



**ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN
YEŞİL SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU,
SİTOTOKSİSİTESİ VE ANTİMİKROBİYAL
AKTİVİTESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doğukan İŞLEK

Danışman

Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK

ANABİLİM DALI

Temmuz 2023

Bu tez çalışması 22.FEN.BİL.16 numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN YEŞİL SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU, SİTOTOKSİSİTESİ VE
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ**

Doğukan İŞLEK

Danışman

Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

Temmuz 2023

TEZ ONAY SAYFASI

Doğukan İŞLEK tarafından hazırlanan “Çinko Oksit Nanopartiküllerinin Yeşil Sentezi, Karakterizasyonu, Sitotoksitesi ve Antimikrobiyal Aktivitesi” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 07/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

Başkan : Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Arzu ÖZKARA
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Nilay İŞİTEZ
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi,
Eczacılık Fakültesi

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
..... /..... /..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.
.....
Prof. Dr. İbrahim EROL
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

07 / 07/ 2023

Doğukan İŞLEK

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİNİN YEŞİL SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU, SİTOTOKSİSİTESİ VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ

Doğukan İŞLEK

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Arzu ÖZKARA

Bu çalışmada, *Sideritis akmanii* bitkisinden elde edilen ekstrakt kullanılarak yeşil sentez tekniği ile çinko oksit nanopartikül (ZnONP)'ler sentezlendi. Elde edilen ZnONP'lerin Ultraviyole-Görünür Spektrofotometrisi (UV-VIS), X Işını Difraksiyonu (XRD) spektrofotometresi, Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektroskopisi (FT-IR) teknikleri ile karakterizasyonu gerçekleştirildi. Yeşil sentez tekniğiyle sentezlenen ZnONP çözeltisinin maksimum absorbands değeri 365 nm olarak kaydedildi. Nanopartiküllerin XRD analizi sonucu elde edilen Bragg tepe noktalarının JCPDS modeli 36-1451 ile uyumlu olduğu ve nanopartiküllerin altıgen yapıda olduğu tespit edildi. XRD ve SEM analizi sonucunda 2 θ açısındaki en yüksek pik 36.262, FWHM değeri 0.437 ve ZnONP partikül boyutu 21.26 nm ve küresel şekilde olduğu tespit edilmiştir.

Sideritis akmanii ekstraktının ve sentezlenen ZnONP'lerin A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri konsantrasyon ve zamana bağlı olarak değerlendirildi. ZnONP için LD₅₀ dozu NP50 (5 mg/mL) olarak belirlendi. ZnONP'lerin, *Sideritis akmanii* özütüne kıyasla çok düşük konsantrasyonlarda bile daha yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edildi. ZnONP'lerin ve bitki ekstraktının A549 hücre hattı üzerindeki genotoksik etkileri 24 ve 48 saatlik periyotlar boyunca karşılaştırıldı. A549 hücre hattı üzerinde ZnONP'lerin farklı dozlarda farklı genotoksik etkilere sebep olduğu gösterildi.

Çalışmada uygulanan bitki ekstraktının üç konsantrasyonunun da 24 ve 48 saatlik uygulamada genotoksik hasarı azaltıcı yönde etki oluşturduğu görüldü. Sentezlenmiş ZnONP 25'in hem 24 saat hem de 48 saat uygulamasında kontrol grubuna kıyasla genotoksik hasarı geriletmediği tespit edildi.

ZnONP'lerin *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) ve *Candida albicans* (ATCC 90028) mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi disk difüzyon yöntemi kullanılarak analiz edildi. Disk difüzyon testi sonuçları, ZnONP'lerin 8-13.67 mm arasında değişen inhibisyon zonu çapları ile 5 mikroorganizma suşu üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur. 24, 48 ve 72 saatlik ZnONP doz uygulamalarının en etkili olduğu suşun *Salmonella enteritidis* olduğu tespit edildi. En yüksek inhibisyon çapı ise 72 saatlik ve 250 mg/mL ZnONP doz uygulaması yapılan *Salmonella enteritidis* suşunda 13.67 mm olarak kaydedildi.

Elde edilen sonuçlar, *Sideritis akmanii* ekstresi ve sentezlenen ZnONP'lerinin çeşitli kanser tiplerine, bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara karşı alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde faydalı olabileceğini göstermektedir.

2023, xiii + 81 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, Çinko oksit nanopartikül, Genotoksisite, *Sideritis akmanii*, Sitotoksisite, Yeşil sentez.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

GREEN SYNTHESIS OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES, CHARACTERIZATION, CYTOTOXICITY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Doğukan İŞLEK

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Arzu ÖZKARA

In this research, zinc oxide nanoparticles (ZnONP) were synthesized by green synthesis technique using the extract obtained from *Sideritis akmanii* plant. The characterization of the obtained ZnONPs was carried out by Ultraviolet-Visible Spectrophotometer (UV-VIS), X-Ray Diffraction (XRD) Spectroscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) techniques. The maximum absorbance value of the ZnONP solution synthesized by the green synthesis technique was recorded as 365 nm. It was determined that the Bragg peaks obtained as a result of the XRD analysis of the nanoparticles were compatible with the JCPDS model 36-1451 and that the nanoparticles had a hexagonal structure. As a result of XRD and SEM analysis, it was determined that the highest peak at 2 θ angle was 36.262, FWHM value was 0.437 and ZnONP particle size was 21.26 nm and spherical.

The cytotoxic effects of *Sideritis akmanii* extract and synthesized ZnONPs on the A549 cell line were evaluated depending on concentration and time. The LD₅₀ dose for ZnONP was determined as NP50 (5 mg/mL). It was determined that ZnONPs showed higher cytotoxic activity even at very low concentrations compared to *Sideritis akmanii* extract. The genotoxic effects of ZnONPs and the plant extract on the A549 cell line were compared for 24 and 48 hour periods. It has been shown that ZnONPs cause different genotoxic effects at different doses on the A549 cell line. It was observed that

all three concentrations of the plant extract applied in the study had a reducing effect on genotoxic damage in 24-hour and 48-hour application. It was determined that the synthesized ZnONP 25 regressed the genotoxic damage compared to the control group in both 24-hour and 48-hour application.

Antimicrobial activity of ZnONPs on *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) and *Candida albicans* (ATCC 90028) microorganisms was analyzed using the disc diffusion method. Disk diffusion test results revealed that ZnONPs were effective on 5 strains of microorganisms with inhibition zone diameters ranging from 8-13.67 mm. Doses of ZnONP for 24, 48 and 72 hours were most effective in *Salmonella enteritidis*. The highest inhibition diameter was recorded as 13.67 mm in the *Salmonella enteritidis* strain, which was administered with a dose of 250 mg/mL ZnONP for 72 hours.

The obtained results show that *Sideritis akmanii* extract and synthesized ZnONPs may be useful in the development of alternative treatment methods against various cancer types, bacterial and fungal infections.

2023, xiii + 81 pages

Keywords: Antimicrobial activity, Zinc oxide nanoparticles, Genotoxicity, *Sideritis akmanii*, Cytotoxicity, Green synthesis.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusu, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi, yazım aşaması ve yüksek lisans eğitimim boyunca yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Arzu ÖZKARA'ya sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başladığım ders dönemimden günümüze kadar bilgileri ve donanımlarıyla bana bu süreçte destek olan Sayın Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ ve Sayın Doç. Dr. Dilek AKYIL'a teşekkür ederim.

Araştırma ve yazım süresince yardımlarını esirgemeyen, her konuda öneri ve eleştirileriyle yardımlarını gördüğüm yüksek lisans öğrencileri Sayın Edanur YENİYOL ve Sayın Tuğçe ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 22.FEN.BİL.16 nolu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne katkılarından dolayı en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu araştırmanın başından sonuna kadar devam eden süreçte maddi ve manevi desteğini hep yanımda hissettiren sevgili eşim Büşra İŞLEK'e teşekkür ederim.

Doğukan İŞLEK
Afyonkarahisar 2023

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1 Nanoteknoloji	3
2.1.1 Nanopartiküller	4
2.1.2 Nanopartiküllerin Tipleri	4
2.1.3 Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri ve Karakterizasyon Teknikleri.....	6
2.1.4 Nanopartiküllerin Uygulama Alanları	10
2.1.5 Çinko Oksit Nanopartiküllerin Önemi.....	11
2.2 Lamiaceae Familyasının Genel Özellikleri	12
2.2.1 <i>Sideritis</i> Cinsi.....	13
2.2.2 Türkiye’de Yetişen <i>Sideritis</i> Türleri	15
2.2.3 <i>Sideritis akmanii</i> Türünün Taksonomik Hiyerarşisi ve Özellikleri	17
2.3 <i>Sideritis</i> Türleri ile Yapılan Çeşitli Çalışmalar	21
2.3.1 Geleneksel Uygulamalar ile İlişkili Çalışmalar	22
2.3.2 Biyolojik Aktiviteler ile İlişkili Çalışmalar	23
3. MATERYAL ve METOT	28
3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....	28
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	28
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	28
3.2 <i>Sideritis akmanii</i> Bitkisinin Temini ve Ekstraktın Hazırlanması	29
3.3 Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	31
3.3.1 Sodyum Hidroksit Çözeltilerinin Hazırlanması.....	31
3.3.2 Çinko Asetat Çözeltilisinin Hazırlanması.....	32
3.4 Yeşil Sentez Yöntemiyle Çinko Oksit Nanopartiküllerin Sentezi.....	32

3.5 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	35
3.5.1 Ultraviyole-Görünür Spektrofotometrisi (UV-VIS)	35
3.5.2 pH Ölçümü.....	35
3.5.3 X Işını Difraksiyon (XRD) Spektroskopisi	35
3.5.4 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)	36
3.5.5 Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi (FT-IR).....	36
3.6 Hücre Kültürü ve A549 Hücre Hattı ile Yapılan Çalışmalar.....	36
3.6.1 Hücre Kültürü Besiyerlerinin Hazırlanması	37
3.6.2 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi	37
3.6.3 Hücrelerin Pasajlanması	38
3.6.4 Hücrelerin Sayılması.....	39
3.6.5 Hücrelerin Dondurularak Saklanması.....	41
3.7 Sitotoksik Aktivite Analizleri	42
3.7.1 MTT Çözeltilisinin Hazırlanması	43
3.7.2 MTT Hücre Canlılık Ölçüm Testi	43
3.8 Genotoksik Aktivite Analizleri.....	44
3.9 Antimikrobiyal Aktivite Analizleri	47
3.9.1 Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması	47
3.9.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Belirleme	48
9.3.3 Disk Difüzyon Yöntemi.....	48
3.10 İstatistiksel Analiz	49
4. BULGULAR	50
4.1 Yeşil Sentez ile İlgili Bulgular	50
4.2 Karakterizasyon ile İlgili Bulgular	50
4.2.1 UV-VIS Sonuçları.....	50
4.2.2 pH Sonuçları	51
4.2.3 XRD Sonuçları.....	51
4.2.4 SEM Sonuçları	53
4.2.5 FT-IR Sonuçları	54
4.3 Sitotoksikite ile İlgili Bulgular.....	55
4.4 Antimikrobiyal Aktivite ile İlgili Bulgular.....	56
4.4.1 MİK Sonuçları	56
4.4.2 Disk Difüzyon Testi Sonuçları	56
4.5 Genotoksikite ile İlgili Bulgular	59

5. TARTIşMA ve SONUÇ	61
6. KAYNAKLAR.....	68
ÖZGEÇMİř.....	81



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

dH ₂ O	Distile su
mg	Miligram
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mA	Miliamper
mm	Milimetre
CO ₂	Karbondioksit
Zn	Çinko
ZnO	Çinko oksit
ZnC ₄ H ₆ O ₄	Çinko asetat
LD ₅₀	%50 öldürücü doz
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
g	Gram
nm	Nanometre
λ	Dalga boyu
V	Volt
ppm	Milyonda bir
%	Yüzde
>	Büyüktür
<	Küçüktür
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar

A549	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri
B100	<i>S. akmanii</i> ekstraktı 100'lük uygulama dozu
Cisplatin	cis-diamminedichloridoplatinum(II)
CNT	Karbon nano tüpler
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
K	Kontrol
KD	Kromozom anormallikleri
KDD	Kardeş kromatit değişimi
LMA	Düşük erime noktalı agaroz
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür

NMA	Normal erime noktalı agaroz
NP100	Nanopartikül 100'lük uygulama dozu
PBMC	Periferik kan mononükleer hücreleri
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PK	Pozitif kontrol
SAE	<i>Sideritis akmanii</i> bitki ekstraktı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TUAM	Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür Spektrofotometrisi
ZnONP	Çinko oksit nanopartikül
XRD	X-Işını Difraksiyon



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Nanoteknolojinin uygulama alanları.	3
Şekil 2.2 Organik yapılı nanopartiküller (A. Dendrimerler, B. Lipozom, C. Misel, D. Ferritin).	4
Şekil 2.3 Karbon bazlı nanopartiküller (A. Fulleren, B. Grafen, C. Karbon nano tüpler, D. Karbon nanofiberler E. Karbon siyahı).	5
Şekil 2.4 Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar.	6
Şekil 2.5 Yeşil sentez süreci.	8
Şekil 2.6 Nanopartiküllerin günümüzde ve yakın gelecekteki kullanım alanları.	11
Şekil 2.7 Çinko oksit nanopartiküllerin biyomedikal açıdan önemi.	12
Şekil 2.8 Bazı <i>Sideritis</i> türlerinde analiz edilen diterpenlerin kimyasal yapıları.	14
Şekil 2.9 <i>Sideritis akmanii</i> (İnt. Kyn. 6).	18
Şekil 2.10 <i>Sideritis akmanii</i> (Duman vd. 1995).	18
Şekil 2.11 <i>Sideritis akmanii</i> türünün ülkemizdeki yayılışı (3b İç Batı Anadolu).	19
Şekil 2.12 Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından onaylı <i>Sideritis akmanii</i>	22
Şekil 2.13 Çeşitli <i>Sideritis</i> ekstraktlarının serbest radikal yakalama aktiviteleri ile toplam fenol içerikleri.	25
Şekil 3.1 Thoma lamının sayım alanları.	40
Şekil 3.2 MTT'nin MTT formazan bileşiğine indirgenmesi.	42
Şekil 3.3 MTT testinin basamakları.	42
Şekil 4.1 ZnONP'lerin yeşil sentez süreci.	50
Şekil 4.2 ZnONP'lerin UV sonuçları.	51
Şekil 4.3 ZnO nanopartiküllerinin XRD difraktogramı.	52
Şekil 4.4 ZnONP'lerin EDX spektrumu.	54
Şekil 4.5 FT-IR Analiz Sonuçları.	54
Şekil 4.6 <i>Sideritis akmanii</i> ekstraktı ve ZnONP'lerin A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri.	55
Şekil 4.7 ZnONP'lerin 24 saatlik uygulaması sonucu oluşan inhibisyon zonları.	57
Şekil 4.8 ZnONP'lerin 48 saatlik uygulaması sonucu oluşan inhibisyon zonları.	58
Şekil 4.9 ZnONP'lerin 72 saatlik uygulaması sonucu oluşan inhibisyon zonları.	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Nanopartikül üretiminde kullanılan teknikler.	7
Çizelge 2.2 Nanopartikül karakterizasyon teknikleri.	9
Çizelge 2.3 Bazı <i>Sideritis</i> türleri ve içerdikleri diterpen çeşitleri ile oranları.....	15
Çizelge 2.4 Türkiye sınırları içinde yer alan <i>Sideritis</i> taksonları.	15
Çizelge 2.5 <i>Sideritis akmanii</i> bitkisinin uçucu yağ bileşenleri ve yüzde dağılımı.....	20
Çizelge 2.6 <i>Sideritis akmanii</i> türünün mineral madde içeriği.	21
Çizelge 2.7 <i>Sideritis</i> ekstraktlarının fenolik içerikleri ve HPLC analizleri.....	23
Çizelge 2.8 Bazı <i>Sideritis</i> türleri ile yapılan çalışmalar.	26
Çizelge 3.1 1 M NaOH çözeltisinin hazırlanması.....	32
Çizelge 3.2 0.1 M NaOH çözeltisinin hazırlanması.....	32
Çizelge 3.3 0.1 M Çinko asetat çözeltisinin hazırlanması.	32
Çizelge 3.4 Hücre kültürü besiyerinin bileşenleri.	37
Çizelge 3.5 Ekim işleminde kullanılan besiyeri miktarları.	38
Çizelge 3.6 Lizis çözeltisinin hazırlanması.	44
Çizelge 3.7 Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması.	45
Çizelge 3.8 Elektroforez tampon çözeltisinin hazırlanması.....	45
Çizelge 3.9 Düşük erime noktalı agaroz çözeltisinin hazırlanması (LMA).....	45
Çizelge 3.10 Normal erime noktalı agaroz çözeltisinin hazırlanması (NMA).....	45
Çizelge 3.11 Etidyum bromür çözeltisinin hazırlanması.	46
Çizelge 4.1 MİK değerleri.....	56
Çizelge 4.2 Mikroorganizmalarda 24 saatlik doz uygulamasında inhibisyon zon çapları.	57
Çizelge 4.3 Mikroorganizmalarda 48 saatlik doz uygulamasında inhibisyon zon çapları.	57
Çizelge 4.4 Mikroorganizmalarda 72 saatlik doz uygulamasında inhibisyon zon çapları.	58
Çizelge 4.5 A549 hücrelerinde Komet yöntemi ile DNA hasarının belirlenmesi.....	59

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 3.1 Deneyde kullanılan <i>Sideritis akmanii</i> bitkisi.	30
Resim 3.2 Toz haline getirilen <i>Sideritis akmanii</i> bitkisinde manyetik ısıtıcı uygulaması.	30
Resim 3.3 <i>Sideritis akmanii</i> ekstraktının watmann no:1 filtre kağıdı ile süzülmesi.	31
Resim 3.4 <i>Sideritis akmanii</i> özütü ile çinko asetat çözeltisinin karıştırılması.	33
Resim 3.5 NaOH çözeltisi ile pH stabilizasyonu.	33
Resim 3.6 Yapılan yıkamalar sonucu çöken çinko oksit nanopartiküller.	34
Resim 3.7 Pellet ve süpernatant kısımlarının birbirinden ayrılması.	34
Resim 4.1 ZnONP'lerin SEM görüntüsü.	53

1. GİRİŞ

Maddenin atomik düzeydeki manipülasyonunu temel alan nanoteknoloji, çağımızın en önemli çalışma alanlarından biri olup, nano boyutlara sahip olan materyaller ile hücre altı boyutlarda oldukça farklı çalışmalar yapılabilmektedir. Herhangi bir terapötik maddenin, değişikliğe uğramadan hücre içindeki hedef noktaya transport edilmesi bugün nanoteknoloji sayesinde mümkün hale gelmiştir. Nanoteknolojinin temeli nanopartiküllerdir ve bu partiküllerin sahip olduğu sıra dışı özellikler bilim insanlarının ilgisini çekmektedir. Araştırmacılar çeşitli yollar ile farklı boyutlara ve özelliklere sahip nanopartikülleri elde edebilmektedir. Bu nanopartiküller, çeşitli mühendislik alanlarının ve diğer disiplinlerin hedeflerini gerçekleştirmesine yönelik fonksiyonlara sahip olan nano düzeydeki malzemelerin üretimi için yapı taşı niteliği taşımaktadır (Khanna vd. 2019, Dutta ve Sugumaran 2021, Biswas vd. 2022).

Nanopartikül sentezi farklı teknikler ile yapılabilmektedir. Klasik metotlar ile yapılan nanopartikül sentezi zahmetli bir iş olmasının yanı sıra olumsuz çevresel etkilere yol açmakta ve zaman kaybına neden olmaktadır. Bilim insanlarının günümüzdeki yeni gözdesi ise yeşil sentez (green synthesis) olarak bilinen daha çevre dostu bir tekniktir. Bitkilerin yaprak, kök, meyve, çiçek gibi çeşitli kısımlarından elde edilen ekstraktların bir metal tuzu ile muamele edilmesi ve uygun sıcaklıkta bekletilmesi sonucu nanopartikül sentezlenmesi sürecini içeren yeşil sentez yöntemi; maliyeti düşük, çevre dostu ve hızlı bir teknik olması sebebiyle günümüzde nanopartikül sentezi için tercih edilebilirliği yüksek bir yöntemdir. Üstelik diğer tekniklere kıyasla yeşil sentez yöntemi ile elde edilen nanopartiküllerin kararlı yapılar sergilediği ve biyolojik olarak uyumlu oldukları bilinmektedir. Bu nanopartiküller tıp, malzeme bilimi, biyomedikal, elektronik, su arıtımı ve temizlik endüstrisi, kozmetik gibi birçok alanda doğrudan ya da çeşitli işlevleri yerine getirebilecek nano yapıları malzemelerin üretimi amacıyla tercih edilmektedir. Ayrıca nanopartiküllerin antimikrobiyal, antikanserojen, antienflamatuvar etkilere sahip olmaları çeşitli hastalıklara yönelik alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi açısından umut vaat etmektedir (Karnani ve Chowdhary 2013, Yuvakkumar vd. 2014, Tailor vd. 2020).

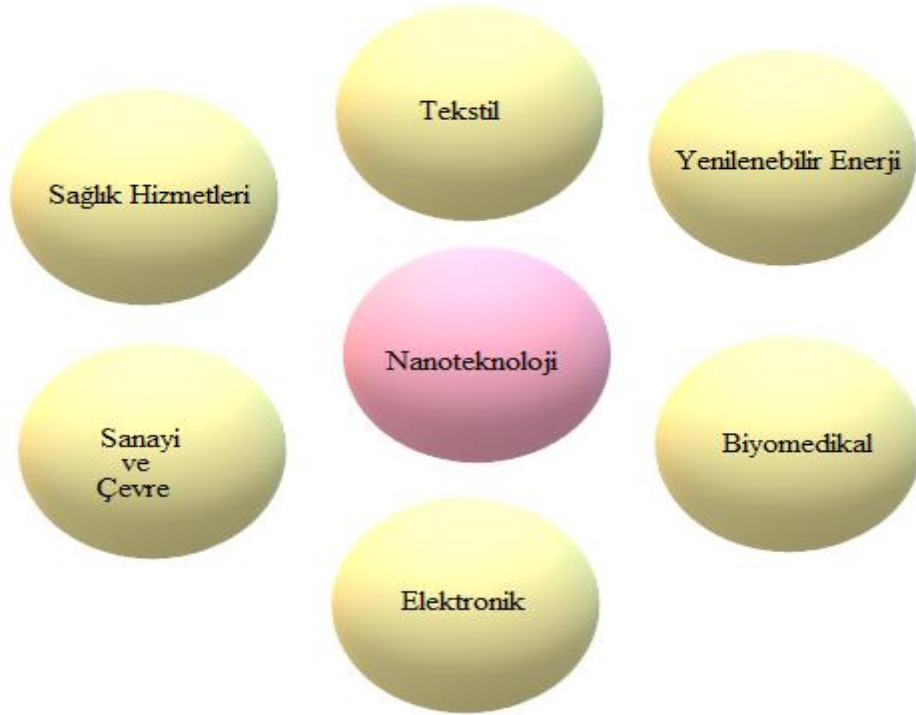
Çinko (Zn), gümüş (Ag), altın (Au), bakır (Cu), demir (Fe), palladyum (Pd) ve titanyum (Ti) günümüzde sık çalışılan nanopartiküllerin başında gelmektedir. Yeşil sentez yöntemiyle elde edilen nanopartiküllerin boyutları ve özellikleri kullanılan bitki türüne ve aynı bitkinin farklı kısımlarından elde edilen ekstraktlara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu nedenle araştırmacılar farklı bitki türlerini ve bitki kısımlarını kullanarak çeşitli nanopartikülleri yeşil sentez yöntemi ile üretilen özelliklerini araştırmaya devam etmektedir (Khan vd. 2021).

Bu tez çalışmasında Afyonkarahisar iline endemik bir bitki olan *Sideritis akmanii* türünün yaprak kısımlarından elde edilen ekstraktlar ve çinko oksit tuzu kullanılarak yeşil sentez tekniği ile elde edilen çinko oksit nanopartiküllerin (ZnONP) karakteristik özellikleri analiz edilmiştir. Elde edilen ZnONP'lerin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (A549) hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve genotoksik aktivitesi araştırılmıştır. Ayrıca çeşitli mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında ZnONP'lerin birçok alanda geniş bir kullanım ağına sahip olduğu ve yaygın olarak çalışıldığı tespit edilmiş olup, yeşil sentez yöntemi ile *Sideritis akmanii* türünün kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yeşil sentezde kullanılan özüt kaynağı değiştiğinde elde edilen nanopartiküllerin özellikleri de değiştiğinden bu çalışmada elde edilen verilerin kanser ve mikrobiyal enfeksiyon gibi hastalıklara karşı geliştirilebilecek çeşitli terapi yaklaşımlarına ışık tutması hedeflenmektedir.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Nanoteknoloji

Nanoteknoloji bilim alanında çığır açan ve sayısız fayda sağlayan büyüleyici bir teknolojidir. Maddeyi atomik düzeylerde manipüle ederek nano boyutlara sahip materyaller tasarlayan ve insanlığın kullanımına sunan teknoloji, mühendislik ve multidisipliner bir bilim dalıdır. Nanoteknolojinin moleküler düzeydeki temelini nanopartiküller oluşturmakta ve bu partiküller ile tasarlanan materyaller ise nanomateryal adını almaktadır. Nanoteknoloji, boyutları 1-100 nm arasında değişen parçacıklar ile çalışmakta olup bu partiküllerin özelliklerini aydınlatarak onları çeşitli alanlarda kullanılabilir kılmayı hedeflemektedir. Nano ölçekteki yapıların makro sistemlere entegrasyonunu yapmasının yanısıra, mikronaltı ölçeklere sahip olan fiziksel, kimyasal ve biyolojik sistemlerin üretimiyle de ilgilenmektedir. Geniş bir çalışma ağına sahip olan nanoteknolojinin başlıca uygulama alanları Şekil 2.1’de gösterilmiştir (Almeida vd. 2020).



Şekil 2.1 Nanoteknolojinin uygulama alanları.

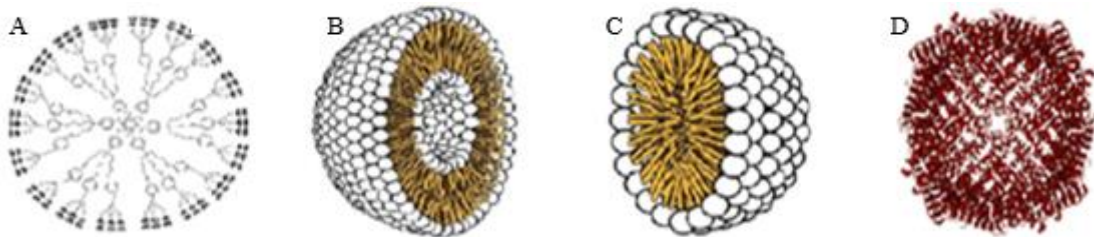
2.1.1 Nanopartiküller

Nanoteknolojinin odak noktası olan ve boyutları 1-100 nm arasında değişen partiküllere nanopartikül adı verilmektedir. Nanopartiküller doğal kaynaklar, kimyasallar ve yan ürünler olmak üzere çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir. Sahip oldukları küçük boyut ve yüksek yüzey alanları, farklı yapıları, gösterdikleri farklı reaktivite veya stabiliteleri, yüksek mekanik dayanıklılıkları ve çeşitli kimyasal yapıları sayesinde eşsiz özellikler sergilemektedirler. Küresel, silindirik, boru şeklinde, içi boş, konik, spiral, düz ya da düzensiz şekle sahip olabilen bu nanopartiküller gevşek ya da kümeli, tek veya çok kristalli yapılarda şekil alabilir. Tüm bu özellikler nedeni ile tıp, biyomedikal, endüstri, tekstil ve elektronik başta olmak üzere birçok alanda kullanım alanına sahiptir (Cho vd. 2013, Machado vd. 2015).

2.1.2 Nanopartiküllerin Tipleri

Nanopartiküller genellikle organik, inorganik ve karbon bazlı nanopartiküller olmak üzere üç kategori altında sınıflandırılmaktadır (Joudeh ve Linke 2022).

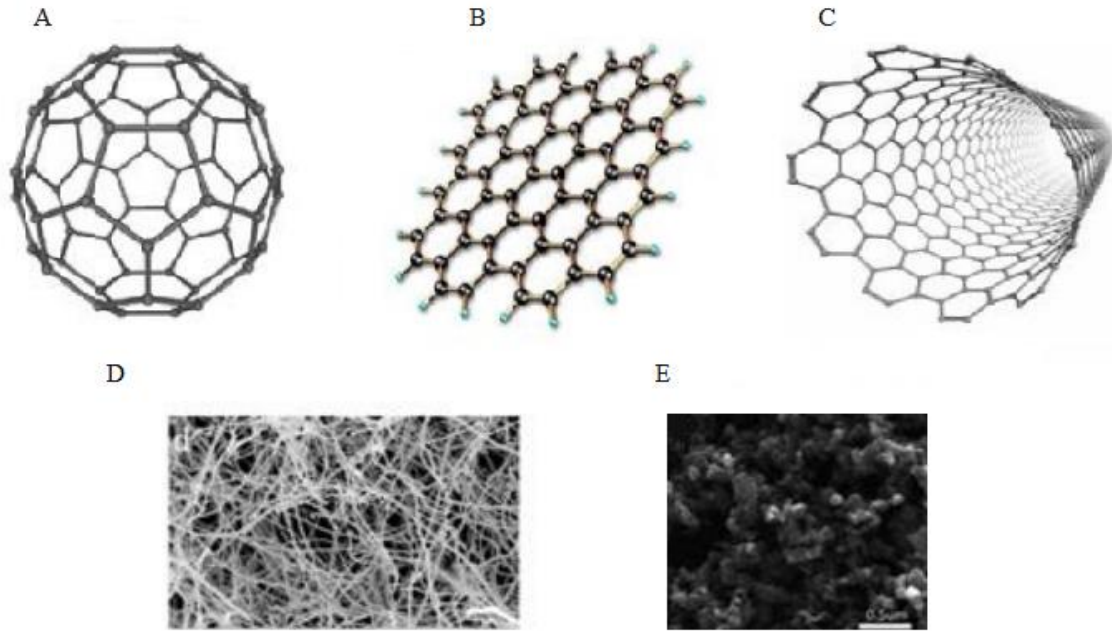
Organik yapıları nanopartiküller biyolojik olarak toksik olmayan ve parçalanabilir özellikte olup, ısı ve ışık gibi termal ve elektromanyetik radyasyona karşı duyarlıdır. Verimli özellikte olan organik nanopartiküller terapötik bir maddenin istenilen hedefe iletilmesi amacıyla kullanıma uygundur. Dendrimer, misel, ferritin ve lipozom yapıları organik nanopartikül yapısındadır. Organik yapıları nanopartiküller ilaç dağıtım sistemleri başta olmak üzere çeşitli biyomedikal uygulamalarda özellikle tercih edilen nanopartiküllerdendir. Şekil 2.2’de organik yapıları nanopartiküllere örnek yapılar gösterilmektedir (Ealia ve Saravanakumar 2017).



Şekil 2.2 Organik yapıları nanopartiküller (A. Dendrimerler, B. Lipozom, C. Misel, D. Ferritin).

İnorganik yapılı nanopartiküller ise karbon temelli olmayan nanopartiküllerdir. Metal ve metal oksit bazlı nanopartiküller genellikle bu kategori içinde sınıflandırılmaktadır. İnorganik yapılı nanopartiküller metallerden çeşitli yöntemlerle elde edilen nanopartiküllerdir. Çinko, alüminyum, kadmiyum, kobalt, bakır, gümüş, altın ve kurşun metalleri inorganik yapılı nanopartikül üretimi için yaygın olarak kullanılan metallere örnek olarak verilebilir. Metal oksit temelli nanopartiküller ise metal bazlı nanopartiküllerin özelliklerini değiştirmek amacıyla sentezlenmektedir. Örneğin, Fe nanopartikülleri, oksijen varlığında ve oda sıcaklığında reaktivitesi daha yüksek olan demir oksit (Fe_2O_3) nanopartiküllere dönüşmektedir. Metal oksit nanopartiküller, metal olanlara kıyasla yüksek verimlilik ve reaktivite sergilemektedirler. Çinko oksit (ZnO), alüminyum oksit (Al_2O_3), demir oksit (Fe_2O_3), titanyum oksit (TiO_2) ve seryum oksit (CeO_2) yaygın olarak bilinen metal oksit nanopartiküllere örnek olarak verilebilir (Ealia ve Saravanakumar 2017).

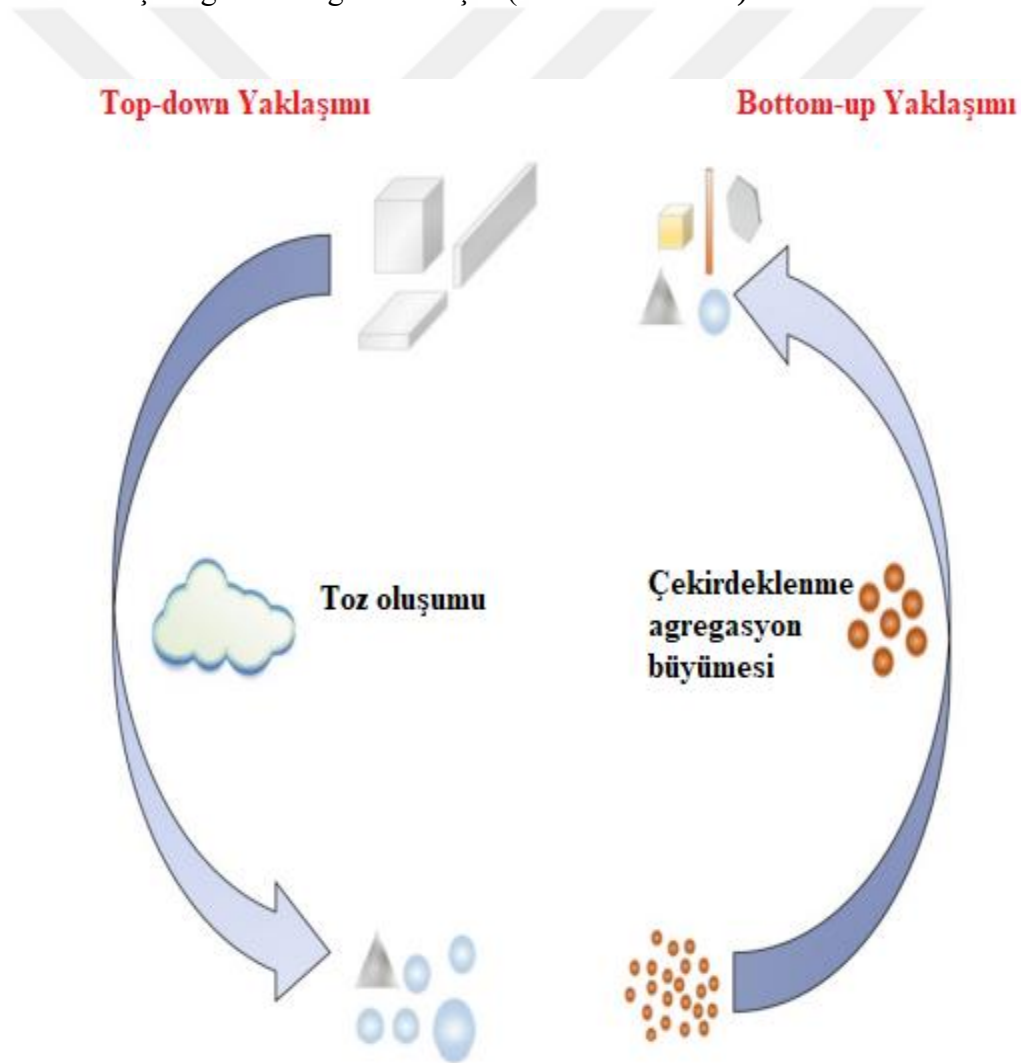
Karbon bazlı nanopartiküller ise tamamen karbondan meydana gelen nanopartiküllerdir. Şekil 2.3'te yapıları gösterilen karbon bazlı nanopartiküllere fullerenerler, grafen, karbon nano tüpler (CNT) ve karbon siyahı bilinen yaygın örneklerdir (Ealia ve Saravanakumar 2017).



Şekil 2.3 Karbon bazlı nanopartiküller (A. Fulleren, B. Grafen, C. Karbon nano tüpler, D. Karbon nanofiberler E. Karbon siyahı).

2.1.3 Nanopartiküllerin Üretim Yöntemleri ve Karakterizasyon Teknikleri

Nanoteknolojide, nanopartikül sentezi fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak çeşitli yollar ile gerçekleştirilebilmektedir (Baran vd. 2020). Tüm bu sentez tekniklerini içeren iki çeşit yaklaşım bulunmaktadır. Yukarıdan aşağıya (Top-Down) yaklaşımında büyük bir malzeme uygun teknikler ile daha küçük parçalara ayrılmaktadır. Aşağıdan yukarıya (Bottom-Up) yaklaşımında ise atomik ya da moleküler boyuta sahip yapılar çeşitli reaksiyonlar ile büyütülerek nanopartikül oluşumunun gerçekleşmesi sağlanmaktadır. Şekil 2.4'te yukarıdan aşağı ve aşağıdan yukarı yaklaşımları şematize edilmiştir (Daniel ve Astruc 2004, Shanmuganathan 2019, Xu vd. 2020). Nanopartikül üretimini sağlayan teknikler ise Çizelge 2.1'de gösterilmiştir (Khanna vd. 2019).



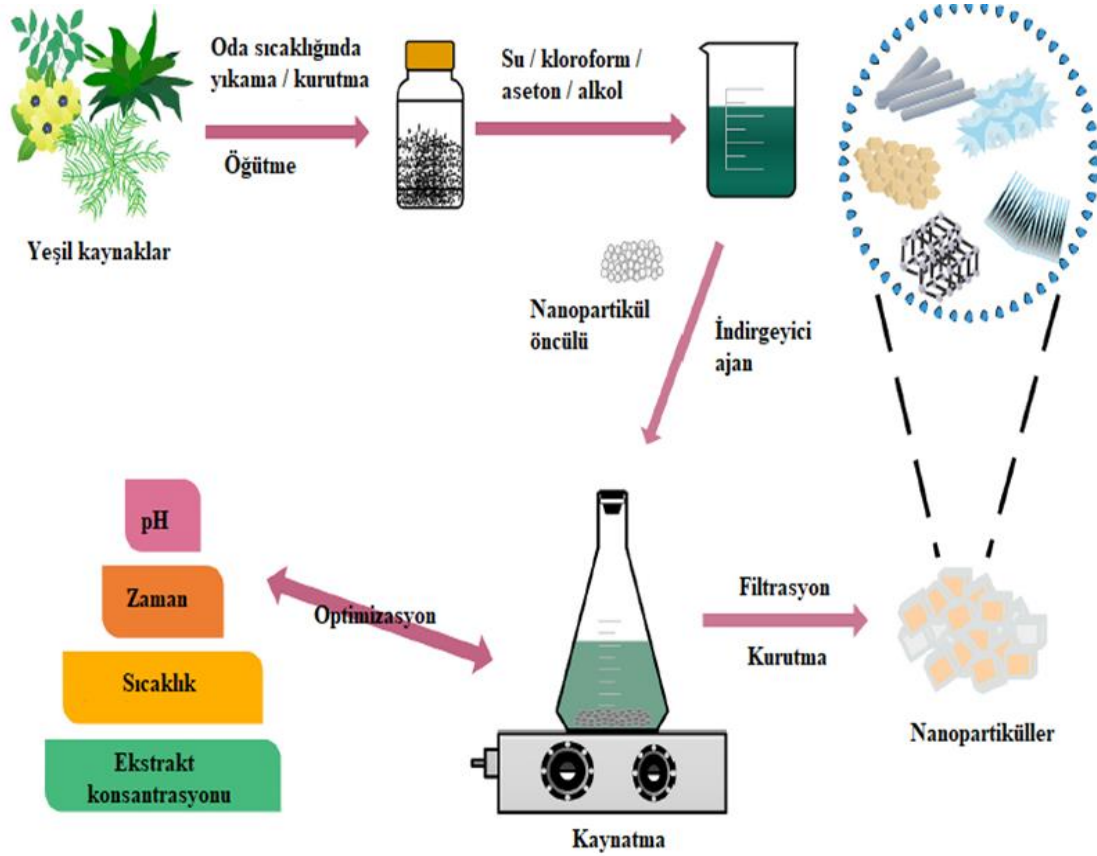
Şekil 2.4 Nanopartikül üretiminde kullanılan yaklaşımlar.

Çizelge 2.1 Nanopartikül üretiminde kullanılan teknikler.

Yaklaşım tipi	Teknik çeşidi
Top-down yaklaşımı	Mekanik-öğütme
	Bilye öğütme
	Lazer uzaklaştırma
	Püskürtme
	Kimyasal aşındırma
Bottom-up yaklaşımı	Aerosol prosesleri
	Lazer prolizi
	Sprey prolizi
	Sol-jel prosesleri
	Buhar biriktirme
	Kimyasal / Elektrokimyasal çökeltme
	Atomik / Moleküler yoğunlaşma
	Yeşil sentez

Yukarıdan aşağı yönde çalışan yaklaşım içinde yer alan mekanik öğütme ve bilye öğütme gibi çeşitli fiziksel teknikler maddi değeri yüksek ekipmanlar ile yüksek sıcaklık ve basınç gibi zorlayıcı koşullara ihtiyaç duymaktadır. Aşağıdan yukarı yönde çalışan yaklaşım içinde yer alan kimyasal tekniklerle nanopartikül sentezi süreçleri de hem zaman gerektiren hem de çevreye zarar verebilen kimyasal bileşenlerin açığa çıktığı tekniklerdir. Yeşil sentez ise tüm diğer tekniklere kıyasla non-toksik ve maliyeti düşük olan bir nanopartikül üretme tekniğidir. Günümüzde bilim insanları nanopartikül sentezi için yaygın olarak yeşil sentezi tercih etmektedir. Çevre dostu olan bu teknikle üretilen nanopartiküller biyo-uyumlu olduklarından tıp ve biyomedikal gibi birçok alanda kullanım alanı bulmaktadır. Aynı zamanda nanopartiküllerin antimikrobiyal ve antikanser aktiviteleri olduğu için çeşitli hastalıkların tedavisinde ve dezenfeksiyon işlemlerinde kullanılabilir olması yeşil sentez tekniğinin tercih edilebilirliğini artırmaktadır (Parveen vd. 2016, Agarwal vd. 2017). Nanopartikül üretim süreçlerinde sıcaklık, pH, konsantrasyon, ışık ve çalkalanma gibi çeşitli fiziksel koşullar elde edilecek nanopartiküllerin şekil ve boyutlarında değişikliklere neden olabilecek değişkenlere örnek olarak verilebilir (Singh vd. 2015).

Bir bitkiye ait yaprak, çiçek, meyve gibi kısımlardan elde edilen ekstraktın üretilmek istenilen nanopartiküle ait metal tuzu ile uygun pH ve sıcaklıkta karşılaştırılarak yeterli kadar beklenmesi sonucu nanopartikül üretiminin sağlandığı yeşil sentez tekniğine ait basamaklar Şekil 2.5’te verilmiştir (Dutta ve Sugumaran 2021).



Şekil 2.5 Yeşil sentez süreci.

Nanopartiküllerin elde edilme sürecinde kullanılan kaynak ve ekstraktın içeriğindeki değişim, üretilen nanopartiküllerin özelliklerinin farklı olmasına neden olmaktadır. Sentezlenen nanopartiküller sahip oldukları çeşitli özellikler bakımından analiz edilerek kullanılabilirliği açısından değerlendirilmektedir. Nanopartikül karakterizasyonu yapmaya yarayan çeşitli teknikler kullanılarak üretilen nanopartiküllerin boyutu, dağılımı, optik özellikleri, yüzey bileşimi ve alanı, kristal yapısı, kristal tane boyutu, konsantrasyonu, fonksiyonel grupların çeşitleri ve moleküler konformasyonu, mevcut atomların türü ve miktarı, yüzey yükü, ligand bağlanması gibi özellikleri tespit edilebilmektedir. Nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılan bazı yöntemler Çizelge 2.2’de verilmiştir (Mourdikoudis vd. 2018, Khan vd. 2021).

Çizelge 2.2 Nanopartikül karakterizasyon teknikleri.

Teknik	Özellik
UV-VIS	Optik özellikler Boyut Stabilite Partikül miktarı
FT-IR	Konsantrasyon Yüzey analizi Fonksiyonel grup tespiti
TEM	Morfoloji Boyut Kristal yapı
SEM	Yüzey analizi (3B) Boyut
AFM	Yüzey topolojisi Morfoloji Boyut Pürüzsüzlük Yüzey alanı ve hacim dağılımı
XRD	Nanopartikül kristalindeki elektronların yoğunluğunun 3B görüntüsü ve kırınım açısı
EDS	Elementel bileşim Bolluk Saflık
XRPCS	Spesifik kimyasal grupları saptama
XRF	Elemental bileşim analizi Film kalınlığının analizi

Ultraviyole-Görünür spektroskopisi (UV-VIS) nanopartiküllerin boyutunu, konsantrasyonunu, optik özelliklerini, toplanma derecesini değerlendirmek ve kararlılığını izlemek için kullanılır. Nanomalzemelerde gerçekleşen elektronik geçişler ile ilgili bilgi sağlar. Yarı iletkenlerdeki kullanışında, değerlik bandı ile iletim bandı

arasındaki elektronik geçişleri araştırdığı için optik bant boşluğunu tahmin etmek için uygun bir yöntemdir (Mourdikoudis vd. 2018, Yakut ve Kum 2022).

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) örnek yüzeyini düşük enerjili bir elektron demeti ile tarayarak görüntüsünü oluşturmaya yarayan bir tekniktir. Nano skaladaki yapıların kimyasal yapılarının ve morfolojilerinin analizi için yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir. Yüzey tayini ve boyut belirlenmesinde etkili olup tüm bu özellikleriyle bilim ve teknoloji alanlarında geniş bir kullanım alanına sahiptir (Yakut ve Kum 2022).

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) nano skalada çok küçük ve ince bölgelerden milyon katı büyüttmeler ile morfolojik ve kristalografik veriler elde edilmesini mümkün kılmaktadır. Bir elektron demetinin örnekten geçişini görüntüleyen yüksek büyütme tekniği olan bu yöntem ile parçacık ve tane büyüklüğü, büyüklük dağılımı, morfolojik yapı gibi özellikler analiz edilebilmektedir (Ateş 2018).

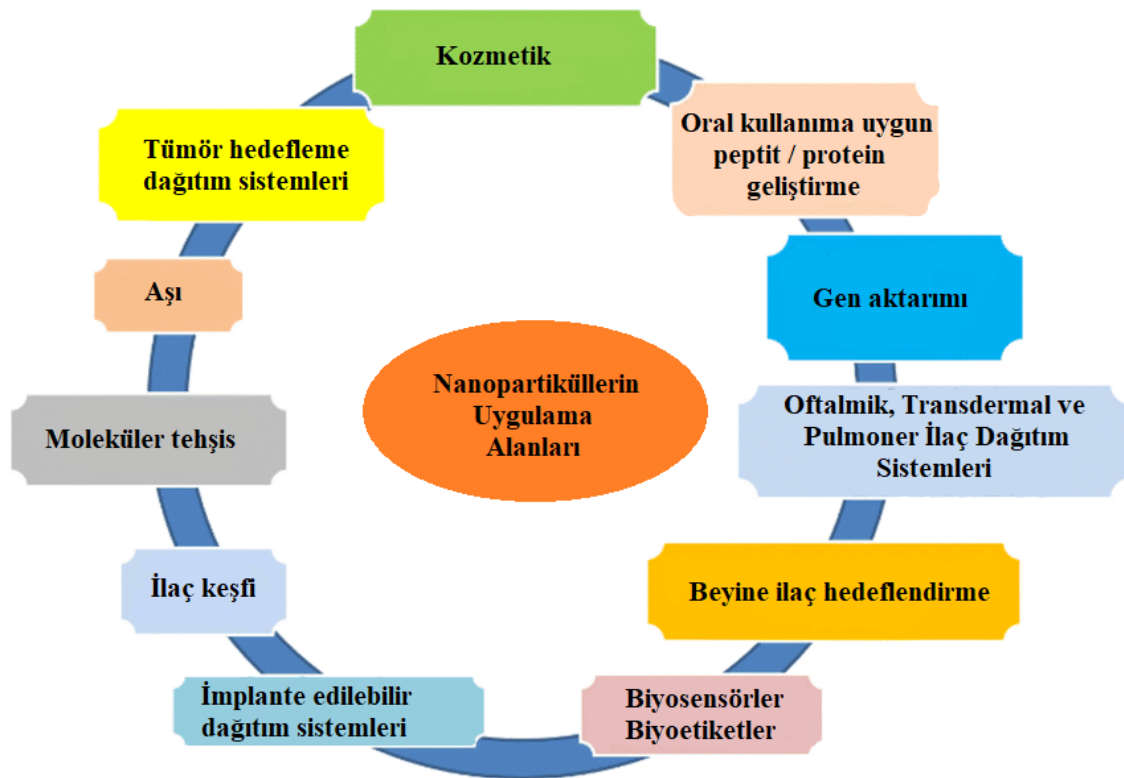
X-Işını Difraksiyon (XRD) spektroskopisi ile yapılan analizler ilgili maddenin spesifik kırınım deseni temellidir. Kristalografik yapının belirlenmesinde temel tekniklerden biri olup, kristal katıların atomik yapılarına göre kimliğini belirleyen bir tekniktir. Bileşim, kristal yapı ve boyut gibi parametreler hakkında bilgi vermektedir (Selmani vd. 2022).

Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometre (FT-IR) tekniği dipol momente sahip bir maddenin kızıl ötesi ışıkla etkileşmesi sonucu madde içerisinde yer alan bağların titreşmesine dayanmaktadır. İncelenecek örnekteki makro moleküllerin işlevsel gruplarının titreşimlerine bağlı olan yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel bilgilerin analizini sağlamaktadır. Bağların tanımlanmasında etkili olup; nanopartiküllerin konsantrasyonu, yüzey analizi ve fonksiyonel grupların tespit edilmesinde de kullanılmaktadır (Ateş 2018).

2.1.4 Nanopartiküllerin Uygulama Alanları

Nanoteknolojide çeşitli yöntemler ile elde edilen nanopartiküller sahip oldukları karakteristik özellikler nedeniyle antikanser ve antimikrobiyal uygulamalar, spesifik ilaç

salınımı ve yara iyileşmesi, kimyasal sensörler ve kozmetik uygulamalar, aşı geliştirme süreçleri, biyolojik sensörlerin ve biyolojik etiketlerin üretimi, gen aktarımı uygulamaları, hastalıkların moleküler tanısı, ağız yoluyla kullanılabilir peptit ve protein yapıları terapötiklerin tasarlanması ve paketlenmesi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin günümüzde ve gelecekteki kullanım alanları Şekil 2.6’da verilmiştir (Singh vd. 2016, İnt. Kyn. 1).

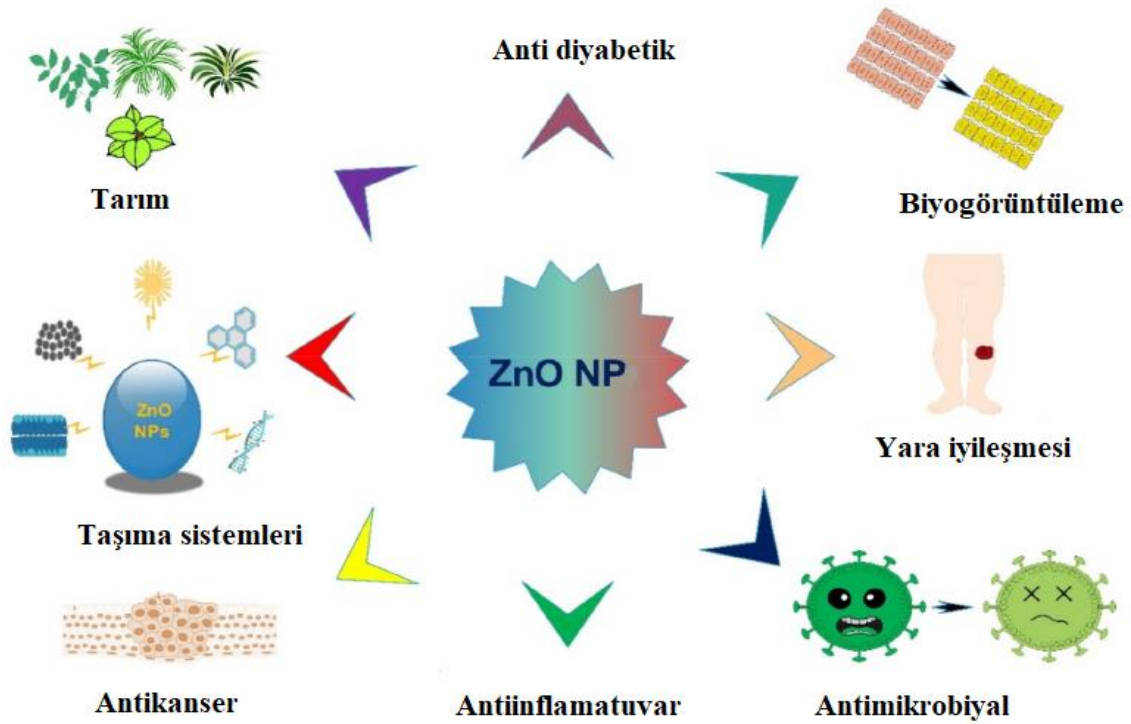


Şekil 2.6 Nanopartiküllerin günümüzde ve yakın gelecekteki kullanım alanları.

2.1.5 Çinko Oksit Nanopartiküllerin Önemi

Çinko oksit nanopartiküller sergiledikleri benzersiz özellikler nedeniyle bilim dünyasında ilgi odağıdır. Geniş radyasyon kapasitesi, etkili sentetik kararlılıkları ve yüksek kuplaj katsayılarından dolayı dikkat çekici fiziksel ve kimyasal özellikler sergileyen çinko oksit nanopartiküller çok boyutlu malzeme niteliği taşımaktadır. Çinko oksit nanopartiküllerin ilk kullanımı kauçuk endüstrisinde aşınmaya karşı direnç oluşturmada karşımıza çıkmaktadır. Biyoyumlu olmaları nedeniyle Amerika Bileşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından güvenli kabul edilen çinko oksit

nanopartiküller çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanım alanı bulmaktadır (Sahoo vd. 2007, İnt. Kyn. 2). Çinko oksit nanopartiküller antikanser, antidiyabetik, antimikrobiyal, yara iyileştirme, UV engelleme ve ilaç taşınımı gibi önemli süreçlerde kullanılmaktadır. Şekil 2.7’de ZnONP’lerin kullanıldığı önemli biyomedikal uygulamalara örnekler gösterilmektedir (Dutta ve Sugumaran 2021).



Şekil 2.7 Çinko oksit nanopartiküllerin biyomedikal açıdan önemi.

2.2 Lamiaceae Familyasının Genel Özellikleri

Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyası kutup bölgeleri hariç dünya üzerinde geniş yayılım gösteren kapalı tohumlu bitkiler sınıfında yer almaktadır. Nane ailesi olarak da bilinen familyanın üyeleri genellikle otsu formda olup, nadir olarak çalı ve ağaç formunda olan üyeleri de bulunan çiçekli bitkilerdir. Yaprakları çevresel ya da karşılıklı olarak diziliş gösteren bu familyanın üyelerinde basit veya bileşik yapılı yapraklara rastlanmaktadır. Dört köşeli gövde yapısı karakteristiktir ve kollenkima demetleri içermektedir. Üyeler kazık veya yumru yapıda köke sahiptir. Kümelenme gösteren çiçekler başaklar üzerinde ya da yaprak koltuklarında konumlanmakta ve genellikle ginodioik ya da hermafrodit özellik sergilemektedir. Üst konumlu ovaryum karpelli

yapıda olmakla birlikte, dört lop ve iki lokus ihtiva etmektedir. Didinam düzenine sahip olan korollaya bağlı stamen sayısı iki ile dört arasında değişkenlik göstermektedir. Bir veya iki keseli yapıda anter tekası bulunmaktadır. Ovaryum içindeki tohum taslakları bazal veya aksenal düzendedir. Lamiaceae familyası için ayırt edici bir diğer özellik dört nukta ayrılan meyve şeklidir (Davis 1982, Seçmen vd. 1995, Baytop 1999, Tanker vd. 2007, Temel vd. 2015, Abdelhalim ve Hanrahan 2021).

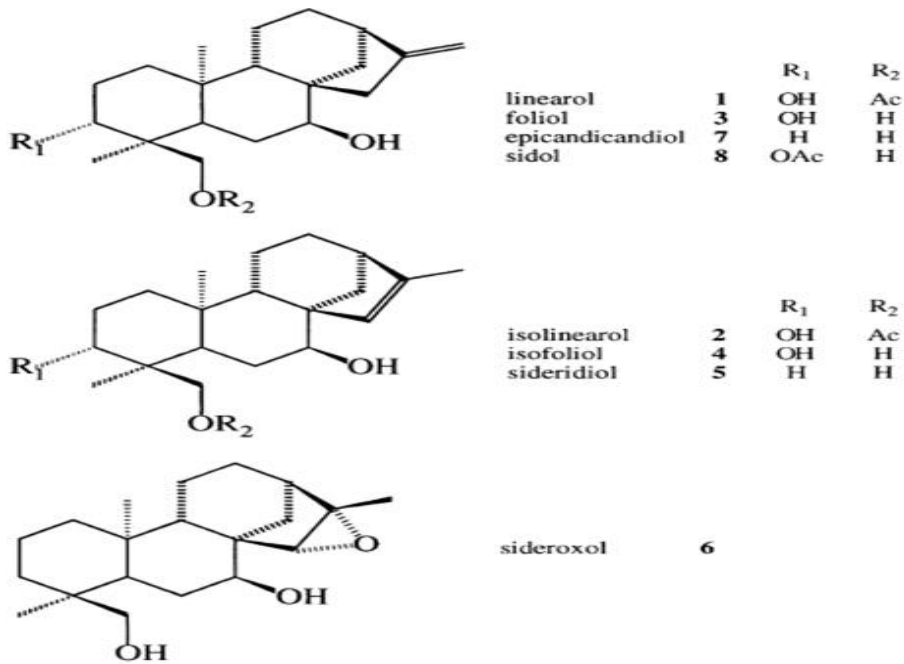
Türkiye'deki en büyük üçüncü familya olan *Lamiaceae* üyelerinin %45'lik endemizm içerdiği bilinmektedir. Tıbbi açıdan önemli olan ve ayrıca gıda alanında da kullanılan çok sayıda tür içeren bu familya ülkemizde 46 cins ve 844 tür ile temsil edilmektedir. *Lamiaceae* familyasında yer alan bitkiler farklı özelliklere sahip sekonder metabolitler ihtiva etmektedir. Tıbbi öneme sahip olan flavonoid, terpenoid, esansiyel lipid ve steroidlere sahip olmaları nedeniyle mikroorganizmaları yok etme, inflamasyonu baskılama, reaktif oksijen bileşiklerini etkisiz hale getirme, fungal enfeksiyonları giderme gibi biyolojik etkileri vardır. Familya üyeleri bu özellikleri nedeniyle dünya genelinde hem besin hem de tıbbi bitki olarak kullanım alanı bulmaktadır. Ayrıca bu familyaya ait bitkilerin soğuk algınlığı, sindirim sistemi rahatsızlıkları, menstrüasyon gecikmeleri ve kanser gibi sorunlar ile mücadelede etkili oldukları uzun yıllardır bilinmektedir (Fecka ve Turek 2008, Kahraman vd. 2009, Kamatou vd. 2010, Gökşen 2016, Ayaz 2021, Çatak ve Atalay 2022, İnt. Kyn. 3).

2.2.1 *Sideritis* Cinsi

Akdeniz Bölgesi'nde 150'den fazla türü olduğu bilinen *Sideritis* cinsinin diğer adı dağ çayıdır. Ayrıca halk arasında sarıkız çayı, kuyruk çayı, adaçayı, yayla çayı gibi farklı isimlerle anılmaktadır. Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinde bitkisel çay olarak tüketilen *Sideritis* türlerinin ayrıca tıbbi bitki olarak çeşitli hastalıkları gidermede kullanıldığı da uzun yıllardır bilinmektedir. Sindirim sistemi sorunlarının çözümü, bağışıklık sistemini güçlendirici, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri ile enfeksiyon giderici, anksiyete ve ağrıyı azaltıcı, gaz giderici, antiviral ve antifungal özellikleri olan *Sideritis* cinsi ülkemizde 45 tür ve 15 alt tür olmak üzere toplam 60 takson ile yayılım göstermektedir. Türkiye için endemizm oranı yaklaşık %66.6'dır

(Kırimer vd. 2004, Gümüşçü vd. 2011, İnt. Kyn. 4). *Sideritis* türleri ile yapılan çeşitli çalışmalar incelendiğinde bu cinse ait bitkilerden elde edilen özütlerin analjezik, antioksidan, antienflamatuvar, antibakteriyel ve antistres etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yine bu türlere ait çok sayıda terpen bileşikleri ve uçucu yağlar ile ilgili çalışmalar mevcuttur. *Sideritis* cinsine ait bitkilerde farklı oranlarda ve çeşitte monoterpen, diterpen ve seskiterpen açısından zengin uçucu yağ çeşitleri bulunmaktadır (Ezer vd. 1994, 1996, Öztürk vd. 1996, Aydın vd. 1996, Tunalıer vd. 2004, Berber ve Aksoy 2021, Aksoy vd. 2022).

Anadolu Üniversitesi ve Palermo Üniversitesi iş birliği ile yapılan ve sonuçları 2000 yılında yayımlanan bir araştırmada *Sideritis akmanii* bitkisinin de içinde bulunduğu ve Türkiye florasına ait beş *Sideritis* türünün sekonder metabolitlerinden diterpen içerikleri ile ilgili veriler değerlendirilmiştir. Toplamda 8 çeşit diterpen varlığı tespit edilmiş olup bunlardan linearol, isolinearol, foliol, isofoliol, sideridiol ve sideroxol bileşiklerine *Sideritis akmanii* türünde rastlanırken, epicandicandiol ve sidol bileşiklerine rastlanamamıştır. Çalışmada analiz edilen bu bileşiklerin kimyasal yapıları Şekil 2.8’de ve araştırma yapılan türler ile bu bileşiklerin bulunma oranları ise Çizelge 2.3’te verilmiştir (Bondi vd. 2000).



Şekil 2.8 Bazı *Sideritis* türlerinde analiz edilen diterpenlerin kimyasal yapıları.

Çizelge 2.3 Bazı *Sideritis* türleri ve içerdikleri diterpen çeşitleri ile oranları.

Tür	a	b	c	d	e	f	g	h
<i>Sideritis akmanii</i>	10.5	3.0	2.2	2.3	5.1	3.8		
<i>Sideritis niveotomentosa</i>	27.5		4.4				5.4	
<i>Sideritis brevidens</i>	16.6						1.7	5.5
<i>Sideritis rubriflora</i>	14.1					2.3	2.4	3.0
<i>Sideritis gulendamii</i>	11					2.2		

* Beş *Sideritis* türündeki ent-kaurane diterpenoidlerin (a-h) miktarları (mg/100 g bitki kuru ağırlığı)

* a.Lineraol, b.isolinerol, c.foliol, d.isofoliol, e.sideridiol, f.sideroksol, g.epicandiciol h.sidol

Ayrıca böcekleri bitkiden uzak tutmayan ancak bu bitkiyle beslenmelerini engelleyen bitkisel sekonder metabolitlere antifeedant adı verilir ve bu komponentlerin iki *Sideritis* türüyle antifeedant aktivite gösterdikleri saptanmıştır (Bondi vd. 2000).

2.2.2 Türkiye’de Yetişen *Sideritis* Türleri

Ülkemizde bulunan *Sideritis* cinsine ait taksonlar ve endemizm durumları Çizelge 2.4’te verilmiştir (İnt. Kyn. 4).

Çizelge 2.4 Türkiye sınırları içinde yer alan *Sideritis* taksonları.

Takson adı	Türkçe adı	
<i>Sideritis akmanii</i>	Kuyrukçayı	E
<i>Sideritis albiflora</i>	Akçiçekçayı	E
<i>Sideritis amasiaca</i>	Bodurçay	E
<i>Sideritis arguta</i>	Kökçayı	E
<i>Sideritis argyrea</i>	Boz eşekçayı	E
<i>Sideritis armeniaca</i>	Yüzükçayı	E
<i>Sideritis athena</i>	Kedikuyruğu çayı	
<i>Sideritis bilgerana</i>	Altınbaş çayı	E
<i>Sideritis brevibracteata</i>	Hacımemetli çayı	E
<i>Sideritis brevidens</i>	Gülner çayı	E
<i>Sideritis caesarea</i>	Topalçay	E

Çizelge 2.4 (Devam). Türkiye sınırları içinde yer alan *Sideritis* taksonları.

<i>Sideritis cilicica</i>	Kandilçayı	E
<i>Sideritis condensata</i>	Kozalıkekik	E
<i>Sideritis congesta</i>	Başakçayı	E
<i>Sideritis dichotoma</i>	Çatayçay	E
<i>Sideritis erythrantha</i>	Morçay	
<i>S. erythrantha</i> subsp. <i>cedretorum</i>	Karlıkçayı	E
<i>S. erythrantha</i> subsp. <i>erythrantha</i>	Morçay	E
<i>Sideritis galatica</i>	Kırçayı	E
<i>Sideritis germanicopolitana</i>	Karakurbağa çayı	
<i>S. germanicopolitana</i> subsp. <i>Germanicopolitana</i>	Karakurbağa çayı	E
<i>S. germanicopolitana</i> subsp. <i>viridis</i>	Köseçay	E
<i>Sideritis gulendamii</i>	Hanımçayı	E
<i>Sideritis hispida</i>	Sertçay	E
<i>Sideritis hololeuca</i>	Çalıçayı	E
<i>Sideritis huber-morathii</i>	Şenköy çayı	E
<i>Sideritis lanata</i>	İpekçayı	
<i>Sideritis leptoclada</i>	Kızlançayı	E
<i>Sideritis libanotica</i>	Gevreğen	
<i>S. libanotica</i> subsp. <i>kurdica</i>	İnceçay	
<i>S. libanotica</i> subsp. <i>libanotica</i>	Gevreğen	
<i>S. libanotica</i> subsp. <i>linearis</i>	Torosçayı	
<i>S. libanotica</i> subsp. <i>microchlamys</i>	Zühreçayı	
<i>S. libanotica</i> subsp. <i>violascens</i>	Topukluçay	E
<i>Sideritis lycia</i>	Kemer çayı	E
<i>Sideritis montana</i>	Karaçay	
<i>S. montana</i> subsp. <i>montana</i>	Karaçay	
<i>S. montana</i> subsp. <i>remota</i>	Mor karaçay	
<i>Sideritis niveotomentosa</i>	Duvaklı çay	E
<i>Sideritis ozturkii</i>	Paşa çayı	E
<i>Sideritis perfoliata</i>	Fincançayı	

Çizelge 2.4 (Devam). Türkiye sınırları içinde yer alan *Sideritis* taksonları.

<i>Sideritis phlomoides</i>	Tilkiçayı	E
<i>Sideritis phrygia</i>	Taşlıkçayı	E
<i>Sideritis pisdica</i>	Eldiven çayı	E
<i>Sideritis romana</i>	Zarifçayı	
<i>S. romana subsp. curvidens</i>	Eğriçayı	
<i>S. romana subsp. romana</i>	Zarifçayı	
<i>Sideritis rubriflora</i>	Gülçayı	E
<i>Sideritis scardica</i>	Pazlak çayı	
<i>S. scardica subsp. scardica</i>	Pazlak çayı	
<i>Sideritis serratifolia</i>	Fenerli çayı	E
<i>Sideritis sipylea</i>	Sipil çayı	E
<i>Sideritis stricta</i>	Tilkikuyruğu çayı	E
<i>Sideritis syriaca</i>	Amanos çayı	
<i>S. syriaca subsp. nusairiensis</i>	Amanos çayı	E
<i>Sideritis taurica</i>	Kırımçayı	
<i>Sideritis tmolea</i>	Sivriçayı	E
<i>Sideritis trojana</i>	Sarıköz çayı	E
<i>Sideritis vulcanica</i>	Madençayı	E
<i>Sideritis vuralii</i>	Babaçayı	E

E: Endemizm

2.2.3 *Sideritis akmanii* Türünün Taksonomik Hiyerarşisi ve Özellikleri

Bilimsel taksonomisi aşağıda verilmiştir (İnt. Kyn. 5).

Kingdom: Plantae

Division: Tracheophyta

Subdivision: Spermatophytina

Class: Magnoliopsida

Suporder: Asteranae

Order: Lamiales

Family: *Lamiaceae*

Genus: *Sideritis* L.

Species: *Sideritis akmanii*

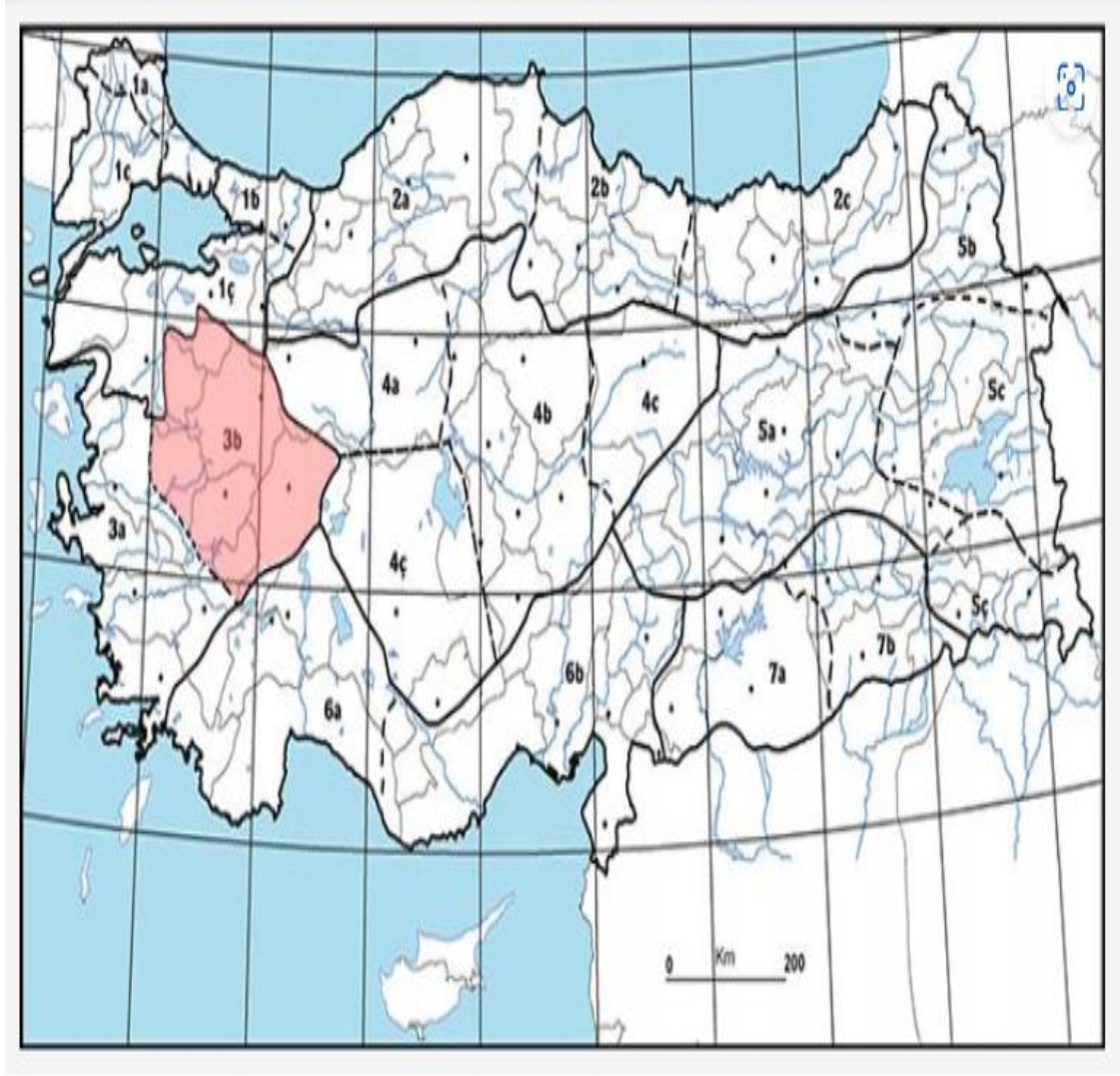
Sideritis akmanii türü Şekil 2.9 ve 2.10'da gösterilmiştir. Kuyruk çayının ülkemizdeki yayılışı Şekil 2.11'de verilmiştir (İnt. Kyn. 7).



Şekil 2.9 *Sideritis akmanii* (İnt. Kyn. 6).



Şekil 2.10 *Sideritis akmanii* (Duman vd. 1995).



Şekil 2.11 *Sideritis akmanii* türünün ülkemizdeki yayılışı (3b İç Batı Anadolu).

Sideritis akmanii bitkisinin uçucu yağ bakımından içeriği Çizelge 2.5'te verilmiştir (Aksoy vd. 2022). Ülkemizde endemik bir tür olan *Sideritis akmanii* bitkisinin günlük yaşamda kullanılan adı kuyruk çayıdır. *Sideritis akmanii* bitkisinin habitatu Afyonkarahisar ilindeki Kumalar yaylasıdır. Aromatik bitki özelliği taşıyan bu tür otsu bir bitki olup, yaprakları açık yeşil renklidir. Boyları yaklaşık bir metre ve çok yıllık yapıda olan bu bitkinin üst kısmında bulunan sarımsı renkteki mukronat yaprakları 0.5 mm kalınlığındadır. Alt kısımda yer alan yaprakların sapı 1-3 cm olup beyaz ipeksi tüylere sahiptir. Bu yaprakların ucu sivri ve uzundur. Üst kısımda yer alan yapraklar sapsız olup birbirine kenetlenmiş durumdadır. Orta kısımda konumlanan yaprakların sapları ise 0.5-2.5 cm uzunluktadır (Edinburg 1982, Duman vd. 2015, Aksoy vd. 2022, İnt. Kyn. 6).

Çizelge 2.5 *Sideritis akmanii* bitkisinin uçucu yağ bileşenleri ve yüzde dağılımı.

Kimyasal bileşen	Bağıl yüzde (%)
β -Burbone	0.5
β -Caryophyllen	1.1
α -Acoradiene	1.0
Curcumen	4.5
Caryophyllen oxide	5.7
Hexahydrofarnesyl acetone	1.5
Spatulenol	8.0
Turmerol	1.3
α -Bisabolol	1.5
9-Geranyl-p-cymene	3.1
Kaur-15-en	0.6
Caryophylla-2(12),6-dien-5 β -ol	1.3
Manoyl oxide	1.3
Dodecanoic acid (Lauric acid)	0.5
(E)-9-octadecen-1-ol (trans-elaidyl alcohol)	0.7
Tetradecanoic acid (myristic acid)	11.0
8,12-epoxy-13-hydroxy-14-ene-labdien	1.1
Pentadecanoic acid	0.6
Hexadecanoic acid (palmitic acid)	17.9
(Z)-Hexadecenoic acid (palmitoleic acid)	1.2
(Z)-9-octadecenoic acid (oleic acid)	2.2

Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler oksidatif stresi önleyici, enflamasyonu engelleyici serbest radikalleri süpürücü, biyokimyasal reaksiyonları mümkün kılan enzimleri düzenleyici ve hücre proliferasyonunu inhibe edici özellikler sergilemektedir. *Sideritis* türleri de diğer aromatik bitkiler gibi flavonoid bakımından zengin bitkilerdir. *Sideritis akmanii* bitkisinde sideridiol, sideroksol, linearol, izolinearol, folanol ve izofiolol fitokimyasalları bulunmaktadır. Fenolik bileşiklerin ve antioksidan aktivitenin tespiti için yapılan çalışmalarda kullanılan çözücü aseton olduğunda elde edilen ekstraktlarda bulunan fenolik bileşik miktarının metanol ekstraktına kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Aksoy vd. 2022). *Sideritis akmanii* türünün mineral madde bakımından içeriği Çizelge 2.6’da verilmiştir (Güzey 2017, Aksoy vd. 2022).

Çizelge 2.6 *Sideritis akmanii* türünün mineral madde içeriği.

Mineral madde	Miktar (ppm)	Mineral madde	Miktar (ppm)
Al	891.64±46.78	K	1904.69±86.48
B	7.884±0.96	Li	0.619±0.28
Ba	31.02±0.98	Mg	907.26±35.96
Bi	3.634±0.64	Mn	32.05±3.46
Ca	1344.5±92.5	Na	461.68±28.59
Cr	2.13±0.17	Ni	1.23±0.16
Cu	6.23±1.82	Pb	3.21±0.83
Fe	1264.37±26.75	Zn	10.01±2.06

Se, Be ve Co elementlerine ait konsantrasyonlar belirlenebilir sınırlar içerisinde olmadığından bu elementlere ait konsantrasyonlar belirlenememiştir.

2.3 *Sideritis* Türleri ile Yapılan Çeşitli Çalışmalar

Metalik nanopartiküller fiziksel ve kimyasal yollarla sentezlenebilmesine rağmen bu tekniklerin olumsuz yanları bilim insanlarını alternatif yollar aramaya sevk etmiştir. Bitkilerden elde edilen ekstraktlar; kolay erişilebilme, biyoyumlu olma, çevreye zarar vermeme, yüksek kararlılık sergileme ve düşük maliyet gibi avantajlara sahip olduğundan farklı nanopartiküllerin sentezinde kullanılmak üzere büyük ilgi görmektedir. Bu ekstraktların içinde bulunan terpenler, polifenoller, alkaloidler ve diğer bitkisel metabolitler nanopartikül sentezinde indirgeyici ve koruyucu özellikte önemli işlevler sergilemektedir. Çay ve bitkisel preparatlar insan diyetinin önemli fenolik bileşik kaynaklarından (Shahidi 2000).

Dağ çayı türleri farklı çeşitte metabolitler içerdiğinden dolayı çeşitli uygulamalarda *Sideritis* cinsine ait farklı türlerden uzun yıllardan beri yararlanılmaktadır (Ceylan vd. 2021).

Bu çalışmada kullanılan *Sideritis akmanii* bitkisi Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından onaylı Tıbbi ve Aromatik Bitkiler kategorisinde yer almakta olup Afyonkarahisar Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Merkezi tarafından hem Türkiye sınırları içinde hem de ihracat yoluyla ticareti yapılan, önemi yüksek bir tıbbi bitki olup, Şekil 2.12’de gösterilmektedir (İnt. Kyn. 8).



Şekil 2.12 Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından onaylı *Sideritis akmanii*.

2.3.1 Geleneksel Uygulamalar ile İlişkili Çalışmalar

İnsanlar çok eski çağlardan beri bitkileri gıda maddesi, aroma verici, yakı, tonik, çay ve hastalık giderici gibi çeşitli amaçlara yönelik kullanmaktadır. Farklı aromalara sahip olan *Sideritis* türlerinin ülkemizde bitkisel çay olarak kullanımı oldukça yaygındır. *S. mugronensis*'in tansiyonu düşürdüğü ve sinir sistemi üzerine etkili olduğu, ayrıca *S. congesta* ve *S. arguta*'nın spazm gidermek amacıyla kullanıldığı bilinmektedir (Çarıkçı 2010).

Halk arasında bazı *Sideritis* türleri gaz söktürme, iştahı açma, mide ağrılarını giderme amacıyla uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bazı diğer ülkelerde histeri ve soğuk algınlığına karşı kullanıldığı bilinmektedir. Yine bazı *Sideritis* bitkilerinden elde edilen metanol ve hexana içeren ekstraktların ateş düşürme etkileri bulunmaktadır (Sarı vd. 2005). Bazı *Sideritis* türlerinde bulunan diterpenlerden epoksi yapıdaki bir bileşiğin böcek kovucu etkisi amacıyla kullanım alanı bulabileceği rapor edilmiştir (Bondi vd. 2000, Köse vd. 2010). Yine başka bir çalışmada, söğüt ekstraktları ile mordanlanmış

çeşitli kumaşların ve ahşap malzemelerin *Sideritis trojana ehrend* taksonundan elde edilen sarı renkli boyar maddenin doğal boyamadaki verimliliği araştırılmıştır (Acar 2014).

2.3.2 Biyolojik Aktiviteler ile İlişkili Çalışmalar

Sideritis cinsine ait türlerin birçok toplumda insanlar tarafından çeşitli hastalıkların giderilmesi amacıyla kullanıldığı yapılan etnofarmakolojik araştırmalar ile gösterilmektedir. Balkan yarımadasında endemik tür olan *S. scardia* alternatif tıpta bronşit, soğuk algınlığı, amfizem, gastrointestinal bozukluklar, enflamasyon ve anemi gibi sorunların giderilmesinde uzun yıllardır kullanılmaktadır (Todorova ve Trendafilova 2014). Bitkilerin tıbbi amaçla kullanımı ve hastalıkları iyileştirici etkileri, bilim insanlarını bu bitkilerin hastalıkları nasıl iyileştirdiğini aydınlatmaları amacıyla çalışmalar yapmaya sevk etmektedir. Yapılan literatür taramasında, çeşitli *Sideritis* türlerinin biyolojik aktiviteleri hakkında sonuçlar ortaya koyan bazı araştırmalar tezin bu kısmında özetlenmektedir. Tunalier ve arkadaşları (2004) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada Türkiye florasına ait 27 farklı *Sideritis* türünün fenolik kompozisyonu ve antioksidan aktivite etkileri analiz edilmiştir. Ekstraktların yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizleri sonucu fenolik bileşiklerin yüzdesi benzoatlar, hidroksi sinamatlar ve flavonoidler olarak hesaplanmıştır. Kanseri, kardiyovasküler hastalıklar ve yaşlanma gibi kritik süreçlerde rol oynadığı bilinen serbest radikaller, fenolik bileşikler tarafından etkisizleştirilmektedir. Ülkemiz açısından önem taşıyan bu türlerin fenolik içerikleri ve HPLC analiz sonuçları Çizelge 2.7’de gösterilmektedir (Tunalier vd. 2004).

Çizelge 2.7 *Sideritis* ekstraktlarının fenolik içerikleri ve HPLC analizleri.

Takson adları	Toplanma bölgesi	Verimlilik %	Toplam fenol içeriği mg GAE/g ekstrakt	HPLC kalitatif verileri %		
				benzoatlar	hidroksi sinamatlar	flavonoidler
<i>S. amasiaca</i> * (A)	A5: Çorum	21.5	389.9±0.6 ^a	-	41.9	36.2
<i>S. argyrea</i> * (B)	C4: Antalya	31.2	262.8±7.4	-	46.0	14.8
<i>S. armeniaca</i> * (C)	A7: Giresun	24.2	310.3±0.9	1.7	21.7	58.0
<i>S. bilgerana</i> * (D)	C4: İçel	21.0	306.2±2.5	-	12.9	55.8

Çizelge 2.7 (Devam) *Sideritis* ekstraktlarının fenolik içerikleri ve HPLC analizleri.

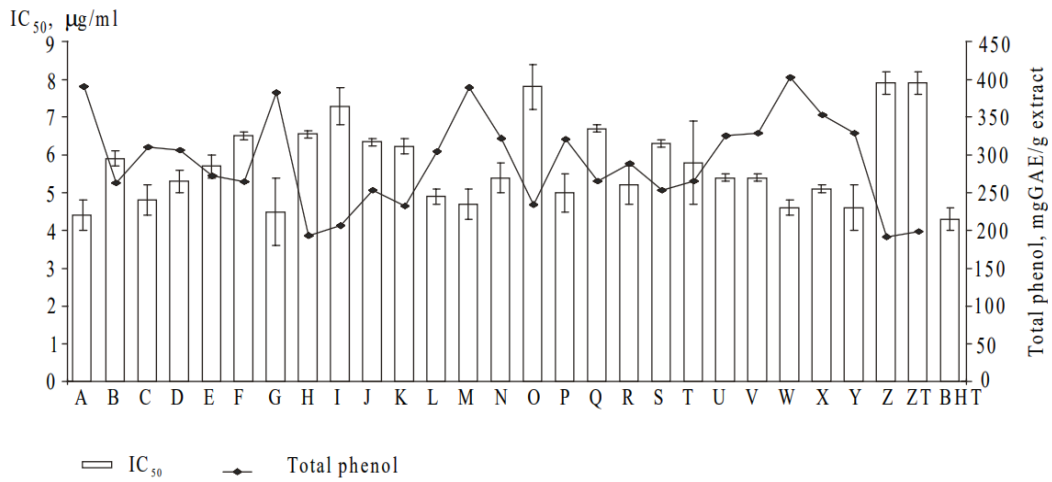
<i>S. brevidens</i> * (E)	C4: İçel	18.0	272.4±7.9	-	37.6	10.9
<i>S. caesarea</i> * (F)	B6: Kayseri	22.4	264.4±5.5	-	19.2	58.4
<i>S. cilicica</i> * (G)	C5: Adana	23.8	382.1±4.5	0.6	12.8	50.8
<i>S. dichotoma</i> * (H)	A2: Kütahya	18.2	193.5±7.1	0.5	4.4	69.9
<i>S. erythrantha</i> subsp. <i>cedretorum</i> * (I)	C4: Antalya	23.2	206.7±7.2	-	26.8	41.7
<i>S. erythrantha</i> subsp. <i>erythrantha</i> * (J)	C3: Antalya	20.6	252.8±4.2	-	21.1	26.6
<i>S. galatica</i> * (K)	A4: Ankara	25.3	232.1±4.3	0.3	8.9	60.5
<i>S. germanicopolitana</i> subsp. <i>germanicopolitana</i> * (L)	A4: Çankırı	27.9	304.7±5.8	2.9	22.9	55.0
<i>S. germanicopolitana</i> subsp. <i>viridis</i> * (M)	A4: Kastamonu	23.8	389.1±5.3	-	32.5	48.5
<i>S. gulendamii</i> * (N)	B3: Eskişehir	23.4	321.5±4.9	-	16.3	63.7
<i>S. hololeuca</i> * (O)	C4: İçel	15.8	234.5±9.3	-	17.7	46.9
<i>S. huber-morathii</i> * (P)	C6: Hatay	18.4	321.1±0.5	-	5.9	71.6
<i>S. libanotica</i> subsp. <i>libanotica</i> * (Q)	C4: Karaman	23.4	265.2±7.0	-	17.2	37.8
<i>S. libanotica</i> subsp. <i>kurdica</i> * (R)	C7: Mardin	26.0	288.3±1.0	-	14.9	43.3
<i>S. niveotomentosa</i> * (S)	C4: İçel	17.8	252.8±4.2	-	41.9	32.6
<i>S. ozturkii</i> * (T)	C3: Konya	27.0	265.5±1.1	-	18.2	55.2
<i>S. phlomoides</i> * (U)	B5: Kayseri	25.3	325.2±3.2	0.6	29.9	53.8
<i>S. phrygia</i> * (V)	B4: Afyon	26.2	328.9±4.9	-	26.6	51.3
<i>S. scardica</i> subsp. <i>scardica</i> (W)	A1: Kırklareli	27.0	402.5±2.5	0.2	11.9	53.4
<i>S. serratifolia</i> * (X)	B4: Konya	25.2	353.3±3.4	-	24.7	57.4
<i>S. taurica</i> (Y)	A4: Karabük	27.5	328.3±8.8	0.4	29.4	38.1
<i>S. vulcanica</i> * (Z)	B7: Elazığ	27.7	191.6±0.9	0.6	17.5	49.2
<i>S. vuralii</i> * (ZT)	C4: İçel	16.8	198.6±6.3	-	16.4	54.9

* Endemizm ^a Değerler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Tunalıer ve arkadaşları (2004) tarafından elde edilen veriler toplam fenol içeriği ile serbest radikal yakalama aktivitesi arasında doğrusal bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. Diğer yandan çalışmada kullanılan bütün *Sideritis* ekstraktlarının artan konsantrasyonla doğru orantılı olarak yüksek antioksidan aktivite sergilediği tespit edilmiştir. En düşük yarı- maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) değeri en yüksek serbest radikal yakalama aktivitesini göstermektedir (Şekil 2.13).

Başka bir çalışmada, *S. scardia* bitkisinden elde edilen çeşitli ekstraktların periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC), B16 melanoma hücre hattı ve akut myeloid lösemi HL-60 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri 2012 yılında Tadić ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada araştırılmıştır. *S. scardia* türünün dietil eter ekstraktının B-16 ve HL-

60 hücreleri üzerinde hücre büyümesini sırasıyla %51.3 ve %77.5 oranlarda sınırlandırırken PBMC'ler üzerinde herhangi bir sitotoksik etki oluşturmadığı tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen ekstraktların antienflamatuvar etkileri yine göze çarpan bulgular arasında yer almaktadır (Tadić vd. 2012). Bu çalışmanın sonuçları *Sideritis* türlerinin kanser araştırmaları açısından önemli bitki materyalleri olabileceğini gözler önüne sermektedir.



Şekil 2.13 Çeşitli *Sideritis* ekstraktlarının serbest radikal yakalama aktiviteleri ile toplam fenol içerikleri.

2019 yılında yapılan bir araştırmada Türkiye için endemik tür olan *Sideritis öztürkii* bitkisinden elde edilen üç farklı ekstraktın sitotoksik, antioksidan ve çeşitli klinik enzimlere karşı inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir. *S. öztürkii* türünün metanol ekstraktının önemli antioksidan özellikler sergilediği gösterilmiştir. Ayrıca etil asetat, su ve metanol ekstraktlarının MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri ve apoptozis ile ilişkili olan genlerin ifade düzeyleri araştırıldığında, meme kanseri ve diğer kanser türlerinin tedavisinde *Sideritis* türlerinin ekstraktlarının çözüm oluşturabileceği öngörülmektedir (Zengin vd. 2019).

Kemoterapötik ilaçların toksik etkileri tedavinin başarı oranı ile yakından ilişkilidir. 2020 yılında yapılan bir araştırmada *Sideritis phrygia* türünden elde edilen ekstraktın kemoterapötik bir ajan olan cisplatin kimyasalının neden olduğu genotoksik hasarları önleyici etkisi araştırılmıştır. Çalışmada A549 hücre hattı üzerinde *S. phrygia* ekstraktının sitotoksik bir etkiye neden olmadığı, ayrıca 100 µg/mL ve 10 µg/mL'lik

doz uygulamalarının ise cisplatinin neden olduğu genotoksik hasarı azaltıcı etkilere neden olduğu tespit edilmiştir (Ateş 2020).

Türkiye florasına ait *S. argyrea*, *S. brevidens* ve *S. lycia* türlerinin ekstraktları elde edilerek yeşil sentez yöntemiyle üretilen çeşitli nanopartiküllerin biyolojik aktivitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada üç türde de önemli sekonder metabolitlerden klorojenik asit bulunduğu tespit edilmiştir. Klorojenik asitin antikanserojen, antioksidan ve antidiyabetik biyoaktivitelere sahip olduğunu literatür verileriyle destekleyen araştırmacılar *Sideritis* türlerinin kanser ve nörodejeneratif hastalıklara karşı geliştirilebilecek tedavi yöntemleri için çok yönlü bitki materyali olabileceğini belirtmektedirler. Ayrıca çalışmada sentezlenen nanopartiküllerin Alzheimer hastalığı ile yakından ilişkili olan kolin esteraz enzimlerini inhibe edebildiğini analiz etmişlerdir. Alzheimer hastalığı seyreden bireylerde karakteristik olarak asetilkolin miktarındaki azalma söz konusu olduğundan bu hastalığın tedavisinde, asetil kolini azaltan enzimler olan kolin esteraz enzimlerini inhibe edebilen nanopartiküllerin yeşil sentez ile üretiminin önemini vurgulamışlardır (Ceylan vd. 2021). *Sideritis* türleri ile yapılan bazı diğer çalışmalar Çizelge 2.8’de gösterilmektedir.

Çizelge 2.8 Bazı *Sideritis* türleri ile yapılan çalışmalar.

Takson adı	Araştırılan biyolojik aktiviteler	Referanslar
<i>S. mugronensis</i>	Antienflamatuvar aktivite	Villar vd. 1982
<i>S. javalambrensis</i>	Antienflamatuvar aktivite	Alacaraz vd. 1989
<i>S. congesta</i>	Analjezik aktivite	Aydın vd. 1996
<i>S. curvidens</i> , <i>S. lonata</i>	Antibakteriyel aktivite	Uğur vd. 2005
<i>S. bilgerana</i> , <i>S. cilicica</i>	Antimikrobiyal aktivite	İşcan vd. 2005
<i>S. syriaca</i>	Antioksidan aktivite	Armata vd. 2008
<i>S. hololeuca</i> , <i>S. libanotica</i> subsp. <i>violascens</i>	Antibakteriyel aktivite	Ayaz 2008
<i>S. euboea</i>	Antioksidan aktivite	Skouroliaou vd. 2009
<i>S. erythrantha</i>	Antimikrobiyal ve antioksidan aktivite	Köse vd. 2010
<i>S. congeste</i> , <i>S. arguta</i>	Antioksidan aktivite	Erkan vd. 2011
<i>S. scardia</i> , <i>S. syriaca</i>	Antioksidan aktivite	Tsibranska vd. 2011
<i>S. libanotica</i>	Sitotoksik ve genotoksik aktivite	Köker 2014

Çizelge 2.8 (Devam). Bazı *Sideritis* türleri ile yapılan çalışmalar.

<i>S. akmanii</i>	Antioksidan aktivite	Güzey 2017
<i>S. congesta.</i>	Antioksidan aktivite	Bardakçı vd. 2020
<i>S. caesarea</i>	Antiülserojenik aktivite	Günbatan vd. 2020
<i>S. leptoclada</i>	Antioksidan aktivite	Sarıkürkçü vd. 2021
<i>S. akmanii</i>	Antioksidan aktivite	Aksoy vd. 2022
<i>S. stricta, S. condensate</i>	Antibakteriyel aktivite	Felek ve Yıldırım 2023

Tüm bu çalışmalar açısından bakıldığında *Sideritis* türleri sahip oldukları özellikler ve sekonder metabolitler bakımından değerli tıbbi bitkiler olarak karşımıza çıkmaktadır. *Sideritis* türlerinden elde edilen ekstraktların sergilediği biyolojik aktiviteler kanser başta olmak üzere enflamasyon, mikrobiyal enfeksiyon, sinir ve sindirim sistemi sorunları gibi birçok hastalığa karşı alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında, Afyonkarahisar iline endemik bir bitki olan *Sideritis akmanii* bitkisine ait sulu ekstrakttan yeşil sentez yöntemi ile üretilen ZnONP'lerin sitotoksik, genotoksik ve antimikrobiyal etkilerini içeren önemli biyolojik aktiviteleri araştırıldı.

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- ELISA (Absorbance Reader ELx800)
- Perkin Elmer BX-II FT-IR Spektrofotometre
- ZEISS LEO-1430 VP SEM Cihazı
- Bruker D8 Advance Yüksek Sıcaklık Aparatlı XRD Cihazı
- Hassas Terazı (Sartorius, Germany)
- Vortex (IKA, USA)
- Vakum Pompası (KNF Neuberger, Germany)
- Floresan Mikroskop (Olympus, Japan)
- Santrifüj (Hettich, Germany)
- Saf Su Cihazı (GFL 2102, Germany)
- Laminer Kabin (JSR, Korea)
- Mikroplak Okuyucu Spektrofotometre (μ - Quant, BioTek Instruments, USA)
- CO₂ İnkübatörü (Panasonic, Japan)
- Canlı Hücre Görüntüleme Mikroskobu (JULI Br, Korea)
- Elektroforez (Thermo Scientific EC 1000-90, USA)
- Otoklav (Jeio tech, Korea)
- pH metre (Hanna instruments, Romania)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Ultraviyole-Görünür Spektroskopi (Uv-1700 Pharmaspec, Japan)
- Mikrodalga Fırın (Beko, Türkiye)
- Öğütücü (Waring Commercial Blender, Romania)
- Sıcak Su Banyosu (Mettler WNB10, Germany)

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

- Çinko Asetat (Sigma, USA)

- Cisplatin (Sigma, USA)
- DMEM High Besiyeri (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma, USA)
- DMSO (Dimetil sülfoksit) (Sigma, China)
- EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) (Sigma, USA)
- Etidyum Bromür (Vivantis, USA)
- Etil Alkol (Sigma-Aldrich, Germany)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Fetal Bovine Serum) (Sigma, USA)
- Ketoconazole (Sigma, USA)
- LMA (Düşük erime noktalı agaroz) (Sigma, USA)
- MTT (Sigma, USA)
- Mueller Hinton Agar (Sigma-Aldrich, Germany)
- NaCl (Sigma-Aldrich, Germany)
- NaOH (AppliChem, Germany)
- NMA (Normal erime noktalı agaroz) (Sigma, USA)
- Nutrient Broth (Sigma-Aldrich, Germany)
- Nutrient Agar (Sigma-Aldrich, Germany)
- PBS (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi) (Sigma, Germany)
- Penisilin (Sigma, USA)
- Streptomisin (Sigma, USA)
- Siproflaksosin (Sigma, USA)
- Saf Su
- Tripan Blue Solüsyonu (Sigma, USA)
- Tripsin-EDTA Solüsyonu (Sigma, USA)
- Trisma Base (Sigma, USA)
- Triton X-100 (Sigma, USA)

3.2 *Sideritis akmanii* Bitkisinin Temini ve Ekstraktın Hazırlanması

Araştırma materyali olan *Sideritis akmanii* bitkisi Afyonkarahisar ilinin Kumalar yaylasından 2021 yılında toplanmıştır (Resim 3.1). Bitkinin teşhisi ise Three new species (Labiateae) from Turkey adlı eserden faydalanılarak yapılmıştır (Duman vd.

1995). *Sideritis akmanii*'nin Türkçe isminin belirlenmesinde ise Türkiye Bitkiler Listesi (Damarlı Bitkiler) adlı eserden yararlanılmıştır (Güner vd. 2012).



Resim 3.1 Deneyde kullanılan *Sideritis akmanii* bitkisi.

Laboratuvar ortamında kurutulmuş olan *Sideritis akmanii* bitkisinin toprak üstü kısımları öğütücüden geçirilerek toz haline getirildikten sonra hassas terazi yardımı ile 5 gram olacak şekilde tartılıp behere aktarıldı ve üzerine 100 mL dH₂O ilave edilerek manyetik ısıtıcı üzerinde 60°C'de 15 dk boyunca karıştırıldı (Resim 3.2).



Resim 3.2 Toz haline getirilen *Sideritis akmanii* bitkisinde manyetik ısıtıcı uygulaması.

Elde edilen ekstrakt whatmann no. 1 filtre kağıdı yardımıyla süzülerek 45 mL özüt elde edildi (Resim 3.3).



Resim 3.3 *Sideritis akmanii* ekstraktının whatmann no:1 filtre kağıdı ile süzülmesi.

3.3 Çalışmalarda Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Nanopartiküllerin yeşil yolla sentezlenmesi, pH stabilizasyonunun gerçekleştirilmesi ve karakterizasyon işlemlerinde kullanılmak üzere sodyum hidroksit ve çinko asetat çözeltileri hazırlandı.

3.3.1 Sodyum Hidroksit Çözeltilerinin Hazırlanması

Çinko oksit nanopartiküllerin yeşil sentezinde ve genotoksisite çalışmalarındaki elektroforez uygulamalarında kullanılmak üzere pH stabilizasyonu gerçekleştirmek için çeşitli konsantrasyonlarda NaOH çözeltileri hazırlandı (Çizelge 3.1 ve 3.2). Çözeltiler hazırlanırken her bir çözelti için hassas terazi ile yeteri kadar NaOH daha sonra erlene aktarıldı ve üzerine yeterli oranda dH₂O ilave edilerek ısı uygulanmadan manyetik karıştırıcı üzerinde homojen bir karışım elde edilinceye kadar bekletildi. İstenilen çözeltiler elde edildikten sonra her bir çözeltiyi içeren erlenin uç kısmı parafilm ile kapatılarak çözeltiler +4°C’de muhafaza edildi.

Çizelge 3.1 1 M NaOH çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
NaOH	20 g

Beher içine alınan NaOH üzerine son hacim 500 mL olacak şekilde dH₂O eklendi.

Çizelge 3.2 0.1 M NaOH çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
NaOH	2.0 g

Beher içine alınan NaOH üzerine son hacim 500 mL olacak şekilde dH₂O eklendi.

3.3.2 Çinko Asetat Çözeltisinin Hazırlanması

Yeşil sentez yöntemi ile çinko oksit nanopartiküllerin sentezlenmesi için 0.1 M çinko asetat çözeltisi hazırlandı. Hassas terazi kullanılarak tartılan 4.38 gr çinko asetat balon jojeye aktarıldıktan sonra son hacim 200 mL olacak şekilde üzerine dH₂O ilave edildi (Çizelge 3.3).

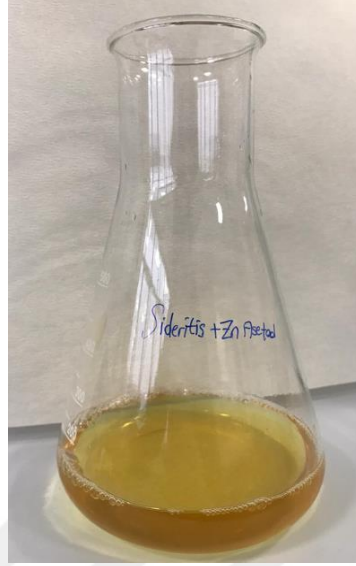
Çizelge 3.3 0.1 M Çinko asetat çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
ZnC ₄ H ₆ O ₄	4.38 g

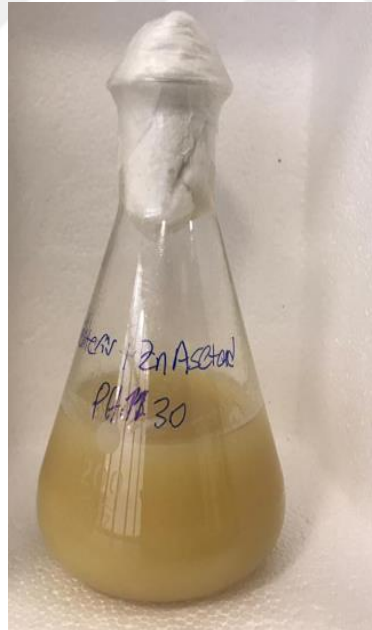
3.4 Yeşil Sentez Yöntemiyle Çinko Oksit Nanopartiküllerin Sentezi

Çinko oksit nanopartiküllerin sentezi için *Sideritis akmanii* bitkisine ait olan özütten 20 mL alınarak beher içerisine aktarıldı ve üzerine 0.1 M 100 mL çinko asetat çözeltisi ilave edildi. Elde edilen karışım manyetik ısıtıcı üzerinde ısıya maruz bırakılmadan 60 dakika süresince karıştırıldı ve pH değerini sabitlemek amacıyla NaOH çözeltilerinden yararlanıldı (Resim 3.4 ve 3.5). Meydana gelen renk değişiminden de görüldüğü üzere *Sideritis akmanii* bitkisine ait özüt ile çinko asetat ve sodyum hidroksit çözeltilerinden

yararlanılarak yeşil sentez tekniği ile çinko oksit nanopartiküllerin üretimi gerçekleştirildi.



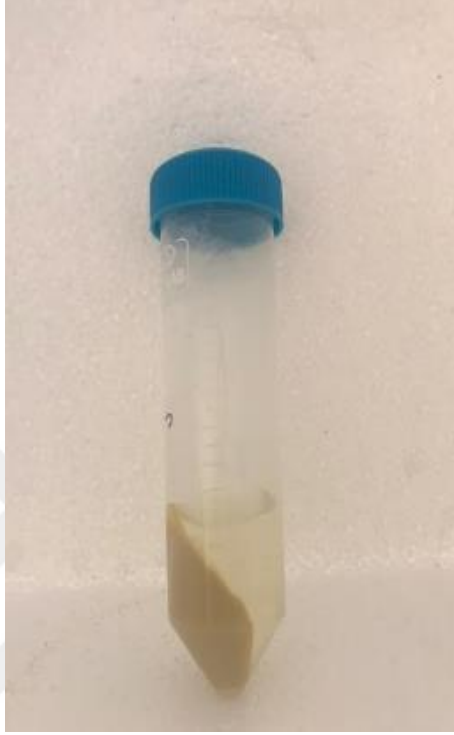
Resim 3.4 *Sideritis akmanii* özütü ile çinko asetat çözeltisinin karıştırılması.



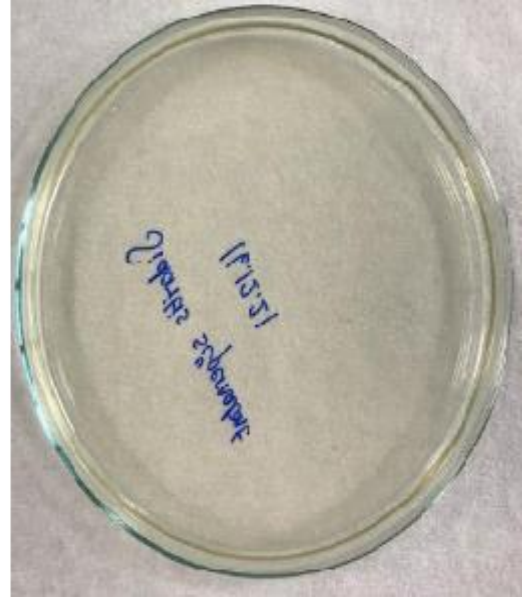
Resim 3.5 NaOH çözeltisi ile pH stabilizasyonu.

Elde edilen karışım falkonlara aktarılıp 3000 rpm'de 15 dakika süre ile santrifüj edilerek süpernatant kısımları uzaklaştırıldı ve devamında sırasıyla iki kez dH₂O ve bir kez etil alkol kullanılarak yıkama yapıldı. Oluşan pellet kısımlar petri kaplarına ince bir

tabaka olacak şekilde yayılıp etüvde 4 saat boyunca 60°C’de kurumaya bırakıldı. Kurutulduktan sonra kazınarak toplandı ve çalışmalarda kullanılmak üzere falkonlarda muhafaza edildi (Resim 3.6 ve 3.7).



Resim 3.6 Yapılan yıkamalar sonucu çöken çinko oksit nanopartiküller.



Resim 3.7 Pellet ve süpernatant kısımlarının birbirinden ayrılması.

3.5 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sideritis akmanii özütü ve çinko asetat çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen yeşil sentez yöntemi ile sentezlenen ZnONP'lerin karakterizasyonu için beş farklı teknikten yararlanıldı.

3.5.1 Ultraviyole-Görünür Spektrofotometrisi (UV-VIS)

Nanopartiküllerin ortamda varlığının, boyutlarının ve konsantrasyonlarının analizinde kullanılan bu teknik Beer Yasası temelli olan ve bir numune tarafından emilen ve yayılan ışığı ölçen, basit ve kullanımı yaygın olan analitik bir yöntemdir (Tejamaya vd. 2012, Mourdikoudis vd. 2018, Dağlıoğlu ve Yılmaz 2018). Çalışmada sentezlenen ZnONP'lerin karakterizasyonu için UV-1700 Pharmaspec cihazından yararlanılarak 190-750 nm aralığında yapılan ölçümler kaydedildi.

3.5.2 pH Ölçümü

Bitki özütü ve çinko asetat çözeltisi manyetik karıştırıcı ile homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra derişimleri 0.1 M ve 1 M olan NaOH çözeltileri kullanılarak pH stabilizasyonu gerçekleştirildi ve bu süreçte pH parametresinde meydana gelen değişimler kaydedildi.

3.5.3 X Işını Difraksiyon (XRD) Spektroskopisi

Kristal yapıları oluşturan atomların geometrik düzeninin anlaşılması, atomlar arasındaki mesafelerin belirlenmesi, nanopartiküllerin kristalografik yapılarının ve elemental bileşimlerinin analiz edilmesinde kullanılan bir tekniktir (Sarıbuğa 2014, Dağlıoğlu ve Yılmaz 2018, Eskin 2022).

Katot ışın tüpü tarafından üretilen X ışınları tek bir dalga boyuna sahip ışınlara çevirilmek üzere filtrelendir ve konsantre hale getirilmek üzere toplanarak örnek üzerine yönlendirilir. Koşullar Bragg Yasasını ($n \lambda = 2 d \sin \theta$) sağladığında örnek ile filtre

edilmiş ve tek dalga boyuna çevrilmiş ışınların etkileşimi sonucu yapıcı girişim oluşur ve kırınımlı bir ışın meydana gelir. Her bir mineralin kendine özgü d-aralığı olduğu için incelenen örneğin kırınım tepe noktalarının d-aralıklarına dönüştürülmesi örnekteki mineralin çeşidinin analiz edilmesini sağlar (Alkan 2022, İnt. Kyn. 9). Bu tez çalışmasında elde edilen ZnONP'ler Bruker marka D8 Advance model olan yüksek sıcaklık aparatlı X-ışınları kırınım cihazı kullanılarak analiz edildi.

3.5.4 Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM)

Çalışmada *Sideritis akmanii* özütüyle yeşil sentez tekniğinden yararlanılarak sentezlenen ve toz haline getirilen çinko oksit nanopartiküller LEO marka 1430 VP model SEM cihazı ile boyut ve şekilsel özellikleri bakımından incelenerek fotoğrafları çekildi.

3.5.5 Fourier Dönüştümlü Kızıl Ötesi Spektrometresi (FT-IR)

Çalışmada sentezlenen ZnONP'lerin bağlanma özellikleri, Perkin Elmer BX-II FT-IR spektrofotometre cihazı ile 4000-400 cm^{-1} spektral aralık kullanılarak analiz edildi.

3.6 Hücre Kültürü ve A549 Hücre Hattı ile Yapılan Çalışmalar

Bu tez çalışmasında küçük hücreli dışı akciğer kanserine özgü olan A549 hücre hattı kullanıldı. Hücreler, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü envanterinden temin edildi ve kullanılan tüm malzeme ve ekipmanlar kontaminasyon riskini ortadan kaldırmak için otoklav ile 121°C'de 15 dakika steril edildi. Optimizasyon açısından hücre kültüründe kullanılan bütün kimyasal bileşenler 37°C'de muhafaza edilmiş olup, yine tüm santrifüjasyon işlemleri 5 dakika süreyle sınırlandırılarak 800 rpm dönüş hızında gerçekleştirildi. Bitki özütü ve yeşil sentez ile elde edilen nanopartiküllerin hücreler üzerindeki sitotoksik ve genotoksik aktiviteleri araştırıldı.

3.6.1 Hücre Kültürü Besiyerlerinin Hazırlanması

Besiyeri hazırlanmasında kullanılan kimyasal bileşenlerin oranları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4 Hücre kültürü besiyerinin bileşenleri.

Kimyasallar	Oran (mL)
DMEM High Glukose Medium	440
Fetal Bovine Serum (FBS)	50
Penisilin-streptomisin	5
L-glutamin	5
Toplam	500

Hücrelerin ihtiyacı olan biyomolekülleri içeren besiyeri gözenek boyutu 0.22 µm olan polietersülfon (PES) membran filtreler yardımıyla hazırlandı. Filtreye aktarılabacak olan bileşenler kontaminasyonu önlemek amacıyla steril laminar steril kabin içerisine alındıktan sonra besiyeri hazırlandı. Besiyerini oluşturacak bileşenler PES membran filtreden geçirilmeden önce vakum pompası %70'lik etil alkol ile steril hale getirildi. Filtreden geçirilen besiyeri daha sonra 50 mL hacimdeki steril falkonlara aktararak +4°C'de muhafaza edildi. İhtiyaç halinde ise işlemiden 30 dakika öncesinde buzdolabından çıkarıldı ve 37°C sıcaklığa ayarlanan su banyosunda ısıtılarak kullanıma hazır hale getirildi.

3.6.2 Hücrelerin Çözdürülmesi ve Ekilmesi

Öncelikle çözdürme ve ekim işlemlerinin gerçekleştirileceği steril kabin içinde 30 dk boyunca UV ile malzemelerin sterilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Sıvı azot tankında kriotüpler içinde dondurulmuş olarak muhafaza edilen A549 hücreleri tankın içerisinden çıkarıldıktan sonra -20°C'de 15 dakika boyunca bekletildi. Daha sonra ise sıcak su banyosunda 1-2 dakika bekletilerek buzun erimesi sağlandı ve steril kabin içerisine alındı.

Buzu çözdürülen tüplerdeki hücreler, 1 mL besiyeri eklenmiş 15 mL hacimdeki falkonlara aktarıldı. Besiyeri ve hücrelerin sorunsuz olarak karıştırılması amacıyla yavaş ve dikkatli bir şekilde pipetaj yapıldı. Daha sonra falkonlar 5 dakika boyunca 800 rpm dönüş hızında santrifügasyona tabi tutuldu. Santrifügasyon sonucu falkonların üst kısmında toplanan süpernatant hücrelere temas etmeden dikkatli bir şekilde alınarak atık kabına aktarıldı. Bu işlem sonrasında falkonların dip kısmında kalan hücrelerin üzerine 1 mL besiyeri ilave edilerek ikinci kez 5 dakika boyunca 800 rpm’de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Santrifügasyon sonrasında falkonların üst kısmında toplanan süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı ve 1 mL yeni besiyeri eklenen hücreler son kez çözdürülerek ekime hazır hale getirildi. Ardışık olarak iki kez gerçekleştirilen yıkama ile DMSO’nun hücrelerden uzaklaştırılması sağlandı. Çözdürülen A549 hücreleri ekim yapılacak flasklara pipet yardımıyla homojen bir şekilde yayılarak ekim işlemi gerçekleştirildi. Ekim yapılan flasklar içerisine eklenen besiyeri miktarları Çizelge 3.5’te verilmiştir.

Çizelge 3.5 Ekim işleminde kullanılan besiyeri miktarları.

Flask büyüklüğü	Eklenen besiyeri hacmi
75 cm ²	7.0 – 10 mL
25 cm ²	4.0 – 7.0 mL

Ekim işlemi sonrasında A549 hücrelerini içeren flasklar canlı hücre görüntüleme mikroskobu (JULI Br, Korea) ile incelendikten sonra hücrelerin büyüyüp çoğalabilmeleri için 37°C sıcaklığa ve %5 CO₂ konsantrasyonuna sahip olacak şekilde ayarlanan inkübatöre dikkatlice yerleştirildi. Flasklar günlük olarak takip edildi ve renk değişimi meydana gelen flasklarda besiyeri tazelendi.

3.6.3 Hücrelerin Pasajlanması

Hücre kültürü çalışmaları sırasında canlı hücre görüntüleme mikroskobundan yararlanılarak flaskların konfluent durumları takip edildi. Konfluent oranı %80-90 olan flaskların içinde bulunan hücrelere tripsinizasyon ve detripsinizasyon işlemleri uygulandı. Bu işlemlerin sorunsuzca gerçekleştirilebilmesi için çalışmada kullanılacak

olan taze besiyeri, Tripsin-EDTA ve FBS sıcak su banyosunda ısıtılarak çalışmaya hazır hale getirildi. Pasajlanması gereken flasklar öncelikle steril haldeki steril kabin içine alındı. Daha sonra pipet yardımıyla hücrelere zarar vermeden kullanışsız besiyeri uzaklaştırıldı. Flask tabanına yapışan hücrelerin bağlantılarının kesilmesi için pasajlanmak istenen flask içerisine 3 mL Tripsin eklenerek 5 dakika inkübe edilmek üzere 37°C sıcaklığa ve %5 CO₂ konsantrasyonuna sahip inkübatöre dikkatlice bırakıldı. Süre sonunda hücrelerin ayrılması sağlanan flasklar inkübatörden alındı. Ayrılma gerçekleşmeyen flasklara ise yavaş bir şekilde vurularak ayrılmayan hücrelerin tabandan ayrılması sağlandı. Bu işlemler sonucunda hücrelerin ayrılmadığı tespit edilen flasklara 1 mL Tripsin-EDTA eklenerek 2 dakika inkübasyona bırakılarak ayrılma gerçekleştirildi.

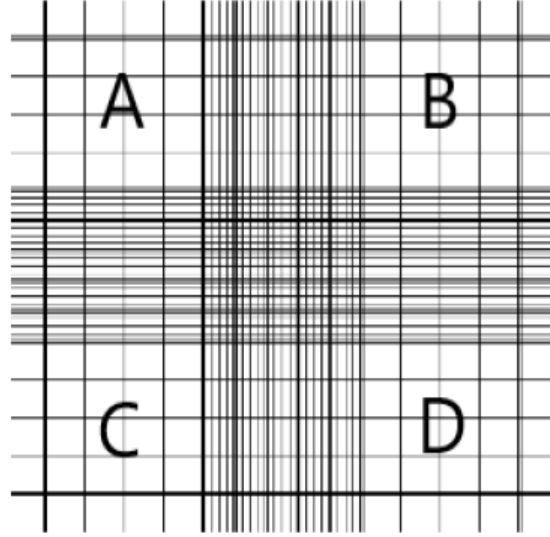
Steril kabin içine alınan flaskların içindeki hücrelerin tripsine maruziyetini önlemek amacıyla 3 mL besiyeri (tripsin/ besiyeri 1:1 olacak şekilde) eklenerek steril falkonlara alınarak santrifügasyon işlemi uygulandı. Santrifüj sonrasında falkon üzerinde biriken süpernatant pipet yardımıyla uzaklaştırılarak 1 mL taze besiyeri eklenip tekrar yıkama yapıldı. Bu işlem ile tripsin ortamdan uzaklaştırılarak detripsinizasyon gerçekleştirildi.

Yıkama işlemini takiben pellet üzerindeki süpernatant uzaklaştırılarak içerisinde bulunan hücrelerin üzerine 2 mL besiyeri eklenerek hafif bir pipetaj yapıldı. Devamında ise falkon içinde bulunan hücre-besiyeri karışımı, içerisinde 7-10 mL besiyeri bulunan iki adet flaska, 1'er mL olacak şekilde pipet yardımıyla dikkatlice bırakılarak hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Ekim işlemi biten flasklar 37°C sıcaklığa ve %5 CO₂ konsantrasyonundaki inkübatöre bırakıldı.

3.6.4 Hücrelerin Sayılması

Bu tez çalışmasında tripan blue ile hücre sayımı tekniği kullanıldı. Tripan blue boyası canlı hücrelerde renk değişimine neden olmazken ölü hücrelerin maviye boyanmasını sağlamaktadır. Thoma lamı üzerinde 4 farklı sayım alanı bulunmaktadır. Bu sayım alanlarının her birinde kare şeklinde 16 bölge yer almaktadır. Thoma lamının sayım alanları Şekil 3.1'de verilmiştir. Sayım alanlarında görüntülenen bütün hücreler

sayılarak ortalamaları alınmalıdır. Bir sonraki aşamada ise formül kullanılarak sayım yapılan flaskın 1 mL'sindeki hücre sayısı elde edilmektedir.



Şekil 3.1 Thoma lamının sayım alanları.

Tripan blue tekniği ile sayım yapılırken aşağıda verilen aşamalar izlendi.

- Hücre yoğunluğu %80-90 olan flasklar steril kabin içine alınarak flaskların üst kısmındaki süpernatant pipet yardımıyla dikkatlice toplandı.
- Flask içindeki hücrelerin üzerine 3 mL Tripsin-EDTA ilave edilerek inkübatörde 5 dakika inkübasyona bırakıldı.
- Hücrelerin tabandan ayrılması sonucu flasklara 3 mL besiyeri ilavesi yapılarak flask içerikleri falkonlara alındı.
- Falkonlar 5 dakika 800 rpm'de santrifüj edildi.
- Falkonların üst kısmındaki süpernatant toplanarak 1 mL besiyeri ilave edildi ve tekrar santrifügasyon gerçekleştirildi.
- Santrifügasyon sonucu süpernatant uzaklaştırılarak 1 mL besiyeri ilave edildi ve yavaşça pipetaj yapıldı.
- Daha sonra bir ependorfun içine 10 μ L tripan blue ve 90 μ L besiyeri koyulduktan sonra falkonda bulunan hücre-besiyeri karışımından 10 μ L alınarak aynı ependorf içine ilave edilmiş ve dikkatlice yapılan pipetaj ile karışmaları sağlanmıştır.
- Ependorftaki karışımdan 10 μ L alınarak sayım işlemi yapmak üzere kullanılacak olan thoma lamı üzerine aktarıldı.

- Canlı hücre görüntüleme mikroskobu yardımıyla yapılan incelemede parlak görünen hücreler canlı, maviye boyanmış olarak görünen hücreler ölü olarak tespit edildi.
- Karışımın mililitresindeki hücre sayısını tespit etmek için hücre sayımı yapıldı.
- Hesaplama yapılırken aşağıda verilen formül esas alındı.
$$\text{Toplam hücre sayısı (mL)} = (\text{ortalama hücre sayısı}) \times 10^4 \times (\text{dilüsyon faktörü})$$

3.6.5 Hücrelerin Dondurularak Saklanması

Hücre hatlarının flask içindeki besiyerinde sonsuza dek canlı kalması mümkün olmamaktadır. Kültür ortamında ve hücrelerde meydana gelen değişiklikler canlılığı olumsuz etkilemektedir. Bu değişikliklere ve bozulmalara karşı hücrelerin stoklanarak saklanması gerekmektedir. Bu nedenle hücre kültürlerinin stoklanmasında dondurularak saklanma yöntemi kullanılmaktadır. Soğutma işlemi ile hücrelerdeki metabolik aktivitelerin yavaşlaması sağlanmaktadır. Hücrelerin termal şoka girmesine neden olmadan bu işlemi gerçekleştirmek oldukça önemlidir. Hücrelerde -79°C 'nin altında yavaşlayan metabolik aktivite -196°C 'de minimum düzeye inmektedir.

Bu çalışmada hücrelerin dondurularak sıvı azot tankında saklanabilmesi için aşağıda verilen aşamalar izlendi.

- Kullanılacak olan kryotüpler soğuması amacıyla -20°C 'de beklemeye alındı. Dondurulacak olan hücreleri içeren flaskların konfluent durumunun uygunluğu canlı hücre görüntüleme mikroskobu ile tespit edildikten sonra %80-90 oranında konfluent olan flasklara 3 mL Tripsin-EDTA eklenerek inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyonu takiben flasklara 3 mL besiyeri eklendi.
- Besiyeri eklenen flasklar içinde bulunan karışım steril falkonlara alındı.
- Detripsinizasyon amacıyla iki kez yıkama yapıldı.
- Santrifügasyon sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak 750 μL besiyeri eklenen falkonlara pipetaj yapıldı.
- Çalışmanın başında soğumaya bırakılan kryotüpler, steril kabin içine alındıktan sonra falkonların içeriği kryotüplere aktarıldı.
- Kryotüplerin içine sırasıyla 675 μL FBS ve 75 μL DMSO kademeli olarak eklendi.

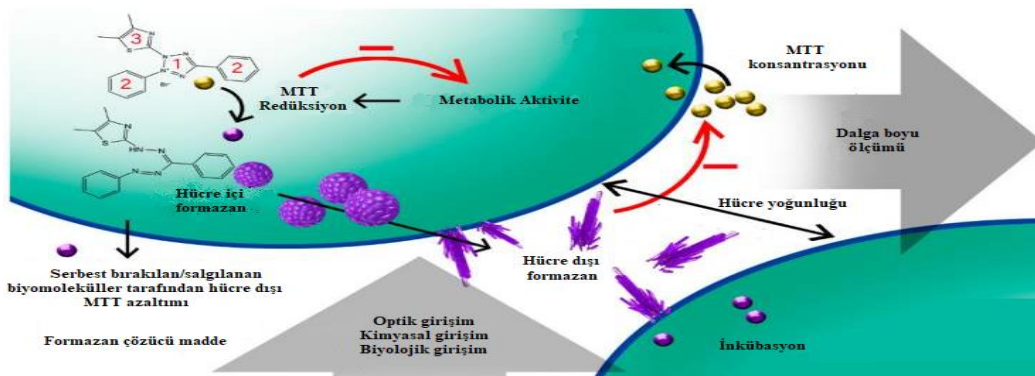
- Yukarıda verilen aşamalar uygulanarak hazırlanan kryotüpler -20°C 'de 15 dakika süresince bekletildikten sonra sıvı azot tankına kaldırıldı.

3.7 Sitotoksik Aktivite Analizleri

MTT hidrofilik özellikteki sarı renkli bir formazan tuz olup kimyasal bileşimi Şekil 3.2'de verilmiştir. Hücrelerin proliferasyonundaki artış ise mitokondriyel dehidrojenaz enzim aktivitesindeki artışa neden olmaktadır. Bu enzim MTT'yi apolar özellikteki mor renkli MTT formazan kristallerine çevirmektedir (Kamiloğlu vd. 2020). Bu dönüşüm sonucu meydana gelen kristaller ise DMSO ya da izopropil alkol içinde çözünmektedir. MTT analizi sonucu elde edilen boya yoğunluğu ile canlı hücre sayısı doğrudan ilişkilidir. MTT prosedürü Şekil 3.3'te verilmiştir (Kumar vd. 2018, Ghasemi vd. 2021).



Şekil 3.2 MTT'nin MTT formazan bileşiğine indirgenmesi.



Şekil 3.3 MTT testinin basamakları.

Bu tez çalışmasında elde edilen ZnONP'lerin küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi (hücre canlılığının belirlenmesi) MTT yöntemi ile analiz edildi. Ölçümler için ELISA (Absorbance Reader ELx800) mikropalak

okuyucu cihazı kullanıldı. MTT uygulamasında canlılığı belirlemek amacıyla 24 ve 48 saatlik gözlemler yapıldı. Ölçümler kaydedilerek değerlendirildi ve LD₅₀ dozları belirlendi.

3.7.1 MTT Çözeltisinin Hazırlanması

MTT çözeltisini hazırlamak için hassas terazi yardımıyla toz haldeki MTT kimyasalı 10 mg olacak şekilde tartıldıktan sonra 10 mL PBS içinde homojen olarak çözündürüldü. Elde edilen MTT çözeltisi membran filtre (0.22 µm) ile falkona aktarılarak kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

3.7.2 MTT Hücre Canlılık Ölçüm Testi

Bu çalışmada *Sideritis akmanii* bitki özütü ve ayrıca yeşil sentez ile elde edilmiş olan ZnONP'lerin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri araştırıldı.

Konfluent uygunluğu sağlanan flasklara 3 mL Tripsin-EDTA eklendi ve inkübasyona bırakılarak ayrışma için beklendi. Bir sonraki aşamada hücrelere 3 mL besiyeri eklenerek santrifügasyon gerçekleştirildi. Süpernatant toplandıktan sonra falkonlara 1 mL besiyeri eklendi ve santrifügasyon tekrarlandı. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra 1 mL besiyeri ilave edilerek ekime hazır duruma getirildi.

MTT çözeltisi, canlılık analizinde kullanılmak üzere uygun sıcaklığa gelmesi için 37°C'deki sıcak su banyosuna koyuldu. Steril kabin içerisine alınan steril petri kabına 20 mL besiyeri eklendi. Falkon içinde bulunan ve thoma lamı kullanılarak hesaplanmış olan sayı kadar hücre içeren karışım petri kabına aktarıldı. Hücre dağılımı pipetaj yapılarak homojen hale getirildi. Kullanılan 48'lik well plakanın her bir kuyucuğuna 400 µL hücre-besiyeri karışımı eklendi. İnkübatöre kaldırılan well plaka içerisindeki hücrelerin konfluent oranının %50-60 olması için yeteri kadar beklendi. Toz haline getirilmiş *Sideritis akmanii* bitkisinden hassas terazi yardımıyla 5 g tartılarak beher içine alındı. Son hacim 100 mL olacak şekilde dH₂O eklenerek bitki ekstraktı hazırlandı. Hem bitki ekstraktına ait dozlar hem de nanopartikül dozları hassas terazide

tartıldıktan sonra ZnONP dozları için DMSO ile çözdürülerek 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 ve 0.156 mg/mL konsantrasyonunda, bitki ekstraktı dozları için dH₂O ile çözdürülerek 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.560 ve 0.780 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde hazırlandı. Her bir kuyucuk için 4 µL'lik uygulama yapıldı.

Kontrol grubu DMSO, pozitif kontrol için ise cisplatin kimyasalları besiyerinin %1'i oranında uygulandı. Doz uygulamaları yapılan well plakalar 24 ve 48 saatlik incelemeler için inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik sürecin sonunda bütün kuyucuklara %10 oranında 40 µL MTT çözeltisi eklendi ve 3 saat boyunca inkübe edildi. 48 saatlik inceleme içinde aynı işlem uygulandı. İnkübasyon sonucu besiyeri pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve oluşan formazan kristallerini çözmesi için her kuyucuğa 400 µL DMSO eklendi. Well plakalar çalkalayıcı üzerinde 1-2 dakika bekletildi. ELISA mikropalak okuyucu kullanılarak 540 nm dalga boyunda 3 tekrarlı ölçümler yapıldı.

3.8 Genotoksik Aktivite Analizleri

Bu çalışmada genotoksisite analizleri komet deneyi ile gerçekleştirildi. Hücrelere, ZnONP dozları olarak 2.5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL ve *S. akmanii* ekstraktının 12.5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL konsantrasyonları uygulandı ve olası DNA hasarlarının takibi yapıldı. 24 ve 48 saatlik sonuçlar kaydedildi. Deney sırasında kullanılacak olan ekipmanlar çalışmaya başlamadan önce buzdolabında soğumaya bırakıldı. Genotoksisite analizinde kullanılacak çözeltiler ve kimyasallar aşağıda verilen çizelgelerde gösterilmiştir. Nanopartikül ve bitki ekstraktı dozlarına ek olarak kontrol grubu için DMSO ve pozitif kontrol grubu için cisplatin kullanıldı.

Çizelge 3.6 Lizis çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
NaCl	73.5 g
EDTA	18.6 g
Trisma base	0.6 g
Triton X-100	5.0 mL
DMSO	50 mL

Hazırlanan kimyasallar balon jojeye aktarıldı ve dH₂O ile son hacim 500 mL'ye tamamlandı. Çözeltinin pH değeri 10 olacak şekilde optimize edildi.

Çizelge 3.7 Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
Trisma base	14.55 g

Hazırlanan kimyasal üzerine dH₂O eklenerek son hacim 300 mL olarak ayarlandı. Çözeltinin pH değeri 7.5 olacak şekilde optimize edildi.

Çizelge 3.8 Elektroforez tampon çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
NaOH	6.0 g
EDTA	0.18 g

Hassas terazi ile tartılan NaOH ve EDTA kimyasalları cam şişeye alındıktan sonra üzerine dH₂O ilave edilerek son hacim 500 mL olacak şekilde elektroforez tamponu hazırlandı. Tampon çözeltinin pH değeri 13.2 olarak ayarlandı. Çalışma aşamasına kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Çizelge 3.9 Düşük erime noktalı agaroz çözeltisinin hazırlanması (LMA).

Kimyasal	Miktar
LMA	0.0016 g
PBS	2.0 mL

%8 LMA çözeltisi hazırlamak için hassas terazide 0.0016 g olarak tartılan LMA cam tüp içine aktarıldıktan sonra üzerine 10 kat seyreltilmiş olan 2 mL PBS eklendi. Cam tüp, saydam bir LMA elde edilene kadar bek alevinde bekletildi. Çalışma esnasında beher içindeki sıcak suda muhafaza edildi.

Çizelge 3.10 Normal erime noktalı agaroz çözeltisinin hazırlanması (NMA).

Kimyasal	Miktar
NMA	0.03 g
PBS	3.0 mL

%1 NMA çözeltisi hazırlamak için hassas terazide 0.03 g olarak tartılan NMA cam tüpün içine aktarılarak üzerine 10 kat seyreltilmiş olan 3 mL PBS ilave edildi. Cam tüp, saydam bir NMA elde edilene kadar bek alevinde bekletildi. Isıtıcı tabla üzerinde kullanıma hazır hale getirilen lamaların üstüne 110 µL NMA eklenerek ince bir tabaka olacak şekilde yayıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Çizelge 3.11 Etidyum bromür çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktar
Etidyum bromür	0.01 g

Hassas terazi yardımı ile 0.01 g olacak şekilde tartılan etidyum bromür bir falkona alındı ve üzerine dH₂O eklenerek son hacim 50 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti +4°C'de muhafaza edilirken çalışmada 10 kat seyreltilerek kullanıldı. Komet deneyi için flasklara ekilen hücreler 24 saat boyunca inkübe edildi. Konfluent oranı uygun olan flasklardan besiyeri alındıktan sonra tripsinizasyon amacıyla Tripsin-EDTA eklendi. Falkonlara aktarılan karışım santrifüj edildi. Daha sonra bir petri kabı alınarak içerisine 20 mL besiyeri eklendi. Thoma lamı yardımıyla yapılan sayımla belirlenen hücre sayısını içeren hücre-besiyeri karışımı falkondan alınarak petri kabına aktarıldı.

24 kuyucuklu well plakanın her bir kuyucuğuna 800 µL ekim yapılarak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında nanopartikül ve bitki ekstraktı dozları uygulandı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Aynı adımlar 48 saatlik uygulama için de tekrarlandı. Uygulanan konsantrasyonlardaki hücreler kazıyıcı ile well plakalardan kazındı. Her bir kuyucuğa 250 µL PBS eklendikten sonra aynı gruplar bir arada olacak şekilde hücreler ependorflara alındı ve 3 dakika boyunca 1000 rpm dönüş hızında santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüj işlemi takiben ependorfların üst kısımları az miktarda dökülerek uzaklaştırıldı. Hücre yoğunluklarına uygun olacak şekilde 10-12 µL alınarak, ependorf içindeki 100-110 µL LMA ile karıştırıldı. Ependorf içindeki hücre-LMA karışımı komple alınarak önceden hazırlanan NMA ile kaplanmış lamaların üzerine yayıldı. Lamel ile kapatılan örnekler 4-5 dakika beklemeye bırakılarak sabitleme işlemi yapıldı. Süre sonunda lameller dikkatlice uzaklaştırıldı. Pens yardımı ile alınan lamalar elektroforez tankına yerleştirilerek ortama yeterli miktarda elektroforez tamponu ilave

edildi. Yaklaşık 20 dakikalık bir beklemenin ardından elektroforez işlemi (25 V/300 mA) gerçekleştirildi. Elektroforez sonrası dH₂O veya nötralizasyon tamponu ile yıkama işlemi uygulanan lamaların üzerine 70 µL etidyum bromür çözeltisi damlatılarak lameller ile kapatıldı ve boyama işlemi gerçekleştirilen lamalar her bir doz için 100 hücre sayılmak üzere floresan mikroskop altında incelendi.

3.9 Antimikrobiyal Aktivite Analizleri

Bu çalışmada *Sideritis akmanii* özütü kullanılarak gerçekleştirilen yeşil sentez yöntemi ile sentezlenen ZnONP'lerin *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) ve *Candida albicans* (ATCC 90028) mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivitesi araştırıldı. Suşlar Nutrient Broth (NB) besiyerine ekilerek 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Çalışma sırasında kullanılacak pens, beher, pipet uçları ve cam tüpler için otoklav cihazında 121°C sıcaklıkta sterilizasyon işlemi uygulandı.

3.9.1 Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

Katı besiyeri çözeltisi hazırlanırken 4 g Nutrient Broth ve 7.5 g Nutrient Agar (NA) hassas terazi yardımıyla tartılarak erlen içine alındı ve dH₂O ile son hacim 500 mL'ye tamamlandı. Erlen içindeki besiyeri otoklav içerisinde 15 dakika 121°C'de steril edildi. Optimum sıcaklığa ulaşan besiyeri, öncesinde %70'lik etil alkol ile silinmiş bench üzerine dizilen plastik petrilere bek alevinin yanında dağıtıldı. Besiyeri katı hale geldikten sonra kullanılabilecek kadar buzdolabında muhafaza edildi.

Sıvı besiyeri hazırlanırken hassas terazi yardımıyla 4 g NB tartılarak erlen içine alındı ve son hacim dH₂O ile 500 mL'ye tamamlandı. Serolojik pipet yardımı ile her cam tüp içerisine 5 mL besiyeri aktarıldı ve otoklavda 15 dakika 121°C'de steril edildi. Antimikrobiyal aktivite araştırmalarında bakteri suşları için pozitif kontrol olarak Siproflaksosin, *Candida* için ise Ketoconazole, negatif kontrol olarak da dH₂O kullanıldı.

3.9.2 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) Belirleme

MİK değerini belirlemek amacıyla 0.5 McFarland standardına uygun hale getirilen sıvı besiyeri içerisine ekilen mikroorganizmalar 24 saat süresince inkübasyona bırakıldı. Mikroorganizmalara uygulanacak olan ZnONP dozları ayarlandı. İnhibisyonu belirleyebilmek için 50 mg/mL, 40 mg/mL, 30 mg/mL ve 25 mg/mL, 20 mg/mL, 15 mg/mL, 12.5 mg/mL, 10 mg/mL, 7.5 mg/mL ve 5 mg/mL olmak üzere toplam 10 doz belirlendi. Dozlar hassas terazide tartılıp cam tüplere alınarak her tüpe eşit miktarda olacak şekilde 5 mL NB koyularak tüpler otoklavda steril edildi. Steril edilen besiyeri optimum sıcaklığa ulaştığında 50 µL mikroorganizma türleri ve uygulama dozları tüplere ekilerek etüvde 24 saat süresince inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda cam tüplerdeki şeffaflık ve bulanıklık oranına bakılarak MİK değerleri tayin edildi.

9.3.3 Disk Difüzyon Yöntemi

Bu çalışmada, antimikrobiyal aktivite analizi amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Veri olarak 24, 48 ve 72 saatlik gözlemler yapılarak sonuçlar kaydedildi. Bakteri suşları için pozitif kontrol olarak Siproflaksosin, *Candida* için ise Ketoconazole, negatif kontrol olarak da dH₂O kullanıldı.

ZnONP'lerin mikroorganizmalar üzerindeki etkisini belirlemek için ilk olarak 24 saat öncesinde inkübasyona bırakılmış olan mikroorganizmalar, sıvı besiyerinde 0.5 McFarland standardına ayarlandı. MİK dozları göz önünde bulundurularak, disk difüzyon testinde uygulanacak dozların hesaplaması yapıldı. Antimikrobiyal aktiviteyi belirleyebilmek için 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL ve 62.5 mg/mL, 31.25 mg/mL ve 15.62 mg/mL olmak üzere toplam 6 farklı ZnONP dozu belirlendi. Bu dozlar hassas terazide tartım işlemi yapılarak ependorflara alındı ve her bir doz 250 µL DMSO içinde çözündürüldükten sonra çalışmadan 1 saat önce ultrasonik su banyosuna alınan dozların homojen hale gelmesi sağlandı. Uygulama yapılacak petriler kodlandı ve her bir katı besiyerinin yüzeyine 500 µL olacak şekilde 0.5 McFarland standardına ayarlanmış olan mikroorganizma ekimi yapıldı. Petrilerin yüzeyine, 10 µL olacak şekilde pozitif kontrol için antibiyotik, negatif kontrol için dH₂O içeren antibiyogram

diskleri yerleştirildi. Etüvde 37°C’de inkübasyona bırakılan petrilerin 24, 48 ve 72 saatlik sonuçları değerlendirildi.

3.10 İstatistiksel Analiz

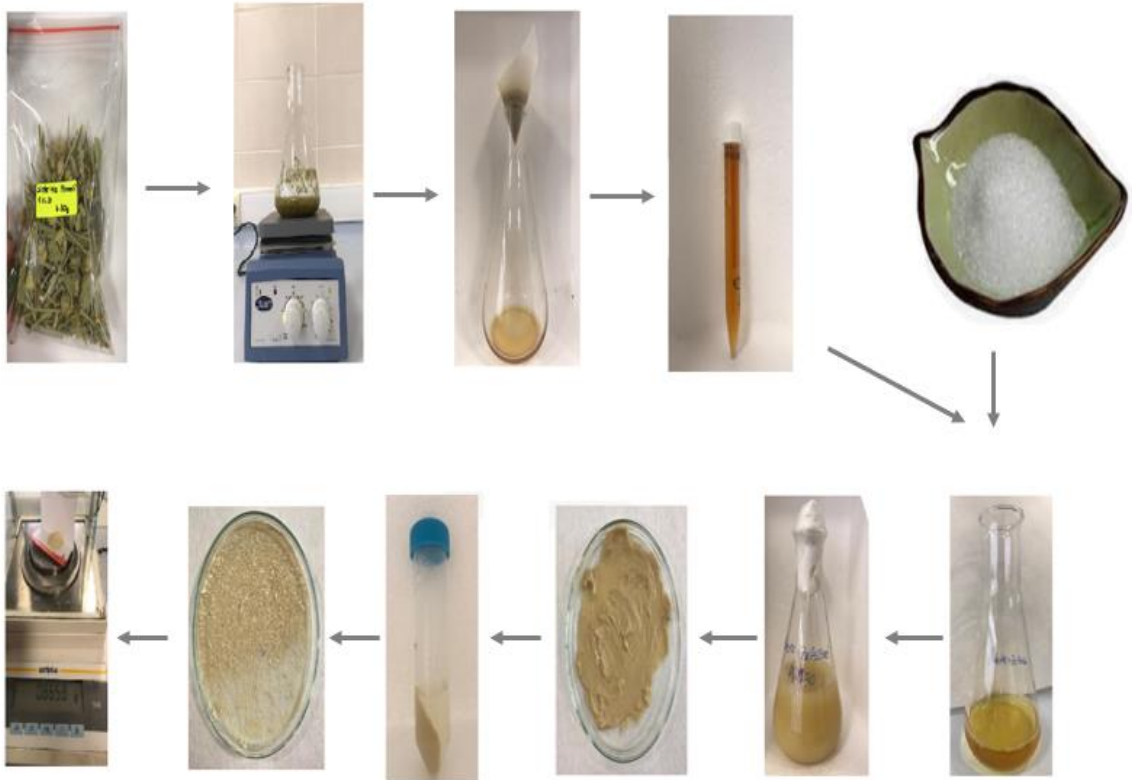
MTT deneyinde elde edilen veriler % olarak ifade edilirken LD₅₀ dozunun belirlenmesinde ise probit analizi kullanılmıştır. Komet verilerinin analizinde Duncan testi ($p<0.05$) kullanılmıştır.



4. BULGULAR

4.1 Yeşil Sentez ile İlgili Bulgular

ZnONP'lerin yeşil sentezi için *Sideritis akmanii* sulu ekstraktı ve çinko asetat çözeltisi kullanıldı. Yeşil sentez sonucu üretilen nanopartiküllerin varlığı renk değişimi ile tespit edildi (Şekil 4.1).

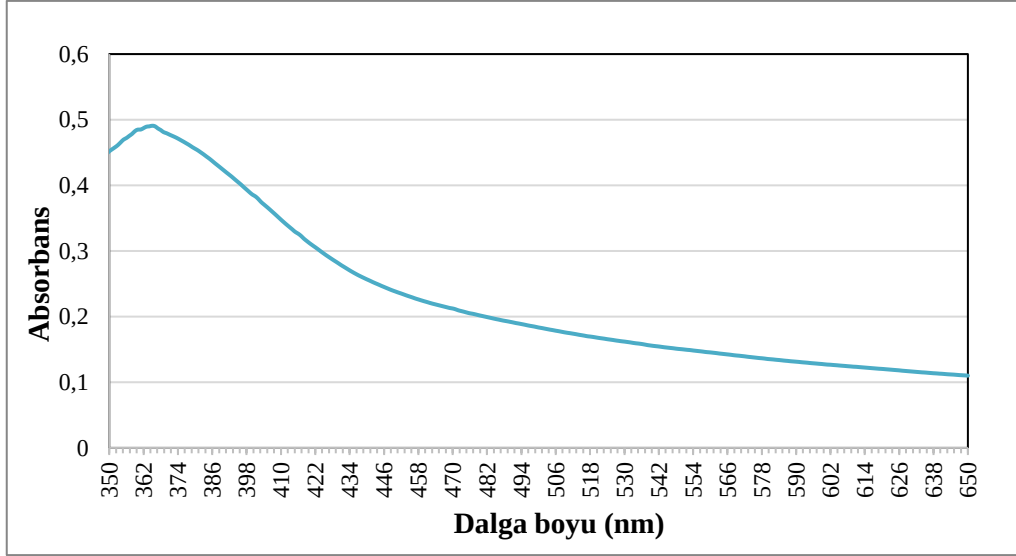


Şekil 4.1 ZnONP'lerin yeşil sentez süreci.

4.2 Karakterizasyon ile İlgili Bulgular

4.2.1 UV-VIS Sonuçları

Sideritis akmanii bitkisinden elde edilen özüt kullanılarak yeşil sentez tekniği ile sentezlenen ZnONP'lerin UV-VIS spektrumları Şekil 4.2'de gösterilmektedir. ZnONP'lerin 340-650 nm aralığındaki maksimum absorbands değeri 365 nm olarak kaydedildi.



Şekil 4.2 ZnONP’lerin UV sonuçları.

4.2.2 pH Sonuçları

Sideritis akmanii özütü (20 mL) elde edildiğinde yapılan ölçümlerde başlangıç pH değeri 5.68 olarak kaydedildi. Deney için hazırlanan 1 M çinko asetat çözeltisinin pH değeri ise 6.03 olarak kaydedildi. Bitki özütü ile çinko asetat çözeltisi karıştırıldığında başlangıç pH değeri 6.45 olarak okundu. Çalışmada pH optimizasyonu için 1 M ve 0.1 M olarak hazırlanan NaOH çözeltilerinden yararlanıldı. NaOH çözeltisi ilave edildikten sonra meydana gelen pH değişimleri izlendi. Son pH 11.30 olarak kaydedildi.

4.2.3 XRD Sonuçları

XRD sonuçları, Afyon Kocatepe Üniversitesi Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde (TUAM) yapılan analizler sonucu elde edildi. Optimum koşullarda sentezlenen ZnONP ile ilgili yapılan XRD analizine ait grafik Şekil 4.3’te gösterilmektedir. ZnONP’lere ait olan $2\theta = 31.773^\circ, 34.441^\circ, 36.262^\circ, 47.558^\circ, 56.604^\circ, 62.888^\circ, 66.387^\circ, 67.968^\circ, 69.100^\circ, 72.613^\circ, 76.981^\circ$ değerlerine ait olan karakteristik piklerin sırasıyla (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004), (202) düzlemlerine karşılık geldiği belirlendi. 2θ açısındaki; en yüksek pik 36.262° olarak tespit edilmiştir (FWHM değeri 0.437) ve buna göre sentezlenen ZnONP partikül boyutu 21.26 nm olarak belirlenmiştir. 2θ açısındaki ikinci en yüksek pik ise

31.773 olarak ölçülmüş (FWHM değeri 0.388) buna göre sentezlenen ZnONP 23.63 nm olarak tespit edilmiştir. Ölçüm sonuçları diğer literatürlerdeki ZnONP'ünün JCPDS (36-1451) 2θ açılarıyla kıyaslandığında uyumlu olduğu saptandı. Partikül boyutu hesaplamaları Debye-Scherrer eşitliği ile aşağıdaki denklem kullanılarak gerçekleştirildi (Varadavenkatesan vd. 2019).

$$d = \frac{K \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (4.1)$$

Yukarıdaki denklemde,

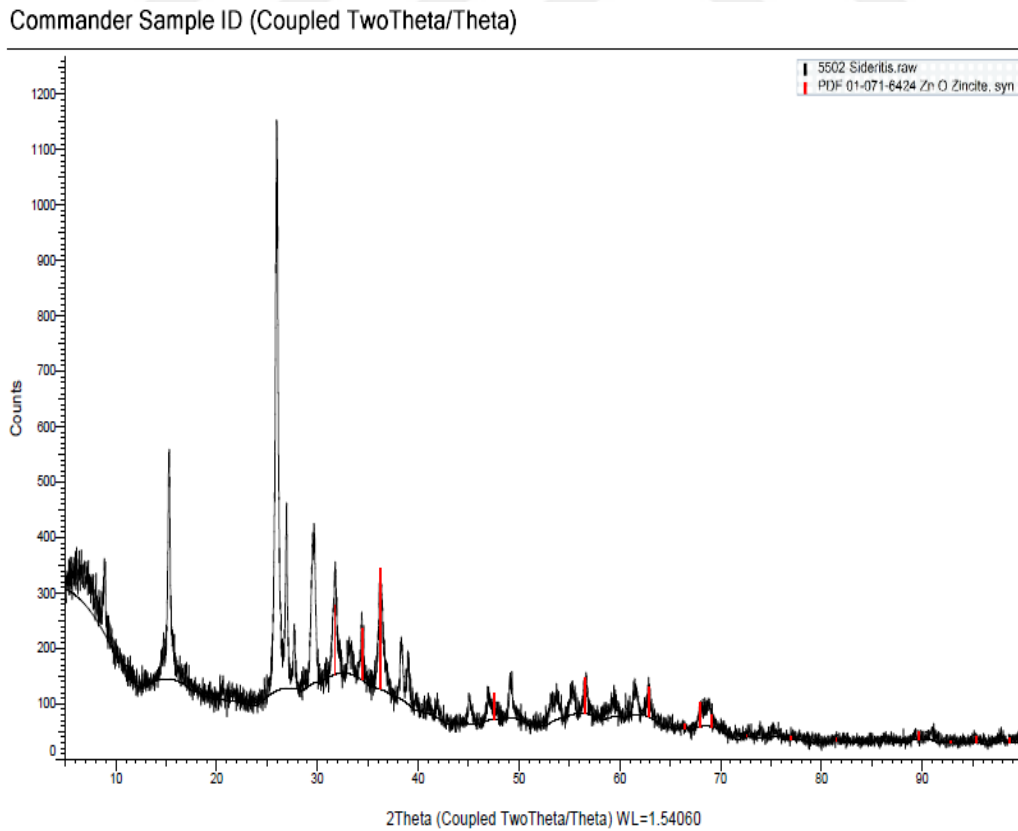
d = Kristalin boyutu (nm)

K = Debye Scherrer sabiti (0.94)

λ = X-ışınının dalga boyu (1.54 Å)

β = Maksimum pikin yarı uzunluğunun genişliği (FWHM)

θ = Maksimum pikin 2θ değerinden elde edilen Bragg açısıdır (Bozkurt 2022).



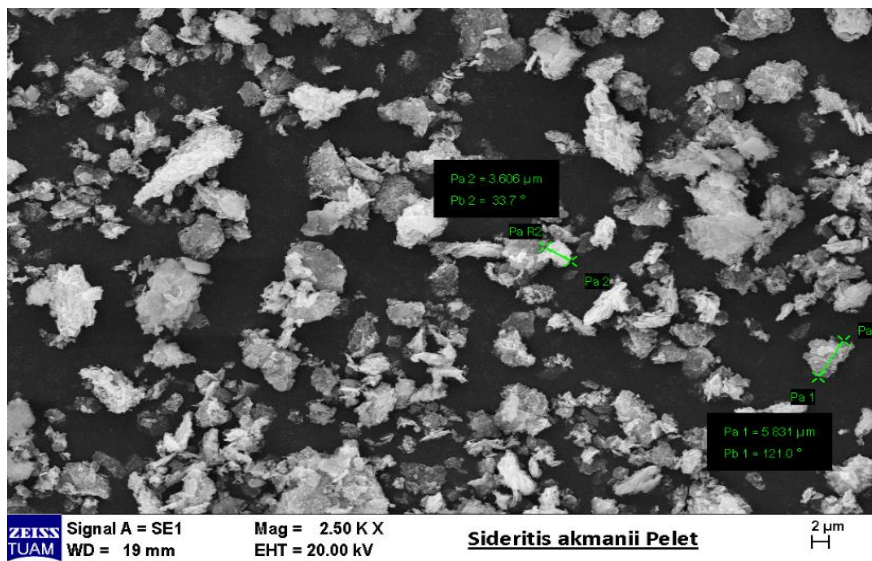
Şekil 4.3 ZnO nanopartiküllerinin XRD difraktogramı.

Elde edilen veriler sonucunda ZnONP'lerin altıgen formunda olduğu bulundu. ZnONP'lerin XRD analizine ait karakteristik piklerin, Toz Kırınım Standartları Ortak Komitesi (Joint Committee on Powder Diffraction Standards, JCPDS) veri bankasındaki JCPDS modeli 36-1451 ile uyumlu olduğu tespit edildi (Madhumitha vd. 2019, Bozkurt 2022).

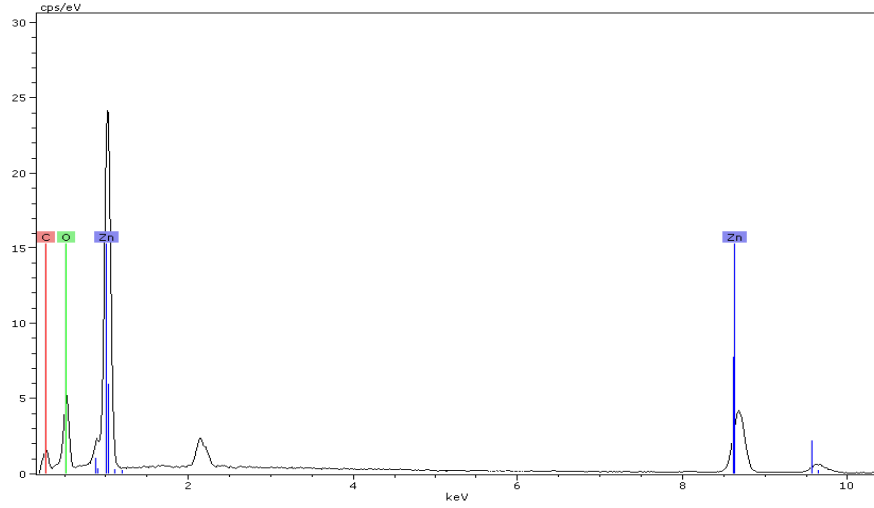
4.2.4 SEM Sonuçları

Bu tez çalışmasında elde edilen ZnONP'lerin SEM görüntüsü Resim 4.1'de verilmiştir. Resim 4.1 incelendiğinde sıkı paketlenme gösteren küresel yapıdaki ZnONP'lerin homojen dağılım gösterdikleri görülmektedir. *Sideritis akmanii* ekstraktı ile yeşil sentez tekniği kullanılarak sentezlenen ZnONP'lerin özelliklerini analiz etmek için yapılan EDX ölçümlerinin spektrumu Şekil 4.4'te gösterilmiştir.

Kütlesel olarak yüzde dağılımı Zn atomu için %48.07 iken O atomu için %41.61 olarak kaydedildi. Atomik olarak yüzde dağılımı ise Zn atomu için %17.52 iken O atomu için %61.98 olarak saptandı. Sentezlenen ZnONP partikül boyutu en yüksek pik noktasında yapılan ölçümler ile 21.26 nm olarak belirlendi. Görüntülemeye küresel yapıdaki ZnONP'lerin yanında tam olarak küresel yapıya sahip olmayan ve çeşitli uzantılar içeren ZnONP'ler de tespit edildi.



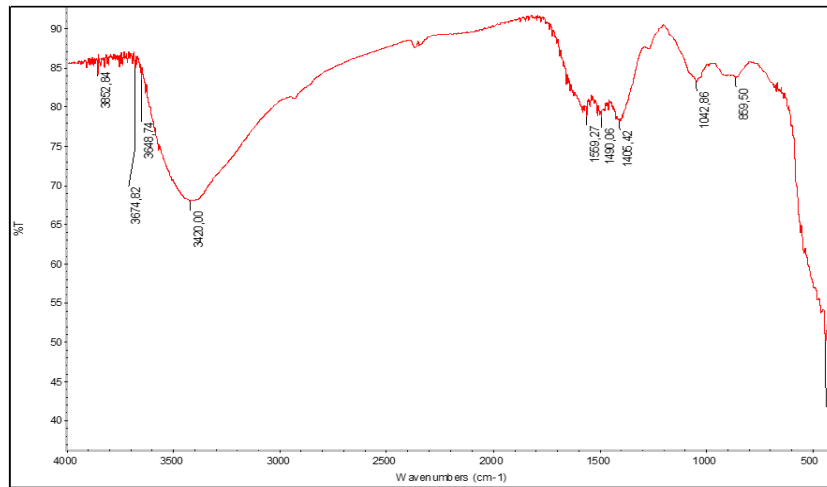
Resim 4.1 ZnONP'lerin SEM görüntüsü.



Şekil 4.4 ZnONP'lerin EDX spektrumu.

4.2.5 FT-IR Sonuçları

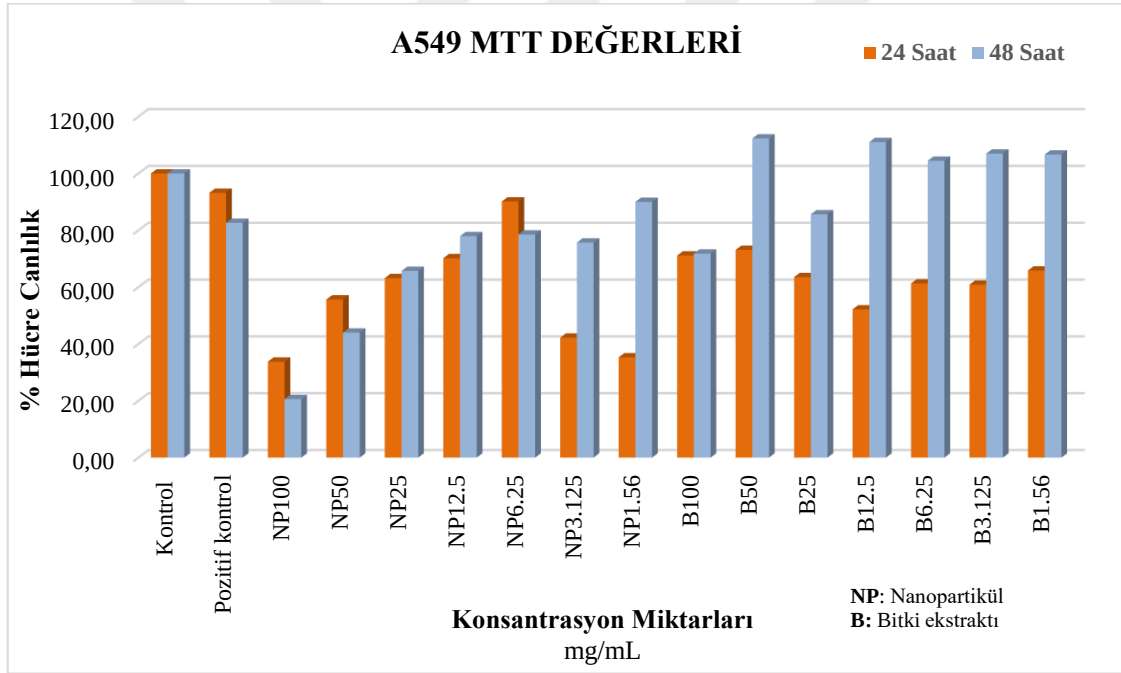
Sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin FT-IR analizi 4000 cm^{-1} ve 400 cm^{-1} aralığında yapılmış olup 435 cm^{-1} 'de pikin olduğu gözlemlendi. 3420 cm^{-1} 'de gözlemlenen piklerin -OH gerilme titreşimleri, $1405\text{--}859\text{ cm}^{-1}$ arasında görülen piklerin ise C-H ve C-O-C aromatik bağlarına bağlı meydana gelen gerilme titreşimleri olduğu belirlendi. 1569 cm^{-1} 'de görülen piklerin -OC=O, 1490 cm^{-1} 'de görülen piklerin -C=O bağlarına bağlı olduğu belirlendi. ZnO nanopartikülünün gözlemlendiği pik ise 476 cm^{-1} olarak belirlendi. FT-IR sonuçları Şekil 4.5'te gösterilmektedir (Thongam vd. 2019, Patron-Romere vd. 2020, Erol vd. 2023).



Şekil 4.5 FT-IR Analiz Sonuçları.

4.3 Sitotoksosite ile İlgili Bulgular

Bu tez çalışmasında, *Sideritis akmanii* özütünün ve yeşil sentez yöntemiyle elde edilen ZnONP'lerin A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesi MTT canlılık testi ile belirlendi. 48 kuyucuklu well plakalar kullanılarak planlanan 24 ve 48 saatlik deneyler üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Kontrol gruplarında DMSO, pozitif kontrol gruplarında ise cisplatin kullanıldı. Sitotoksik aktivite sonuçları Şekil 4.6'da gösterilmektedir. A549 hücrelerine, *Sideritis akmanii* ekstraktı için 0.780-50 mg/mL aralığındaki 7 farklı konsantrasyon ve ZnO nanopartikülü için 0.156-10 mg/mL aralığındaki 7 farklı konsantrasyon ile ayrıca kontrol grubu ve pozitif kontrol grubu da dahil olmak üzere toplamda 16 farklı grubun ölçümleri kaydedildi.



Şekil 4.6 *Sideritis akmanii* ekstraktı ve ZnONP'lerin A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri.

Yeşil sentez tekniğiyle elde edilen ZnONP dozlarının sitotoksik aktivitesinin genellikle *Sideritis akmanii* dozlarına kıyasla yüksek olduğu görüldü. A549 hücrelerinin bitki ekstraktı dozlarına 48 saatlik maruziyetinin 24 saate kıyasla proliferasyonu önemli ölçüde azaltıcı etki oluşturmadığı tespit edildi. ZnONP için LD₅₀ dozu NP50 (5 mg/mL) olarak belirlendi. Sitotoksik etkisi en yüksek olan bitki dozu B12.5 (6.25 mg/mL) olarak tespit edildi.

4.4 Antimikrobiyal Aktivite ile İlgili Bulgular

Bu çalışmada yeşil sentez ile üretilen ZnONP'lerin *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) ve *Candida albicans* (ATCC 90028) mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkilerini araştırmak için MİK testi ve disk difüzyon testi gerçekleştirildi.

4.4.1 MİK Sonuçları

MİK değerlerini belirlemek için makrodilüsyon metodu kullanıldı. İnkübasyon sonucunda cam tüplerin şeffaflık ve bulanıklık durumları incelenerek MİK değerleri tayin edildi. Yapılan analizler sonucu elde edilen MİK değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 MİK değerleri.

Mikrorganizma	MİK değeri (mg/mL)
<i>Escherichia coli</i>	12.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.0
<i>Candida albicans</i>	30.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30.0
<i>Salmonella enteritidis</i>	25.0

En güçlü antimikrobiyal etkinin *S. aureus* suşuna karşı olduğu tespit edildi. Diğer yandan ise *C. albicans* ve *K. pneumoniae* suşları antimikrobiyal etkinin en düşük olduğu suşlar olarak tespit edildi.

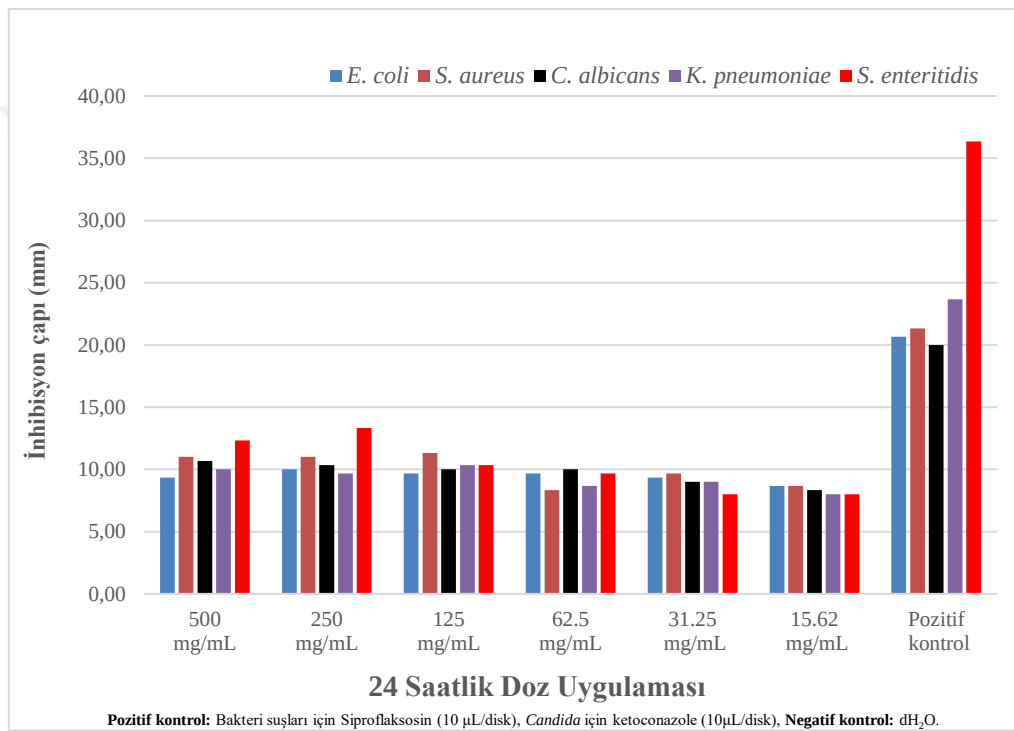
4.4.2 Disk Difüzyon Testi Sonuçları

Bu çalışmada, saptanan MİK değerleri referans alınarak belirlenen konsantrasyonlar ile gerçekleştirilen disk difüzyon testlerinde, disklerin etrafında meydana gelen inhibisyon zon çapları mm cinsinden ölçülerek kaydedildi. Bütün uygulamalar üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Deney sonucunda elde edilen veriler Çizelge 4.2, 4.3, 4.4 ve Şekil 4.7, 4.8, 4.9'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.2 Mikroorganizmalarda 24 saatlik doz uygulamasında inhibisyon zon çapları.

Mikroorganizma çeşidi	500 mg/mL	250 mg/mL	125 mg/mL	62.5 mg/mL	31.25 mg/mL	15.62 mg/mL	Pozitif kontrol
24 saatlik doz uygulaması için inhibisyon zonunun çapı (mm)							
<i>E. coli</i>	9.33	10.00	9.67	9.67	9.33	8.67	20.67
<i>S. aureus</i>	11.00	11.00	11.33	8.33	9.67	8.67	21.33
<i>C. albicans</i>	10.67	10.33	10.00	10.00	9.00	8.33	20.00
<i>K. pneumoniae</i>	10.00	9.67	10.33	8.67	9.00	8.00	23.67
<i>S. enteritidis</i>	12.33	13.33	10.33	9.67	8.00	8.00	36.33

Pozitif kontrol: Bakteri suşları için Siproflaksosin (10 µL/disk), *Candida* için ketoconazole (10 µL/disk), negatif kontrol: dH₂O.

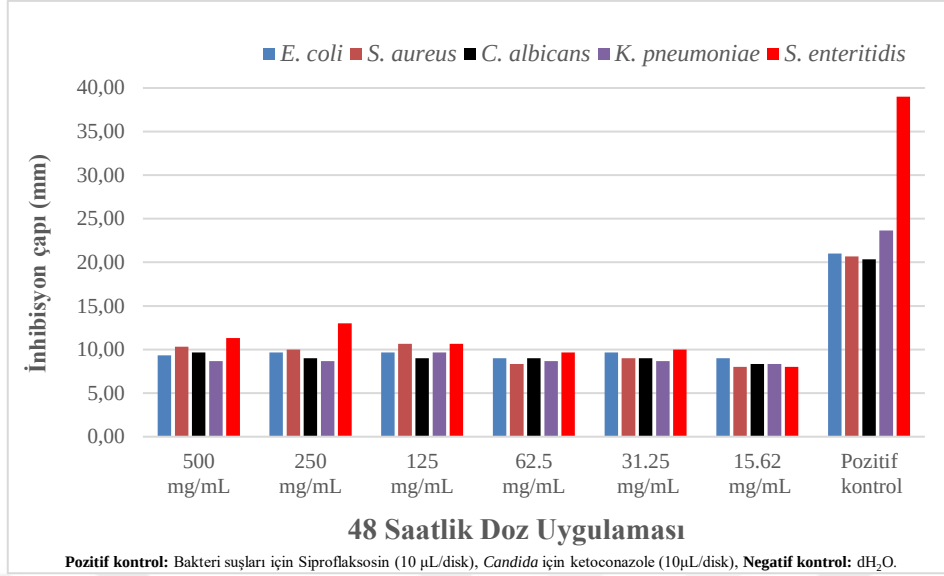


Şekil 4.7 ZnONP'lerin 24 saatlik uygulaması sonucu oluşan inhibisyon zonları.

Çizelge 4.3 Mikroorganizmalarda 48 saatlik doz uygulamasında inhibisyon zon çapları.

Mikroorganizma çeşidi	500 mg/mL	250 mg/mL	125 mg/mL	62.5 mg/mL	31.25 mg/mL	15.62 mg/mL	Pozitif kontrol
48 saatlik doz uygulaması için inhibisyon zonunun çapı (mm)							
<i>E. coli</i>	9.33	9.67	9.67	9.00	9.67	9.00	21.00
<i>S. aureus</i>	10.33	10.00	10.67	8.33	9.00	8.00	20.67
<i>C. albicans</i>	9.67	9.00	9.00	9.00	9.00	8.33	20.33
<i>K. pneumoniae</i>	8.67	8.67	9.67	8.67	8.67	8.33	23.67
<i>S. enteritidis</i>	11.33	13.00	10.67	9.67	10.00	8.00	39.00

Pozitif kontrol: Bakteri suşları için Siproflaksosin (10 µL/disk), *Candida* için ketoconazole (10 µL/disk), negatif kontrol: dH₂O.

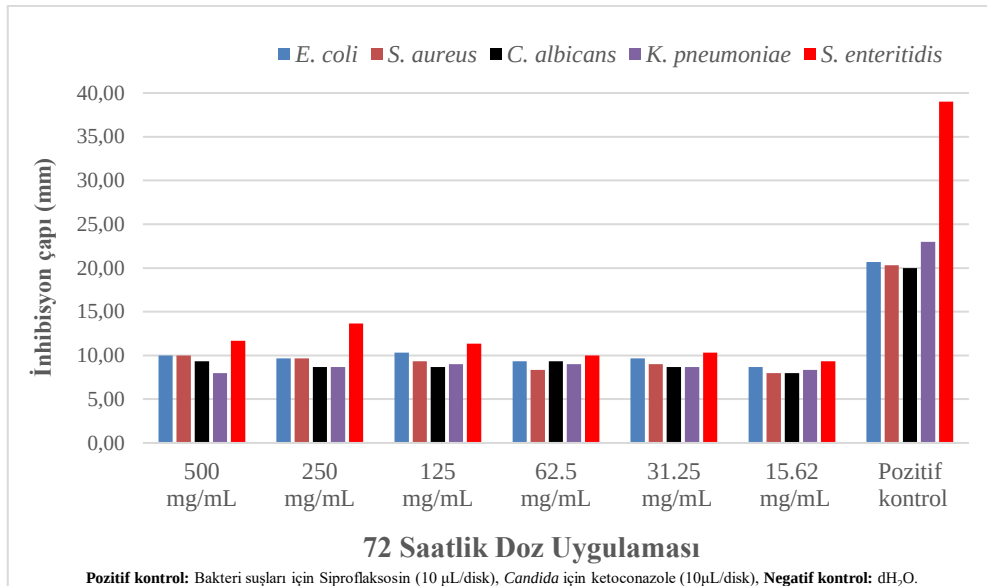


Şekil 4.8 ZnONP’lerin 48 saatlik uygulaması sonucu oluşan inhibisyon zonları.

Çizelge 4.4 Mikroorganizmalarda 72 saatlik doz uygulamasında inhibisyon zon çapları.

Mikroorganizma çeşidi	500 mg/mL	250 mg/mL	125 mg/mL	62.5 mg/mL	31.25 mg/mL	15.62 mg/mL	Pozitif kontrol
72 saatlik doz uygulaması için inhibisyon zonunun çapı (mm)							
<i>E. coli</i>	10.00	9.67	10.33	9.33	9.67	8.67	20.67
<i>S. aureus</i>	10.00	9.67	9.33	8.33	9.00	8.00	20.33
<i>C. albicans</i>	9.33	8.67	8.67	9.33	8.67	8.00	20.00
<i>K. pneumoniae</i>	8.00	8.67	9.00	9.00	8.67	8.33	23.00
<i>S. enteritidis</i>	11.67	13.67	11.33	10.00	10.33	9.33	39.00

Pozitif kontrol: Bakteri suşları için Siproflaksosin (10 µL/disk), *Candida* için ketoconazole (10 µL/disk), negatif kontrol: dH₂O.



Şekil 4.9 ZnONP’lerin 72 saatlik uygulaması sonucu oluşan inhibisyon zonları.

4.5 Genotoksisite ile İlgili Bulgular

Çalışmamızda *Sideritis akmanii* ekstraktının ve sentezlenen ZnONP'lerin A549 hücre hattı üzerindeki genotoksik etkisi Komet yöntemi ile belirlendi. Komet testi sonucu elde edilen veriler Çizelge 4.5'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.5 A549 hücrelerinde Komet yöntemi ile DNA hasarının belirlenmesi.

Uygulama	Konsantrasyon (mg/mL)	DNA Hasarı (Arbitrary Unit)	
		Ortalama $\pm$ Standart Sapma	
		24 Saat	48 Saat
Kontrol	-	32 $\pm$ 2.63 ^a	36.52 $\pm$ 1.96 ^{ac}
Pozitif Kontrol	0.5	50.22 $\pm$ 9.47 ^c	49.74 $\pm$ 8.92 ^c
ZnONP 100	10	59.86 $\pm$ 6.35 ^c	62.25 $\pm$ 10.15 ^d
ZnONP 50	5	58.47 $\pm$ 4.11 ^c	61.62 $\pm$ 8.85 ^b
ZnONP 25	2.5	20.48 $\pm$ 4.72 ^b	17.35 $\pm$ 3.43 ^b
SAE 100	50	29.68 $\pm$ 3.17 ^{ab}	30.14 $\pm$ 2.64 ^{ab}
SAE 50	25	24.55 $\pm$ 3.48 ^{ab}	26.22 $\pm$ 4.08 ^{ab}
SAE 25	12.5	19 $\pm$ 2.21 ^a	23.46 $\pm$ 3.64 ^b

* Sütunlarda belirtilen harfler p<0.05 anlamlılık düzeyinde önemlidir (Duncan dağılım testi), ZnONP: Çinko oksit nanopartikülü, SAE: *Sideritis akmanii* bitki ekstraktı, Kontrol: DMSO; Pozitif Kontrol: cisplatin.

A549 hücre hattına, *S. akmanii* bitkisinin ekstraktının (SAE) 50, 25 ve 12.5 mg/mL olmak üzere üç farklı konsantrasyonu ve ZnO nanopartikülünün (ZnONP) 10, 5 ve 2.5 mg/mL olmak üzere üç farklı konsantrasyonu uygulanmıştır. Bitki ekstraktı ve nanopartikül dozlarına ek olarak kontrol grubu için DMSO ve pozitif kontrol grubu için cisplatin kullanılmıştır. 24 ve 48 saat doz uygulamasındaki genotoksik etkilerinin istatistiksel analizleri, grup ortalamalarının karşılaştırılması Duncan testi ile yapıldı (p <0.05).

A549 hücre hattı üzerinde sentezlenmiş ZnONP'ler tarafından en yüksek DNA hasarı (62.25 $\pm$ 10.15), 48 saatlik uygulamada 10 mg/mL'de görülmüştür. En az DNA hasarı ise (17.35 $\pm$ 3.43) ise 48 saatlik uygulamada 2.5 mg/mL'lik konsantrasyonda belirlendi. Sentezlenmiş ZnONP 25'in hem 24 saat hem de 48 saat uygulamasında kontrol grubuna kıyasla genotoksik hasarı gerilettiği tespit edilmiştir. Diğer ZnONP'ler ise 24 ve 48

saatlik uygulamalarda kontrol grubunun üzerinde bir genotoksik hasar sergilemiştir. Çalışmada uygulanan bitki ekstraktının üç konsantrasyonunun ZnONP 25'in 24 ve 48 saatlik uygulamada genotoksik hasarı azalttığı görülmektedir.



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sideritis cinsine ait türler, içerdikleri çeşitli sekonder metabolitlerin önemli biyolojik aktiviteleri nedeniyle uzun yıllardır insanlar tarafından çeşitli hastalıkların tedavi edilmesi amacıyla tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır (Ceylan vd. 2021). Nanopartiküller, sıra dışı özellikleri nedeniyle sağlık, endüstri, tekstil ve elektronik başta olmak üzere birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Machado vd. 2015). Son yıllarda bilim insanları nanopartikül sentezi için yaygın olarak yeşil sentezi tercih etmektedir. Doğa dostu olan bu teknikle üretilen nanopartiküller biyo-uyumlu özelliklere sahip olup tıp ve biyomedikal gibi birçok alanda kullanım alanı bulmaktadır. Aynı zamanda nanopartiküllerin antimikrobiyal ve antikanser aktiviteleri olduğu için, çeşitli hastalıkların tedavisinde ve dezenfeksiyon işlemlerinde kullanılabilir olması yeşil sentez tekniğinin tercih edilebilirliğini artırmaktadır (Parveen vd. 2016, Agarwal vd. 2017).

Bu tez çalışmasında Afyonkarahisar iline endemik olan *Sideritis akmanii* bitkisinin ekstraktı ve çinko asetat tuzu kullanılarak ZnONP'lerin yeşil sentezi gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda, sentezlenen ZnONP'lerin karakterizasyonu, bu nanopartiküllerin ve *Sideritis akmanii* ekstraktının A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri ile çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır.

Bitki ekstraktları, içerdikleri sekonder metabolitler ile yeşil sentez aracılığıyla nanopartikül üretimi sırasında indirgenme reaksiyonlarını gerçekleştirdiğinden, kullanılan ekstrakta göre özgülük kazanmış spesifik nanopartiküllerin meydana gelmesini sağlamaktadır (Aksoy vd. 2022). *Sideritis akmanii* ekstraktında bulunan biyomoleküller, çinko asetat tuzundan ZnONP'lerin üretilmesinden sorumludur. Nanopartiküllerin oluşumu, sentez ortamına çinko asetat tuzu ilave edildiğinde meydana gelen renk değişimi ile tespit edilebilmektedir (Agarwal vd. 2017). Çalışmamızda, yeşil sentez sırasında meydana gelen renk değişiminin tespiti, ZnONP'lerin sentezlendiğinin göstergesidir.

Üretilen ZnONP'ler çeşitli teknikler yardımı ile karakterize edilmiştir. UV-VIS analizleri sonucu 340-650 nm aralıktaki maksimum absorbands değeri 365 nm olarak kaydedilmiştir. Abomuti ve arkadaşları (2021), yaptıkları çalışmada yeşil sentez tekniği ile elde ettikleri ZnONP'lerin maksimum absorbands değerini 368 nm olarak tespit etmişlerdir (Abomuti vd. 2021). Literatürdeki diğer çalışma sonuçları da değerlendirildiğinde çalışmamızda nanopartikül sentezinin başarılı olduğu sonucuna varılmakta ve bu çalışmadaki UV-VIS sonuçlarının literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir (Vijayakumar vd. 2018, Bandeira vd. 2020, Gür vd. 2022).

Sideritis akmanii sulu ekstraktı ile çinko asetat tuzu karıştırıldıktan sonra pH değerinde meydana gelen yükselme yeşil sentezin başarıyla gerçekleştiğinin bir başka göstergesidir. Çalışmamızda kullanılan bitki ekstraktının pH değeri 5.68 iken çinko asetat ile karıştırıldıktan sonra bu değer 6.45 olarak değişim göstermiştir. Benzer bir sonuca Shaba ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan bir çalışmada da rastlanmaktadır (Shaba vd. 2021). Abomuti ve arkadaşları (2021), tıbbi adaçayı olarak bilinen *Salvia officinalis* bitkisinin yapraklarından elde ettikleri ekstraktı kullanarak yeşil sentezle ZnONP ürettikleri çalışmada başlangıçtaki düşük pH değerinin ZnONP'lerin sentezlenmesiyle yükselmeye başladığını göstermiştir (Abomuti vd. 2021).

XRD analizinden elde edilen sonuçlara göre çalışmamızda sentezlenen ZnONP'lerin altıgen formunda olduğu tespit edilmiştir. Yeşil sentezlenen ZnONP partikül boyutu 21.26 nm olarak belirlenmiştir. Ayrıca 2 θ açılarına ait olan karakteristik piklerin karşılık geldiği düzlemler sıralı olarak değerlendirildiğinde JCPDS modeli 36-1451 ile uyumlu olduğu, yeşil sentez uygulaması ile nanopartikül sentezinin ve XRD analizinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği sonucuna varılmaktadır (Madhumitha vd. 2019). Yanti ve Maryanti (2021), yaptıkları bir çalışmada XRD analizi sonucu altıgen formunda olan ZnONP'lerin ortalama boyutunun yaklaşık 35.78 nm olduğunu ve JCPDS modeli 36-1451 ile uyumlu olduğunu belirlemişlerdir (Yanti ve Maryanti 2021). Kamarajan ve arkadaşları (2022), yeşil sentez sonucu ZnONP'lerin XRD analizinde altıgen formunda ve yaklaşık 16.2 nm boyutunda ZnONP ürettiklerini göstermişlerdir (Kamarajan vd. 2022). Başka bir çalışmada yeşil sentezlenmiş ZnONP'lerin XRD analizi sonucu karakteristik piklerin sırasıyla (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112) ve

(201) ve ortalama partikül boyutunun 35.69 nm olduğu belirlenmiştir (Shanmugam vd. 2022). Tez çalışmamızda elde edilen nanopartikül boyutunun literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada sentezlenen ZnONP'lerin şekil ve boyutları SEM analizi ile tespit edilmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin boyutları farklılık göstermekle birlikte en yüksek pik noktasında yapılan ölçümler doğrultusunda ZnONP boyutu 21.26 nm olarak belirlenmiştir. ZnONP'lerin normal yapısı küreseldir, ancak görüntülemeye tam bir küresel yapıya sahip olmayan ve çeşitli uzantılar içeren ZnONP'ler de tespit edilmiştir. Bu durumun sentez esnasında iki veya daha fazla sayıda ZnONP'nin agregasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Literatürdeki diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Erdoğan ve arkadaşları (2019), enginar bitkisinin yaprağından elde ettikleri ekstraktı kullanarak yeşil sentez tekniği ile sentezledikleri ZnONP'leri SEM tekniği ile analiz ettiklerinde nanopartiküllerin küresel şekilde ve partikül büyüklüğünün 276-309 nm aralığında olduğunu tespit etmişlerdir (Erdoğan vd. 2019). Dönmez (2020) tarafından yapılan bir çalışmada *Zingiber officinale* (zencefil) bitkisinin kök ekstraktı kullanılarak sentezlenen ZnONP'lerin SEM analizi sonucunda ZnONP'lerin küresel şekilde ve 17-40 nm boyut aralığında olduğu saptanmıştır (Dönmez 2020). Yeşil sentezde kullanılan ekstrakt kaynağı değiştiğinde elde edilen nanopartiküllerin boyutlarının değişiklik gösterdiği anlaşılmaktadır.

Homojen dağılım gösteren ZnONP'lerin EDX analizlerinde 3 farklı pik gözlenmiştir. Bu pikler, *Sideritis akmanii* ekstraktındaki organik bileşiklerden kaynaklanan C ve O elementlerine ait olan pikler ile sentezlenen nanopartikülleri temsil eden Zn elementine ait olan piklerdir. Bitki ekstraktında bulunan indirgeyici organik bileşiklerin Zn ile kompleks oluşturması ve EDX analizinde elde edilen pikler dikkate alındığında, bu çalışmada yapılan nanopartikül sentezinin ve uygulanan yöntemin başarılı olduğu görülmektedir. Bu çalışmada elde edilen EDX analizi verileri literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir (Ali vd. 2022, Shanmugam vd. 2022, Kamarajan vd. 2022).

4000 cm^{-1} ve 400 cm^{-1} aralığında yapılan FT-IR analiz sonucunda ZnO nanopartikülünün gözlendiği pik 476 cm^{-1} olarak belirlendi. 3420 cm^{-1} 'de görülen piklerin -OH gerilme titreşimleri, 1405-859 cm^{-1} arasında görülen piklerin ise C-H ve C-O-C aromatik bağlarına bağlı meydana gelen gerilme titreşimleri olduğu belirlendi. 1569 cm^{-1} 'de görülen piklerin -OC=O, 1490 cm^{-1} 'de görülen piklerin -C=O bağlarına bağlı olduğu belirlendi. Madhumitha ve arkadaşları (2019), yeşil sentezledikleri ZnONP'lerin FT-IR analizi sonucu 667.37-408.91 cm^{-1} aralığında görülen piklerin ZnO gerilme ve bozulma titreşimleri, 3414 cm^{-1} 'de görülen piklerin -OH gerilme titreşimleri olduğunu göstermişlerdir (Madhumitha vd. 2019). Bu tez çalışmasında elde edilen FT-IR analizi bulgularının literatürdeki çeşitli çalışmalarla benzer olduğu tespit edildi (Thongam vd. 2019, Patron-Romere vd. 2020, Erol vd. 2023).

Sitotoksosite, çeşitli etkenlerin hücreler açısından ne kadar toksik olduğunun ifade edilmesidir. Sitotoksik olan bir etken hücrede apoptoz ya da nekroz yolu ile hücrenin hasar görmesine ve ölümüne yol açabilmektedir. Bir maddenin veya materyalin biyoyoumluluk düzeyi sitotoksik aktivitesi ile yakından ilişkilidir. *İn vitro* koşullarda çeşitli yöntemler kullanılarak bir etkenin sitotoksik aktivitesi analiz edilebilmektedir. 1983 yılında Mosmann tarafından geliştirilen 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) testi günümüzde hücre canlılığı, proliferasyon ve sitotoksitenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan hassasiyeti yüksek bir analiz yöntemidir (Mosman 1983, Yıldırım Biçer 2011, Erkekoğlu ve Baydar 2021, İnt. Kyn. 10).

Bu tez çalışmasında bitki ekstraktından sentezlenen ZnONP'lerin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış (10 mg/mL, 5 mg/mL, 2.5 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.625 mg/mL, 0.312 mg/mL, 0.156 mg/mL) olan dozları ile sadece bitki ekstraktı ile farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış (50 mg/mL, 25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.25 mg/mL, 3.125 mg/mL, 1.560 mg/mL ve 0.780 mg/mL) dozlarının 24 ve 48 saat doz uygulaması boyunca MTT canlılık testi ile A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmıştır. ZnONP için LD₅₀ değeri 5 mg/mL olarak bulunmuştur. ZnONP'lerin antikanser aktivitesi, kanser hücresinin apoptozunu, otofajiyi ve antikanser ilaç dağıtımını indüklemeye dahil olmak üzere çeşitli şekillerde kendini göstermektedir. Balraj ve arkadaşları (2017), ZnONP'lerin A549

hücreleri üzerindeki antikanser aktivitesini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada A549 hücre hattı için hücre inhibitör konsantrasyon (IC₅₀) değerini yaklaşık 15.6 µg/mL olarak tespit etmişlerdir (Balraj vd. 2017). Nilavukkarasi ve arkadaşları (2020), yeşil sentezlenmiş ZnONP'leri kullanarak A549 hücreleri üzerinde gerçekleştirdikleri bir çalışmada 250 µg/mL ve 500 µg/mL'lik ZnO nanopartikül konsantrasyonlarının, hücre apoptozu ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (Nilavukkarasi vd. 2020). Umamaheswari ve arkadaşları (2021), A549 hücre hattı üzerinde biyosentezlenmiş ZnONP'ler ile antikanser aktivite çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada farklı şekil değişimlerine uğramış olan çok sayıda ölü hücre gözlemlemişlerdir. IC₅₀ değerinin 40 µg/mL olduğunu saptadıkları bu çalışmada, küçük ZnO parçacıklarının artan yüzey alanı/hacim oranının artan sitotoksik etkiden sorumlu olabileceğini saptamışlardır (Umamaheswari vd. 2021). Çalışmamızda elde edilen sitotoksik aktivite sonuçları ve literatürde yer alan benzer sonuçlara sahip çeşitli çalışmalar düşünüldüğünde bu tez çalışmasında yeşil sentezlenen ZnONP'lerin daha farklı çalışmalarda kullanılmasıyla elde edilebilecek sonuçların antikanser terapi uygulamalarında alternatif ilaç için bir basamak olacağı düşünülmektedir.

Hücrelerin çekirdek, kromozom, DNA, mitotik iğ iplikleri ve hücre döngüsünün kontrol mekanizmalarına zarar veren etkenler genotoksin olarak tanımlanmaktadır. Genotoksinler, replikasyonda görevli enzimleri etkileyebildikleri gibi DNA hasarının onarım süreçlerini de engelleyebilmektedirler. Böylece genetik materyal olan DNA molekülünde doğrudan ya da dolaylı olarak farklı şekillerde hasarlara yol açabilmektedirler. Genetik materyalin hasar alması ise genotoksisite olarak tanımlanmaktadır. Genetik toksisite olarak da bilinen bu süreç kanser, yaşlanma, doku hasarı, infertilite ve çeşitli kalıtsal hastalıklara neden olabilmektedir. Genetik toksisitenin analizi amacıyla Komet testi, Ames testi, Kardeş kromatit değişimi (KDD) Kromozom anormallikleri (KA) testi ve Mikronükleus testi günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011, Sezginer 2016).

Bu çalışmada sentezlenen ZnONP'lerin ve *Sideritis akmanii* ekstraktının A549 hücre hattı üzerindeki 24 ve 48 saatlik doz uygulamalarının genotoksik etkisi Komet testi ile belirlenmiştir. A549 hücre hattı üzerinde sentezlenmiş ZnONP'ler tarafından en yüksek DNA hasarı (62.25±10.15), 48 saatlik uygulamada 10 mg/mL'de görülmüştür. En az DNA hasarı ise (17.35±3.43) ise 48 saatlik uygulamada 2.5 mg/mL'de kaydedilmiştir. Sentezlenmiş ZnONP 25'in hem 24 saat hem de 48 saat uygulamasında kontrol grubuna

kıyasla genotoksik hasarı gerilettiği tespit edilmiştir. Diğer ZnONP'ler ise 24 ve 48 saatlik uygulamalarda kontrol grubunun üzerinde bir genotoksik hasar sergilemiştir. Komet testinde uygulanan tüm bitki ekstraktı dozlarının (12.5, 25, 50 mg/mL) 24 ve 48 saatlik uygulamada genotoksik hasarı azalttığı görülmektedir. Ali ve arkadaşları (2022), yeşil sentezlenmiş ZnONP'lerin genotoksik etkilerini MCF-7 hücre hattı üzerinde komet testi ile analiz etmişlerdir. Çalışmada çeşitli konsantrasyonlara (5, 10 ve 20 µg/ml) maruz bıraktıkları MCF-7 hücrelerinde meydana gelen DNA hasar yüzdesinin doz artışına bağlı olarak azaldığını ancak kuyruk hareket yüzdesinin arttığını belirlemişlerdir (Ali vd. 2022). Başka bir çalışmada ise ZnONP'lerin oral kanser KB hücreleri üzerindeki genotoksik aktivitesini araştıran araştırmacılar komet testi sonucunda 15 ve 20 µg'lık dozlara maruz bırakılan hücrelerde kuyruklu yıldız oluşumunu belirlemişlerdir (Shanmugam vd. 2022).

Bu çalışmada, ZnONP'lerin ve bitki ekstraktının antibakteriyel ve antifungal etkileri disk difüzyon testleri yapılarak araştırılmıştır. ZnONP'lere karşı duyarlılığı en fazla olan suşun *S. aureus* olduğu anlaşılmıştır. ZnONP'lerin mikroorganizma suşları üzerinde 8-13.67 mm arasında değişen inhibisyon zonu oluşumuna neden olduğu kaydedildi. 24, 48 ve 78 saatlik bütün ZnONP doz uygulamalarına karşı en duyarlı suşun *Salmonella enteritidis* olduğu görülmüştür. En yüksek inhibisyon çapı 72 saatlik ve 250 mg/ml ZnONP doz uygulaması yapılan *Salmonella enteritidis* suşunda 13.67 mm olarak kaydedilmiştir. Disk difüzyon testi sonuçlarına bakıldığında yeşil sentez tekniği ile elde edilen ZnONP'lerin deneyde araştırılan değişik mikroorganizmalara karşı farklı antimikrobiyal etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

ZnONP'ler süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit oluşumu gibi ROS üretimini artırıcı etkilere sahip olduğundan kuvvetli antimikrobiyal etkilere yol açmaktadır. Bu yollar ile ZnONP'ler bakteri hücre duvarlarında parçalanmaya, zar proteinlerinde hasarlara ve genomik kararsızlığa yol açarak mikroorganizmaları etkisizleştirebilmektedir (Dutta ve Sugumaran 2021). Literatürde yer alan çeşitli çalışmalarda yeşil sentez tekniğiyle elde edilen ZnONP'lerin antimikrobiyal aktiviteleri ve bu etkileri oluşturmalarını sağlayan çeşitli mekanizmalar gösterilmiştir (Ganesan vd. 2020, Sumanth vd. 2020, El-Belely vd. 2021).

Sonuç olarak *Sideritis akmanii* ekstraktı kullanılarak yeşil sentez tekniği ile sentezlenen ZnONP'lerin karakterizasyonu çeşitli teknikler kullanılarak yapılmış ve elde edilen veriler literatür ile uyumlu bulunmuştur. ZnONP'lerin A549 hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluşturduğu tespit edilmiştir. Yapılan genotoksik aktivite analizleri sonucunda ZnONP'lerin A549 hücrelerinin DNA'ları üzerinde genotoksik etkilere yol açtığı komet testi ile gösterilmiştir. ZnONP'lerin çeşitli suşlar üzerinde antibakteriyel ve antifungal etkilere yol açtığı disk difüzyon testi ile tespit edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen bütün bulgular göz önüne alındığında, *Sideritis akmanii* özütünü kullanarak gerçekleştirilen yeşil sentez tekniği ile üretilen ZnONP'lerin A549 hücre hattı üzerinde neden olduğu sitotoksik ve genotoksik aktiviteleri hangi sinyal yollarını etkileyerek ve hangi epigenetik değişikliklere yol açarak bu etkileri meydana getirdiğini aydınlatabilmek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu süreçlerin detaylarının aydınlatılmasının küçük hücreli dışı akciğer kanseri başta olmak üzere çeşitli kanser tiplerine karşı alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesinde faydalı olabileceğini düşünmekteyiz. Aynı zamanda bu çalışmada sentezlenen ZnONP'lerin, mikroorganizmalar üzerinde neden olduğu antimikrobiyal etkilerin detaylandırılması için daha farklı çalışmalarda kullanılmasıyla elde edilebilecek verilerin çeşitli bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara karşı geliştirilebilecek yeni tedavi yöntemleri için bir basamak olabileceği kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

- Abdelhalim A, Hanrahan J, 2021, Biologically active compounds from Lamiaceae family: Central nervous system effects, Studies in Natural Products Chemistry, Volume - 68: Bioactive Natural Products, Elsevier, 505p.
- Abomuti M A, Danish, E Y, Firoz A, Hasan N, Malik M A, 2021, Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using salvia officinalis leaf extract and their photocatalytic and antifungal activities, Biology, 10, 1075.
- Acar N, 2014, Söğüt (*Salix alba*) ekstaktı mordanlı pamuk, yün elyaf ve ahşap numunelerinin sarıkız çayı otu (*Sideritis trojana ehrend*) ile boyanma özelliklerinin incelenmesi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 80s, Tokat.
- Agarwal H, Kumar S V, Rajeshkumar S, 2017, A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles - An eco-friendly approach, Resource-Efficient Technologies, 3, 406–413.
- Aksoy L, Güzey İ, Düz M, 2022, Essential oil content, antioxidative characteristics and enzyme inhibitory activity of *Sideritis akmanii* Aytaç, Ekici & Dönmez, Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 19, 76–83.
- Alcaraz M J, Jimenez M J, Valverde S, Sanz J, Rabanal R M, Villar A, 1989, Anti-inflammatory compounds from *Sideritis javalambrensis* n-hexane extract, Journal of natural products, 52, 1088–1091.
- Ali S, Sudha K G, Karunakaran G, Kowsalya M, Kolesnikov E, Gorshenkov M V, vd., 2022, Anticancer and photocatalytic activities of zinc oxide nanorods synthesized from *Manilkara littoralis* leaf extract, Materials Chemistry and Physics, 277, Article number 125541.
- Alkan H, 2022, Gümüş Nanopartiküllerin *Moringa oleifera* Özütü ile Biyosentezi ve MCF-7 Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Sitotoksik ve Genotoksik Etkileri, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 65s, Afyonkarahisar.

- Almeida L, Felzenszwalb I, Marques M, Cruz C, 2020, Nanotechnology activities: environmental protection regulatory issues data, Heliyon, 6, Article number e05303.
- Armata M, Gabrieli C, Termentzi A, Zervou M, Kokkalou E, 2008, Constituents of *Sideritis syriaca*. ssp. *syriaca* (Lamiaceae) and their antioxidant activity, Food Chemistry, 111, 179–186.
- Ateş M, 2018, Nanoparçacıkların ölçme ve inceleme teknikleri, Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 11, 63–69.
- Ateş N, 2020, A549 Hücrelerinde *Sideritis phyrgia* Ekstresinin Cisplatin Toksisitesi Üzerine Etkileri, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 81s, Afyonkarahisar.
- Atlı Şekeroğlu Z, Şekeroğlu V, 2011, Genetik toksisite testleri, Tübvav Bilim Dergisi, 4, 221–229.
- Ayaz A, 2008, *Sideritis Hololeuca* Boiss&Heldr. Apud. Bentham ve *Sideritis Libanotica* Labill. Subsp. *Violencens* Ekstraktlarının Antibakteriyal Aktivitesinin Belirlenmesi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 59s, Konya.
- Ayaz E, 2021, Farklı Nane (*Mentha X Piperita* L. ve *Mentha Pulegium* L.) Türlerinin Doğal ve Doku Kültürü Yardımıyla Geliştirilip Sekonder Metabolit ve Uçucu Bileşenlerinin Tespiti, Uşak Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 62s, Uşak.
- Aydın S, Öztürk Y, Beis R, Başer K H C, 1996, Investigation of *Origanum onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* essential oils for analgesic activity, Phytotherapy Research, 10, 342–344.
- Balraj B, Senthilkumar N, Siva C, Krithikadevi R, Julie A, Potheher, I, vd., 2017, Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using marine *Streptomyces* sp. with its investigations on anticancer and antibacterial activity, Research on Chemical Intermediates, 43, 2367–2376.
- Bandeira M, Possan A L, Pavin S S, Raota C S, Vebber M C, Giovanela M, vd., 2020, Mechanism of formation, characterization and cytotoxicity of green synthesized

- zinc oxide nanoparticles obtained from *Ilex paraguariensis* leaves extract, *Nano-Structures & Nano-Objects*, 24, Article number 100532.
- Baran M F, Acay H, Keskin C, 2020, Determination of antimicrobial and toxic metal removal activities of plant-based synthesized (*Capsicum annuum* L. Leaves), ecofriendly, gold nanomaterials, *Global Challenges*, 4, Article number 1900104.
- Bardakçı H, Çevik D, Barak T H, Gözet T, Kan Y, Kırmızıbekmez H, 2020, Secondary metabolites, phytochemical characterization and antioxidant activities of different extracts of *Sideritis congesta* PH Davis et Hub.-Mor, *Biochemical Systematics and Ecology*, 92, 104120.
- Baytop T, 1999, Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün, Nobel Tıp Kitabevleri, 2, 480, İstanbul.
- Berber A A, Aksoy H, 2021, Dağ Çayı’nın (*Sideritis trojana*) Periferik İnsan Lenfositlerinde in vitro Antigenotoksik Etkisi, *Environmental Toxicology and Ecology*, 1, 8–13.
- Biswas R, Alam M, Sarkar A, Haque M I, Hasan M M, Hoque M, 2022, Application of nanotechnology in food: Processing, preservation, packaging and safety assessment, *Heliyon*, Article number 8, e11795.
- Bondi M L, Bruno M, Piozzi F, Başer K H C, Simmonds M S, 2000, Diversity and antifeedant activity of diterpenes from Turkish species of *Sideritis*, *Biochemical systematics and ecology*, 28, 299–303.
- Bozkurt R N, 2022, Kuşburnu çekirdeği özütünden yeşil sentez ile çinko oksit nanopartikül sentezi ve karakterizasyonu, İstanbul Üniversitesi – Cerrahpaşa, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 91s, İstanbul.
- Ceylan R, Demirbaş A, Öçsoy İ, Aktümsek A, 2021, Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extracts of three *Sideritis* species from Turkey and evaluations bioactivity potentials, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 21, Article number 100426.
- Cho E J, Holback H, Liu K C, Abouelmagd S A, Park J, Yeo Y, 2013, Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging Technologies, *Molecular pharmaceutics*, 10, 2093–2110.

- Çarıkçı S, 2010, Bazı Sideritis (*Sideritis niveotomentosa*, *Sideritis hololeuca*, *Sideritis brevidens*) türlerinin diterpenik bileşenlerinin izolasyonu ve yapılarının tayini, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 163s, Balıkesir.
- Çatak E, Atalay A, 2022, Lamiaceae (Labiatae) (Ballıbabagiller) Familya'sının Ekonomik ve Tıbbi Değerleri, Euroasia Journal of Mathematics, Engineering, Natural & Medical Sciences, 9, 150–157
- Dağlıoğlu Y, Özkan Yılmaz H, 2018, Nanopartikül karakterizasyon yöntemleri ve ekotoksisite deneylerindeki önemi, Marmara Fen Bilimleri Dergisi, 30, 1–17.
- Daniel M C, Astruc D, 2004, Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, Chemical reviews, 104, 293–346.
- Davis P H, 1982, Lamiaceae, Flora of Turkey and East Aegean Islands Edinburgh University Press, edingburg, 7.
- Dönmez S, 2020, Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using zingiber officinale root extract and their applications in glucose biosensor, El-Cezeri, 7, 1191–1200.
- Duman H, Aytaç Z, Ekici M, Karavelioğulları F A, Dönmez A, Duran A, 1995, Three new species (Labiatae) from Turkey, Flora Mediterranea, 5, 221–228.
- Dutta G, Sugumaran A, 2021, Bioengineered zinc oxide nanoparticles: Chemical, green, biological fabrication methods and its potential biomedical applications, Journal of drug delivery science and technology, 66, 102853.
- Ealia S A M, Saravanakumar M P, 2017, A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. In IOP conference series: materials science and engineering, 263, Article number 032019.
- El-Belely E F, Farag M M, Said H A, Amin A S, Azab E, Gobouri A A, vd., 2021, Green synthesis of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) using *Arthrospira platensis* (Class: Cyanophyceae) and evaluation of their biomedical activities, Nanomaterials, 11, 95.

- Erol İ, Sivrier M, Ciğerci İ H, Özkara A, Akyıl D, 2023, ZnO-containing nanocomposites produced from *Mentha pulegium* L. of a new HEMA-based methacrylate copolymer: improvement the thermal and antimicrobial effect, *Journal of Polymer Research*, 30, Article number 103.
- Davis P H, 1982, *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh University, Edinburgh, 7, 96–97.
- Erdoğan Ö, Birtekocak F, Orayşın E, Abbak M, Demirbolat G M, Paşa S, vd., 2019, Enginar yaprağı sulu ekstraktı kullanılarak çinko oksit nanopartiküllerinin yeşil sentezi, karakterizasyonu, anti-bakteriyel ve sitotoksik etkileri, *Düzce Medical Journal*, 21, 19–26.
- Erkan N, Çetin H, Ayrancı, E 2011, Antioxidant activities of *Sideritis congesta* Davis et Huber-Morath and *Sideritis arguta* Boiss et Heldr: Identification of free flavonoids and cinnamic acid derivatives, *Food Research International*, 44, 297–303.
- Erkekoğlu P, Baydar T, 2021, Güncel in vitro sitotoksikite testleri, *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41, 45–63.
- Eskin A N, 2022, Demir Oksit Nanopartiküllerinin *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae)’nın Biyolojisine ve Hemositlerine Etkisi, Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 61s, Nevşehir.
- Ezer N, Usluer, G, Güneş I, Erol, K, 1994, Antibacterial activity of some *Sideritis* species, *Fitoterapia*, 65, 549–551.
- Ezer N, Vila R, Cañigual S, Adzet T, 1996, Essential oil composition of four Turkish species of *Sideritis*, *Phytochemistry*, 41, 203–205.
- Fecka I, Turek S, 2008, Erratum to “Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques” [Food Chem. 108 (3) (2008) 1039–1053], *Food Chemistry*, 4, 1051–1052.
- Ganesan V, Hariram M, Vivekanandhan S, Muthuramkumar S, 2020, *Periconium* sp. (endophytic fungi) extract mediated sol-gel synthesis of ZnO nanoparticles for

antimicrobial and antioxidant applications, *Materials Science in Semiconductor Processing*, 105, 104739.

Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I, 2021, The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis, *International journal of molecular sciences*, 22, Article number 12827.

Gökşen N, 2016, *Mentha pulegium*, *Ziziphora tenuior* ve *Echinophora tenuifolia*'nın Esansiyel Yağlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri ve Biyofilm Üzerine Etkisi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 60s, Tokat.

Gümüşçü A, Tugay O, Kan Y, 2011, Comparison of essential oil compositions of some natural and cultivated endemic *Sideritis* species, *Advances in Environmental Biology*, 222–227.

Günbatan T, Gürbüz I, Bedir E, Özkan A M G, Özçınar Ö, 2020, Investigations on the anti-ulcerogenic activity of *Sideritis caesarea* H. Duman, Aytac & Baser, *Journal of Ethnopharmacology*, 258, Article number: 112920.

Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç T, 2012, *Türkiye bitkileri listesi*, İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Yayını, 1290s.

Gür T, Meydan İ, Seçkin H, Bekmezci M, Şen F, 2022, Green synthesis, characterization and bioactivity of biogenic zinc oxide nanoparticles, *Environmental Research*, 204, Article number 111897.

Güzey İ, 2017, *Afyon Endemiği Sideritis akmanii* Türünün Serbest Radikal İçeriği, Toplam Fenolik Madde Miktarı, Total Antioksidan ve Oksidan Statüsü ile Mineral Madde İçeriğinin İncelenmesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 65s, Afyonkarahisar.

İşcan G, Kırimer N, Kürkçüoğlu M, Başer K H C, 2005, Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Two Endemic Species from Turkey: *Sideritis cilicica* and *Sideritis bilgerana*, *Chemistry of Natural Compounds*, 41, 679–682.

- Joudeh N, Linke D, 2022, Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists, *Journal of Nanobiotechnology*, 20, 262.
- Kahraman, A, Celep F, Doğan, M, 2009, Morphology, anatomy and palynology of *Salvia indica* L. (Labiatae), *World Applied Sciences Journal*, 6, 289–296.
- Kamarajan G, Anburaj D B, Porkalai V, Muthuvel A, Nedunchezian G, 2022, Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extract and their photocatalyst degradation and antibacterial activity, *Journal of the Indian Chemical Society*, 99, Article number 100695.
- Kamatou G P, Viljoen A M, Steenkamp P, 2010, Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species, *Food Chemistry*, 119, 684–688.
- Kamiloğlu S, Sarı G, Özdal T, Çapanoğlu E, 2020, Guidelines for cell viability assays, *Food Frontiers*, 1, 332–349.
- Karnani R L, Chowdhary A, 2013, Biosynthesis of silver nanoparticle by eco-friendly method, *Indian Journal of NanoScience*, 1, 25–31.
- Khan M A R, Al Mamun M S, Ara M H, 2021, Review on platinum nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications, *Microchemical Journal*, 171, Article number 106840.
- Khanna P, Kaur A, Goyal D, 2019, Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications, *Journal of microbiological methods*, 163, Article number 105656.
- Kırımer N, Başer K H C, Demirci B, Duman H, 2004, Essential oils of *Sideritis* species of Turkey belonging to the section *Empedoclia*, *Chemistry of Natural Compounds*, 40, 19–23.
- Köker E, 2014, *Sideritis libanotica* Bitkisinin Genotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 83s, Kahramanmaraş.

- Köse E O, Deniz I G, Sarıkürkçü C, Aktaş Ö, Yavuz M, 2010, Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Sideritis erythrantha* Boiss. and Heldr.(var. *erythrantha* and var. *cedretorum* PH Davis) endemic in Turkey, *Food and chemical toxicology*, 48, 2960–2965.
- Kumar P, Nagarajan A, Uchil P D, 2018, Analysis of Cell Viability by the MTT Assay, *Cold Spring Harb Protoc*, 469–471.
- Machado S, Pacheco J G, Nouws H P A, Albergaria J T, Delerue-Matos C, 2015, Characterization of green zero-valent iron nanoparticles produced with tree leaf extracts, *Science of the total environment*, 533, 76–81.
- Madhumitha G, Fowsiya J, Gupta N, Kumar A, Singh M, 2019, Green Synthesis, characterization and antifungal and photocatalytic activity of *Pithecellobium dulce* peel-mediated ZnO nanoparticles, *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 127, 43–51.
- Mosmann T, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65, 55–63.
- Mourdikoudis S, Pallares R M, Thanh N T, 2018, Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties, *Nanoscale*, 10, 12871–12934.
- Nilavukkarasi M, Vijayakumar S, Prathipkumar S, 2020, *Capparis zeylanica* mediated bio-synthesized ZnO nanoparticles as antimicrobial, photocatalytic and anti-cancer applications, *Materials Science for Energy Technologies*, 3, 335–343.
- Öztürk Y, Aydın S, Öztürk N, Başer K H C, 1996, Effects of extracts from certain *Sideritis* species on swimming performance in mice, *Phytotherapy Research*, 10, 70–73.
- Parveen K, Banse V, Ledwani L, 2016, Green synthesis of nanoparticles: Their advantages and disadvantages, In *AIP conference proceedings*, 1724, Article number 020048.
- Patron-Romere L, Luque P A, Soto-Rables C A, Nava O, Vilchis-Nestor A R, Barajas-Carrillo V W, vd., 2020, Synthesis, characterization and cytotoxicity of zinc

- oxide nanoparticles by green synthesis method, Journal of Drug Delivery Science and Technology, 60, Article number 101925.
- Sahoo S, Maiti M, Ganguly A, Jacob George J, Bhowmick A K, 2007, Effect of zinc oxide nanoparticles as cure activator on the properties of natural rubber and nitrile rubber, Journal of applied polymer science, 105, 2407–2415.
- Sarı A O, Bilgin O, Bilgiç A, 2005, Dağ çayında (*Sideritis perfoliata* L.) Bitki sıklığının verim üzerine etkisi, Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi, 15, 27–33.
- Sarıbuğa S, 2014, Manyetik nanopartiküllerin analitik incelenmesi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 73s, İstanbul.
- Sarıkürkçü C, Özer M S, İstifli E S, Şahinler S Ş, Tepe B, 2021, Chromatographic profile and antioxidant and enzyme inhibitory activity of *Sideritis leptoclada*: An endemic plant from Turkey, South African Journal of Botany, 143, 393–405.
- Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E, 1995, Tohumlu bitkiler sistematığı Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, 116, 394, İzmir.
- Selmani A, Kovačević D, Bohinc K, 2022, Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond, Advances in Colloid and Interface Science, Article number 102640.
- Sezginer H, 2016, Toksik maddelerin genotoksik analiz yöntemleri, Türk Bilimsel Denemeler Dergisi, 9, 50–55.
- Shaba E Y, Jacob J O, Tijani J O, Suleiman M A T, 2021, A critical review of synthesis parameters affecting the properties of zinc oxide nanoparticle and its application in wastewater treatment, Applied Water Science, 11, 1–41.
- Shahidi F, 2000, Antioxidants in food and food antioxidants, Food/nahrung, 44, 158–163.
- Shanmugam K, Sellappan S, Alahmadi T A, Almoallim H S, Natarajan N, Veeraraghavan V P, 2022, Green synthesized zinc oxide nanoparticles from *Cinnamomum verum* bark extract inhibited cell growth and induced caspase-

- mediated apoptosis in oral cancer KB cells, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 74, Article number 03577.
- Shanmuganathan R, Karuppusamy I, Saravanan M, Muthukumar H, Ponnuchamy K, Ramkumar V S, vd., 2019, Synthesis of silver nanoparticles and their biomedical applications-a comprehensive review, *Current pharmaceutical design*, 25, 2650–2660.
- Singh A, Singh N B, Hussain I, Singh H, Singh S C, 2015, Plant-nanoparticle interaction: an approach to improve agricultural practices and plant productivity, *International Journal of Pharmaceutical Science Invention*, 4, 25–40.
- Singh P, Kim Y J, Zhang D, Yang D C, 2016, Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms, *Trends in biotechnology*, 34, 588–599.
- Skouroliaiou M, Kastanidou O, Stathopoulou M, Vourli G, 2009, Evaluation of the Antioxidant Effect of a New Functional Food Enriched with *Sideritis Euboea* in Healthy Subjects, *Journal of Medicine Food*, 12, 1105–1110.
- Sumanth B, Lakshmeesha T R, Ansari M A, Alzohairy M A, Udayashankar A C, Shobha B, vd., 2020, Mycogenic synthesis of extracellular zinc oxide nanoparticles from *Xylaria acuta* and its nanoantibiotic potential, *International Journal of Nanomedicine*, 15, 8519–8536.
- Tadić V M, Jeremic I, Dobric S, Isakovic A, Markovic I, Trajkovic V, Zoran Redžić, vd., 2012, Anti-inflammatory, gastroprotective, and cytotoxic effects of *Sideritis scardica* extracts, *Planta medica*, 78, 415–427.
- Tailor G, Yadav B L, Chaudhary J, Joshi M, Suvalka C, 2020, Green synthesis of silver nanoparticles using *Ocimum canum* and their anti-bacterial activity, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 24, Article number 100848.
- Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M, 2007, *Farmasötik Botanik*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 93, 1–458.
- Tejamaya M, Römer I, Merrifield R C, Lead J R, 2012, Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media, *Environmental science & technology*, 46, 7011–7017.

- Temel M, Kargioğlu M, Arı S, 2015, Afyonkarahisar'da Yayılış Gösteren *Stachys byzantina*'nın (Lamiaceae) Morfolojik, Anatomik ve Ekolojik Özellikleri, *SDU Journal of Science (E-Journal)*, 10, 35–47.
- Thongam D D, Gupta J, Sahu N K, 2019, Effect of induced defects on the properties of ZnO nanocrystals: surfactant role and spectroscopic analysis, *SN Applied Sciences*, Article number 1030.
- Todorova M, Trendafilova A, 2014, *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity, *Journal of ethnopharmacology*, 152, 256–265.
- Tsibranska I, Tylkowski B, Kochanov R, Alipieva K, 2011, Extraction of biologically active compounds from *Sideritis* ssp. L, *Food and Bioproducts Processing*, 89, 273–280.
- Tunalıer Z, Koşar M, Öztürk N, Başer K H C, Duman H, Kırimer N, 2004, Antioxidant properties and phenolic composition of *Sideritis* species, *Chemistry of natural compounds*, 40, 206–210.
- Umamaheswari A, Prabu S L, John S A, Puratchikody A, 2021, Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using leaf extracts of *Raphanus sativus* var. *Longipinnatus* and evaluation of their anticancer property in A549 cell lines, *Biotechnology Reports*, 29, Article number e00595.
- Uğur A, Varol Ö, Ceylan Ö, 2005, Antibacterial of *Sideritis curvidens* and *Sideritis lonata* from Turkey, *Pharmaceutical Biology* 43, 47–52.
- Varadavenkatesan T, Lyubchik E, Pai S, Pugazhendhi A, Vinayagam R, Selvaraj R, 2019, Photocatalytic degradation of Rhodamine B by zinc oxide nanoparticles synthesized using the leaf extract of *Cyanometra ramiflora*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 199, Article number 111621.
- Vijayakumar S, Mahadevan S, Arulmozhi P, Sriram S, Praseetha P K, 2018, Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Atalantia monophylla* leaf extracts: Characterization and antimicrobial analysis, *Materials Science in Semiconductor Processing*, 82, 39–45.

- Vijayaraghavan K, Ashokkumar T, 2017, Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications, *Journal of environmental chemical engineering*, 5, 4866–4883.
- Villar A, Esplugues J, Alacaraz M J, 1982, Acute Anti-inflammatory Activity of *Sideritis mugronensis* Flavonoid, *Arch Pharmacology Toxicology*, 8, 99–106.
- Yakut M, Kum M, 2022, *Nanoteknolojide Karakterizasyon Teknikleri*, İksad Yayınevi, 110, Ankara.
- Yanti D D, Maryanti E, 2021, Green synthesis ZnO nanoparticles using rinds extract of *sapindus rarak* DC, *Journal of Science and Applicative Technology*, 5, 198–201.
- Yıldırım Bıçer A Z, 2011, Seromer esaslı iki farklı indirekt kompozit materyalin sitotoksik etkilerinin in vitro değerlendirilmesi, *Gazi Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 28, 69–74.
- Yıldırım İ, Felek R, 2023, Investigation of antimicrobial activities of some *sideritis* species, *Mediterranean Agricultural Sciences*, 36, 19–21.
- Yuvakkumar R, Suresh J, Nathanael A J, Sundrarajan M, Hong S I, 2014, Novel green synthetic strategy to prepare ZnO nanocrystals using rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) peel extract and its antibacterial applications, *Materials Science and Engineering: C*, 41, 17–27.
- Zengin G, Uğurlu A, Baloglu M C, Diuzheva A, Jekő J, Cziáky Z, vd., 2019, Chemical fingerprints, antioxidant, enzyme inhibitory, and cell assays of three extracts obtained from *Sideritis ozturkii* Aytaç & Aksoy: An endemic plant from Turkey, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 171, 118–125.
- Xu L, Yi-Yi, W, Huang J, Chun-Yuan C, Zhen-Xing W, Xie H, 2020, Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety, *Theranostics*, 10, Article number 8996.

İnternet Kaynakları

- 1- https://www.researchgate.net/figure/Present-and-future-applications-of-nanoparticles_fig5_340041612, 09.10.2022
- 2- <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.8991>, 09.12.2022
- 3- <https://bizimbitkiler.org.tr/v2/hiyerarsi.php?f=Lamiaceae>, 20.12.2022
- 4- <https://bizimbitkiler.org.tr/v2/hiyerarsi.php?c=Sideritis>, 20.12.2022
- 5- https://itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=32756#null, 20.12.2022
- 6- <https://gbif.org/occurrence/574760935>, 25.12.2022
- 7- <https://bizimbitkiler.org.tr/yeni/demos/technical/map1.php?id=8697>, 25.12.2022
- 8- <https://pttavm.com/afyon-dag-cayi-sideritis-akmanii-p-86054330>, 25.12.2022
- 9- https://serc.carleton.edu/msu_nanotech/methods/XRD.html, 15.01.2023
- 10- <https://news-medical.net/health/What-is-Cytotoxicity.aspx>, 21.01.2023