre istatistiksel olarak daha başarılı bulunmuştur. Bu bulguları doğrulamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: İnsan gingival fibroblast hücreleri, invitro, altın nanopartikül, gümüş nanopartikül, bitkisel sentez, biyosentez, yara iyileşmesi



ABSTRACT

THE EVALUATION OF THE CYTOTOXIC EFFECT OF GOLD AND SILVER NANOPARTICULES ON HUMAN GINGIVAL FIBROBLAST CELL IN VITRO

Objective: Biosynthesis nanomaterials were obtained by reducing metallic salts using living organisms such as fungi, virus, bacteria, plants. Silver and gold nanoparticles were known with their antimicrobial, anti-inflammatory characteristics, and accelerating burn wound healing. The aim of this study, compare the cellular effects such as 48-hour cytotoxicity, proliferation and migration in order to evaluate its safe use in surgical and non-surgical periodontal treatments.

Materials and Methods: Gold and silver nanoparticles were obtained by biosynthesis using pomegranate peel extract. Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-Vis) analysis, Fourier conversion infrared spectroscopy (FTIR) analysis, scanning electron microscopy (SEM) analyzes of the synthesized nanoparticles were accomplished. Cytotoxicity experiments were performed by adding gold and silver nanoparticles to human gingival fibroblast (IGF) cells at seven different dilutions, with the highest concentrations of 5.23 $\mu\text{g} / \text{ml}$ and 13.06 $\mu\text{g} / \text{ml}$, respectively. In addition, the effect of gold and silver nanoparticles at the lowest two concentrations on the wound model created on IGF cells was evaluated.

Results: According to SEM results, gold nanoparticles synthesized from pomegranate peel extract are about 25 nm, silver nanoparticles are about 60 nm. Gold nanoparticles yielded 95% and above viability against IGF cells at all concentrations used for 24 and 48 hours. In silver nanoparticles, 80% and above viability was obtained against IGF cells at all concentrations used for 24 and 48 hours. When the effects of gold and silver nanoparticles at similar concentrations on IGF cells were compared, it was observed that silver nanoparticles were more cytotoxic ($p < 0.05$). The healing potential at 24 hours between groups were compared and it was found that silver and gold nanoparticle group significantly increased the migration rate compared to negative control groups ($p < 0.05$). When the 24-hour results were evaluated, the higher concentration used in both nanoparticles group were found to be more effective on wound healing ($p < 0.05$).

Conclusion: According to the results showed that gold and silver nanoparticles any cytotoxic effects against IGF cells and can be preferred as a therapeutic agent for periodontal

wound healing. Silver nanoparticles were statistically more effective in proliferation and migration than gold nanoparticles. Further studies are needed to confirm these findings.

Key words: Human gingival fibroblast cells, gold nanoparticle, silver nanoparticle, biosynthesis, wound healing



TEŞEKKÜR

Bir mum alevi olup tek başına yanmayı değil, başka mumlara da ışık verebilmeyi hedef koyan ve her daim duasıyla yanımda olan sevgili aileme,

Uzmanlık eğitimim süresince her türlü düşüncemi yargılamadan dinleyen ve beni yönlendiren ayrıca tezimin her aşamasında yanımda olan, empati kurabilen, daha iyisi için hep destekleyen sevgili tez danışmanım Doç. Dr. Özge GÖKTÜRK'e,

Cerrahi cesaretimi arttıran, desteğini ve samimiyetini her zaman hissettiren Dr. Öğr. Üyesi Şevki GÜLER'e,

Bilgi ve deneyimlerini hiç esirgmeden paylaşan bölümümüzün değerli hocalarından Dr. Öğr. Üyesi Şadiye GÜNPINAR'a ve Dr. Öğr. Üyesi Gülbahar USTAOĞLU'na,

Çalışmamızın laboratuvar aşamalarındaki katkılarından dolayı Gebze Yüksek Teknoloji Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Kimya Bölümünde görevli sevgili Dr. Aişe ÜNLÜ'ye ve Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyomühendislik Bölümünde görevli sevgili Dr. Öğr. Üyesi Seçil ERDEN TAYHAN ile birlikte tüm ekip arkadaşlarına,

Uzmanlık eğitimine ilk başladığım süreçte bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve cesaretlendiren kıdemlilerim Kerem Çağlar GÜMÜŞ ve Umut ÖĞÜTÜCÜ'ye

Klinikte keyifle çalışmamı sağlayan bölümdeki tüm asistan arkadaşlarıma,

Aile olarak her zaman destek olan Elvan ARIÖZ ve Özkan ARIÖZ'e

Huzurlu ve sıkıntılı her anda dostluklarıyla yanımda olan canım arkadaşlarım Berna Sena CİVAN ve Dr. Yasemin DENİZ'e

Bolu'ya benim için gelerek bu zorlu uzmanlık sürecinde bana her zaman destek olan sevgili eşim Numan TORLAK'a ve sevgili ailesine,

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
FOTOĞRAFLAR DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Periodontal Hastalıklar ve Sınıflandırılması.....	3
2.2. Periodontal Yara İyileşmesi	4
2.3. Yara İyileşmesinin Fizyolojisi	5
2.3.1. Enflamatuar faz	5
2.3.2. Proliferasyon fazı	7
2.3.3. Remodelig fazı	8
2.4. Oral Mukozadaki Yara İyileşmesi Farklılıkları	9
2.5. Nanoteknoloji	9
2.5.1. Diş Hekimliğinde Altın ve Gümüş Nanopartiküller	10
2.6. Nanopartikül Sentezi	12
2.6.1. Nanopartiküllerin Bitkisel Sentezi	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Nar Kabuğu Ekstraktının Eldesi.....	17
3.2. Nar Ekstraktından Nanopartikül Eldesi.....	18
3.2.1. Nar Ekstraktından Gümüş Nanopartikül Eldesi	18
3.2.2. Nar Ekstraktından Altın Nanopartikül Eldesi	19
3.3. Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	20
3.4. Hücre Kültürü Çalışması.....	20
3.4.1. Hücrelerin Çözülmesi, Pasajlanması, Çoğaltılmaları ve Sayılması. 20	
3.4.2. MTT Testinin (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide) Uygulanması.....	24
3.4.3. In-Vitro Yara Modeli	26

3.5. İstatistiksel Analiz	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. Gümüş Nanopartikülünün Karakterizasyonu	30
4.1.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis) analizi	30
4.1.2. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR) analizi	31
4.1.3. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizleri	32
4.2. Altın Nanopartikülünün Karakterizasyonu	34
4.2.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis) analizi	34
4.2.2. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR) analizi	35
4.2.3. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) analizleri	36
4.3. Altın ve Gümüş Nanopartiküllerin Doza ve Zamana Bağlı Olarak Sitotoksisite Sonuçları.....	38
4.4. Altın ve Gümüş Nanopartiküllerin Doza ve Zamana Bağlı Olarak Yara İyileşmesi Modeli Sonuçları.....	41
5. TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇLAR.....	48
7. KAYNAKLAR.....	49

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1: Gümüş nanopartikül sentezinde kullanılan AgNO_3 /nar kabuğu ekstraktı oranı

Tablo 3.2: Altın nanopartikül sentezinde kullanılan HAuCl_4 /nar kabuğu ekstraktı oranı

Tablo 4.1: Farklı konsantrasyonlarda nar ekstraktından sentezlenen gümüş nanopartiküllerin dalga boyları

Tablo 4.2: Farklı konsantrasyonlarda nar ekstraktından sentezlenen altın nanopartiküllerin dalga boyları

Tablo 4.3: Farklı konsantrasyonlardaki AgNP'nin MTT analiz sonuçları

Tablo 4.4: Farklı konsantrasyonlardaki AuNP'nin MTT analiz sonuçları

Tablo 4.5: 24.saat farklı konsantrasyondaki nanopartiküllerin yara iyileşme sonuçları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1: Nar ekstraktarı ile sentezlenen AgNP UV spektrumları

Şekil 4.2: Nar ekstraktarı ile sentezlenen AgNP FTIR spektrumu

Şekil 4.3: Nar ekstraktarı ile sentezlenen AgNP ler farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri

Şekil 4.4: Nar ekstraktarı ile sentezlenen AuNP UV spektrumları

Şekil 4.5: Nar ekstraktarı ile sentezlenen AuNP FTIR spektrumu

Şekil 4.6: Nar ekstraktarı ile sentezlenen AuNP ler farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri

Şekil 4.7: Farklı konsantrasyonlardaki AgNP'nin MTT analiz sonuçları

Şekil 4.8: Farklı konsantrasyonlardaki AuNP'nin MTT analiz sonuçları

FOTOĞRAFLAR DİZİNİ

Fotoğraf 3. 1: Nar kabuğu ekstraktından senteze altın ve gümüş nanopartikül

Fotoğraf 3.2. Sentez ve santrifüj sonrası çöken altın ve gümüş nanopartikül

Fotoğraf 3. 3: Soğutmalı santrifüj cihazı

Fotoğraf 3. 4: Kullanılan inkübatör

Fotoğraf 3. 5: Kullanılan ters-faz mikroskop

Fotoğraf 3. 6: Kullanılan EDTA solüsyonu

Fotoğraf 3. 7: Neubauer lamı

Fotoğraf 3. 8: Steril nanopartiküllerin kabin içindeki görüntüsü

Fotoğraf 3. 9: Nanopartikül ve DMEM HG eklenmiş 96 gözlü kültür kapları

Fotoğraf 3. 10: MTT çözeltisi eklenmiş 96 gözlü kültür kapları

Fotoğraf 3. 11: Çizik testi esnasında 6 gözlü kültür kapları

Fotoğraf 3. 12: Oluşturulan yara modelinin 0.saat inverted mikroskop görüntüsü

Fotoğraf 3. 13: Oluşturulan yara modelinin 24.saat inverted mikroskop görüntüsü

Fotoğraf 3. 14: Oluşturulan yara modelinin 48.saat inverted mikroskop görüntüsü

SİMGELER VE KISALTMALAR

AgNP	Gümüş nanopartiküller
AuNP	Altın nanopartiküller
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
DMEM HG	Dulbecco's modified Eagle's medium, 4,5 g/L glikoz
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FGF-2	Fibroblast büyüme faktörü-2
FTIR	Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
g	Gram
g/L	Gram/litre
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörleri
İGF	İnsan gingival fibroblast
IL-1	İnterlökin-1
mM	Milimolar
mL	Mililitre
µg/ml	Mikrogram/mililitre
Mg ⁺²	Magnezyum iyonu
µL	Mikrolitre
MMP	Matriks metalloproteinazlar
MTA	Mineral trioksit agregat
NSAİ	Non-steroid antienflamatuarlar
nm	Nanometre
OD	Optik dansite
PMNL	Polimorf nükleer lökosit
PDGF	Trombosit türevi büyüme faktörü
PMMA	Polimetil metakrilat

PPE	Pomegrante peel extract
ROS	Reaktif oksijen ürünlerini
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SPR	Yüzey plazmon rezonansı
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TGF- β	Transforming Büyüme Faktörü-Beta
TGF- α	Transforming Büyüme Faktörü-Alfa
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör-Alfa
TIMP	Metalloproteinazların doku inhibitörü
UV-Vis	Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Tüm toplumlarda yaygın olarak görülen periodontal hastalıklar, multifaktöriyel, enfeksiyöz ve enflamatuvar hastalıklardır [1]. Periodontal hastalıklar sonucunda dokuda bir yara oluşur. Yapılan cerrahi ve cerrahi olmayan periodontal tedaviler sonucu gerçekleşen iyileşme de bir yara iyileşmesi süreci olarak düşünülebilir. Çünkü terim olarak yara, çeşitli etkenler sonucu (delici aletler ile mekanik olarak, travma sonucu, fiziksel ve kimyasal etkenlerle, mikroorganizmalar, ameliyat sonrası, vb.) canlı dokunun başlangıç anatomik yapı ve fonksiyonunun kaybolması demektir [2].

Yara iyileşmesi, karmaşık olaylar zinciridir ve dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen kronik enflamasyonda merkezi bir rol oynamaktadır [3]. Birçok hücre tipi, büyüme faktörleri ve diğer biyokimyasal olaylar birbirleriyle etkileşime girerek bu süreci yürütürler [4]. Hastalık sonucu azalmış periodontal dokuda oluşan yara iyileşmesinden sonra tam doku rejenerasyonu genellikle sağlanamaz. Özellikle, yara bölgesinde enfeksiyon mevcutsa kronik bir iyileşme yanıtı gelişir [5].

Yara iyileşmesi sırasında enfeksiyonu önleyebilmek için yara bakımında kullanılan terapötik ajanlarla ilgili farklı sonuçlar bulunmuştur. Son yıllarda yapılan birçok çalışmada, alternatif olarak kullanılabilecek bitkisel preparatlar veya diğer alternatiflerin yara iyileşmesi sırasında antimikrobiyal, antienflamatuvar etkileri incelenmiştir [6].

Nanopartiküller, tıp ve diş hekimliği alanında tıbbi görüntüleme, ilaç taşıma, kanser tedavisinde antimikrobiyal ve antienflamatuvar etkileriyle oldukça popüler hale gelmişlerdir. Özellikle gümüş nanopartiküller (AgNP) ve altın nanopartikülleri (AuNP) bilinen geniş antimikrobiyal ve antienflamatuvar etkilere sahip olan ve en yaygın kullanılan nanopartiküllerdir [7, 8]. Bu partiküller, fiziksel, kimyasal veya biyolojik yöntemlerle üretilebilmektedir. Biyosentez ile nanopartiküllerin üretimi; çevre dostu, basit, temiz, toksik olmayan ve ucuz uygulamalar olarak literatüre kazandırılmıştır [9].

Bu çalışma, bitkisel biyosentez ile elde edilmiş altın ve gümüş nanopartiküllerinin in-vitro koşullarda insan gingival fibroblast (İGF) hücrelerine

sitotoksitesini değerlendirmek ve yara iyileşme modeli üzerindeki etkilerini gözlemeyi hedeflemiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Hastalıklar ve Sınıflandırılması

Diş ve destek dokular (dişeti, periodontal ligament, alveoler kemik ve sement) periodonsiyum olarak isimlendirilir. Bu dokuları etkileyen hastalıklar ise “periodontal hastalıklar” olarak tanımlanmaktadır. Periodontal hastalıkların tanımlaması, 2017 Dünya Çalıştayı’nın “Periodontal ve Peri-İmplant Hastalık ve Koşullarının Sınıflandırılma Kriterleri” kararlarına göre yenilenmiştir [10].

Yeni sınıflandırmaya göre, klinik olarak dişetinde enflamasyon görülmeyen, başarılı bir şekilde tedavi edilmiş gingivitis, periodontitis geçmişi olan hastalar ve diğer periodontal durumlu kişiler “periodontal olarak sağlıklı” kabul edilir [11]. Periodontal hastalıklar, plak birikimine bağlı gelişen basit enflamatuvar yanıtın konak aleyhine bozulması ile başlar [12]. Sadece dişeti dokusunda sınırlı enflamatuvar durum gingivitis olarak adlandırılır. Gingivitis, dişetinde klinik olarak gözlemlenebilen ödem, sondlamada kanama, renk değişikliği ve kıvam bozukluğu ile karakterizedir [13]. Gingivitis hastalığında görülen enflamasyon geri dönebilen bir durumdur. Ancak eğer tedavi edilmezse gingivitis kronikleşir ve periodontitise dönüşebilir [14].

Periodontitis ise diş etinde görülen enflamasyonun ilerleyip periodontal doku yıkımına ve alveoler kemik kaybına neden olduğu kronik enflamatuvar hastalıktır [15, 16]. Yeni sınıflamada periodontitis hastalarında tanı; etiyoloji, prognoz, karmaşıklık düzeyi ve hastalığın nüks veya progresyon riski değerlendirilerek daha bireyselleştirilmiştir. Ayrıca 1999 sınıflandırmasına göre “kronik” veya “agresif” olarak bilinen ayrı hastalık kategorileri “periodontitis” adı altında toplanmıştır. Evreleme (staging) ve derecelendirme (grading) süreciyle birlikte detaylı bir periodontitis sınıflandırması olarak geliştirilmiştir [10, 17, 18]

Periodontitis hastasında evre (evre I-IV); interdental klinik ataçman kaybı, radyografik kemik kaybı, sondlama derinliği, dişlerde migrasyon, furkasyon tutulumu, açıl kemik defekti ve periodontitise bağlı gelişen diş kaybı varlığına göre belirlenir [19]. Periodontitis hastasında derecelendirilme (derece A - düşük risk, derece B - orta risk, derece C - yüksek risk) ise periodontitisin ilerleme hızını belirler. Periodontitisin derecelendirmesi; hastanın genel sistemik sağlığı, sigara kullanımı, diyabetin metabolik kontrolü gibi kriterler değerlendirilerek yapılır [18].

Genel olarak periodontal hastalıkların tedavisinde amaç, enflamasyonu ortadan kaldırarak hastalığın ilerlemesini durdurmaktır [20]. Bu amaçla cerrahi ve cerrahi olmayan tedavi seçenekleri kullanılmaktadır. Bu tedaviler sonucu gerçekleşen iyileşme, rol alan hücresel ve moleküler olaylara bağlıdır [21].

2.2. Periodontal Yara İyileşmesi

Periodontal yara iyileşmesi, vücudun herhangi bir bölgesinde gerçekleşen yara iyileşmesine benzerdir. Ancak en önemli farkı epitelin ve bağ dokusunun tutunduğu bölgede bulunan mineralize diş yüzeyidir [21]. Melcher periodontal dokulardaki iyileşmeyi açıkladığı hipotezinde, ekspozite kök yüzeyinde tekrar kolonize olan hücre tipinin oluşan tamir dokusunun yapısını belirlediğini söylemiştir [22]. Bu hipoteze göre, periodontal yara iyileşmesi sırasında kök yüzeyinde ağız epitelinden kaynaklanan hücreler proliferasyon olursa, uzun bağlantı epiteli oluşur. Dişeti bağ dokusundan kaynaklanan hücreler yara iyileşme bölgesinde aktif olursa, bağ dokusu adezyonu sert ve yumuşak doku aralığını doldurur, buna bağlı olarak kök rezorpsiyonu da meydana gelebilmektedir. Eğer kemik iliğinden kaynaklanan hücreler yara iyileşme bölgesindeki aktif hücrelerse, ankiloz ve kök rezorpsiyonu meydana gelmesi beklenen süreçtir [23].

Yara iyileşme sürecinin sonunda periodontal sağlığın beklentileri tamir, rejenerasyon, reataşman veya yeni ataşman oluşumudur. Rejenerasyon yapı ve fonksiyonu bozulmuş dokunun tümüyle yenilenmesini içeren biyolojik bir süreçtir. Tamir ise hasara uğramış dokunun form ve fonksiyon açısından eskiden mevcut doku yerine yeni doku oluşması ve devamlılığının sağlanmasıdır [22, 24]. Başlangıç periodontal tedaviler sonucunda genel olarak hasarlı periodontal dokular rejenerasyondan ziyade tamir ile yanıt verirler [25]. Bu sonuçlar, yara iyileşmesi sırasında gerçekleşen hücresel ve moleküler olaylara bağlıdır [21]. Özellikle dişeti bağ dokusunda baskın olarak bulunan gingival fibroblast hücrelerinin proliferasyonları, sentezlenmeleri ve yıkımları yara iyileşmesini etkileyen önemli bir hücresel faktördür [26, 27]. Gingival fibroblast hücreleri birçok büyüme faktörünü eksprese ederek; reepitelizasyonda, granülasyon dokusu oluşumunda, ekstrasellüler matriks sentezinde rol alırlar. Dolayısıyla tüm bu mekanizmalar, gingival fibroblast hücrelerinin proliferasyon ve migrasyon kapasiteleri ile direk ilişkilidir [28].

Yara iyileşmesi, doku hasarından sonra başlayan ardışık fazlardan oluşur [5]. Bu kompleks süreçte ekstrasellüler matriksteki değişim fibroblastlar, makrofajlar, trombositler ve endotelial hücreler gibi birçok başrol içerir ve hücreler ürettikleri sitokinler veya mediyatörler ile süreci yönetmektedirler [29]. Özellikle cerrahi tedaviler sonrası beklenen yara iyileşmesi, yapılan cerrahi işlemin başarısını da etkilediğinden ötürü çok uzun yıllardır araştırılan bir konu olmuştur.

Yara iyileşmesini doğru yönetebilmek için, yara iyileşme fizyolojisinin tam olarak anlaşılması önemlidir. Bu fizyolojinin çalışmasını bozabilecek faktörlerin olumsuz etkilerini ortadan kaldıracak terapötik çalışmalar günümüzde çok fazla araştırılan konulardan olmuştur.

2.3. Yara İyileşmesinin Fizyolojisi

Yara iyileşme süreci, koagülasyon ile başlar. Pıhtı oluşumu sonrası birbirleriyle örtüşen 3 ana fazdan oluşur. Bunlar; enflamatuar, proliferatif ve remodeling fazlarıdır [30]. Bütün süreç, selüler ve ekstraselüler yapıların etkisi ile şekillenir. Aynı zamanda sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin spesifik olarak uyarıcı veya baskılayıcı görevleri de süreci yönetir [31].

2.3.1. Enflamatuar faz

Enflamatuar faz, iyileşme yanıtının ilk habercisidir. Yaralanmadan hemen sonra meydana gelir ve 3-5 gün süresince devam eder [30]. Dokuda gerçekleşen travma sonucu kanama gözlenir. Kanamaya karşı gerçekleşen ilk vasküler yanıt 5-10 dakika sürebilen geçici vazokonstriksiyondur. Damarlardaki vazokonstriksiyon geçici bir çözümdür.

2.3.1.1. Koagülasyon aşaması

Geçici vazokonstriksiyondan sonra pıhtılaşma kaskadı, lokal arteriyel ve venöz kanamayı kontrol etmek için aktive edilir [5]. Pıhtılaşma, bir fibrin ağında trombositlerin bir araya getirilmesiyle başlar. Fibrin ağında temel amaç vasküler sistemi koruyarak vital fonksiyonun devamlılığını sağlamaktır. Ayrıca oluşacak bu pıhtı, gerçekleşecek hücre göçü için geçici matriks oluşturur [32, 33]. Aktive edilen trombositler; hücre göçünü, adezyonunu ve proliferasyonunu uyaran sitokinleri, büyüme faktörlerini ve kemokinleri serbest bırakırlar [34].

Trombositlerin sitoplazması, trombosit türevi büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), transforme edici büyüme faktörü β (TGF- β), ve insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF) gibi sitokinlerle dolu α -granülleri içerir. Bu moleküller nötrofilleri aktive ederek ve bölgeye göçünü sağlayarak yara iyileşme kaskadında nötrofillerin promotör olarak görev yapmalarını sağlar [35]. Daha sonra makrofajlar, endotel hücreleri ve fibroblastlar da yara bölgesine yine bu sitokinler sayesinde gelir. Ayrıca trombositler, vazodilatasyona ve artmış vasküler geçirgenliğe neden olan serotonin gibi vazoaaktif aminler içerir, bu da dokuda sıvı ekstrasvazasyonuna yol açan ödem ile sonuçlanır [36].

2.3.1.2. Enflamasyon aşaması

Damarsal geçirgenliğin artması ile birlikte kan plazmasının ve diğer mediyatörlerin damar duvarlarından diapedez ile geçip ekstrasvasküler alana yerleşmesi gerçekleşir [30]. Enflamatuvar aşamadaki hücre yanıtı, yara bölgesindeki lökositlerin akışı ile karakterizedir. Polimorf nükleer lökositlerden (PMNL), nötrofiller yara bölgesine ilk gelen enflamatuvar hücrelerdir, yaralanmadan 6 saat sonra yarada görülürler. 1-2 günde maksimum sayıya ulaşırlar. Nötrofillerin görevi enfeksiyonun önlenmesi için fagositoz ve proteaz salınımı ile ölü dokuların ortadan kaldırılmasıdır [37].

Yaralanmadan 48-72 saat sonra, yarada makrofajlar görülür ve fagositoz sürecine devam eder. Bu hücreler aslında yaraya gelirken doku makrofajları olmak üzere fenotipik değişikliklere uğrayan kan monositleridir. Pıhtılaşma faktörleri, kompleman bileşenleri, PDGF, TGF- β , lökotrien B4 ve trombosit faktör IV gibi çok sayıda ajan tarafından yara bölgesine çekilen makrofajlar, nötrofillerden daha uzun bir ömre sahiptir ve daha düşük bir pH değerinde çalışmaya devam eder [38, 39]. Bu hücreler, önemli düzenleyici olarak işlev gören TGF- β 'nin yanı sıra bol miktarda büyüme faktörü (TGF- α , heparin bağlayıcı epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü, kollajenaz) rezervuarı sağlayarak enflamatuvar yanıtın geç aşamaları için keratinositleri, fibroblastları ve endotelyal hücreleri aktive ederler. Böylece doku rejenerasyonuna ve yara iyileşmesinin proliferatif evresine geçişe destek olurlar [37]. Makrofajlar yara onarımı bitene kadar yara iyileşmesini düzenlemeye devam ederler ancak sayıları ve aktiviteleri yaralanmadan sonraki beşinci güne kadar azalır [30].

2.3.2. Proliferasyon fazı

Proliferatif faz, yaralanmadan sonraki üçüncü günde başlar ve daha sonra yaranın büyüklüğüne göre ortalama 2 hafta sürer. Fibrin ve fibronektinden oluşan geçici fibrin ağının yerini alan yeni sentezlenmiş ekstrasellüler matrisin birikmesi ve fibroblast göçü ile karakterizedir [40]. Makroskopik düzeyde, yara iyileşmesinin bu aşaması bol miktarda granülasyon dokusu oluşumu olarak görülebilir. Fibroblastlar, epitel hücreleri ve endotel hücreleri proliferatif fazda etkin olan primer hücrelerdir.

2.3.2.1. Fibroblast migrasyonu

Yaralanmadan sonra, çevre dokulardaki fibroblastlar ve miyofibroblastlar ilk 3 gün boyunca proliferasyon için uyarılırlar [41]. Enflamatuar hücreler ve trombositler tarafından salınan TGF- β , EGF, PDGF gibi sitokinler ve fibronektin fibroblastların yaraya göçünü sağlar [42]. Fibroblastlar, yarada birikirler ve hyaluronik asit, proteoglikanlar, fibronektin ve tip 1 ve tip 3 prokollajen matris proteinleri üretirler [38].

Kollajen, fibroblastlar tarafından sentezlenmektedir ve tüm dokulara bütünlük ve sağlamlık kazandırır. Ayrıca, yara iyileşmesinin proliferatif ve yeniden şekillenme fazlarında anahtar bir rol oynar [43]. Kollajen üretimi, doku hasarının yaklaşık 3-5. gününde başlar ve epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β), trombosit türevi büyüme faktörü (PDGF) ve fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) tarafından stimüle edilir [44]. Kollajen, yara içindeki hücre içi matris oluşumu için bir temel görevi görür.

2.3.2.2. Anjiyogenez ve granülasyon doku oluşumu

Yeni kan damarlarının oluşumu, var olan kan damarlarının da filizlenmesi yara iyileşmesinde kritiktir ve tüm aşamalarda eşzamanlı olarak gerçekleşir. Yara iyileşmesinin 2. gününde endotelial hücreler, fibroblastlara benzer şekilde göç ederler [45]. Endotel hücreleri; FGF, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), PDGF, anjiyojen dahil olmak üzere bir dizi anjiyojenik faktöre yanıt verir. Aynı zamanda anjiyostatin ve steroidler gibi inhibitör faktörlerin etkisi ile denge korunmuş olur [46, 47]. Matriks metalloproteinazlar (MMP), anjiyogenezde önemli görev alır ve endotelial hücrelerin geçişine izin verecek şekilde ekstrasellüler matrisin yıkımını

sağlar [48]. Anjiogenezde rol alan MMP-1, MMP-2, MMP-9 ve MMP-19 en önemli matriks metalloproteinazlardır [49].

Enflamasyon fazında oluşan hücre debrisleri ve bakteriler ortadan kaldırılınca bir defekt meydana gelir. Bu defekti dolduran kan damarları bakımından zengin geçici bağ dokusu ağına granülasyon dokusu adı verilir. Yaralanmadan yaklaşık 4 gün sonra, geçici ekstrasellüler matriks dokusunun yerini alarak oluşur. Granülasyon dokusu; fibroblast, kollajen ve kan damarları içerir [29].

Yara iyileşmesinde proliferatif aşamanın sonu, bu fazda meydana gelen bütün süreçlerin belirli bir noktada sona ermesi ve granülasyon dokusu oluşumunun durmasıdır. Yara defekti kollajen sentezi ile dolduktan sonra fibroblastlar hızlıca apoptoz ile vücut tarafından ortadan kaldırılır. Bununla birlikte, yara kenarlarının yaklaşmasına yardımcı olan yara kasılması miyofibroblastlarca gerçekleşir [50]. Aynı apoptoz süreci görevi biten tüm fibroblastlarda gerçekleşir.

2.3.3. Remodelig fazı

Yara iyileşmesinin en uzun ve son evresi olarak kabul edilir. Kollajenin sentezlenmesi, parçalanması ve hücre dışı matrisin yeniden şekillendirilmesi sürekli olarak gerçekleşir ve her ikisi de yaralanmadan yaklaşık 3 hafta sonra dengelenir [43, 51]. Bu aşamaya yeniden şekillenme (remodelling) denir. Yara iyileşmesinin 21. gününde maksimum kollajen miktarına ulaşılsa da yaranın gerilme direnci normalin ancak %20'sidir. 6. haftada ise yaranın gerilme direnci %80'e artar. Yaranın gerilme kuvvetindeki bu artışın sebebi, kollajen yapım/yıkımının yeniden düzenlenmesidir [48]. Kollajen yapım/yıkımı aktivör ve inhibitör faktörler tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Yaradaki nötrofiller, makrofajlar ve fibroblastlar tarafından üretilen MMP, kollajenin yıkımından sorumludur. Yavaş yavaş, metalloproteinaz doku inhibitörlerinin aktivitesinin artması ile birlikte MMP aktivitesinde bir düşüş gerçekleşir, böylece yeni matris birikimi teşvik edilir [52, 53].

Metalloproteinaz doku inhibitörü (TIMP), MMP aktivitesini düzenler. Bu dengenin herhangi bir şekilde bozulması durumunda, aşırı veya yetersiz matriks oluşumu ya da yaranın açık kalması gibi problemler oluşabilir [54]. Doğru bir yara iyileşmesinde, Tip I kollajen miktarı artar, Tip III kollajen, proteoglikan ve su miktarı azalır. Bununla birlikte kollajen fibrillerinin kalınlığı ve interfibriller bağlanma artar [55].

Yeniden şekillenme aşamasının sonlarında, büyük ölçüde proliferatif aşamada başlamış olan yara kontraksiyonu görülür. Süreç, en önemlileri PDGF, TGF- β ve FGF olan bir dizi faktör tarafından düzenlenir [56]. Yara iyileştikçe, fibroblastların ve makrofajların yoğunluğu apoptoz ile daha da azalır [57].

Zamanla bölgeye kan akışı azalır ve yara bölgesindeki metabolik aktivite de azalmış olur [58]. Sonuç, hücre ve kan damarlarının sayısı azalmış ve yüksek gerilme mukavemeti ile tamamen olgunlaşmış bir yaradır.

2.4. Oral Mukozadaki Yara İyileşmesi Farklılıkları

Oral mukozadaki yumuşak doku iyileşmesinin hücresel yönleri ile ilgili çok daha az bilgi bulunmakla birlikte, yara iyileşmesinin benzer bir süreç temsil ettiği varsayılarak yumuşak dokudaki yara iyileşmesi hakkındaki bilgi daha çok deri yaralarının iyileşmesi ile ilgili çalışmalardan elde edilmiştir [24, 59]. Oral mukozadaki yara iyileşmeleri ile dermal yaraların iyileşmesi arasında genellikle skar oluşmayı, iyileşmenin hızlı oluşu gibi farklar vardır [60, 61]. Ayrıca, IL-1'in oral yara iyileşmesinde rol oynamasına karşın dermal yara iyileşmesinde etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Bunun sebebi olarak, oral kavite içinde yer alan kommensal bakterilere karşı savunma mekanizmasını kontrol etmek amacıyla IL-1'in gerekli olduğu düşünülmüştür [62].

2.5. Nanoteknoloji

1974 yılında Japon bilim adamı Norio Taniguchi tarafından Tokyo Üniversitesinde nanometre düzeyinde materyallerin hassas üretimlerinin tanımlanması ile nanoteknoloji terimi ortaya atılmıştır [63]. Nanomateryaller 1-100 nm boyutundadır ve kimya, biyoloji, mühendislik, fizik, tıp ve diş hekimliği gibi pek çok bilim dalının da ilgi odağıdır [9, 64].

Bir materyalin, nano boyutta sergilediği fiziksel ve kimyasal özellikleri normal boyutlarındaki özelliklerinden çok daha farklıdır [65]. Boyutun küçülmesi ile değişen fizikokimyasal özellikler, nanomateryalleri belirgin olarak diğerlerinden iki temel faktörle ayırır. Bu iki temel faktör, nano boyutta yüzey alanının artması ve kuantum etkisinin oluşmasıdır [66].

Nanopartiküller kimyasal, fiziksel ve biyolojik yöntemlerle üretilmektedir. Bu partiküllerin elde edilmesinde; aşağıdan yukarıya (*bottom up*), yukarıdan aşağıya

(*top down*) ve fonksiyonel (*functional*) olmak üzere üç temel yaklaşım bulunur [67]. Aşağıdan yukarıya olan yaklaşımda nanopartiküller direk sentezlenerek daha büyük kompleks moleküller oluşturmak üzere birleştirilirler. Yukarıdan aşağı olan sentezde partiküller konvansiyonel olarak sentezlenip, bileme ya da öğütme yoluyla daha küçük hale getirilmesidir. Fonksiyonel yaklaşım ise nanopartiküllerin özel kullanım alanına uygun üretilmesidir [68].

Diş hekimliğinde nanoteknoloji kavramından 2000’li yıllarda bahsedilmeye başlanmıştır [69]. Günümüzde, diş hekimliğinde metalik nanopartiküllerin üretimi ve uygulamaları üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Ağız ve diş hastalıklarının teşhisi, tedavisi ve önlenmesinde, ağrı giderme ve ağız sağlığının iyileştirilmesinde nanoteknolojinin kullanımı özellikle ilgilenilen alanlardır [70].

Biyolojik uygulamalarla sentezlenen metalik nanopartiküllerin sitotoksik ve antimikrobiyal etkileriyle ilgili çalışmalar son derece yaygındır [9]. Özellikle, gümüş ve altın gibi nanopartiküllerin antimikrobiyal etkileri daha önce de rapor edilmiştir [71]. Son yapılan çalışmalar, gümüş nanopartiküllerinin yanık tedavilerinde, dental materyallerde, güneş koruma losyonlarında, çelik ürünlerin kaplanması, tekstil ürünlerinde, suların temizlenmesinde kullanımı gibi birçok alanda yapılmıştır.[72-77] Gümüş nanopartiküllerinin insan hücrelerine karşı düşük toksisitesi, yüksek termal stabilitesi nedeniyle kullanımı ilgi çekmektedir [72].

2.5.1. Diş Hekimliğinde Altın ve Gümüş Nanopartiküller

Altın (AuNP) ve gümüş nanopartiküllerin (AgNP) biyomedikal uygulamalarda ve gelişen nanobiyoteknoloji alanında kullanımı oldukça yaygındır. Biyouyumluluk ve toksik olmama özellikleri altın nanopartiküllerin antimikrobiyal, antitümör aktivitelerde ve ilaç taşınımı gibi uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlar [78]. Aynı şekilde, gümüş nanopartiküllerin de en büyük karakteristiği birçok mikroorganizmaya ve bakteriye karşı antimikrobiyal ve antibakteriyel etki göstermesidir [79-81]. Bununla birlikte, AgNP’nin, antienflamatuar etkisinin de bulunduğu bilinmektedir [82].

Diş hekimliğinde metalik nanopartiküller en çok antimikrobiyal etkileri ve mekanik etkileri sebebiyle kullanılmaktadır. Oei ve ark. polimetil metakrilat (PMMA) içine dahil edilmiş AgNP’lerin etkisini araştırmışlardır. AgNP’lerin eklenmesi ile mekanik ve antibakteriyel özelliklerde iyileşme olduğu ve bu iyileşmenin 28 güne

kadar sürdüğü gösterilmiştir [83]. Acosta-Torres ve ark. yine PMMA'ya AgNP ekleyerek biyouyumluluk ve antifungal özellikler üzerindeki etkisini araştırmıştır. Sonuçta *C. albicans*'ın yapışkanlığının azaldığı gösterilmiş ve sitotoksosite, genotoksosite gözlenmemiştir [84].

Vazquez-Garcia ve ark. mineral trioksit agregat (MTA) materyaline AgNP eklenmesiyle mekanik ve antibakteriyel özellikleri üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak MTA'nın daha yüksek antibakteriyel etki ve daha iyi mekanik özellikler gösterdiğini bulmuşlardır [85]. Cheng ve ark. biyofilm üzerine etkisini araştırmak için AgNP'lerin farklı konsantrasyonlarını kompozit materyaline ilave etmişlerdir. AgNP'lerin eklendiği kompozitlerin, özellikle düşük konsantrasyonlarda remineralizasyon ve antibakteriyel özelliklere sahip olması ile dental restorasyonlar için uygun olduğunu gösterilmiştir [86].

Frankova ve ark. AgNP'lerin fibroblastlar, keratinositler ayrıca interlökinler, büyüme faktörleri ve MMP üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, AgNP'lerin 1-2 gün sonra IL-12, TNF- α gibi enflamatuar sitokinlerde azalmaya neden oldukları bulunmuştur [87]. Farklı bir çalışmada, AgNP periodontal patlara eklenmiştir. Onarım ve rejenerasyon değişikliklerinin değerlendirilmesi için histolojik değişiklikler 4 ve 7 gün sonra gözlenmiştir. Kontrollere kıyasla AgNP eklenen grupta, göreceli olarak zayıf enflamatuar hücre infiltrasyonu ve belirgin neovaskülarizasyon ile birlikte yeni kolajen sentezi sergilendiği gözlenmiştir. Bu çalışmaya göre, AgNP'lerin biyouyumluluğa sahip oldukları bu nedenle; yerel ilaç dağıtımı, periodontal pat, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu membranları vb. içine dahil edilebilir olduğu düşünülmüştür [88].

Dental implantlar için de peri-implantitis oluşumunu önlemek için titanyum implantlar üzerinde antimikrobiyal yüzey kaplaması oluşturmak için AgNP kullanılabileceği gösterilmiştir [89].

Altın nanopartiküllerin gümüş nanopartiküllere göre antimikrobiyal etkilerinin daha düşük olduğu rapor edilmiştir [90]. Altın nanopartiküllerin toksik olmadığı ve osteojenik farklılaşmayı indükleyebildiği jel formunda kullanılan in-vivo hayvan çalışmasıyla rapor edilmiştir [91]. Dong ve ark. altın nanopartiküllerini titanyum implantların yüzeyinde kemik rejenerasyonunu desteklemek için kullanmışlardır.

Sonuç olarak osteoblast farklılaşmasını uyardığını ve yeni kemik oluşumunu arttırdığını in-vivo hayvan çalışmasıyla ortaya koymuşlardır [92].

2.5.1.1. Altın ve Gümüş Nanopartiküllerin Antimikrobiyal Etki Mekanizması

AgNP'ler, hem gram pozitif hem de gram negatif organizmalar ve çeşitli antibiyotik direnci olan suşlar üzerine bile etkili geniş spektrumlu bir antibakteriyel etki sergilemiştir. Antibakteriyel etki için çeşitli mekanizmalar önerilmiş olmasına rağmen, kesin etki şekli tam olarak anlaşılamamıştır. Gümüş iyonları, bakteri hücresinin farklı yapıları üzerinde etkili olabilir. Öncelikle, hücre duvarı ve sitoplazmik membranın geçirgenliğini arttırmakta ve bu yapıların bozulmasına neden olmaktadır [48,49]. AgNP'ler tarafından bakteriyel moleküllerden DNA [50-52], proteinler [51,53] ve lipitlere [54] zarar verilebilir. AgNP'ler ayrıca bakteriyel hücre yıkımına neden olan oksidatif strese de neden olur [52]. Reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) hücre zarı bozulmasına ve DNA modifikasyonuna neden olduğu literatürde bahsedilmiştir [30].

Altın nanopartiküllerin antibakteriyel etkilerini esas olarak iki yolla gerçekleştirdikleri bilinmektedir. Bunlardan biri, mikroorganizmanın membran potansiyelini değiştirmek ve ATP seviyesini azaltmak için ATP sentaz aktivitelerini inhibe etmektir. Bu da mikroorganizmanın metabolizmasında genel bir düşüşe neden olur [93]. Diğer biyolojik süreçte bir çöküşü gösteren tRNA bağlanması için ribozom alt biriminin inhibisyonudur [93]. Bakterisidal altın NP'ler reaktif oksijen ürünlerini indüklemeyizler. ROS üretimi, çoğu bakterisidal antibiyotik ve antibakteriyel nanomalzeme için hücre ölümünü sağladıkları mekanizmadır [94, 95].

2.6. Nanopartikül Sentezi

Geleneksel olarak nanopartiküller, fiziksel ve kimyasal tekniklerle sentezlenmekte ve stabilize edilmektedir. Fiziksel yöntemler, lazer ablasyon [96], litografi [97] ve yüksek enerjili ışınlama [98] gibi teknikleri içerir. Kimyasal yaklaşım ise, kimyasal indirgeme, elektrokimya ve fotokimyasal indirgeme gibi tekniklerden oluşmaktadır [99-102]. Yapılan çalışmalar, sentez işlemi sırasında, nanopartiküllerin boyut, şekil, stabilite ve fizikokimyasal özelliklerin çeşitli faktörlerden güçlü bir şekilde etkilendiğini göstermiştir. Bu nedenle nanopartiküllerin boyut, şekil, stabilite

ve fizikokimyasal özellikleri etkin bir şekilde kontrol eden süreçlerin tasarlanması nanopartikül sentezine yönelik araştırmalarda önemli hale gelmektedir [103, 104].

Geleneksel kimyasal nanopartikül sentezleri hücreye toksik, kanser oluşumuna sebep olan ve çevresel olarak toksik, pahalı ve zehirli kimyasalların kullanıldığı yöntemlerle gerçekleştirilmektedir [105]. Geleneksel kimyasal sentez yöntemleri ayrıca içerdikleri organik çözücüler, indirgeyici ajanlar ve kolloidlerin istenmeyen aglomerasyonunu önlemek için kullanılan stabilizörler gibi tehlikeli kimyasallardan dolayı da toksik olabilmektedirler. Bazı nanopartiküllerin ise bileşim, boyut, şekil ve yüzey kimyası gibi faktörler nedeniyle toksik olduğu da bilinmektedir. Sonuç olarak, bu toksik ajanlar ile sentezlenmiş veya potansiyel olarak toksik olan nanopartiküllerin klinik ve biyomedikal uygulamalarda kullanımı mümkün olmamaktadır. Fiziksel ve kimyasal yöntemler metal nanopartiküllerin sentezinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, fiziksel yöntemler oldukça pahalı, kimyasal yöntemler ise çevreye ve canlı organizmalar için zararlıdır. Bu sentez yöntemleri ile geniş ölçekli nanopartikül üretimi yüksek enerji tüketiminden kaynaklanan maliyetler, zehirli organik çözücülerin kullanımı, tehlikeli ara maddelerin üretimi ve çevre kirliliğine ve çeşitli biyolojik risklere yol açan zararlı atık ürünlerinin oluşumu nedeniyle sınırlıdır. Bu sorunu ortadan kaldırmak için nanopartiküllerin sentezinde temiz, güvenilir, biyolojik olarak uyumlu ve çevreci yeşil süreçlerin geliştirilmesine ile ilgili çalışmalar son zamanlarda artış göstermektedir [103, 106].

Son yıllarda, nanopartiküllerin biyosentez ile sentezlenmesi geleneksel sentez yöntemlerine çekici bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Biyosentez, aktinomisetler [107, 108], bakteriler [109, 110], mantarlar [107, 111], virüsler [112] ve bitkiler [113, 114] gibi tek hücreli ve çok hücreli biyolojik materyallerin kullanımı ile gerçekleştirilen çevre dostu yeşil kimya temelli bir yaklaşımdır. Nanopartiküllerin sentezinde biyolojik fabrikalar olarak biyolojik materyallerin kullanımı ile geniş bir boyut, şekil, kompozisyon ve fizikokimyasal özellikte temiz, toksik olmayan ve çevre dostu nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirilmektedir [115].

Bakteri, virüs, mantar ve maya gibi biyolojik materyallerin nanopartiküllerin sentezinde kullanımına alternatif olarak bitki ekstraktlarının nanopartikül sentezinde kullanımı nispeten daha kolay ve daha avantajlıdır [116, 117]. Bitki ekstraktları ile gerçekleştirilen nanopartikül sentezinde mikroorganizmalarla gerçekleştirilen

sentezlerde gerekli olan mikroorganizma izolasyonu, kültür hazırlama ve kültür bakımı gibi özel, karmaşık ve çok aşamalı prosedürlere ihtiyaç duyulmamaktadır. Ayrıca, bitki ekstraktı ile sentezlenen nanopartiküller mikroorganizmalar ile sentezlenenlere göre büyük miktarlarda nanopartiküllerin üretimi için daha kolay, daha hızlı ve daha uygun maliyetlidir [118].

2.6.1. Nanopartiküllerin Bitkisel Sentezi

Bitkilerin metalik iyonları biriktirme ve biyolojik olarak azaltma potansiyeline sahip oldukları uzun zamandır bilinmektedir. Bu ilginç özellikler nedeniyle, bitkiler, metalik nanopartiküllerin biyolojik olarak sentezlenmesi ve detoksifikasyon uygulamaları için daha çevre dostu bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Kolayca elde edilebilen bitki materyalleri ve bitkilerin toksik olmayan yapısı sayesinde üretilen bitki kaynaklı sentezlenen nanopartiküller, biyomedikal ve çevre alanlardaki uygulamalar için gerekli olan yüksek talebin karşılanmasına imkân sağlamaktadır. Bitkilerin yaprak, meyve, sap, kökler ve çiçek ekstraktlarının kullanımıyla metal nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirilebilmektedir [119]. Biyoaktif alkaloidler, fenolik asitler, polifenoller, proteinler, şekerler ve terpenoidleri içeren bitki ekstraktları, metalik iyonları indirgemede ve stabilize etmede önemli role sahiptir [120]. Örneğin El-Kassas ve ark. *Corallina officinalis* ekstraktındaki polifenollerdeki hidroksil ve proteinlerindeki karbonil grubunun altın nanopartiküllerin sentezinde ve kararlı hale getirilmesinde etkili olabileceğini göstermişlerdir [121]. Özellikle, tohumlu bitkiler nanopartikül sentezi için uygun olabilecek birçok ikincil metabolitleri içermektedir [119].

Nanopartikül sentezi, bitki ekstrakt numunesinin bir metal tuzu çözeltisi ile karıştırılmasıyla başlar. Tuzların biyokimyasal olarak indirgenmesi hemen gerçekleşir ve nanopartiküllerin oluşumu reaksiyon karışımının renginde değişikliklerle sebep olur. Sentez sırasında, işlem metal iyonlarının mono veya iki değerlikli oksidasyon durumlarından sıfır değerli durumlara dönüştürüldüğü ve indirgenmiş metal atomlarının çekirdeklenmesinin gerçekleştiği bir başlangıç basamağı ile başlar [122]. Bunun hemen ardından, küçük komşu parçacıkların, metal iyonlarının biyolojik olarak daha fazla indirgenmesi gerçekleşirken, termodinamik olarak daha kararlı olan daha büyük nanopartiküller oluşturmak üzere birleştiği bir büyüme periyodu izler. Büyüme ilerledikçe, nanopartiküller, küpler, küreler, üçgenler, altıgenler, pentagonlar, çubuklar

ve teller gibi çeşitli morfolojileri oluşturmak için toplanırlar. Sentezin son aşamasında ise bitki ekstraktı nanopartikülü stabilize etmekte ve en uygun ve kararlı morfolojiyi oluşturmaktadır.

2.6.1.1. Nar Bitkisi ve Nar Bitkisinden Nanopartikül Sentezi

Nar (*Punica granatum* L.) Punicaceae ailesine ait ve bilinen en eski yenebilen ve kutsal kitaplarda da adı geçen meyvelerden birisidir [123]. Kaynaklarda insanoğlunun narı 6500 yıldır bildiği, yediği ve şifa kaynağı olarak kabul ettiğine değinilmiştir. Nar meyvesi fenolik maddeler, vitamin, mineral, organik asitler, antosiyaninler gibi insan sağlığını olumlu yönde etkileyen birçok bileşen sayesinde antioksidan kapasitesi yüksek besinler arasında yer almaktadır [124]. Narın içerdiği fenolik madde özellikle kabukta bulunmaktadır. Yüksek antioksidan kapasitesi sayesinde; kanser, kalp-damar hastalıkları, diyabet gibi yaygınlaşan birçok hastalıktan korunmada etkilidir [125]. Ayrıca enfeksiyonlarda, periodontal hastalıklarda, gıda zehirlenmelerinde, ülser, diyare, dizanteri, hemoroid tedavisinde yararlı olmaktadır [126].

Ahmad ve ark. nar kabuğu ekstresinden küresel şekilli gümüş ve altın nanopartiküller sentezleyebilmişlerdir [127]. Sentezledikleri AgNP'lerin ve AuNP'lerin ortalama kristal boyutunun, sırasıyla 5 nm ve 10 nm olduğunu bulmuşlardır [127]. Ancak bu çalışmalarında sadece nanopartikül karakterizasyonu yapılmıştır.

Devanesan ve ark. nar kabuğu ekstresinden ortalama 26,95 nm'lik bir partikül boyutuna sahip olan AgNP sentezlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada AgNP'lerin çeşitli gram-negatif ve gram-pozitif bakteriler üzerinde iyi antimikrobiyal etkiler sergilediği bulunmuştur [128]. Ayrıca, kolon kanseri hücre hattına karşı sentezlenen AgNP'ler test edilmiştir. AgNP'lerin kolon kanseri tedavisinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Esawya ve ark. aynı şekilde nar kabuğu ekstraktından bitkisel sentezle AgNP elde etmişlerdir. [129]. Sentezledikleri AgNP ve nar kabuğu ekstraktlarıyla oluşturdukları 4 farklı ağız gargarasının *Streptococcus mutans* ve dental plaktan izole edilen *Lysinibacillus cresolivorans*, *Lysinibacillus cresolivorans* ve *Lysinibacillus boronitolerans*'a karşı antimikrobiyal etkilerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda, AgNP' den hazırlanan ağız gargaraları BJ-1 hücre hattına karşı % 35 ve

23.66' ya eşit sitotoksistede azalmaya yol açmıştır [129]. Son olarak, oluşturulan iki gargarada da güçlü anti-plak etkisi ve anti-hemorajik etkisini gözlemlemişlerdir [129].

Tüm bu bilgiler değerlendirildiğinde, multifaktöryel, enflamatuar ve enfeksiyöz bir hastalık olan periodontitisin cerrahi ve cerrahi olmayan tedavilerinin hepsinde nanopartiküller antimikrobiyal, antienflamatuar ve diğer olumlu etkileriyle birlikte sürece destek olabilirler.

Bu çalışmanın amacı, bitkisel biyosentez ile nar kabuğundan elde edilen altın ve gümüş nanopartiküllerin periodontal tedavilerde de güvenle kullanılabilmesi için in-vitro koşullarda insan gingival fibroblast (İGF) hücreleri üzerindeki proliferasyon, sitotoksiste ve hücre migrasyonu etkilerinin değerlendirilmesidir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan altın ve gümüş nanopartiküllerin sentezi Gebze Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü Biyokimya Laboratuvarında, hücre kültürü deneyleri ise Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1. Nar Kabuğu Ekstraktının Eldesi

Öncelikle temin edilen nar meyvesinde taneler ayrılarak kabuklar önce çeşme suyu daha sonra ise distile su ile yıkandı. Daha sonra küçük parçalara ayrılan nar kabukları karanlık bir ortamda oda sıcaklığında yaklaşık bir hafta kurutulmaya bırakıldı. Kurutulan nar kabukları kullanılacakları zamana kadar -20°C'da muhafaza edildi. Kurutulmuş kabuklar elektrikli öğütücü ile küçültülerek un haline getirildi ve fenolik bileşen eldesi için kaynatma yöntemi kullanıldı. Çözücü olarak %80 metanol-su kullanıldı. 400 ml metanol ile 100 ml ultra saf su karıştırılarak 500 ml %80 metanol-su hazırlandı. Kurutulmuş nar kabuğu tozundan 50 g tartıldı ve 500 ml %80 metanol-su tozun üzerine ilave edildi. Elde edilen karışım 80°C'de 300 rpm'de 40 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

Ekstraksiyon sonrası karışım adi süzgeç kağıdı ile süzüldü. Elde edilen ekstraktan döner buharlaştırıcı cihazı (Heidolph, Schwabach, Almanya) ile organik çözücü olan metanolün uzaklaştırılması sağlandı.

3.2. Nar Ekstraktından Nanopartikül Eldesi

3.2.1. Nar Ekstraktından Gümüş Nanopartikül Eldesi

Nar kabuğu ekstraktları ile gümüş nanopartiküllerin biyosentezinde, gümüş nitrat (AgNO_3) sulu çözeltisinin bitki özütü ile etkileşimi sonucu gümüş iyonları indirgenerek gümüş nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirildi. Nar kabuğu ekstraktı, hem indirgeyici hem de oluşan partiküllerin çözünmesine karşı stabilize etme görevi görür [130].

Eppendorf tüplerde; AgNO_3 (10 mM) ve farklı oranlarda nar kabuğu ekstraktı kullanılarak gümüş nanopartikül sentezi için optimum şartlar belirlendi (Tablo 3.1). Optimum koşullardaki AgNO_3 /nar ekstraktı 40°C 'de 30 dakika inkübe edildi.

Tablo 3.1. Gümüş nanopartikül sentezinde kullanılan AgNO_3 /nar kabuğu ekstraktı oranı

AgNO_3 miktarı (μL)	Nar kabuğu ekstraktı miktarı (μL)
970	30
950	50
930	70

Elde edilen AgNP'ler 30 dakika boyunca 13,000 rpm'de 4°C 'de santrifüje edildi (Fotoğraf 3.2). Daha sonra ortamda reaksiyona girmeden kalan AgNO_3 ve nar kabuğu ekstraktı iki kez ultradeiyonize su ile yıkanmış ve gümüş nanopartikül elde edildi.

Fotoğraf 3.1. Nar kabuğu ekstraktından sentezlenen altın ve gümüş nanopartikül



3.2.2. Nar Ekstraktından Altın Nanopartikül Eldesi

Nar kabuğu ekstraktları ile altın nanopartiküllerin biyosentezinde kloroaurik asit (HAuCl_4) suluçözeltisi bitki özütü ile etkileşerek altın iyonların indirgenmesi sonucu altın nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirildi.

Eppendorf tüplere alınan HAuCl_4 (%0.1) ve farklı oranlarda nar kabuğu ekstraktları kullanılarak optimum şartlar belirlendi (Tablo 3.2). Optimum koşullardaki HAuCl_4 /nar ekstraktı oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi . Sentez sonrasında elde edilen AuNP'ler 30 dakika boyunca 13,000 rpm'de 4°C'de santrifüje edildi (Fotoğraf 3.2.). Daha sonra ortamda reaksiyona girmeden kalan HAuCl_4 ve nar kabuğu ekstraktı iki kez ultradeiyonize su ile yıkanmış ve altın nanopartikül elde edildi.

Tablo 3.2. Altın nanopartikül sentezinde kullanılan HAuCl_4 /nar kabuğu ekstraktı oranı

HAuCl_4 miktarı (μL)	Nar kabuğu ekstraktı miktarı (μL)
995	5
990	10
985	15
980	20

Fotoğraf 3.2. Sentez ve santrifüj sonrası çöken altın ve gümüş nanopartikül



3.3. Sentezlenen Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen altın ve gümüş nanopartiküllerin özelliklerinin belirlenmesi için taramalı elektron mikroskobu (SEM), ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi (UV-Vis) ve fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR) spektral analizleri Gebze Teknik Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü ve Kimya Bölümünde gerçekleştirildi.

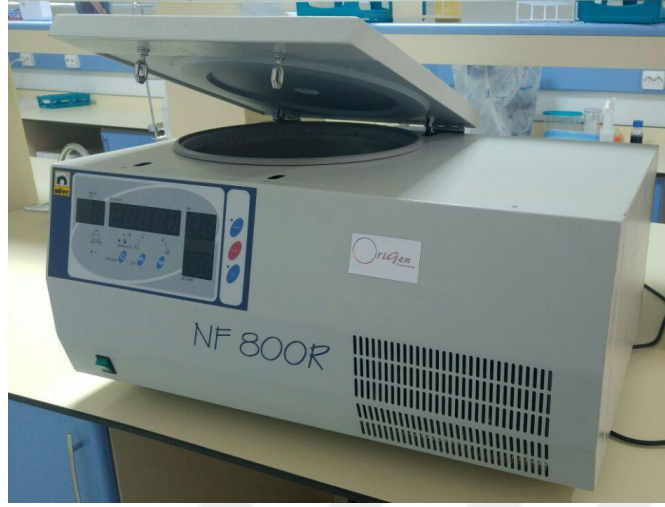
3.4. Hücre Kültürü Çalışması

3.4.1. Hücrelerin Çözülmesi, Pasajlanması, Çoğaltılmaları ve Sayılması

Nanopartiküller kullanılarak in-vitro olarak gerçekleştirilecek hücre kültürü deneylerinde Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hücre ve Doku Kültürü Laboratuvarı'nda stok halde bulunan insan gingival fibroblast (İGF) (ATCC®CRL-2014TM) hücreleri kullanıldı.

-196°C içerisinde saklanan sıvı azot, kriotüpten çıkartılır çıkartılmaz, vakit kaybetmeden 37°C'deki su banyosu içerisinde çözündürüldü. İçeriği çözünen kriotüp biyogüvenlik kabinine alınarak üzerine hazırlanan besi ortamı damla damla eklenerek santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreler 800 rpm (devir/dakika)'de 4°C'de 5 dk soğutmalı santrifüj cihazında çöktürüldü (Fotoğraf 3.3).

Fotoğraf 3.3. Soğutmalı santrifüj cihazı



Santrifüjasyon sonrasında oluşan üst faz (süpernatant) atılarak, pelet üzerine taze besi ortamı eklenerek homojenize edildi. Homojenize edilen hücreler taze hazırlanmış 37°C'ye ısıtılmış, DMEM HG (Dulbecco's modified Eagle's medium, 4,5 g/L glikoz) besi ortamı, %10 (v/v) inaktif fetal sığır serumu (FBS) ve %1 (v/v) L-glutamin içeren besi ortamı ile flasklara geçirilerek 37°C'de, %5 CO₂ içeren %95 nemli ortamda inkübasyona bırakıldı (Fotoğraf 3.4).

Fotoğraf 3.4. Kullanılan inkübatör



Hücrelerin morfolojileri, ters-faz mikroskop (Olympus, Tokyo, Japonya) ile incelenmiş ve hücrelerin besiy ortamı iki günde bir değiştirilerek %70-80 konfluensiye ulaşılması için beklenmiştir (Fotoğraf 3.5).

Fotoğraf 3.5. Kullanılan ters-faz mikroskop



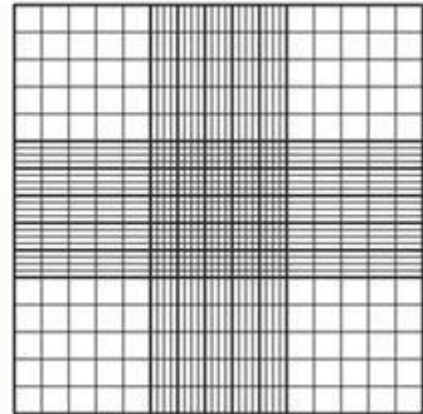
%70-80 konfluensiye ulaşmış flasklardaki hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besiy ortamı uzaklaştırıldıktan sonra 37°C'de ısıtılmış olan, steril Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen fosfat tamponu ile hücrelerin yüzeyi yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine 37°C' de ısıtılmış tripsin-EDTA (2,5 g/L tripsin, 0.5 mM EDTA) çözeltisi eklenerek 37°C' de 5 dk bekletilip, hücrelerin yüzeyden ve birbirlerinden ayrılması sağlandı (Fotoğraf 3.6).

Fotoğraf 3.6. Kullanılan EDTA solüsyonu



Çalışmamızda kullanılan hücrelerin canlılığı ve sayımı, tripan mavisi boya yöntemi ile Neubauer Lamı kullanılarak belirlendi (Fotoğraf 3.7). Bu yöntemde; hücre süspansiyonu %0.4'lük 45 tripan mavisi (Sigma Aldrich, Missouri, ABD) ile 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra, Thoma Lamı üzerine yüklenerek ışık mikroskobu altında hücre sayımı yapıldı.

Fotoğraf 3.7. Neubauer lamı



Ölü hücreler, hücre membranlarını kaybettikleri için boyayı içine alarak mavi renkte, canlı hücreler ise boya almadığı için parlak sarı renkte izlendi. Sayım alanındaki tüm bölmeler sayılarak, hücre konsantrasyonu (hücre/ml) olarak aşağıdaki gibi formüle edildi:

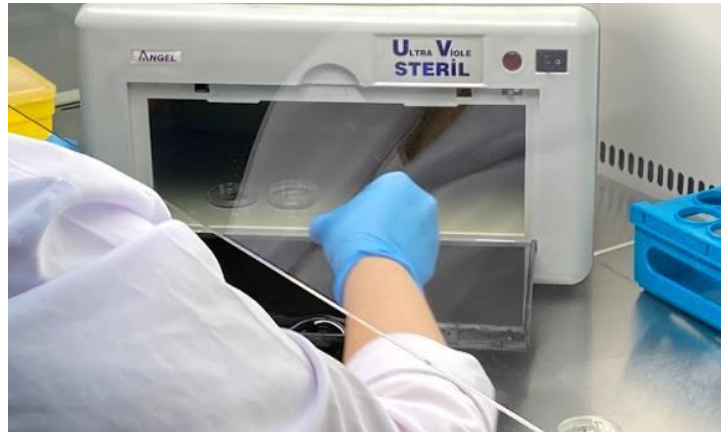
$$A \text{ (Sayım alanında sayılan hücre sayısı) } \times SF \text{ (Sulandırma faktörü) } \times 10^4$$

Ayrılan hücrelerin üzerine serum içeren besi ortamı ilave edilerek süspansiyon homojenize edilmiş ve tüpler, 800 rpm'de 4°C'de 5 dk. santrifüjlendi. Santrifügasyon sonrasında üst faz (süpernatant) atıldıktan sonra, pellet üzerine taze besi ortamı eklenerek homojenizasyon sağlanmıştır. Hücre süspansiyonundan, her kuyucuğa 5×10^4 hücre/ml konsantrasyonda olacak şekilde altı tekrarlı (n=6) olarak 96 gözlü kültür kaplara çoğaltılmak üzere ekilmiştir. Hücreler %5 CO₂ içeren 37°C'deki nemli inkübatörde 24 saat boyunca inkübe edildi.

3.4.2. MTT Testinin (3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Uygulanması

Kültüve edilen hücreler inkübatörde iken, ultraviyole ile altın ve gümüş nanopartikülleri 4 saat boyunca steril edildi. Sterilizasyonu sağlanmış nanopartiküllerin ultraviyole cihazının içinden steril kabin içerisinde açıldı (Fotoğraf 3.8).

Fotoğraf 3.8. Steril nanopartiküllerin kabin içindeki görüntüsü



Altın ve gümüş nanopartiküller için en yüksek konsantrasyon sırasıyla %13.06 ve %5.23 olacak şekilde 4,5 g/L Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM HG) glikoz besi ortamında süspansiyon halinde çözündürüldü. 96 gözlü kültür kaplarında nanopartikül ve DMEM HG süspansiyonu 7 dilüsyonla uygulandı. Negatif kontrol olarak bırakılan 12 kuyucuğa ise sadece tam besi ortamı koyuldu (Fotoğraf 3.9). 24 saat 37°C'de, %5 CO₂ içeren %95 nemli ortamda inkübasyondan sonra pleytteki kullanılmış besi ortamı boşaltıldı ve hücrelerin üzerine %10 MTT (5 mg/mL konsantrasyonda, PBS içerisinde hazırlanmış) içeren besi ortamı eklendi.

Fotoğraf 3.9. Nanopartikül ve DMEM HG eklenmiş 96 gözlü kültür kapları



Mikroplaklar yine aynı inkübatörde üç saat daha inkübe edildi (Fotoğraf 3.10). Formazan kristalleri, 100 uL dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak çözündürüldü ve plakalar, ELISA plaka okuyucusu kullanılarak 570 nm'de okundu.

Fotoğraf 3.10. MTT çözeltisi eklenmiş 96 gözlü kültür kapları



Nanopartikül ile muamele edilen kuyucuklarda ölçülen optik dansite (OD) değerleri, negatif kontrol olarak hazırlanan kuyucukların OD değerleriyle karşılaştırıldı ve nanopartiküllerin her dilüsyonu için canlılık değerleri (%) aşağıdaki gibi formüle edildi:

$$\% \text{ Canlılık} = \text{OD (Örnek)} / \text{OD (Kontrol)} \times 100$$

Her test materyalinin her bir dilüsyonu için üç kuyucuk kullanıldı ve deneyler iki kez tekrarlandı. Elde edilen verilerin ortalamaları hesaplanarak analizler tamamlandı.

3.4.3. In-Vitro Yara Modeli

İnsan gingival fibroblast hücrelerinin migrasyon/invazyon kapasitesinin belirlenmesi için in vitro yara iyileşmesi modeli testi yapıldı. İGF hücreleri 6 gözlü kültür plakalarına ekilerek ve hücrelerin %80-90 konfluensiye gelmesi beklendi. 6 gözlü kültür plakalarında yeterli konfluensiye gelen hücreler üzerine steril P200 pipet ucu ile bir 'çizik' oluşturuldu (Fotoğraf 3.11). 0. gün inverted mikroskop altında 4x ve 10x büyütmede fotoğraflandı (Fotoğraf 3.12). Besi ortamı ve MTT analizinde kullanılan en düşük iki konsantrasyondaki altın ve gümüş nanopartikül

konsantrasyonları ile hücreler, in-vitro çizik tahlili için 37°C, %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol ise sadece besi ortamı ile 37°C, %5 CO₂ içeren nemli ortamda inkübe edildi.

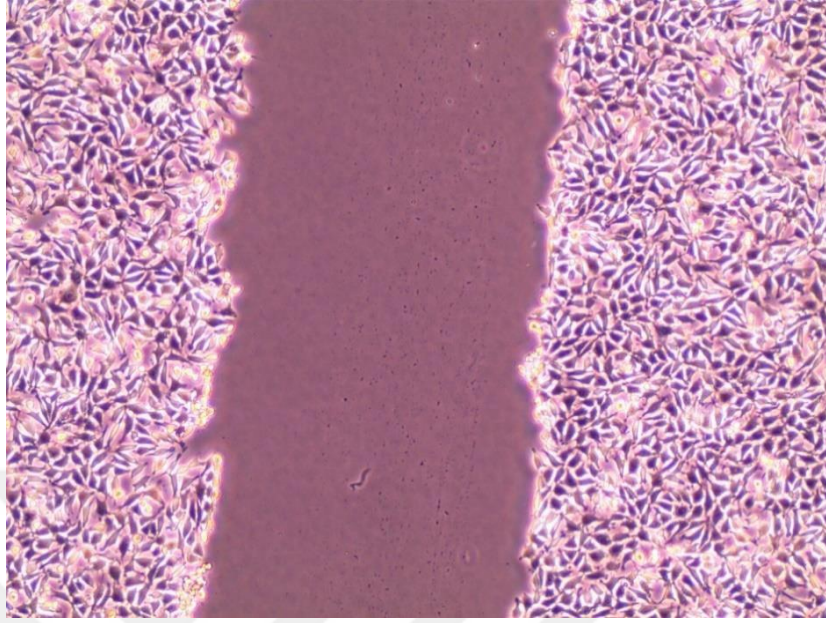
Fotoğraf 3.11. Çizik oluşturma esnasında 6 gözlü kültür kapları



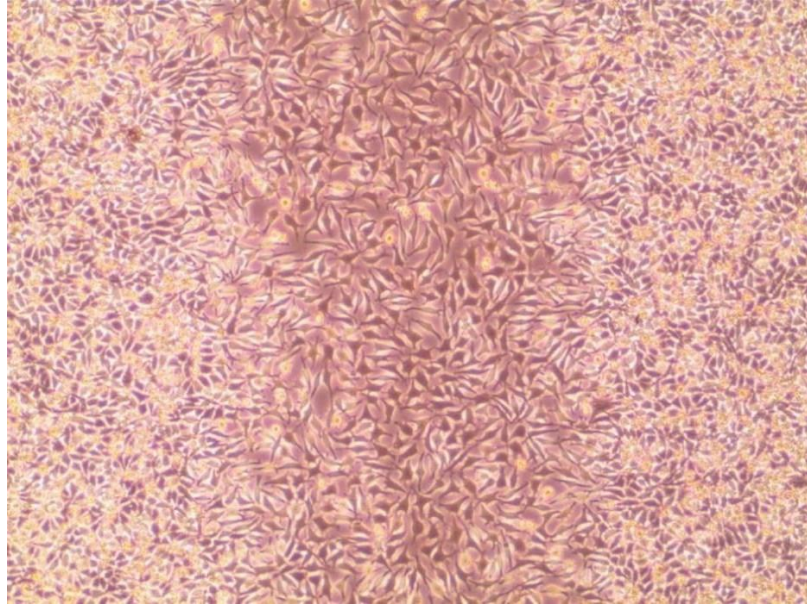
Hücreler ilgili bileşenlerle 48 saat kültüre edildi ve her 24 saatte bir inverted mikroskop altında 4x büyütmede fotoğraflandı (Fotoğraf 3.13 ve Fotoğraf 3.14). 48 saat sonunda görüntüler, mikroskop yazılımı (Olympus, Tokyo, Japan) aracılığıyla analiz edildi. Kapanmayan yara alanları alansal olarak ImageJ software 1.49 (Public Domain, BSD-2) ile hesaplandı. Elde edilen veriler negatif kontrolle oranlanarak % yara iyileşme oranları tespit edildi.

$$\% \text{ Yara İyileşme Oranı} = \frac{\text{Kapanmayan Yara Alanı (Örnek)}}{\text{Kapanmayan Yara Alanı (Kontrol)}} \times 100$$

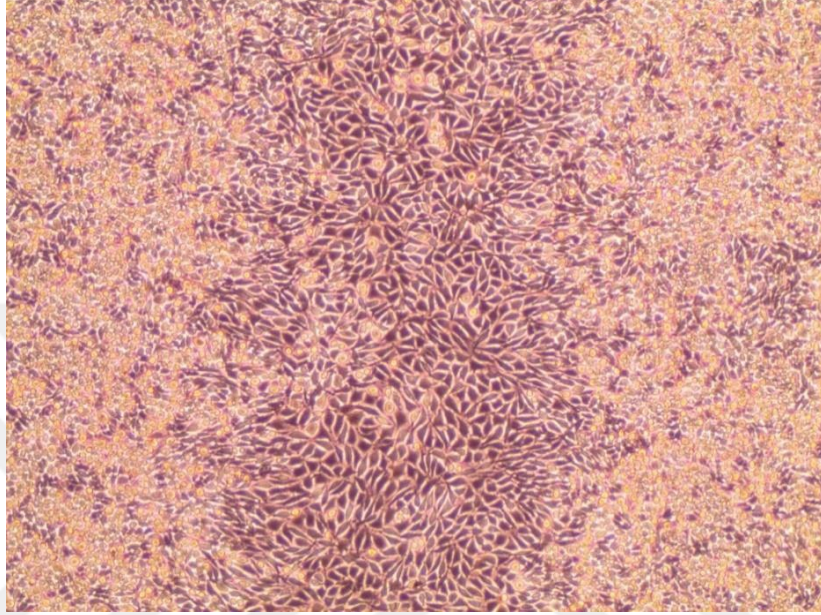
Fotoğraf 3.12. Oluşturulan yara modelinin 0.saat inverted mikroskop görüntüsü



Fotoğraf 3.13. Oluşturulan yara modelinin 24.saat inverted mikroskop görüntüsü



Fotoğraf 3.14. Oluşturulan yara modelinin 48.saat inverted mikroskop görüntüsü



3.5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel karşılaştırmaları SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotlarla (ortalama, standart sapma) birlikte niceliksel verilerin karşılaştırılmasında Tek yönlü varyans analiz testi (ANOVA) kullanıldı. İstatistiksel olarak fark bulunan gruplara ise Bonferroni Post Hoc düzenlemesi uygulandı. Tüm değerlerin istatistiksel analizlerinde ve $p < 0,05$ 'in altındaki farklılıklar anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Gümüş Nanopartikülünün Karakterizasyonu

4.1.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis) analizi

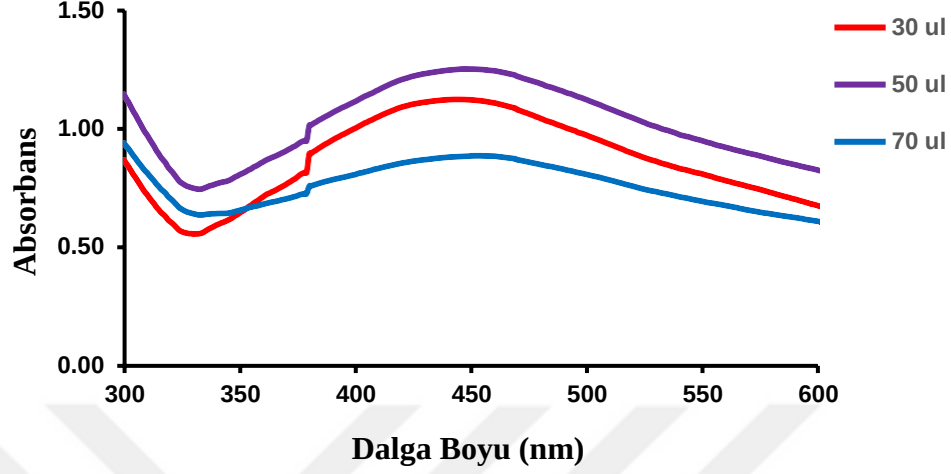
Gümüş nanopartiküllerinin sahip oldukları serbest elektronların yüzey plazmon rezonansına (SPR) ait dalga boyları 400 ile 470 nm dalga boyu aralığında maksimum pikler vermektedir [131]. Farklı tepkime koşullarında oluşan nanopartiküllerin UV-Vis spektral analizleri, Gebze Teknik Üniversitesi bünyesindeki UV-VIS-NIR Spektrofotometre (Shimadzu, Kyoto, Japonya) cihazı ile yapıldı ve görünür bölgede keskin pikler elde edildi. Gümüş nanopartikül sentezinin gerçekleştiği, örneklerin açık kahverenginden koyu kahverengiye dönmesi ve 400 ile 470 nm dalga boyu aralığında maksimum pikler verdiği UV-Vis spektrumları ile belirlendi (Şekil 4.1).

Konsantrasyona bağlı olarak 444 ile 453 nm arasında absorpsiyon gözlemlenmiştir. Nar ekstraktı, 30 µL konsantrasyonda kullanıldığında absorbans grafiği sonuçlarınca sentez için en uygun konsantrasyon olarak belirlendi. Tüm gümüş nanopartiküller, AgNO₃ (10 mM) ve 30 µL nar kabuğu ekstraktı kullanılarak elde edilmiş ve diğer karakterizasyon işlemleri bu sentez sonucu oluşan gümüş nanopartiküllerle yapıldı. Ayrıca, 380 nm'de gözlemlenen absorpsiyon bandı, nar kabuğundan elde edilen ekstraktta bulunan organik maddelerin n-π* geçişinden kaynaklanır. Nar kabuğu ekstresinde bulunan polifenoller, AgNO₃'ün indirgenmesinde güçlü bir indirgeme maddesi olarak işlev görmüştür.

Tablo 4.1. Farklı konsantrasyonlarda nar ekstraktından sentezlenen gümüş nanopartiküllerin dalga boyları

Nar ekstraktı miktarı (µL)	Dalga boyu (nm)	A _{max}
30	444	1.13
50	449	1.25
70	453	0.89

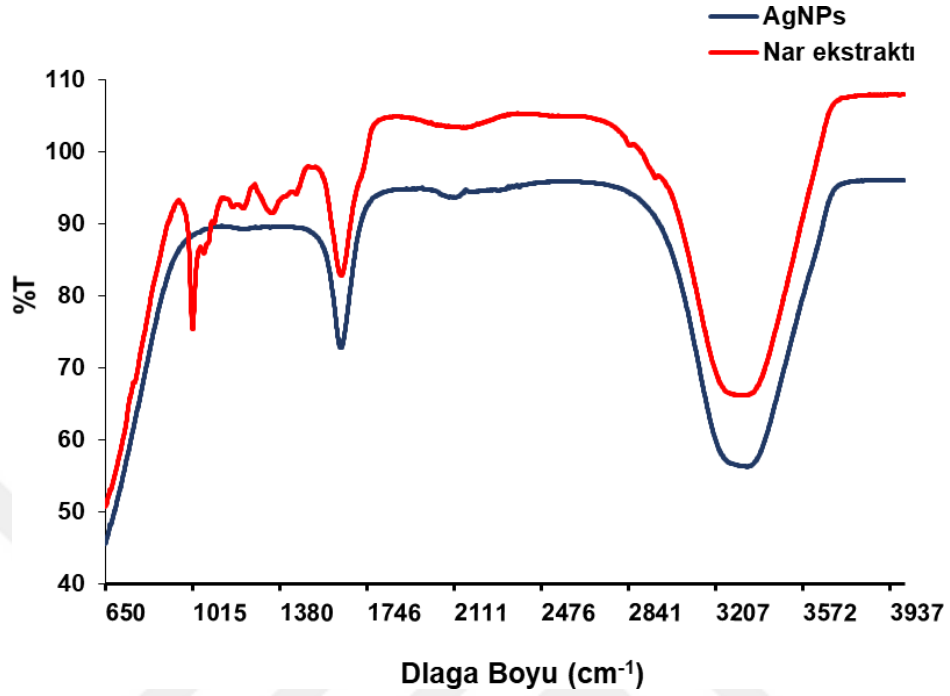
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda nar ekstraktları ile sentezlenen AgNP UV spektrumları



4.1.2. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR) analizi

Gümüş nanopartikül sentezinin hangi bağlar üzerinden yürüdüğünü belirleyebilmek için elde edilen nar kabuğu ekstraktı AgNO_3 çözeltisi ile etkileştirilmeden önce ve sonra (nar kabuk ekstraktı + AgNPs) FT-IR (PerkinElmer, Inc., Massachusetts, ABD) ile analizleri yapıldı. FTIR sonuçlarına göre absorbanstaki kaymalar bağ değişikliğinin göstergeleridir. 3500-3000 aralığında yapılan okumalarda nanopartikülde absorbanstaki azalması O-H bağlarının ayrıldığına işaret etmekte ve oluşan C-O bağları 1250-1000 arasındaki absorbanstaki değişikliğini açıklamaktadır (Şekil 4.2).

Şekil 4.2. Nar ekstraktı ile sentezlenen AgNP FTIR spektrumu

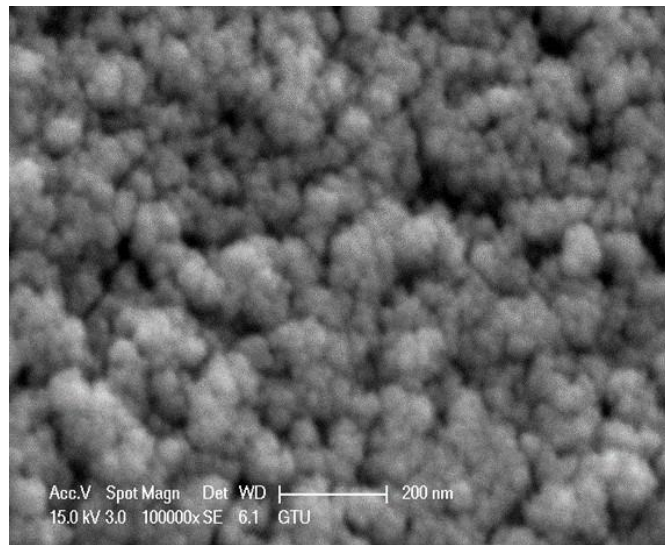
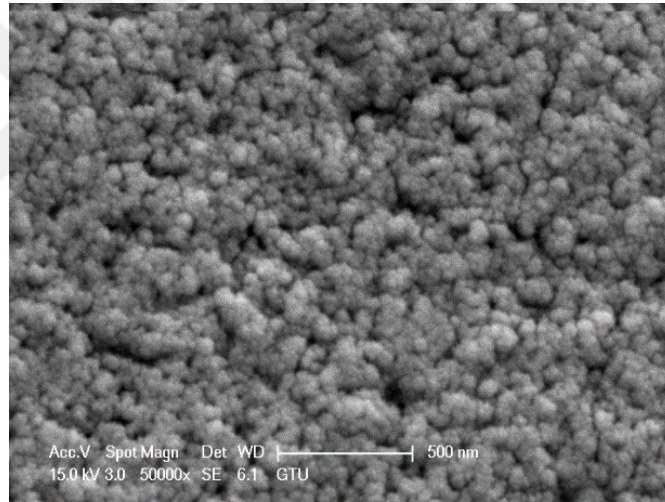
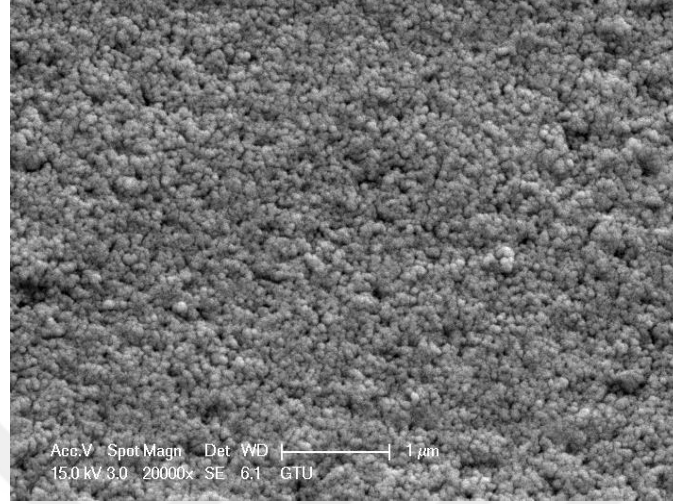


4.1.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri

Gebze Teknik Üniversitesi Malzeme Mühendisliği Bölümü SEM (Philips, Amsterdam, Hollanda) cihazı ile nar kabuğu ekstraktı/AgNP'lerin boyut ve içerdiği elementel analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen nanopartiküllerin yüzey morfolojileri SEM analizleri ile belirlendi.

Elde edilen verler, sentezlenen nanopartiküllerin monodispers, küresel şekilli ve yaklaşık ~60 nm çaplarında olduğu tespit edildi (Şekil 4.3).

Şekil 4.3. Nar ekstraktları ile sentezlenen AgNP ler farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri



4.2. Altın Nanopartikülünün Karakterizasyonu

4.2.1. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis) analizi

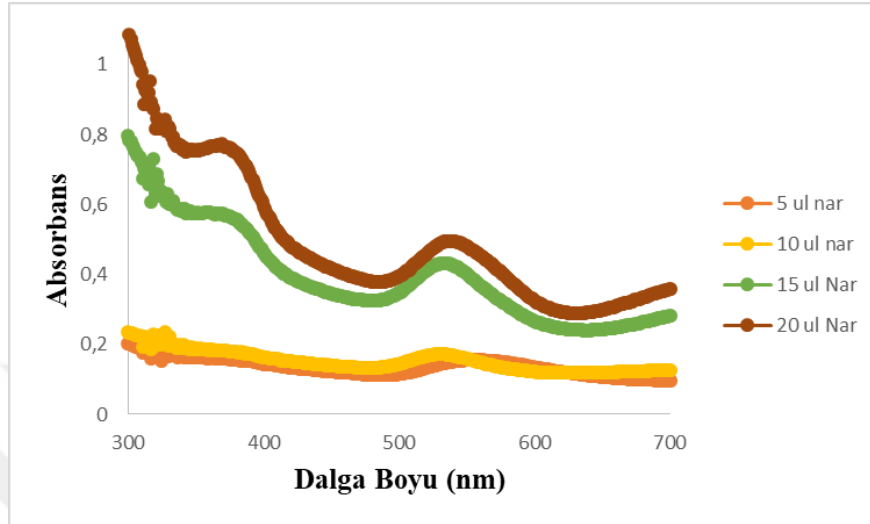
Altın nanotaneceklerin sahip oldukları serbest elektronların yüzey plazmon rezonansına (SPR) ait dalga boyları sayesinde genellikle 500 ve 550 nm arasındaki piklerin varlığı ile tespit edilir [132, 133]. Çeşitli tepkimeler sonucu oluşan nanopartiküllerin UV-Vis spektral analizleri UV-Vis-NIR Spektrofotometre (Shimadzu, Kyoto, Japonya) cihazı ile yapıldı ve görünür bölgede keskin pikler elde edildi.

Altın nanopartiküllerinin oluşumu örneklerin renginin sarıdan şarap kırmızı rengine dönmesi ve UV-Vis spektroskopisi kullanılarak 530 ile 560 nm dalga boyu aralığında maksimum pikler verdiğinin izlenmesi ile belirlendi (Şekil 4.4). Nar ekstraktı, 15 µL konsantrasyonda kullanıldığında absorbans grafiği sonuçlarınca sentez için en uygun konsantrasyon olarak belirlendi (Tablo 4.2). Tüm altın nanopartiküller, AuCl₄ (%0.1) ve 15 µL nar kabuğu ekstraktı kullanılarak elde edilmiş ve diğer karakterizasyon işlemleri bu sentez sonucu oluşan altın nanopartiküllerle yapıldı. Ayrıca, 380 nm'de gözlemlenen absorpsiyon bandı, nar kabuğundan elde edilen ekstraktında bulunan organik maddelerin n-π* geçişinden kaynaklanmaktadır. Nar meyvesi ekstresinde bulunan polifenoller, AuCl₄⁻'nin indirgenmesinde güçlü bir indirgeme maddesi olarak işlev görmüştür.

Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda nar ekstraktları ile sentezlenen AuNP UV spektrumları

Dalga boyu (nm)	A _{max}	A ₆₅₀ / A ₅₃₀	Nar kabuğu ekstraktı miktarı (µl)
556	0,155	0,74	5
531	0,172	0,7	10
534	0,432	0,56	15
538	0,496	0,61	20

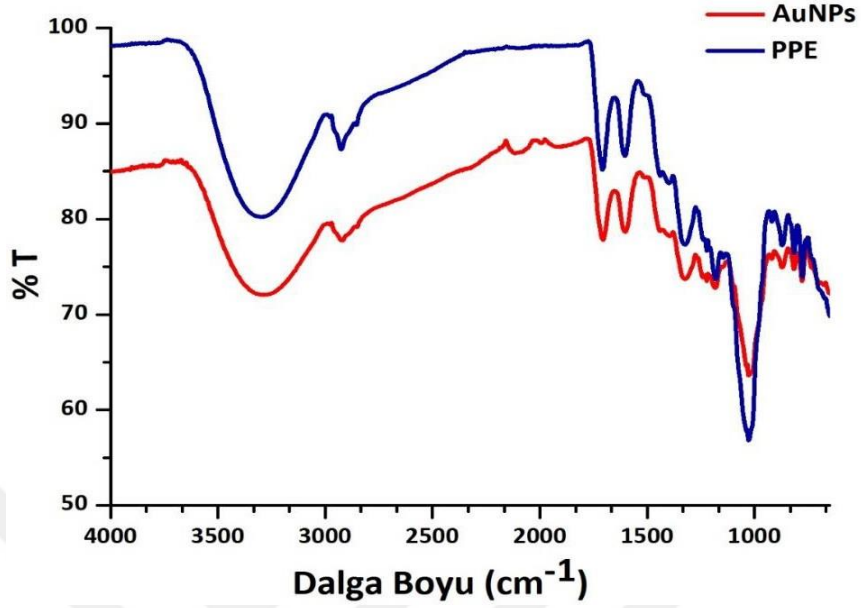
Tablo 4.2. Nar ekstraktının farklı konsantrasyonlarıyla elde edilen altın nanopartiküllerin dalga boyları



4.2.2. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR) analizi

Altın nanopartikül sentezinin hangi bağlar üzerinden yürüdüğünü belirleyebilmek için elde edilen nar kabuğu ekstraktı AuCl_4 çözeltisi ile etkileştirilmeden önce ve sonra (nar kabuk ekstraktı + AuNPs) FT-IR (PerkinElmer, Inc., Massachusetts, ABD) ile analizleri yapıldı. FTIR spektroskopisi ile, yüzey kimyasının araştırılması ve nanopartikül sentezi sırasında yüzeye ilave olan karbonil ve hidroksil grupları gibi fonksiyonel grupları tanımlamak için kullanılmıştır (Şekil 4.5).

Şekil 4.5. Nar ekstraktı ile sentezlenen AuNP FTIR spektrumu

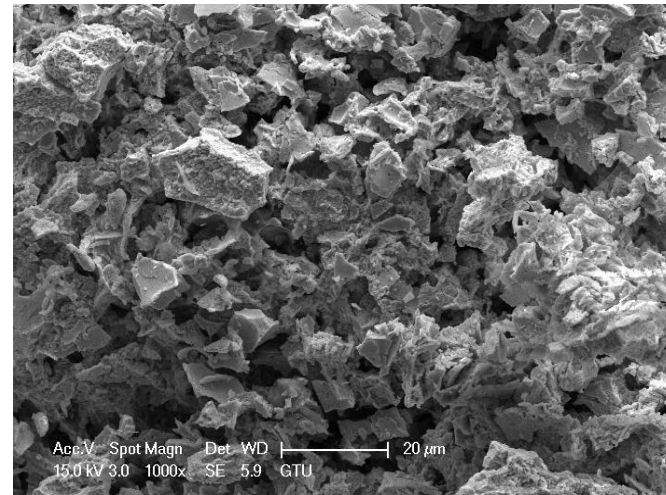
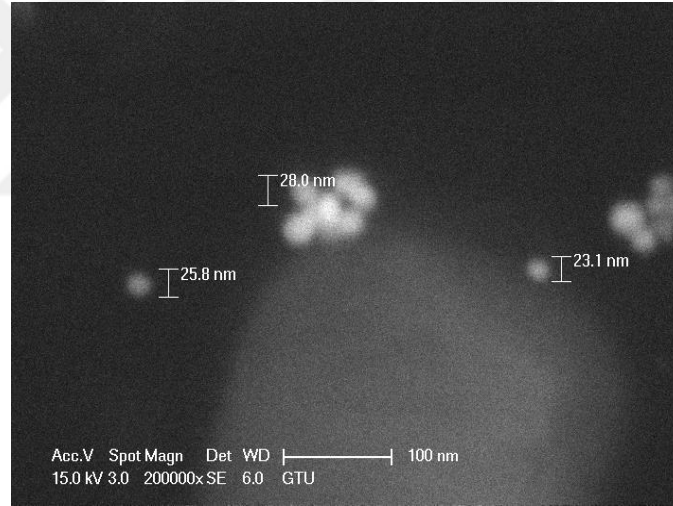
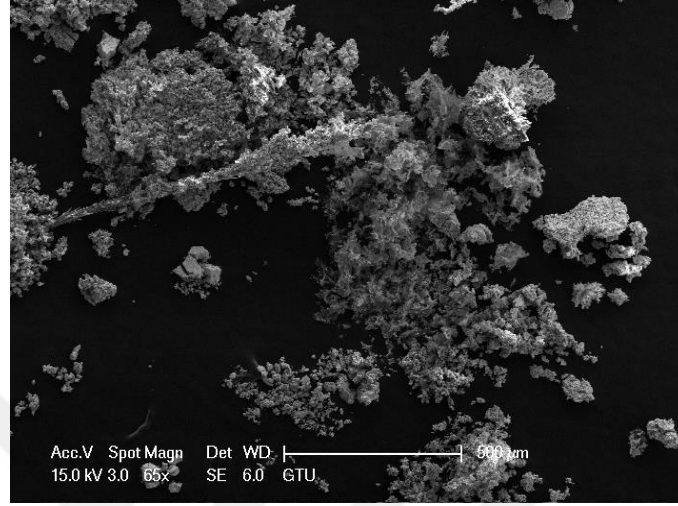


4.2.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri

Gebze Teknik Üniversitesi Malzeme Mühendisliği Bölümünde SEM cihazı (Philips, Amsterdam, Hollanda) ile nar kabuğu ekstraktı/AuNP'lerin boyut ve içerdiği elementel analizleri gerçekleştirildi ve elde edilen nanopartiküllerin yüzey morfolojileri belirlendi.

Sentezlenen nanopartiküllerin monodispers, küresel şekilli ve yaklaşık ~25 nm çaplarında nanopartiküller olarak oluştuğunu gösterildi(Şekil 4.6).

Şekil 4.6. Nar ekstraktları ile sentezlenen AgNP ler farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri



4.3. Altın ve Gümüş Nanopartiküllerin Doza ve Zamana Bağlı Olarak Sitotoksikite Sonuçları

Çalışmamızda altın ve gümüş nanopartikül ile muamele edilen insan gingival fibroblast hücrelerinde doza ve süreye bağlı oluşan sitotoksik etkinin değerlendirilmesi için MTT analizi yapıldı.

İlk 24 saatte elde edilen sonuçlara göre, gümüş nanopartiküllerin hücre kültürü ile etkileşiminde %80 ve üzeri hücre canlılığı saptandı (Tablo 4.3). Benzer şekilde, altın nanopartiküller ile muamele edilen kültürlerde %95 ve üzeri hücre canlılığı gözlemlendi (Tablo 4.4). Benzer konsantrasyonlarda altın ve gümüş nanopartiküller ilk 24 saatteki performansları karşılaştırıldığında, altın nanopartiküller ile istatistiksel olarak anlamlı ve daha yüksek hücre canlılığı elde edildi ($p<0,05$).

Altın ve gümüş nanopartiküllerle muamele edilen insan gingival fibroblast hücrelerinde zamana bağlı hücre canlılığında istatistiksel anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p<0,05$). 48. saat sonundaki veriler değerlendirildiğinde de tüm konsantrasyonlardaki nanopartiküller insan gingival fibroblastları ile muamele edildiğinde herhangi bir sitotoksik etki göstermemiştir (Tablo 4.3 ve Tablo 4.4)

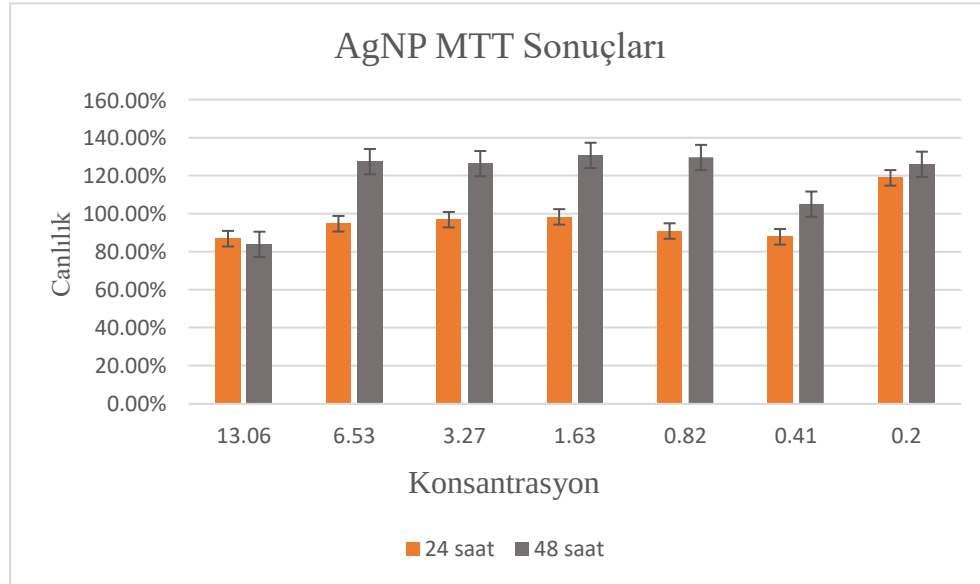
Tablo 4.3: Farklı konsantrasyonlardaki AgNP'nin MTT analiz sonuçları

Konsantrasyon	24 Saat	48 Saat
13,06	86,83±0,00 ^a	83,87±0,00 ^a
6,53	94,74±0,00 ^b	127,4±0,00 ^b
3,27	96,85±0,00 ^c	126,36±0,00 ^c
1,63	98,33±0,00 ^d	130,67±0,00 ^d
0,82	90,89±0,00 ^e	129,58±0,00 ^e
0,41	87,84±0,00 ^f	105,06±0,00 ^f
0,2	118,84±0,00 ^g	126,02±0,00 ^g
<i>p</i>	0.000	0.000

p: Tek yönlü varyans analiz testi (ANOVA)

a,b,c,d,e,f,g: simgeleri gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

Şekil 4.7. Farklı konsantrasyonlardaki AgNP'nin MTT analiz sonuçları



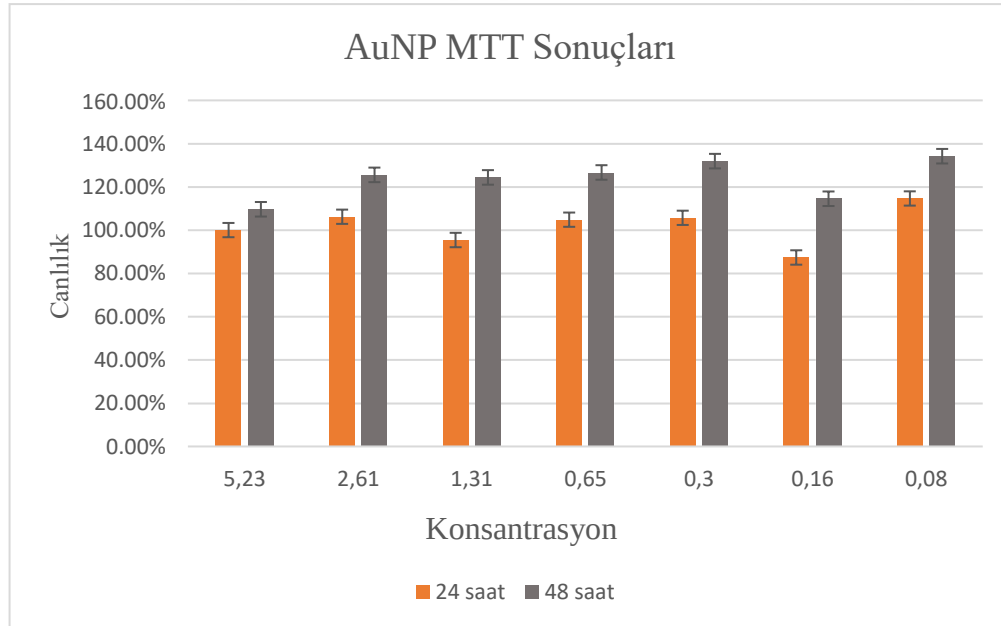
Tablo 4.4: Farklı konsantrasyonlardaki AuNP'nin MTT analiz sonuçları

Konsantrasyon	24 Saat	48 Saat
5,23	100,01±0,00 ^a	109,62±0,00 ^a
2,61	106,18±0,00 ^b	125,56±0,00 ^b
1,31	95,43±0,00 ^c	124,36±0,00 ^c
0,65	104,83±0,00 ^d	126,67±0,00 ^d
0,3	105,68±0,00 ^e	131,94±0,00 ^e
0,16	97,36±0,00 ^f	114,56±0,00 ^f
0,08	114,65±0,00 ^g	134,23±0,00 ^g
<i>p</i>	0.000	0.000

p: Tek yönlü varyans analiz testi (ANOVA)

a,b,c,d,e,f,g: simgeleri gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlardaki AgNP'nin MTT analiz sonuçları



4.4. Altın ve Gümüş Nanopartiküllerin Doza ve Zamana Bağlı Olarak Yara İyileşmesi Modeli Sonuçları

Çalışmamızda yüksek ve düşük konsantrasyon olarak adlandırılan iki farklı konsantrasyonda altın ve gümüş nanopartiküller ile muamele edilen insan gingival fibroblast hücresi üzerinde oluşturulan yara modelindeki iyileşme zamana ve doza bağlı olarak incelendi.

İlk 24 saat sonuçlarına göre negatif kontrol grubuna kıyasla tüm konsantrasyonlarda hem altın hem de gümüş nanopartikül ile muamele edilen yara modelinde iyileşmeden kalan yara alanı yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($p<0.05$) (Tablo 4.5). Aynı zamanda iki nanopartikülde kendi içinde yüksek konsantrasyonlarında yara modeli üzerinde istatistiksel olarak daha başarılı bulundu ($p<0.05$) (Tablo 4.5).

24 saatlik sonuçlar birbirleri ile karşılaştırıldığında gümüş nanopartikül eklenen İGF yara modelinde hem yüksek hem de düşük konsantrasyonda altın nanopartikül eklenen İGF yara modeline göre istatistiksel olarak daha başarılı yara kapanması elde edildi ($p<0.05$) (Tablo 4.5).

Yara iyileşme modelinde verilen yüzdelere oluşturulan yaranın kapanmadan kalan kısmının oranıdır. 48. saatte alınan sonuçlarda tüm yara modelleri %100 kapandığı için değerlendirmeye alınmadı.

Tablo 4.5: 24. saat farklı konsantrasyondaki nanopartiküllerin yara iyileşme sonuçları

	<i>N K</i>	<i>AgNP</i>	<i>AuNP</i>	<i>p^β</i>
Düşük Konsantrasyon	5,08±0,00	3,93±0,00 ^{a,c}	4,05±0,00 ^{a,b}	0.000
Yüksek Konsantrasyon	5,16±0,00	1,30±0,00 ^{a,c}	2,06±0,00 ^{a,b}	0.000
<i>p^α</i>	0.000	0.000	0.000	

p^α; Tek yönlü varyans analiz testi (ANOVA)

p^β; Tek yönlü varyans analiz testi (ANOVA)

^{a,b,c}; simgeleri gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Çalışmamız, nar kabuğundan biyosentez ile elde edilen iki farklı nanopartikülün in vitro koşullarda insan gingival fibroblast hücrelerine karşı hem sitotoksiste hem de yara iyileşmesinde etkisini değerlendiren ilk çalışmadır. Primer hücre kültürü çalışmamız sonucunda altın ve gümüş nanopartiküllerinin sitotoksitelerinin düşük olduğu, hücre migrasyonu ve proliferasyonunu da arttırdığı bulunmuştur.

Bu çalışma sonucunda, altın ve gümüş nanopartiküller yara iyileşmesi süresince kontrol grubuna göre daha başarılı bulunmuştur. Yara iyileşmesi sonuçlarına göre en başarılı uygulama yüksek konsantrasyonda kullanılan gümüş nanopartikülünde elde edilmiştir. Ayrıca, sitotoksiste açısından benzer konsantrasyondaki altın nanopartiküller gümüş nanopartiküllere kıyasla daha iyi sonuçlar vermiştir. Tüm sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Periodontal hastalıkların ilerleyişi, bakterilerin virülansı ve konak immün yanıtı arasındaki dengenin bozulması sonucu gerçekleşir. Periodontal hastalıkların tedavisinde en önemli amaç mikrobiyal dental plağın uzaklaştırılmasıdır. Diş ve kök yüzeylerinin mekanik temizliğinin sağlanmasıyla birlikte hastanın oral hijyen motivasyonunun artırılması periodontal başlangıç tedavisi olarak adlandırılır. Bu tedaviye yanıt alınamayan durumlarda, farklı bakteriyel etiyolojik faktörlere sahip olan ve/veya başarılı bir tedaviye rağmen tekrarlayan periodontal hastalıkların tedavisi için lokal ve/veya sistemik antimikrobiyal ajan uygulamaları gereklidir.

Periodontolojide kemateröpötik ajan olarak antibiyotikler ve antimikrobiyaller çok sık tercih edilmektedir. Sistemik antibiyotik kullanımı tüm vücudu etkiler; aynı zamanda antibiyotik direnci gelişmesi ve normal floranın baskılanması gibi yan etkileri vardır [134]. Lokal antibiyotik uygulamaları, oluşan yan etkileri ortadan kaldırmak için tercih edilmiştir. Ancak lokal olarak kullanılan antibiyotiklerin tüm ağızı etkileyen bir enfeksiyonun tedavisinde yetersiz kaldığı gösterilmiştir [135].

Oral flora dengesinin periodontal hastalık oluşturacak şekilde bozulması sonucu oluşan mikrobiyal yükke başa çıkmak için antiseptikler de tercih edilmektedir. Klorheksidin, periodontolojide en çok kullanılan antiseptiklerin başında gelir. Klorheksidinin antibakteriyel etkinliğini sağlayan olumlu özellikleri aynı zamanda

oral dokular için toksik etkiler de oluşturabilir [136]. Bunun haricinde, klorheksidinin dişlerde renklenme ve mantar süperenfeksiyonu gibi farklı yan etkileri de bulunmaktadır [137]. Antibiyotikler ve antiseptiklerde bulunan bu olumsuz özellikler, farklı kemoterapotik ajan arayışlarını beraberinde getirmiştir.

Diş hekimliğinde metalik nanopartiküller antimikrobiyal etkileri nedeniyle tercih edilmektedir. Özellikle, gümüş ve altın gibi nanopartiküllerin hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere etki ettikleri daha önce de rapor edilmiştir [98]. Ancak bu nanopartiküllerin insan gingival fibroblast hücreleri üzerine sitotoksitelerini değerlendiren çalışma sayısı azdır.

Składanowski ve ark. biyosentez ile elde ettikleri farklı konsantrasyonlarda gümüş nanopartiküllerin L929 fare fibroblastı hücrelerine karşı sitotoksik etkisini MTT analizi ile değerlendirmişlerdir. Gümüş nanopartiküllerin 10 µg/ml'ye kadar herhangi bir sitotoksik etkisi bulunmazken, 100 µg/ml ve 50 µg/ml konsantrasyonlarında fare fibroblastlarına karşı sitotoksik etkiler bulmuşlardır [138].

Suwannakul ve ark. meyan kökünden bitkisel sentezle elde ettikleri gümüş nanopartiküllerin sitotoksik etkisini hem insan gingival fibroblast hem de insan baş ve boyun karsinom hücrelerine karşı gözlemlemişlerdir.[139]. Yaptıkları MTT analizleri sonucunda 10 µg/ml konsantrasyonunda gümüş nanopartiküllerin insan baş ve boyun karsinom hücrelerinin % 80'ini öldürebildiğini aynı zamanda bu konsantrasyonun insan gingival hücrelerine sitotoksik etkisi olmadığını göstermişlerdir. [139]. Bu nedenle oral hastalıkların tedavisinde gümüş nanopartiküllerinin kullanımının yararlı olabileceğini belirtmişlerdir [139]. Bu çalışmada da önceki çalışmalarla tutarlı olarak benzer konsantrasyonlarda bitkisel olarak sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerinin insan gingival fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik etkisi olmadığı bulunmuştur.

Fernandes ve ark. L929 fibroblast hücre hattını kullanarak nanopartiküllerle ilgili sitotoksikite çalışmaları yapmışlardır [130]. Yaptıkları çalışmada, kimyasal yöntemle elde edilen gümüş nanopartiküllerini, nar kabuğu ekstraktından elde edilen gümüş nanopartiküllerini ve nar kabuğu ekstraktını kullanmışlardır. Bitkisel sentezle elde edilen gümüş nanopartikül 50 µg/ml ve daha düşük konsantrasyonlarda L929 fibroblast hücre hattında %80 ve üzeri canlılık gösterirken, kimyasal sentezle elde edilen gümüş nanopartikül 6,25 µg/ml'de bile %20 canlılık göstererek oldukça sitotoksik bulmuşlardır.[130]. Fernandes ve ark. nar bitkisinin antioksidan ve

antienflamatuar etkilerinin bitkisel sentezle elde edilen gümüş nanopartikülleri ile sinerjistik bir etki gösterdiği ve gümüş nanopartiküllerinin insan hücrelerine karşı toksik etkilerini azalttığını düşünmüşlerdir[130]. Bu çalışmada da nar kabuğu ekstraktından gümüş nanopartikül elde edilmiş ve kullanılan en yüksek konsantrasyonda bile insan gingival fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik bir etki gözlenmemiştir.

Jadhav ve ark. bitkisel sentezle elde ettikleri altın nanopartiküllerin karakterizasyonunu yaptıkları çalışmalarında, altın nanopartikülün olası osteoindüktif etkisini ve ortodontik amaçla çekilmiş dişlerden izole ettikleri periodontal fibroblast hücrelerine karşı sitotoksitesini değerlendirmişlerdir [140]. Sitotoksikite deneylerinde kullandıkları altın nanopartikül konsantrasyonlarını 7,25 µg/ml'den başlayarak seri dilüsyon yöntemi ile değiştirmişlerdir [140]. Çalıştıkları tüm konsantrasyonlarda periodontal fibroblastlara karşı herhangi bir sitotoksik etki tespit etmemişlerdir[140]. Bu çalışmada da benzer şekilde altın nanopartiküller seri dilüsyon ile farklı konsantrasyonlarda insan gingival fibroblast hücreleri üzerinde kullanılmıştır ve hiçbir konsantrasyonda sitotoksik etki saptanmamıştır.

Ahmad ve ark. daha önce nar kabuğu ekstraktından bitkisel sentezle gümüş ve altın nanopartikül elde etmişlerdir [127]. Çalışmalarında elde ettikleri nanopartiküllerin sadece karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada, Ahmad ve ark. farklı olarak gümüş ve altın nanopartiküllerin karakterizasyonu ile birlikte İGF hücrelerine karşı sitotoksikite ve yara iyileşme modeli deneyleri de yapılmıştır. Bu çalışmada yapılan MTT analizinin 24 saat sonundaki sonuçlarına göre benzer konsantrasyonlarda gümüş nanopartiküller, altın nanopartiküllere göre daha fazla sitotoksik etki göstermişlerdir. Bunun nedeni iki nanopartikülün etki mekanizmalarının farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Periodontal cerrahilerin ve rejenerasyonun ana konularından olan yara iyileşmesi, çok sayıda hücrenin (epitel hücreleri, fibroblastlar, osteoblastlar, sementoblastlar, periodontal ligament hücreleri) görev aldığı karmaşık bir süreçtir [141]. Yara iyileşmesi aşamalarının en kritik noktalarından biri kollajenin yapım-yıkımının rol oynadığı remodelling evresidir. Bu evrede ana karakter olan kollajen, bilindiği üzere fibroblastlar tarafından sentezlenmektedir ve tüm dokulara bütünlük ve sağlamlık kazandırır. Bununla birlikte tüm yara iyileşmesi süreci sistemik, çevresel ve lokal faktörler tarafından da etkilenmektedir. Oral kavitenin çok sayıda kommensal

bakteriye ev sahibi olması yanı sıra, yara iyileşmesini lokal olarak etkileyen faktörlerin başında enfeksiyonun gelmesi bu süreci zorlaştırmaktadır. Tüm bunlar düşünüldüğünde, oral dokularda yara iyileşmesini destekleyebilmek için kullanılabilecek kemoterapotik ajanlar; hem ana hücre fibroblastlara karşı toksik olmayan hem de antibakteriyel, antienflamatuar şeklinde tercih edilmelidir. Bilindiği üzere gümüş nanopartiküllerin antimikrobiyal, antibakteriyel antienflamatuar etkisi bulunmaktadır. Aynı şekilde, altın nanopartiküllerin de antibakteriyel etkileri bulunmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı nanopartiküller daha önce de yanık yaralarının iyileşmesinde ya da periodontolojide periodontal patlara eklenerek kullanılmıştır [75, 88].

Habiboallah ve ark. tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmada, sol ve sağ mandibular kesici dişlerin bukkal diş etine gingivektomi uygulamışlardır [88]. Gingivektomi sonrası randomize bir şekilde A grubunda (25% v/v) ve B grubunda (%50 v/v) gümüş nanopartikül içeren periodontal pat kullanmışlardır [88]. Bu çalışmanın sonucunda, gümüş nanopartikül eklenmiş periodontal patların lokal uygulamasının, kontrol grubuna kıyasla iyileşme sürecini önemli ölçüde hızlandırdığını göstermişlerdir [88]. Yapılan histolojik incelemelerde, tüm enflamatuar ve onarım parametrelerinin skorlarının kontrol grubunun aleyhine olarak A ve B gruplarında hem 4. hem de 7. günde istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır [88]. Bu çalışmada da insan gingival fibroblastlarında oluşturulan yara modelinde iyileşme ile gerçekleşen kapanma miktarının hem gümüş hem de altın nanopartiküller tarafından desteklendiğini saptandı. Özellikle, İGF hücrelerinde yara iyileşmesini en çok destekleyen, gümüş nanopartikülün yüksek konsantrasyonda kullanıldığı grup olarak bulunmuştur ($p < 0.05$).

Min ve ark. gümüş nanopartikül eklenmiş ipek fibroin süngerimsi yara sargısını tavşanların sırt tarafındaki tam kalınlıktaki deri yaralarının iyileşme sürecini desteklediğini göstermişlerdir [142]. Aynı şekilde, Tian ve ark. gümüş nanopartikül içeren yara patlarının yara iyileştirme yeteneklerini belirlemek için farelerde termal yara modeli üzerine kullanmışlardır [75]. Standart yanık yara tedavisinde kullanılan gümüş sülfadiazine kıyasla gümüş nanopartikül içeren yara patlarının topikal uygulaması yanık yaralarının iyileşmesini hızlandırdığını belirtmişlerdir [75].

Franková ve ark. in-vitro koşullarda gümüş nanopartiküllerinin insan epidermal keratinosit hücrelerine ve dermal fibroblast hücrelerinde çizik testi kullanarak oluşturdıkları yara iyileşme modeli üzerinde etkilerini değerlendirmişlerdir. Gümüş nanopartiküllerinin her iki hücrenin IL-12, TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerinin sentezini azalttığı ve epidermal keratinositlerin MMP üretimini (MMP-3) azalttığını bulmuşlardır [87]. Bu sonuçlarına dayanarak, gümüş nanopartiküllerin yara iyileşme sürecini destekleyebileceğini önermişlerdir.

Sunitha ve ark. fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, bağırsakta defekt oluşturmuşlar ve defektleri normal sütur materyali ve altın nanopartikül kaplanmış sütur materyali ile dikmişlerdir [143]. Bir hafta sonra yapılan histolojik çalışma sonucunda altın nanopartikül ile kaplanmış dikişlerle daha iyi iyileşme ve daha az iltihaplanma gözlemlenmiştir [143]. Cerrahi alan enfeksiyonlarını önlemek için sütur materyalinin nanopartiküllerle geliştirilmesinin uygun olabileceğini önermişlerdir [143]. Tüm bu çalışmaları destekler şekilde bu çalışmada da altın ve gümüş nanopartiküllerin insan gingival fibroblastları üzerinde oluşturulan yara modellerinde iyileşmeyi hızlandırdığı bulunmuştur.

Bilgimiz dahilinde, daha önce literatürde bitkisel sentezle elde edilen altın ve gümüş nanopartiküllerin in-vitro koşullarda İGF hücrelerinde oluşturulan yara modelinde iyileşmeye etkisini inceleyen bir çalışmanın olmayışı, bu çalışmanın özgünlüğünü ve gerekliliğini göstermektedir. Ayrıca, iki farklı nanopartikülü İGF hücreleri üzerinde aynı koşullarda inceleyen çalışma da bulunmamaktadır. Bu durum sonuçlarımızı yorumlamamızı güçleştirmektedir.

Kullanılan konsantrasyonlar, hem nanopartiküllerin μg ölçeğinde tartılmasının zorluğundan hem de literatürde net bir konsantrasyon yorumu tespit edilmediğinden dolayı Jadhav ve ark.'nın çalışmasında olduğu gibi seri dilüsyon şeklinde oluşturulmuştur. [140]. Elde edilen veriler doğrultusunda, nanopartiküller hiçbir konsantrasyonda İGF hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermemişlerdir. Bu sonucun nedeni, literatürde kullanılan yüksek konsantrasyondaki nanopartiküllere nazaran bu çalışmada daha düşük konsantrasyonlar tercih edilmiş olması olabilir. Bu çalışmada düşük konsantrasyonların seçilmesinin sebebi, sitotoksikite deneyinde kullanılan en düşük konsantrasyon değerlerinin yara iyileşme modelindeki etkinliğini incelemektir.

Bu çalışmada elde edilen verilere göre İGF hücrelerine karşı benzer konsantrasyolarda altın nanopartikülleri, gümüş nanopartiküllerine göre daha az sitotoksik bulunmuştur. Daha önceki çalışmalarda, daha küçük boyutlu AgNP'lerin, daha büyük boyutlu AgNP'ye göre sitotoksitesinin yüksek olabileceği bildirilmiştir [144, 145]. Ancak bu çalışmada, altın nanopartiküller daha küçük boyutlu olmalarına rağmen, sitotoksiteleri gümüş nanopartiküller ile karşılaştırıldığında daha düşük bulunmuştur. Bu sonuç göz önüne alındığında sitotoksik etkinin, partikül boyutundan ziyade iki nanopartikülün etki mekanizmalarının farklılığından kaynaklandığı düşünülebilir. Ancak bu konuda başka çalışmalara da ihtiyaç vardır.

Bu çalışma, insan gingival fibroblast hücrelerinde oluşturulan yara iyileşmesi modelinde bitkisel kaynaklı nanopartiküllerin kullanıldığı ilk çalışmadır. Hem sitotoksiste hem de yara iyileşme analizi sonuçları diş hekimliği açısından özellikle de periodontoloji bilimi açısından umut vericidir. Ancak elde edilen sonuçların in-vitro koşullarda laboratuvarda elde edilmesi bu çalışmanın kısıtlılıklarındandır. Daha ileri deneysel hayvan çalışmalarının da yapılarak histolojik açıdan biyosentez ile elde edilen nanopartiküllerin rolünün değerlendirilmesi gerekmektedir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda nar kabuğu ekstraktından bitkisel sentez ile elde edilen gümüş ve altın nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının insan gingival fibroblast hücrelerine karşı etkisi incelendi. Ayrıca, sitotoksisite deney sonuçlarına göre uygun iki farklı konsantrasyon kullanılarak, nanopartiküllerin insan gingival fibroblastlarında oluşturulan yara modeli üzerine etkisi değerlendirildi. Elde edilen verilere göre;

1. Yapılan sitotoksisite deneyi sonucunda hiçbir konsantrasyon insan gingival fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik bulunmamıştır. Altın ve gümüş nanopartiküllerin benzer konsantrasyonlarının sitotoksisite deney sonuçları karşılaştırıldığında, altın nanopartiküller gümüş nanopartiküllere göre sitotoksisite açısından istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

2. İnsan gingival fibroblastlarında oluşturulan yara modeli üzerinde kullanılan altın nanopartikülünün iki farklı konsantrasyonda da negatif kontrole göre daha başarılı olduğu saptandı. Yüksek konsantrasyondaki altın nanopartikül, düşük konsantrasyona göre yara iyileşme modelinde istatistiki olarak daha başarılı olduğu tespit edildi.

3. İnsan gingival fibroblastlarında oluşturulan yara modeli üzerinde kullanılan gümüş nanopartikülün iki farklı konsantrasyonda da negatif kontrole göre daha başarılı olduğu tespit edildi. Yüksek konsantrasyondaki gümüş nanopartikül, düşük konsantrasyona göre yara iyileşme modelinde istatistiki olarak daha başarılı bulundu.

4. Gümüş nanopartikül, altın nanopartikül ve kontrol grubu karşılaştırıldığında insan gingival fibroblastlarında oluşturulan yaranın kapanmasının en hızlı olduğu grup, gümüş nanopartiküllerin yüksek konsantrasyonda kullanıldığı grup olduğu bulunmuştur.

7. KAYNAKLAR

1. Petersen, P.E., *The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme*. Community Dentistry and oral epidemiology, 2003. **31**: p. 3-24.
2. Tepebaşı, M.Y. and N.Ş. Calapoğlu, *Yara iyileşmesinin hücresel ve moleküler mekanizması*. Medical Journal of Suleyman Demirel University, 2016. **23**(4).
3. Kaplani, K., et al., *Wound healing related agents: Ongoing research and perspectives*. Advanced drug delivery reviews, 2018. **129**: p. 242-253.
4. Berberoğlu, A., *Periodontal dokuların iyileşmesinde büyüme faktörlerinin rolü*. Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi, 2007. **3**: p. 114-121.
5. Smith, P.C., et al., *Role of fibroblast populations in periodontal wound healing and tissue remodeling*. Frontiers in physiology, 2019. **10**.
6. Hassan, K.A., et al., *Wound healing potential of the ethanolic extracts of Bidens pilosa and Ocimum suave*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2011. **5**(2): p. 132-136.
7. Halkai, K.R., et al., *Biosynthesis, characterization and antibacterial efficacy of silver nanoparticles derived from endophytic fungi against P. Gingivalis*. Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, 2017. **11**(9): p. ZC92.
8. Singh, P., et al., *In vitro anti-inflammatory activity of spherical silver nanoparticles and monodisperse hexagonal gold nanoparticles by fruit extract of Prunus serrulata: a green synthetic approach*. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, 2018. **46**(8): p. 2022-2032.
9. Patil, M.P. and G.-D. Kim, *Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles*. Applied microbiology and biotechnology, 2017. **101**(1): p. 79-92.
10. Caton, J.G., et al., *A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification*. Journal of periodontology, 2018. **89**: p. S1-S8.
11. Lang, N.P. and P.M. Bartold, *Periodontal health*. Journal of periodontology, 2018. **89**: p. S9-S16.

12. Kinane, D.F., *Causation and pathogenesis of periodontal disease*. Periodontology 2000, 2001. **25**(1): p. 8-20.
13. Williams, R.C., *Periodontal disease*. New England Journal of Medicine, 1990. **322**(6): p. 373-382.
14. Kinane, D.F. and D.F. Lappin, *Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease*. Acta Odontologica Scandinavica, 2001. **59**(3): p. 154-160.
15. Hinrichs, J.E. and M.J. Novak, *Classification of diseases and conditions affecting the periodontium*. Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Carranzas Clinical Periodontology. 11th ed. Louis Missouri: Elsevier Saunders, 2012: p. 34-54.
16. Newman, M., et al., *Classification of diseases and conditions affecting the periodontium*. Carranza's Clinical periodontology, 2012.
17. Chapple, I.L., et al., *Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*. Journal of periodontology, 2018. **89**: p. S74-S84.
18. Papapanou, P.N., et al., *Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions*. Journal of periodontology, 2018. **89**: p. S173-S182.
19. Tonetti, M.S., H. Greenwell, and K.S. Kornman, *Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition*. Journal of periodontology, 2018. **89**: p. S159-S172.
20. GINGIVITIS, P.-I., *Treatment of plaque-induced gingivitis, chronic periodontitis, and other clinical conditions*. odontol, 2001. **72**: p. 1790-1800.
21. Aukhil, I., *Biology of wound healing*. Periodontology 2000, 2000. **22**(1): p. 44-50.
22. Melcher, A., *On the repair potential of periodontal tissues*. Journal of periodontology, 1976. **47**(5): p. 256-260.
23. Kao, R.T., et al., *Tissue engineering for periodontal regeneration*. CDA. JOURNAL, 2005. **33**(3).
24. Polimeni, G., A.V. Xiroupaidis, and U.M. Wikesjö, *Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration*. Periodontology 2000, 2006. **41**(1): p. 30-47.

25. Chen, F.-M. and Y. Jin, *Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities*. Tissue Engineering Part B: Reviews, 2010. **16**(2): p. 219-255.
26. Irwin, C.R., et al., *Inter-and intra-site heterogeneity in the expression of fetal-like phenotypic characteristics by gingival fibroblasts: potential significance for wound healing*. Journal of cell science, 1994. **107**(5): p. 1333-1346.
27. Schor, S., et al., *Subpopulations of fetal-like gingival fibroblasts: characterisation and potential significance for wound healing and the progression of periodontal disease*. Oral diseases, 1996. **2**(2): p. 155-166.
28. Haekkinen, L., V.J. UITTO, and H. Larjava, *Cell biology of gingival wound healing*. Periodontology 2000, 2000. **24**(1): p. 127-152.
29. Singer, A.J. and R.A. Clark, *Cutaneous wound healing*. New England journal of medicine, 1999. **341**(10): p. 738-746.
30. Miloro, M., et al., *Oral and maxillofacial surgery*. 2004, BC Decker, Ontario.
31. Karukonda, S.R., et al., *The effects of drugs on wound healing: part 1*. International journal of dermatology, 2000. **39**(4): p. 250-257.
32. DN, E., *Farklı Dikiş Materyallerinin Gingivada Oluşturduğu Doku Reaksiyonunun Değerlendirilmesi (Doktora Tezi)*. Ankara: Başkent Univeritesi, 2009.
33. George Broughton, I., J.E. Janis, and C.E. Attinger, *Wound healing: an overview*. Plastic and reconstructive surgery, 2006. **117**(7S): p. 1e-S-32e-S.
34. Dovi, J.V., L.K. He, and L.A. DiPietro, *Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice*. Journal of leukocyte biology, 2003. **73**(4): p. 448-455.
35. George Broughton, I., J.E. Janis, and C.E. Attinger, *The basic science of wound healing*. Plastic and reconstructive surgery, 2006. **117**(7S): p. 12S-34S.
36. Richardson, M., *Acute wounds: an overview of the physiological healing process*. Nursing times, 2004. **100**(4): p. 50-53.
37. Guo, S.a. and L.A. DiPietro, *Factors affecting wound healing*. Journal of dental research, 2010. **89**(3): p. 219-229.
38. Ramasastry, S.S., *Acute wounds*. Clinics in plastic surgery, 2005. **32**(2): p. 195-208.
39. Pierce, G.F., et al., *Role of platelet-derived growth factor in wound healing*. Journal of cellular biochemistry, 1991. **45**(4): p. 319-326.

40. Velnar, T., T. Bailey, and V. Smrkolj, *The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms*. Journal of International Medical Research, 2009. **37**(5): p. 1528-1542.
41. Witte, M.B. and A. Barbul, *General principles of wound healing*. Surgical Clinics of North America, 1997. **77**(3): p. 509-528.
42. Goldman, R., *Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future*. Advances in skin & wound care, 2004. **17**(1): p. 24-35.
43. Clark, R.A., *Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair*. The American journal of the medical sciences, 1993. **306**(1): p. 42-48.
44. Lawrence, W.T., *Physiology of the acute wound*. Clinics in plastic surgery, 1998. **25**(3): p. 321-340.
45. Monaco, J.L. and W.T. Lawrence, *Acute wound healing an overview*. Clinics in plastic surgery, 2003. **30**(1): p. 1-12.
46. Ribatti, D., et al., *Angiogenesis under normal and pathological conditions*. Haematologica, 1991. **76**(4): p. 311-320.
47. Oike, Y., et al., *Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes angiogenesis*. Blood, 2004. **103**(10): p. 3760-3765.
48. Baum, C.L. and C.J. Arpey, *Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events*. Dermatologic surgery, 2005. **31**(6): p. 674-686.
49. Nagase, H., *Matrix metalloproteinases*, in *Zinc metalloproteases in health and disease*. 1996, CRC Press. p. 173-224.
50. Rudolph, R., *Location of the force of wound contraction*. Surgery, gynecology & obstetrics, 1979. **148**(4): p. 547-551.
51. Sieggreen, M., *Healing of physical wounds*. The Nursing clinics of North America, 1987. **22**(2): p. 439-447.
52. Toy, L., *Matrix metalloproteinases: their function in tissue repair*. Journal of wound care, 2005. **14**(1): p. 20-22.
53. Mulder, G.D. and J.S. Vande Berg, *Cellular senescence and matrix metalloproteinase activity in chronic wounds: relevance to debridement and new technologies*. Journal of the American Podiatric Medical Association, 2002. **92**(1): p. 34-37.
54. Schultz, G.S. and B.A. Mast, *Molecular analysis of the environments of healing and chronic wounds: cytokines, proteases and growth factors*. Primary Intention, 1999. **7**: p. 7-15.
55. Soo, C., et al., *Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair*. Plastic and reconstructive surgery, 2000. **105**(2): p. 638-647.

56. Pierce, G., et al., *Platelet-derived growth factor-BB and transforming growth factor beta 1 selectively modulate glycosaminoglycans, collagen, and myofibroblasts in excisional wounds*. The American journal of pathology, 1991. **138**(3): p. 629.
57. Ganz, T., *Macrophage function*. New horizons (Baltimore, Md.), 1993. **1**(1): p. 23-27.
58. Falanga, V., *Wound healing and chronic wounds*. Journal of cutaneous medicine and surgery, 1998. **3**: p. S1-1-5.
59. Wikesjö, U.M. and K.A. Selvig, *Periodontal wound healing and regeneration*. Periodontology 2000, 1999. **19**(1): p. 21-39.
60. Wong, J.W., et al., *Wound healing in oral mucosa results in reduced scar formation as compared with skin: evidence from the red Duroc pig model and humans*. Wound Repair and Regeneration, 2009. **17**(5): p. 717-729.
61. Szpaderska, A., J. Zuckerman, and L. DiPietro, *Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds*. Journal of dental research, 2003. **82**(8): p. 621-626.
62. Graves, D.T., et al., *IL-1 plays a critical role in oral, but not dermal, wound healing*. The Journal of Immunology, 2001. **167**(9): p. 5316-5320.
63. Sahoo, S., S. Parveen, and J. Panda, *The present and future of nanotechnology in human health care*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2007. **3**(1): p. 20-31.
64. Saglam, N., et al., *Innovation of strategies and challenges for fungal nanobiotechnology*, in *Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology*. 2016, Springer. p. 25-46.
65. Erkoç, Ş., *Nanobilim ve nanoteknoloji*. 2007.
66. Eric Drexler, K., *Nanosystems: molecular machinery, manufacturing, and computation*. 1992, New York: John Wiley & Sons.
67. Satyanarayana, T. and R. Rai, *Nanotechnology: the future*. Journal of interdisciplinary dentistry, 2011. **1**(2): p. 93.
68. Chandki, R., et al., *'Nanodentistry': Exploring the beauty of miniature*. Journal of clinical and experimental dentistry, 2012. **4**(2): p. e119.
69. Freitas Jr, R.A., *Nanodentistry*. The Journal of the American Dental Association, 2000. **131**(11): p. 1559-1565.
70. Sharma, S., et al., *Nanocharacterization in dentistry*. International journal of molecular sciences, 2010. **11**(6): p. 2523-2545.

71. Mittal, A.K., Y. Chisti, and U.C. Banerjee, *Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts*. Biotechnology advances, 2013. **31**(2): p. 346-356.
72. Rai, M., A. Yadav, and A. Gade, *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*. Biotechnology advances, 2009. **27**(1): p. 76-83.
73. Maneerung, T., S. Tokura, and R. Rujiravanit, *Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing*. Carbohydrate polymers, 2008. **72**(1): p. 43-51.
74. Jain, P. and T. Pradeep, *Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter*. Biotechnology and bioengineering, 2005. **90**(1): p. 59-63.
75. Tian, J., et al., *Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing*. ChemMedChem, 2007. **2**(1): p. 129-136.
76. Furno, F., et al., *Silver nanoparticles and polymeric medical devices: a new approach to prevention of infection?* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004. **54**(6): p. 1019-1024.
77. Atiyeh, B.S., et al., *Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature*. burns, 2007. **33**(2): p. 139-148.
78. Lokina, S., et al., *Spectroscopic investigations, antimicrobial, and cytotoxic activity of green synthesized gold nanoparticles*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2014. **129**: p. 484-490.
79. Annamalai, J. and T. Nallamuthu, *Green synthesis of silver nanoparticles: characterization and determination of antibacterial potency*. Applied Nanoscience, 2016. **6**(2): p. 259-265.
80. Otari, S., et al., *Canna edulis leaf extract-mediated preparation of stabilized silver nanoparticles: characterization, antimicrobial activity, and toxicity studies*. J Microbiol Biotechnol, 2017. **27**: p. 731-738.
81. Priya, R.S., D. Geetha, and P. Ramesh, *Antioxidant activity of chemically synthesized AgNPs and biosynthesized Pongamia pinnata leaf extract mediated AgNPs—A comparative study*. Ecotoxicology and environmental safety, 2016. **134**: p. 308-318.
82. Ge, L., et al., *Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity*. International journal of nanomedicine, 2014. **9**: p. 2399.
83. Oei, J.D., et al., *Antimicrobial acrylic materials with in situ generated silver nanoparticles*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2012. **100**(2): p. 409-415.

84. Acosta-Torres, L.S., et al., *Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures*. International journal of nanomedicine, 2012. **7**: p. 4777.
85. Vazquez-Garcia, F., et al., *Effect of silver nanoparticles on physicochemical and antibacterial properties of calcium silicate cements*. Brazilian dental journal, 2016. **27**(5): p. 508-514.
86. Cheng, L., et al., *Effect of amorphous calcium phosphate and silver nanocomposites on dental plaque microcosm biofilms*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2012. **100**(5): p. 1378-1386.
87. Franková, J., et al., *Effects of silver nanoparticles on primary cell cultures of fibroblasts and keratinocytes in a wound-healing model*. Journal of applied biomaterials & functional materials, 2016. **14**(2): p. 137-142.
88. Habiboallah, G., et al., *Enhancement of gingival wound healing by local application of silver nanoparticles periodontal dressing following surgery: a histological assessment in animal model*. Modern Research in Inflammation, 2014. **2014**.
89. Zhu, Y., et al., *Hierarchical micro/nanostructured titanium with balanced actions to bacterial and mammalian cells for dental implants*. International journal of nanomedicine, 2015. **10**: p. 6659.
90. Velammal, S.P., T.A. Devi, and T.P. Amaladhas, *Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of silver and gold nanoparticles synthesized using Plumbago zeylanica bark*. Journal of Nanostructure in Chemistry, 2016. **6**(3): p. 247-260.
91. Heo, D.N., et al., *Enhanced bone regeneration with a gold nanoparticle–hydrogel complex*. Journal of Materials Chemistry B, 2014. **2**(11): p. 1584-1593.
92. Heo, D.N., et al., *Titanium dental implants surface-immobilized with gold nanoparticles as osteoinductive agents for rapid osseointegration*. Journal of colloid and interface science, 2016. **469**: p. 129-137.
93. Cui, Y., et al., *The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on Escherichia coli*. Biomaterials, 2012. **33**(7): p. 2327-2333.
94. De Jong, W.H. and P.J. Borm, *Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards*. International journal of nanomedicine, 2008. **3**(2): p. 133.
95. Dawson, K.A., A. Salvati, and I. Lynch, *Nanoparticles reconstruct lipids*. Nature nanotechnology, 2009. **4**(2): p. 84-85.

96. Mafuné, F., et al., *Dissociation and aggregation of gold nanoparticles under laser irradiation*. The Journal of Physical Chemistry B, 2001. **105**(38): p. 9050-9056.
97. Zhang, G. and D. Wang, *Fabrication of heterogeneous binary arrays of nanoparticles via colloidal lithography*. Journal of the American Chemical Society, 2008. **130**(17): p. 5616-5617.
98. Treguer, M., et al., *Dose rate effects on radiolytic synthesis of gold–silver bimetallic clusters in solution*. The Journal of Physical Chemistry B, 1998. **102**(22): p. 4310-4321.
99. Chen, W., et al., *Sonochemical processes and formation of gold nanoparticles within pores of mesoporous silica*. Journal of colloid and interface science, 2001. **238**(2): p. 291-295.
100. Eustis, S., H.-Y. Hsu, and M.A. El-Sayed, *Gold nanoparticle formation from photochemical reduction of Au³⁺ by continuous excitation in colloidal solutions. A proposed molecular mechanism*. The Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(11): p. 4811-4815.
101. Frattini, A., et al., *Effect of amine groups in the synthesis of Ag nanoparticles using aminosilanes*. Materials chemistry and physics, 2005. **94**(1): p. 148-152.
102. Starowicz, M., B. Stypuła, and J. Banaś, *Electrochemical synthesis of silver nanoparticles*. Electrochemistry Communications, 2006. **8**(2): p. 227-230.
103. Kulkarni, N. and U. Muddapur, *Biosynthesis of metal nanoparticles: a review*. Journal of Nanotechnology, 2014. **2014**.
104. You, H., et al., *Synthesis of colloidal metal and metal alloy nanoparticles for electrochemical energy applications*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(7): p. 2880-2904.
105. Ai, J., et al., *Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs*. International journal of nanomedicine, 2011. **6**: p. 1117.
106. Jain, N., et al., *Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using Aspergillus flavus NJP08: a mechanism perspective*. Nanoscale, 2011. **3**(2): p. 635-641.
107. Ahmad, A., et al., *Extra-/intracellular biosynthesis of gold nanoparticles by an alkalotolerant fungus, Trichothecium sp.* Journal of Biomedical Nanotechnology, 2005. **1**(1): p. 47-53.
108. Ahmad, A. and S. Senapati, *Islam Khan M, Kumar R, Sastry M: Extracellular biosynthesis of monodisperse gold nanoparticles by a novel Extremophilic actinomycete, Thermomonospora sp.* Langmuir, 2003. **19**: p. 3550-3553.

109. Klaus-Joerger, T., et al., *Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science*. TRENDS in Biotechnology, 2001. **19**(1): p. 15-20.
110. Lengke, M. and G. Southam, *Bioaccumulation of gold by sulfate-reducing bacteria cultured in the presence of gold (I)-thiosulfate complex*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2006. **70**(14): p. 3646-3661.
111. Mishra, A., S.K. Tripathy, and S.-I. Yun, *Fungus mediated synthesis of gold nanoparticles and their conjugation with genomic DNA isolated from Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. Process Biochemistry, 2012. **47**(5): p. 701-711.
112. Merzlyak, A. and S.-W. Lee, *Phage as templates for hybrid materials and mediators for nanomaterial synthesis*. Current opinion in chemical biology, 2006. **10**(3): p. 246-252.
113. Kumar, P., et al., *A green approach for the synthesis of gold nanotriangles using aqueous leaf extract of Callistemon viminalis*. Materials Letters, 2011. **65**(4): p. 595-597.
114. Patra, J.K., Y. Kwon, and K.-H. Baek, *Green biosynthesis of gold nanoparticles by onion peel extract: synthesis, characterization and biological activities*. Advanced Powder Technology, 2016. **27**(5): p. 2204-2213.
115. Mohanpuria, P., N.K. Rana, and S.K. Yadav, *Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications*. Journal of nanoparticle research, 2008. **10**(3): p. 507-517.
116. Iravani, S., *Green synthesis of metal nanoparticles using plants*. Green Chemistry, 2011. **13**(10): p. 2638-2650.
117. Thakkar, K., S. Mhatre, and R. Parikh, *Biological synthesis of metallic nanoparticles*. Nanomed Nanotechnol Biol Med 6: 257–262. 2010.
118. Jha, A.K., et al., *Plant system: nature's nanofactory*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2009. **73**(2): p. 219-223.
119. Singh, P., et al., *Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms*. Trends in biotechnology, 2016. **34**(7): p. 588-599.
120. Castro, L., et al., *Biosynthesis of gold nanowires using sugar beet pulp*. Process Biochemistry, 2011. **46**(5): p. 1076-1082.
121. El-Kassas, H.Y. and M.M. El-Sheekh, *Cytotoxic activity of biosynthesized gold nanoparticles with an extract of the red seaweed Corallina officinalis on the MCF-7 human breast cancer cell line*. Asian Pacific journal of cancer prevention, 2014. **15**(10): p. 4311-4317.

122. Malik, P., et al., *Green chemistry based benign routes for nanoparticle synthesis*. Journal of Nanoparticles, 2014. **2014**.
123. Modaresi, J., et al., *Effects of supplementation with pomegranate seed pulp on concentrations of conjugated linoleic acid and punicic acid in goat milk*. Journal of dairy science, 2011. **94**(8): p. 4075-4080.
124. Shirode, A.B., et al., *Antiproliferative effects of pomegranate extract in MCF-7 breast cancer cells are associated with reduced DNA repair gene expression and induction of double strand breaks*. Molecular carcinogenesis, 2014. **53**(6): p. 458-470.
125. Mphahlele, R., et al., *Effect of extraction method on chemical, volatile composition and antioxidant properties of pomegranate juice*. South African Journal of Botany, 2016. **103**: p. 135-144.
126. Lee, C.-J., et al., *Anti-inflammatory effects of Punica granatum Linne in vitro and in vivo*. Food chemistry, 2010. **118**(2): p. 315-322.
127. Ahmad, N., S. Sharma, and R. Rai, *Rapid green synthesis of silver and gold nanoparticles using peels of Punica granatum*. Adv. Mater. Lett, 2012. **3**(5): p. 376-380.
128. Devanesan, S., et al., *Antimicrobial and cytotoxicity effects of synthesized silver nanoparticles from Punica granatum peel extract*. Nanoscale research letters, 2018. **13**(1): p. 315.
129. Esawy, M.A., et al., *Evaluated bioactive component extracted from Punica granatum peel and its Ag NPs forms as mouthwash against dental plaque*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019. **18**: p. 101073.
130. Fernandes, R.A., et al., *Antimicrobial potential and cytotoxicity of silver nanoparticles phytosynthesized by pomegranate peel extract*. Antibiotics, 2018. **7**(3): p. 51.
131. Yakout, S.M. and A.A. Mostafa, *A novel green synthesis of silver nanoparticles using soluble starch and its antibacterial activity*. International journal of clinical and experimental medicine, 2015. **8**(3): p. 3538.
132. Mishra, A., S.K. Tripathy, and S.I. Yun, *Fungus mediated synthesis of gold nanoparticles and their conjugation with genomic DNA isolated from Escherichia coli and Staphylococcus aureus*. Process Biochemistry, 2012. **47**(5): p. 701-711.
133. Kelly, K.L., et al., *The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment*. 2003, ACS Publications.

134. MEŞELİ, S.E., et al., *Başlangıç Periodontal Tedavide Sistemik Antibiyotiklerin Kullanımı*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 2014. **15**(2).
135. Kaner, D., et al., *Controlled-delivery chlorhexidine chip versus amoxicillin/metronidazole as adjunctive antimicrobial therapy for generalized aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial*. Journal of Clinical Periodontology, 2007. **34**(10): p. 880-891.
136. Mariotti, A.J. and D.A. Rumpf, *Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production*. Journal of periodontology, 1999. **70**(12): p. 1443-1448.
137. Gürkan, C.A., et al., *Short-term side effects of 0.2% alcohol-free chlorhexidine mouthrinse used as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a double-blind clinical study*. Journal of periodontology, 2006. **77**(3): p. 370-384.
138. Składanowski, M., et al., *Evaluation of cytotoxicity, immune compatibility and antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles*. Medical microbiology and immunology, 2016. **205**(6): p. 603-613.
139. Suwannakul, S., S. Wacharanad, and P. Chaibenjwong, *Rapid green synthesis of silver nanoparticles and evaluation of their properties for oral disease therapy*. Songklanakarin Journal of Science & Technology, 2018. **40**(4).
140. Jadhav, K., et al., *Phytosynthesis of gold nanoparticles: Characterization, biocompatibility, and evaluation of its osteoinductive potential for application in implant dentistry*. Materials Science and Engineering: C, 2018. **93**: p. 664-670.
141. Callens, A. *Growth factors in periodontal regeneration-a review*. in *Proceedings of the 2nd European workshop on periodontology*, 1997. 1997. Quintessence.
142. Min, S., et al., *Preparation of a silk fibroin spongy wound dressing and its therapeutic efficiency in skin defects*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2012. **23**(1-4): p. 97-110.
143. Sunitha, S., et al., *Fabrication of surgical sutures coated with Curcumin loaded gold nanoparticles*. Pharm. Anal. Acta, 2017. **8**: p. 1-12.
144. Zhao, W., et al., *Effect of size and processing method on the cytotoxicity of realgar nanoparticles in cancer cell lines*. International Journal of Nanomedicine, 2011. **6**: p. 1569.

145. Yen, H.J., S.h. Hsu, and C.L. Tsai, *Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes*. *Small*, 2009. 5(13): p. 1553-1561.



