



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Lepista nuda ve *Marasmius oreades* MANTAR EKSTRAKTLARI ile
SENTEZLENEN GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN ANTİKANSER
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Beren DEMİR

Danışman: Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR

TOKAT- 2023

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Doç. Dr. Aykut Özgür danışmanlığında hazırlamış olduğum “*Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* Mantar Ekstraktları ile Sentezlenen Gümüş Nanopartiküllerin Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

.../.../...

Beren Demir

JÜRİ KABUL VE ONAY

Beren DEMİR tarafından hazırlanan “ *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* Mantar Ekstraktları ile Sentezlenen Gümüş nanopartiküllerin Antikanser Aktivitelerinin İncelenmesi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 12/05/2023 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Danışman : Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR

Üye (Başkan) : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU

Üye : Prof. Dr. İbrahim TÜRKEKUL

ONAY

...../...../.....

Prof. Dr. Mehmet GÜNEŞ
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimime başladığımda desteklerini esirgemeyen merhum Prof. Dr. Necmettin YILMAZ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol gösteren, beni cesaretlendiren, öğrencisi olmaktan onur duyduğum değerli danışmanım Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR'e,

Çalışmamda mantarların elde edilmesi aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. İbrahim TÜRKEKUL'a,

Bilimsel ve deneysel çalışmalarda bana yardımcı olan Dr. Nazan GÖKŞEN TOSUN'a ve Dr. Özlem KAPLAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan arkadaşlarım Reyhan ÖNEN, Burak KÜÇÜK, Çağlar BERKEL ve Bahra NAJİ'ye,

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, bana her zaman sabır ve anlayışla yaklaşan, sevgilerini daima hissettiğim annem Meryem DEMİR'e ve babam İsmail DEMİR'e sonsuz teşekkür ederim.

Beren Demir

MAYIS 2023

ÖZET

Lepista nuda ve *Marasmius oreades* MANTAR EKSTRAKTLARI ile SENTEZLENEN GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN ANTİKANSER AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Demir, Beren

Yüksek Lisans, Biyoloji Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Aykut Özgür

Mayıs 2023, xii + 63 sayfa

Çalışmamızda *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* isimli mantarlar kullanılarak antikanser aktiviteleri değerlendirilmek üzere AgNP'lerin yeşil sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada çevre dostu, toksik olmayan, maliyeti düşük ve elde edilmesi kolay olan mantarlar biyolojik sentez aracı olarak kullanılmıştır. Sentezlenen AgNP'lerin karakterizasyonunda, UV-Vis spektrofotometrisi, FT-IR analizi, DLS tekniği kullanılmıştır. Çalışmamızda, FT-IR analizinde literatürle benzer şekilde AgNP'lerin sahip olduğu fonksiyonel grupların varlığı gösterilmiştir. DLS tekniği ile AgNP'lerin boyut analizi yapılmış olup nanoparçacıkların kararlılığı incelenmiş ve literatürle karşılaştırılmıştır. Yaptığımız DLS analizinde *Lepista nuda* mantarı ile sentezlenen AgNP'lerin ortalama boyutu 50.2 nm ve *Marasmius oreades* mantarı ile sentezlenen AgNP'lerin ortalama boyutu ise 54.6 nm olarak ölçülmüştür ve her iki mantar ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin monodispers olduğu gösterilmiştir. AgNP'lerin sitotoksik aktivitesi MTT canlılık testi ile 24 saat ve 48 saat süreyle MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde gösterilmiştir. MTT analizinde negatif kontrole göre MCF-7 hücrelerinin canlılığında doza bağlı olarak azalma gözlemlenmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında ise 24 saat süreli MTT testinde dozdan bağımsız bir şekilde, 48 saat süreli MTT testinde ise doza bağımlı şekilde hücrelerin canlılığında azalma görülmüştür. qRT-PCR analizi ile Kaspaz-9, Bax ve Bcl-2 genlerinin ifadeleri kontrol grubuyla kıyaslanmıştır. Analizler sonucunda hücrelerin canlılığını kaybetmesinin, apoptozun bir göstergesi olan Bax/Bcl-2 oranında kontrol grubuna kıyasla artış gözlemlenmesiyle ilişkili olabileceği değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler; Kanser, Gümüş nanopartikül, Mantar, Apoptoz

ABSTRACT
INVESTIGATION OF ANTICANCER ACTIVITIES OF SILVER
NANOPARTICLES SYNTHESIZED BY *LEPISTA NUDA* AND *MARASMIUS*
OREADES MUSHROOM EXTRACTS

Demir, Beren
Master's Thesis, Division of Biology
Advisor: Assoc.Prof. Dr. Aykut Özgür
May 2023, xii + 63 pages

In our study, green synthesis of silver nanoparticles was performed to evaluate anticancer activities by using fungi named *Lepista nuda* and *Marasmius oreades*. In this study, fungi, which are environmentally friendly, non-toxic, low cost and easy to obtain, were used as a biological synthesis tool. In the characterization of the synthesized AgNPs, UV-Vis visible region spectrophotometry, FT-IR analysis, DLS technique were used. In our study, the FT-IR analysis showed the existence of functional groups that AgNPs have, similar to the literature. The dimensional analysis of the AgNPs was performed using the DLS technique, and the stability of the nanoparticles was examined and compared with the literature. In our DLS analysis, the average size of AgNPs synthesized by *Lepista nuda* fungus was measured as 50.2 nm and the average size of AgNPs synthesized by *Marasmius oreades* fungus was measured as 54.6 nm, and it was shown that AgNPs synthesized by both mushroom extracts were monodisperse. The cytotoxic activity of AgNPs was shown in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells for 24 hours and 48 hours using the MTT viability test. In the MTT analysis, a dose-dependent decrease in the viability of MCF-7 cells was observed compared to the negative control. In the MDA-MB-231 cell line, a dose-independent decrease in cell viability was observed in the 24-hour MTT test and a dose-dependent decrease in the 48-hour MTT test. In the MDA-MB-231 cell line, a dose-independent decrease in cell viability was observed in the 24-hour MTT test and a dose-dependent decrease in the 48-hour MTT test. The expressions of Caspase-9, Bax and Bcl-2 genes were compared with the control group by qRT-PCR analysis. As a result of the analyses, it was evaluated that the loss of cell viability may be related to the observation of an increase in Bax/Bcl-2 expression, which is an indicator of apoptosis, compared to the control group.

Keywords; Cancer, Silver nanoparticle, Fungus, Apoptosis

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK SÖZLEŞME SAYFASI	
JÜRİ KABUL VE ONAY	
ÖNSÖZ	
ÖZET (TÜRKÇE)	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mantarların tıbbi alanda kullanılması	3
2.2. <i>Lepista nuda</i> ve <i>Marasmius oreades</i> mantarlarının özellikleri	4
2.2.1 <i>Lepista nuda</i>	4
2.2.2 <i>Marasmius oreades</i>	5
2.3. Nanoteknoloji ve nanopartiküller	6
2.4. Nanopartiküllerin yeşil sentezi	7
2.5 Nanopartiküllerin yeşil sentezinde kullanılan ikincil metabolitler	8
2.6. Nanopartiküllerin kullanım alanları	8
2.7. Gümüş nanopartikülü	9
2.8. Kanseri nanoteknolojisi	10

2.9. Kanser ve apoptoz	11
2.10. Metalik nanopartiküllerin antikanser aktiviteleri	13
2.11. Metalik nanopartiküllerin toksisitesi	14
2.12. AgNP'lerin antikanser aktiviteleri.....	15
2.13. Biyolojik sentezlenen nanopartiküllerin karakter analiz yöntemleri	16
2.13.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) tekniği	16
2.13.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) tekniği.....	16
2.13.3. Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) tekniği.....	17
2.13.4. UV-Vis / Görünür Absorpsiyon tekniği	17
2.13.5. X-ışını Kırınımı (XRD) tekniği	17
2.13.6. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)	18
2.13.7. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) tekniği.....	18
2.13.8. Zeta potansiyeli	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Mantar örneklerinin elde edilmesi ve hazırlanması.....	22
3.2. Biyolojik yöntem ile sentezlenen AgNP'lerin yeşil sentezi	22
3.3. AgNP'lerin optimizasyonu	23
3.4. Sentezlenen AgNP'lerin karakterizasyonu	25
3.5. Kullanılan kanser hücre hatları	25
3.6. Hücre kültürü	25
3.7. Hücrelerin pasajlanması.....	26
3.8. MTT hücre canlılık testi / Sitotoksite testi	27
3.9. qRT-Real Time PCR analizi	29

3.9.1. Total RNA izolasyonu	29
3.9.2. Tamamlayıcı DNA / cDNA sentezi.....	30
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	33
4.1. Uv-Vis spektroskopisi analizi sonuçları	33
4.2. DLS analizi sonuçları	35
4.3. FT-IR analizi sonuçları	37
4.4. Sentezlenen AgNP'lerin sitotoksisite analizleri.....	40
4.5 qRT-PCR analiz sonuçları	49
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	55
6. KAYNAKLAR	57
7. ÖZGEÇMİŞ	63

SİMGE VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
+/-	: Artı eksi
µL	: Mikrolitre
Ag	: Gümüş
AgNO ₃	: Gümüş nitrat
C	: Karbon
°C	: Santigrad Derece
Ca ⁺⁺	: Kalsiyum
cm	: Santimetre
CO ₂	: Karbondioksit
dH ₂ O	: Distile su
g	: Gram
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HeLa	: Cervical cancer cells
HepG2	: Hepatocellular carcinoma cells
HT29	: The human colon adenocarcinoma cell line
IL	: İnterlökin
keV	: Kiloelektronvolt
M	:Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mV	: Milivolt
OH	: Hidroksil

p53	: Tumor protein 53
pH	: Power of Hydrogen
R ²	: Belirleme katsayısı
rpm	: Revolutions per minute
sp	: Species

Kısaltmalar	Açıklama
A549	: Akciğer kanseri hücre hattı
AgNP	: Gümüş nanopartikül
BAX	: Bcl-2 Associated X protein (Bcl-2 ilişkili X Proteini)
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2 (B-hücre lenfoma protein-2)
BRCA	: Breast cancer
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
COX	: Siklooksijenaz
DAPI	: 4 ', 6-diamidino-2-phenylindole
DLS	: Dinamik Işık Saçılımı
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPBS	: Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EDX	: Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi
ER	: Östrojen reseptörü
FBS	: Fetal Bovine Serum
FT-IR	: Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi
H2DCFDA	: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate

HCT-116	: Human Colon Cancer-116
IC ₅₀	: Inhibitory concentration at 50%
IR	: İnfrared
L.N.	: <i>Lepista nuda</i>
MCF-7	: Michigan Cancer Foundation-7
MDA-MB-231	: M.D. Anderson - Metastatic Breast-231
M.O.	: <i>Marasmius oreades</i>
MTT	: 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid
NP	: Nanopartikül
PC-3	: Prostate cancer-3
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SIOH	: Silanol
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
TNF-a	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
UV-Vis	: Ultraviyole ve görünür ışık
XRD	: X-Işını Difraksiyonu

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Tokat/Avlunlar bölgesinden toplanan <i>Lepista nuda</i> mantarının fotoğraf görüntüsü	4
Şekil 2.2. Tokat/Avlunlar bölgesinden toplanan <i>Marasmius oreades</i> mantarının fotoğraf görüntüsü	5
Şekil 2.3 Tokat /Avlunlar bölgesinde çekilen peri halkalarının fotoğraf görüntüsü	6
Şekil 2.4 Mantar ekstresi aracılığıyla gümüş nanopartikül sentezi şeması	8
Şekil 2.5 Apoptozun mitokonriyal ve ölüm reseptörleri yolağı şeması	13
Şekil 3.1 AgNP'lerin biyolojik sentezi aşamaları	24
Şekil 3.2 MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 24 saat boyunca (A) ve 48 saat boyunca (B) MTT solüsyonu ile muamele edilen hücrelerin fotoğraf görüntüsü	28
Şekil 3.3 Favorgen internet sitesinden alınan RNA izolasyon şeması	30
Şekil 3.4 Deneyde kullanılan Roche adlı firmanın Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit'in fotoğraf görüntüsü	31
Şekil 4.1 Sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis absorpsiyon spektrumu	34
Şekil 4.2 <i>Lepista nuda</i> + AgNP zeta potansiyeli (mV)	36
Şekil 4.3 <i>Marasmius oreades</i> + AgNP zeta potansiyeli (mV)	37
Şekil 4.4. <i>Lepista nuda</i> mantar ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin FT-IR grafiği.	39
Şekil 4.5 <i>Marasmius oreades</i> mantar ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin FT-IR grafiği	39

Şekil 4.6 <i>Lepista nuda</i> (A) ve <i>Marasmius oreades</i> (B) mantar ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarındaki 24 saat süreli sitotoksik aktivitesi.....	42
Şekil 4.7 <i>Lepista nuda</i> (A) ve <i>Marasmius oreades</i> (B) mantar ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarındaki 24 saat süreli sitotoksik aktivitesi.....	43
Şekil 4.8 <i>Lepista nuda</i> (A) ve <i>Marasmius oreades</i> (B) mantar ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarındaki 48 saat süreli sitotoksik aktivitesi.....	45
Şekil 4.9 <i>Lepista nuda</i> (A) ve <i>Marasmius oreades</i> (B) mantar ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarındaki 48 saat süreli sitotoksik aktivitesi.....	46
Şekil 4.10 MCF-7 hücre hattında <i>Lepista nuda</i> ve <i>Marasmius oreades</i> mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele edilen hücrelerin kontrol grubuna göre Kaspaz-9 geni ifadeleri (A) MDA-MB-231 hücre hattında <i>Lepista nuda</i> ve <i>Marasmius oreades</i> mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele edilen hücrelerin kontrol grubuna göre Kaspaz geni ifadeleri (B)	50
Şekil 4.11 MCF-7 hücre hattında <i>Lepista nuda</i> ve <i>Marasmius oreades</i> mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele edilen hücrelerin kontrol grubuna göre Bcl-2 geni ifadeleri (A) MDA-MB-231 hücre hattında <i>Lepista nuda</i> ve <i>Marasmius oreades</i> mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele edilen hücrelerin kontrol grubuna göre Bcl-2 geni ifadeleri (B)	51
Şekil 4.12 MCF-7 hücre hattında <i>Lepista nuda</i> ve <i>Marasmius oreades</i> mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele edilen hücrelerin kontrol grubuna göre Bax geni ifadeleri (A) MDA-MB-231 hücre hattında <i>Lepista nuda</i> ve <i>Marasmius oreades</i> mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele edilen hücrelerin kontrol grubuna göre Bax geni ifadeleri (B)	53
Şekil 4.13 MCF-7 hücre hattında <i>Lepista nuda</i> ve <i>Marasmius oreades</i> mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele edilen hücrelerin kontrol grubuna göre Bax/Bcl-2 oranı grafikleri (A) MDA-MB-231 hücre hattında <i>Lepista nuda</i>	

ve *Marasmius oreades* mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele edilen hücrelerin kontrol grubuna göre Bax/Bcl-2 oranı grafikleri (B)53



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Kullanılan sarf malzemeler	20
Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar	21
Çizelge 4.1 AgNP'lerin MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücreleri üzerinde IC ₅₀ değerleri	40

1. GİRİŞ

Kanser, hasarlı hücrelerin kontrolsüz çoğalarak, başka bölgelere de yayılmasından kaynaklanan hastalıkların genel adıdır. Kadınlarda en fazla rastlanılan kanser türü meme kanseridir. Ölümle sonuçlanan kanserlerde akciğer kanserinden sonra ikinci kanser türü olan meme kanserinin oluşmasında genetik faktörler olmak üzere birçok risk faktörü bulunmaktadır. İnsan meme kanserlerinin yaklaşık %40'ından p53 mutasyonları sorumludur. DNA tamirinde görev alan BRCA1 ve BRCA2 meme kanseri genlerinde oluşan hatalar tüm meme kanserlerinin oluşmasında yaklaşık %10 oranında etkilidir. Östrojen reseptörü de meme kanserinin oluşmasında oldukça önemlidir. Güncel kanser çalışmalarında, çeşitli proteinlere işlevsellik kazandıran glikozilasyon mekanizması bir takım hastalıkların ortaya çıkış prosesini düzenleyen bir sistemdir (Demircan ve ark.,2019).

Nanoteknoloji, metrenin milyarda biri anlamına gelen, nanometre boyutlarındaki parçacıkları içeren bir bilim dalıdır. Bir nanopartikül (NP), genellikle 1 nm ile 100 nm arasındaki parçacıklar şeklinde tanımlanmaktadır. Partiküllerin boyutunun çok küçük olması, çeşitli veriliş yolları için uygun olması, taşıma kapasitelerinin yüksekliği, ilaçların kombine şekilde taşınması, suda çözünen ve çözünemeyen ilaçların birleştirilebilmesi, ilaçlardan daha fazla etki sağlanması, ilaçların hedefe taşınması gibi sıradışı avantajlarından ötürü oldukça elverişli hale gelmiştir (Emel ve ark., 2020). Nanoteknoloji esasında, maddeyi oluşturan atomların istenilen nitelikleri kazandırmak amacıyla onları yeniden manipüle etmeyi temel alır. Atom parçacıklarını 2000 kez büyütebilen Tarama Tünel Mikroskopy'nun 1981 yılında keşfedilmesiyle beraber nanoteknoloji de gelişmiştir (Ormanoğlu ve ark., 2021). Günümüz bilimin çığır açan teknoloji alanlarından biri olan nanoteknoloji, birçok bilim dalı ile birlikte koordine olan bir teknolojiye sahiptir (Kütük ve ark., 2019).

Nanopartiküller fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntem olmak üzere üç şekilde sentezlenebilirler. Toksikite miktarının fazla olmasından ve pahalılık açısından fiziksel ve kimyasal yöntemler birer dezavantajdır. Biyolojik sentez ise düşük bütçeli, çevre dostu ve güvenilir bir yöntemdir. Bakteriler, funguslar, algler ve bitkilerin farklı kaynaklarından yararlanılmasıyla birlikte tüm bunlar biyolojik sentezin daha fazla tercih edilmesini sağlamıştır (Baran, 2019).

Nanomateriyallerin göreceli olarak yüzey alanının artması, daha büyük boyutlardaki materyallerden farklı olmasına sebep olur. Bir parçacığın küçülmesiyle yüzey hacim oranı artarken, parçacığın yüzeyindeki atomların sayısı, içinde bulunan atomların sayısına oranla artış gösterir. Bu yüzeylerde kimyasal reaksiyonlar gerçekleştiğinde, daha büyük boyutlu parçacıklardan yapılmış örneklerle nazaran, çevre ile daha elverişli bir etkileşim olmaktadır. Bu sebeplerden dolayı nanomalzemeler, potansiyel olarak güçleri ve elektriksel özellikleri değişmekte olup kimyasal olarak daha reaktiftir (Ateş ve ark., 2013).

Bu tez çalışmasında Tokat ilinin Avlunlar bölgesinden toplanan *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantarlarının ekstraktları kullanılarak biyolojik sentezi gerçekleştirilen gümüş nanopartiküllerin (AgNP), MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarında hücre canlılığı ve Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-9 genleri ifadelerindeki etkilerini araştırmak amaçlanmıştır. Bu çalışma sonunda, mantar ekstraktları kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin hücrelerin canlılığında azalmaya neden olarak kanser tedavilerinde alternatif bir antikanser ajan olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mantarların tıbbi alanda kullanılması

Yüksek yapılı yabani ve yenilebilir mantarlar tıbbi fonksiyonlara sahip özellikleri sayesinde fonksiyonel besin grubuna dahil edilmiştir. Mantarlar ayrıca lezzetli aromaları ve yüksek besleyiciliği nedeniyle birçok ülkede gıda olarak tüketilmekle birlikte gıda endüstrisinin de dikkatini çekmeyi başarmıştır. Mantarlar, mükemmel bir protein kaynağı olmakla beraber iyi bir karbonhidrat, yağ, lif ve vitamin kaynağı besinlerdir. Yapılan araştırmalar mantarların kolesterol seviyesinin azaltılması, kalp hastalıkları, kanser türleri gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde tıbbi yarar sağladığı gösterilmiştir. Mantar polisakkaritleri diğer türlerin polisakkaritlerinden kimyasal bileşim, iskelet uzunluğu, üç boyutlu konformasyon gibi yapılardan dolayı farklıdır. Mantar polisakkaritleri, karakteristik birincil yapılarından dolayı antitümör, anti-inflamatuar, antioksidatif, antiviral, antidiabetik, immünomodülatör gibi önemli biyolojik aktivitelere sahiptir. Mantar polisakkaritleri tümör hücrelerine karşı etkilerini doğrudan yapmazlar. Mantar polisakkaritleri konaktaki doğal katil hücreleri olarak da bilinen NK-hücrelerini, T hücrelerini, B hücrelerini ve makrofaj bağımlı bağışıklık hücrelerini uyarak bağışıklık sistemini tetiklemek suretiyle etki eder (Maity ve ark., 2021). Makro mantarların sahip olduğu bazı glikozidik bağlar, immün sistem düzenleyici ve antikanser aktiviteleri sayesinde kanseri tedavi etme sürecinde yer alırlar. Mantar polisakkaritlerinin, çoğu kemoterapötik ilaca göre daha az zararlı olduğu rapor edilmiştir. Bu sebeple kanser tedavisinde farklı bir seçenek olarak destekleyici ilaçlar geliştirmek üzere kullanılabilirler. Araştırmacılar *Pleurotus ostreatus* ekstresinden elde edilen bir β -glukan bileşiği olan Pleuran'ın, çeşitli kanser hücrelerinin büyümesini durdurabildiğini bildirmiştir (Öztürk ve ark., 2021). Dünya üzerindeki mantar sayısının 140.000 olduğu tahmin edilmektedir. Fakat bunların yaklaşık %10'u tür olarak isimlendirilmiştir (Wasser, S.P., 2002). Biyoteknolojinin gelişim sürecinde mantarlar çok büyük öneme sahiptir. Endüstri alanında özellikle farmakolojik çalışmalarda çeşitli ürünlerin sentezinde mantarlar kullanılmaktadır. Bunların dışında antibiyotik direncine karşı yeni antibiyotik taleplerini karşılamada mantarlar kullanılmıştır (Atabay ve ark, 2021).

2.2. *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantarlarının özellikleri

2.2.1. *Lepista nuda*

Lepista nuda sonbahar ve kış aylarında ormanlık alanlarda, genellikle ılıman havalarda yetişebilen bir mantar türüdür (Sevindik ve ark., 2019). Tricholomataceae ailesinden olan *L. nuda*, yumuşak, sulu bir mantar olmakla birlikte hoş bir kokuya sahiptir (Ceylan, 2021). *L. nuda*, leylak ile mor-pembe rengi, kendine has kokusu ile diğer türlerden ayırt edilebilir. İnsanlar tarafından tadı beğenilen bir mantardır ve içerisinde büyük oranda protein ve polisakkarit barındırması sebebiyle besleyicidir (Du ve ark., 2018). Ülkemizde mor mantar ya da mavi cincile olarak da bilinir. *L.nuda* ekstresinden elde edilen örneklerde antioksidan, antimikrobiyal ve antikanser aktiviteler gösterdiği rapor edilmiştir (Özdal, 2018).



Şekil 2.1 Tokat/Avlunlar bölgesinden toplanan *Lepista nuda* mantarının fotoğraf görüntüsü

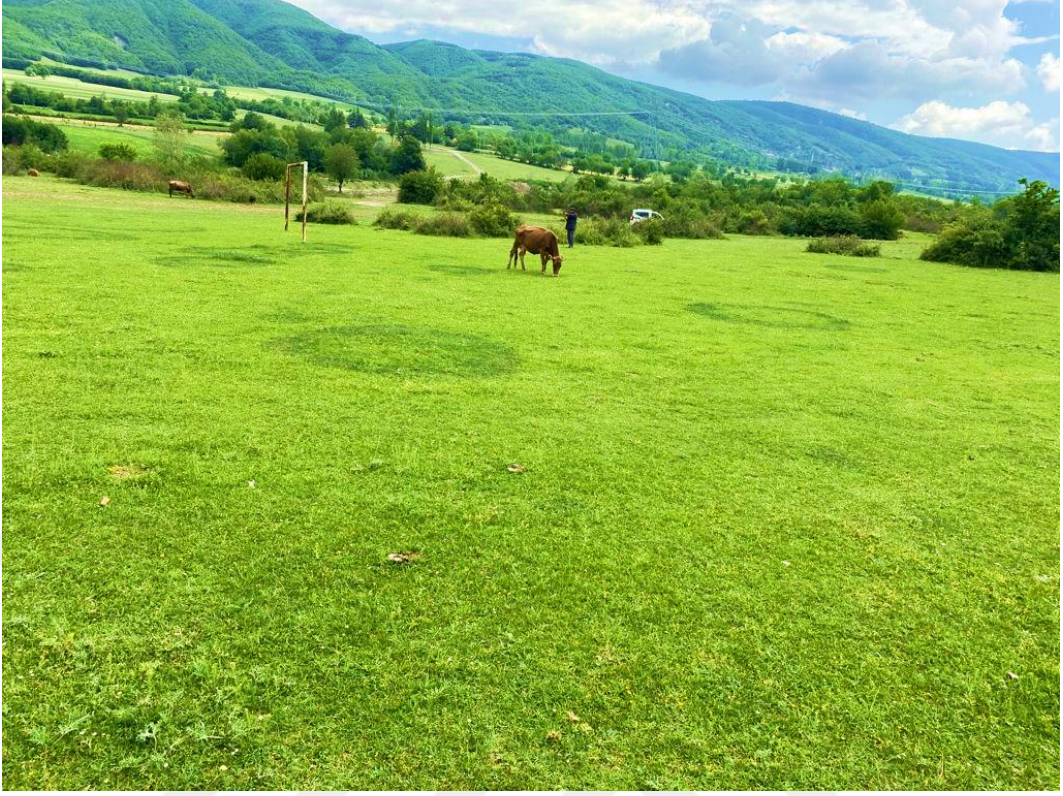
2.2.2 *Marasmius oreades*

Marasmius oreades, 3-3.5 cm genişliğinde, soluk kahverengimsi renklerinde, tüysüz, kırılğan, gençken dışbükey konik şeklinde olup büyüdükçe düzleşen mantar türüdür (Razaq ve ark., 2013).



Şekil 2.2. Tokat/Avlunlar bölgesinden toplanan *Marasmius oreades* mantarının fotoğraf görüntüsü

M.oreades, Agaricales takımı ve Marasmiaceae familyasına ait bir mantardır (Yeşilbaş, 2015). Her yerde bulunabilen, yenilebilir bir mantardır. Çimlik ve otlak alanlarda yetişen bu mantar türü yeraltı misellerine sahiptir. Genellikle peri halkaları oluşturmasıyla bilinir (Hiltunen ve ark., 2021). Peri halkaları, ormanlık ve otlak alanlarda, tarım arazilerinde yaygın olarak görülebilen, mantarların gövdelerinin öldükten sonra oluşturduğu koyu renkte halkalardır. Bu peri halkaları yıldan yıla çapları artarak büyürler (Choi ve ark., 2019).



Şekil 2.3 Tokat /Avlunlar bölgesinde çekilen peri halkalarının fotoğraf görüntüsü

2.3. Nanoteknoloji ve nanopartiküller

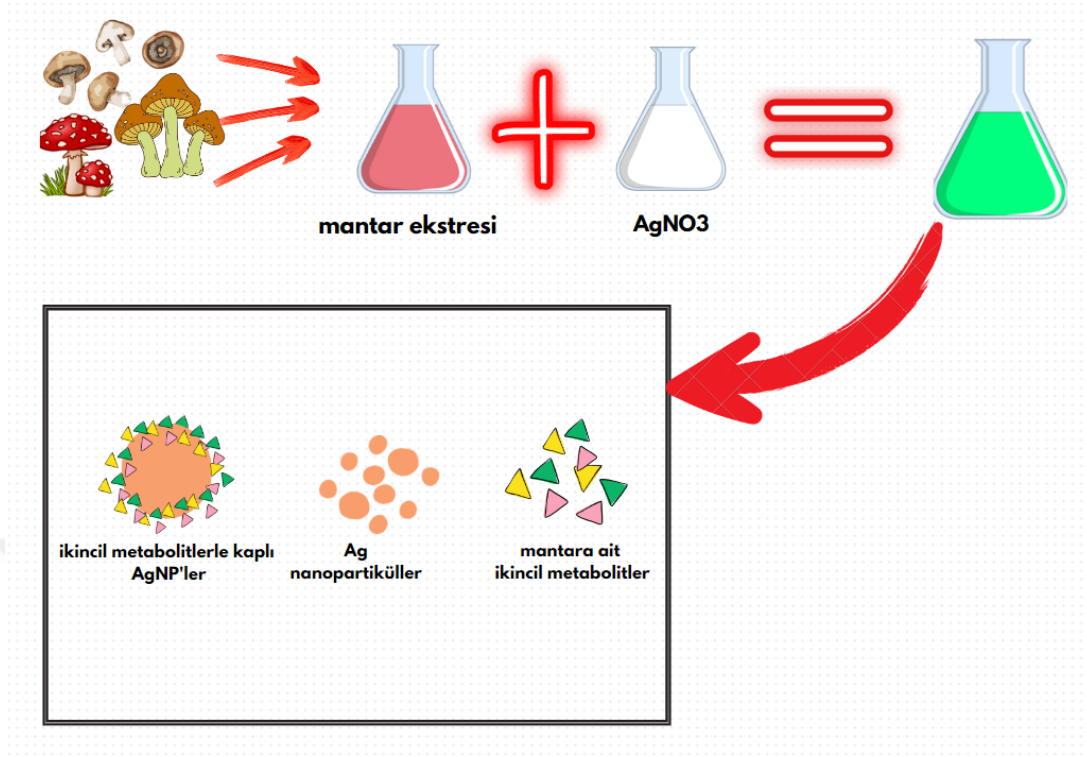
Nanoteknoloji, 1 nanometre ile 100 nanometre arasında kalan boyuttaki maddeleri kapsayan bir teknolojidir. Günümüzde kullandığımız birçok ürün nanoteknoloji sayesinde üretilir. Bu yüzden nanoteknoloji modern yaşamın vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Nano boyut kavramı ilk kez 1959 yılında fizikçi Richard Feynman'ın yaptığı bir konuşmada önem kazanmıştır. Feynman, nanometre boyutundaki malzemelerin ve cihazların gelecek dönemlerde çeşitli avantajlar sunacağını belirtmiş, bazı şeyleri küçük boyutlarda manipüle etme ve kontrol etme düşüncesini bildirmiştir (Tüylek, 2021).

Nanoteknoloji, maddelerin atomik ve moleküler düzeyde daha avantajlı, yeni özellikler kazanmasını amaçlamaktadır. 'Nano' kelimesi, büyüklüğün milyarda biri olarak tanımlanır. Bu anlamda metrenin milyarda biri, bir nanometre olarak ifade edilir. Nano boyuttaki bir malzeme yaklaşık 100 ile 1000 arası atomdan meydana gelir. Malzemelerin üzerinde büyük değişiklikler yapılabilmesinin sebebi nano boyuttaki malzemelerin

yüzey/hacim oranlarının artmasıdır. Bu da nanoteknolojiyi diğer teknolojilerden ayıran önemli bir özelliktir (Beykaya ve ark., 2016). Nanopartiküller fiziksel, kimyasal ve biyosentez yoluyla sentezlenebilirler. Nanopartiküllerin yüzeylerinde gözlemlenen toksisitenin kimyasal sentez yoluyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kimyasal ve fiziksel yolla senteze alternatif bir seçenek olarak bitki, mantar, mikroorganizma gibi biyolojik kaynaklar da nanopartikül sentezi için kullanılabilir (Hasan, 2015). Biyosentez metodu kullanılarak üretilen nano materyallerin elde edilmesi sürecinde toksik kimyasalların kullanılmaması, yüksek enerji ihtiyacının olmaması, ucuz olması, kolay bir uygulama olması, medikal uygulamalar için biyouyumlu yapı göstermeleri biyosentez yöntemlerini diğer yöntemlere göre daha cazip hale getirmektedir (Aktepe, 2021).

2.4. Nanopartiküllerin yeşil sentezi

Nanopartiküllerin sentezi kimyasal ve fiziksel metod ile başarılı bir şekilde gerçekleşse de toksisite, pahalılık ve çevre dostu olmamasından dolayı dezavantajdır. Nanopartiküllerin değişken boyut ve şekilleri bitkilerin barındırdığı indirgeyici bileşenlerin miktarına bağlıdır (Genç ve ark.,2021). Biyolojik sentez nanopartiküllerin sentez yöntemlerinden biridir ve aynı zamanda yeşil sentez olarak da tanımlanır. Toksik olmayan, çevre dostu, ekstrem koşullara ihtiyaç duymayan hızlı bir sentez yöntemidir. Bitkilerin ve mikroorganizmaların içerdikleri ikincil metabolitler sayesinde moleküler indirgeme yeteneğiyle biyolojik kaynaklardan nanopartiküllerin sentezi tek seferde gerçekleştirilir (Çiftçi ve ark.,2021).



Şekil 2.4 Mantar ekstresi aracılığıyla AgNP sentezi şeması

2.5. Nanopartiküllerin yeşil sentezinde kullanılan ikincil metabolitler

Flavonoidler, flavon, flavonol, flavonon, flavononol ve izoflavon türevlerini içeren bir doğal polifenolik bileşik ailesidir. Flavonoidlerin iskeleti, oksijenli bir heterosiklik halkası, C ile birbirine bağlanan iki fenil halkasından ve birkaç pozisyonda hidroksillerden oluşur. Bu bileşikler, biyotik ve abiyotik streslere verilen yanıtta katıldıkları için bitkilerde önemli rollere sahiptir. Hidroksil gruplarının sayısı ve flavonoidlerin yapısı, metal bağlama aktivitesi için önemlidir (Marşlin ve ark., 2018).

2.6. Nanopartiküllerin kullanım alanları

Nanoteknoloji günümüzde çok kullanılan bir teknolojidir. Malzemelerin atom dizilişlerindeki değişiklik sebebiyle nanoboyutları onları daha işlevsel yapmaktadır. Maddeler nanoteknoloji sayesinde manipüle edilebilmektedir. Malzemelere daha iyi performans kazandıran bu uygulama daha ucuz ürünlerin üretimine fayda sağlamaktadır. Maddelerdeki bu fiziksel, kimyasal veya biyolojik yeni özellikler onları daha iyi elektrik

iletkenliği, daha hafif, daha iyi kimyasal reaktivite gibi birçok gelişmiş özellik kazandırır. Nanopartikül kullanımına bir diğer örnek ise nanoteknolojinin elektronik alanda kullanımındır. Geleceğin teknolojisi olarak tanımlanan ip kullanımı, bilgisayarların nanopartiküller sayesinde çok küçük boyutlarda işlevsel olmasını mümkün kılar. Yakın zamanda çiplerin cerrahide robot olarakta kullanılması beklenmektedir. Ayrıca ilaç tanı ve dağıtımında da yine iplerden faydalanılması mümkündür. Günümüzde nanoboyuttaki malzemeler sayesinde daha az güç kullanan daha uzun pil ömrüne sahip elektronik cihazlar üretilebilmektedir. Nanopartiküller ilaçların hedef bölgeye nüfuz etmesini ve emiliminin artmasını sağlamaktadır. Bunların yanında kanser tedavisinde yararlanılan kemoterapötik ilaçların tümör hücreleri gibi özgül hücrelere direkt ulaşmasını mümkün kılar. Örneğin solunabilir nanopartiküllerin akciğere verilmesi, oral yolla ya da serum yoluyla alınan ilacın neden olduğu yan etkileri en aza indirir.

Nanopartiküller otomotiv sektöründe de sıklıkla kullanılır. İki ya da daha fazla malzemenin birleşiminden oluşan kompozitlerin nanokompozit formları da vardır. Bunlar sayesinde metale göre daha güçlü ve daha hafif araç parçaları üretilmektedir. Nanopartiküller, gıdaların raf ömrünün uzatılması amacıyla ambalaj üretiminde, güneş kremlerinin etkinliğinin arttırılmasında, plastik içecek şişelerinin kalitesini arttırmada olmak üzere çok farklı alanlarda kullanılır. Nanopartiküller laboratuvarlarda kimyasal nanosensörler olarak molekülleri tespit etmek amacıyla da kullanılabilmektedir (Tüylek, 2021).

2.7. Gümüş nanopartikülü

Gümüş, çok eski zamanlardan beri metalik gümüş, gümüş nitrat, gümüş sülfadiazin formunda antiseptik olarak yanık, yara ve bakteriyel enfeksiyonlarda tedavi edici olarak kullanılmıştır. Bu gümüş formları yerine zaman içerisinde gümüşün daha işlevsel olduğu manipüle edilebilir özellikte gümüş nanopartiküller tercih edilmiştir. Gümüşün sahip olduğu antimikrobiyal özellik sayesinde özellikle tıbbi cihazların kaplanmasından ve yara pansumanlarının içeriğine dahil olmasından dolayı AgNP'lerin kullanımı artmıştır.

Gümüş, bakteri DNA ve RNA'sına bağlanarak bakteriyel replikasyonu engeller. Araştırmalar, AgNP'lerin antibakteriyel etkinliğinin AgNP'lerin farklı şekillerine bağlı olduğunu göstermiştir (Rai ve ark., 2009).

Gümüş herhangi bir metalin sahip olabileceği en fazla elektriksel ve termal iletkenliğe sahiptir. Sitotoksik potansiyelleri sebebiyle gümüş nanopartiküller kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılmıştır. AgNP'lerin artan konsantrasyonlarda artan etkinlikleri HeLa hücre hatlarında gösterilmiştir.

Nanopartiküller gelişen bir teknoloji olmakla beraber sahip olduğu eşsiz optik, fizikokimyasal vb. özellikleri sayesinde günümüzde birçok alanda kullanımı tercih edilen bir uygulamadır. Özellikle tıp, tarım, gıda, elektronik ve kozmetik endüstrileri başta olmak üzere geniş kullanım alanına sahiptir. Gümüş nanopartiküller, nanoteknolojide sahip olduğu üstün özellikler sayesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Öztürk, 2020).

2.8. Kanser nanoteknolojisi

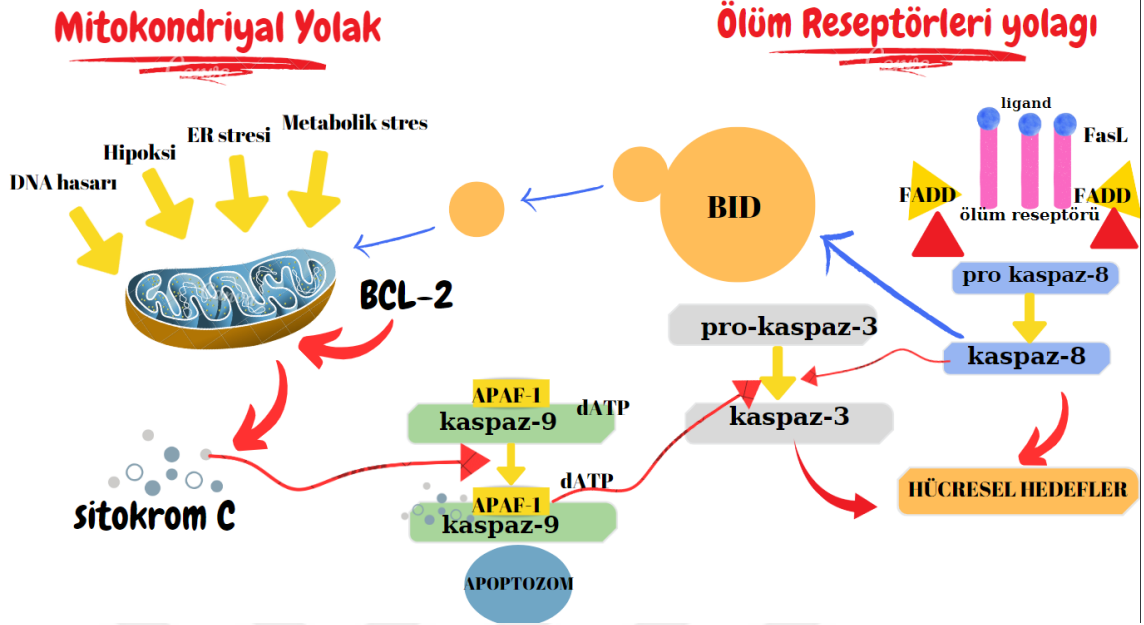
Kanser, hücrelerin büyüme ve bölünmesinden sorumlu olan genlerin tahrip olması ile oluşur. Vücutta farklı yerlerde oluşabilen ve diğer organlara dağılabilen doğal olmayan hücre çoğalmalarıdır. Anormal olarak çoğalan bu hücre grubu çevrelediği dokunun veya organın fonksiyonlarını yerine getiremez hale getirir. Nanoparçacıklar, maddelerin bileşenlerini bozmamak suretiyle onların sahip olduğu biyolojik, kimyasal ve fiziksel özelliklerinin istenilen özelliklere sahip nano boyutlarda parçacıklara dönüştürülmesiyle elde edilir. Bu sayede kanser teşhis ve tedavisinde nanoteknolojinin kullanılmasını çekici kılar. Kanser vakaları teşhis edildiğinde 2/3'si ölümcül hale gelmiştir. Genellikle tümörlerin görüntüleme cihazları ile görüntülenmesi için en az 1 cm çapına ve 1 gram ağırlığına ulaşması gerekirken, nanoteknoloji sayesinde erken dönemde tespit edilebilir. Meme kanserini görüntülemeye kanserin teşhisi için 1.000.000 kanserli hücre oluşması gerekirken nanoteknolojik yöntemler sayesinde 100'den daha az kanserli hücrede bile görüntüleme mümkün olmaktadır. Nano-onkoloji alanında yapılan çalışmalar ilaçların tümör hücrelerinin hücre içi konsantrasyonlarını arttırabileceğini, sağlıklı hücrelere karşı toksisite miktarını ise minimuma indirilebileceğini göstermiştir. (Oylar ve ark., 2011). Ulusal kanser enstitüsü, ölümcül kanser hastalıklarını tedavi etmede nanoteknoloji

alanında milyonlarca dolarlık yatırım yapmıştır. Kanser tedavisinde nanoteknolojik uygulamalardan biri olan nanotaşıyıcı ile ilaç taşınımında en sık kullanılanları polimerik, manyetik, nükleik asit bazlı yapılar, dendrimerler, lizozomlardır. Nanotaşıyıcı ilaç sistemlerinde ilacın yan etkisini azaltıp etkinliğini arttırmak amaçlanır. Kanserli hücrelerin mikroçevresinde bulunan kanserleşmiş hücreye spesifik olan ve antijenlerini tanıyan bir takım moleküllerin (antikor, peptid gibi ligandlar) fonksiyonelleştirilmesiyle kanserin hedeflenebilmesi için nanotaşıyıcılar geliştirilebilirler. Bunun dışında nanotaşıyıcı moleküller, transmembran tümör antijenlerinin hücre dışını hedef alarak reseptör aracılı endositoz ile özgün olarak, kanser hücreleri tarafından alınabilmektedir (Alexis ve ark., 2008).

2.9. Kanser ve apoptoz

Ökaryotik hücreler yaşam sürelerini tamamladığında ya da DNA'larında hata meydana geldiğinde ölme eğilimi gösterirler. Canlılarda meydana gelen bu fizyolojik süreç dokuların homeostazından sorumludur. Apoptoz aynı zamanda canlıların embriyolojik gelişimi, bağışıklık sistemi regülasyonu gibi süreçlerde de rol alır. Hücrelerin bölünmesi ile ölmesi arasındaki dengenin sağlanması açısından apoptozun hatasız gerçekleşmesi oldukça önemlidir (Ulukaya ve ark., 2011). Apoptoz kaspaz aracılı ya da kaspazlardan bağımsız şekillerde gerçekleşebilir (Norberg ve ark., 2010). Apoptozda kromozom şeklindeki DNA'nın nükleozom birimleri şeklinde parçalanması en ayırt edici özelliğidir (Güleş ve Eren, 2008). Bu parçalanma endojen endonükleaz enziminin (Ca ve Mg bağımlı) aktivasyonu ile gerçekleştiğinden hücre içi kalsiyum artışı gereklidir. Apoptoza uğramış hücreler agaroz jel elektroforezinde merdivenin basamakları şeklinde özgün bir görüntü sağlar (Turgut ve ark., 2006). Ekstrinsik ve intrinsik olmak üzere başlıca iki yolla gerçekleşir. Ekstrinsik yolda hücre dışı ölüm sinyalleri ile intrinsik yolda ise mitokondri aracılığıyla hücre içi yolla gerçekleşir. Apoptozun hücre dışı yolağı, apoptozu başlatan Pro-kaspaz-8'i tetikleyen Fas ve TNF reseptörleri aracılığıyla uyarılır. İlgili ligandlar hücre zarındaki reseptörlerini dönüştürerek bir dizi molekülleri etkiler ve Pro-kaspaz-8'i keser. Kesilerek aktifleşen Kaspaz-8 Bid proteinini uyararak mitokondriden Sitokrom c'nin salınmasını tetikler ve ölüm sinyalleri aracılığıyla gerçekleşen apoptoz mekanizması aynı zamanda mitokondriyal yolağı da uyarır. Mitokondriyal yolda ise hücrelerin

enerji üretiminden sorumlu organeli mitokondrinin hücrenin içinden ve dışarıdan gelen sinyalleri alarak apoptozda görev alması esastır. Bcl-2 protein ailesi aracılığıyla meydana gelen mitokondri zarındaki bütünlüğün bozulmasıyla mitokondri içinde bulunan Sitokrom c ve diğer proteinler sitoplazmaya salınır. Sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanmasıyla oluşan apoptozom kompleksi Kaspaz-9'u aktifleştirerek diğer kaspazların aktifleşmesine öncülük eder. Bir dizi kaspazın kesilerek aktifleşmesi hücrenin ölümlüyle sonuçlanır. Bunların dışında endoplazmik retikulumda meydana gelen hatalar sonucu proteinlerin katlanmasıdaki bozuklukların yarattığı stres ve DNA'daki hataları tanıyarak hücrenin apoptoza gitmesini sağlayan p53 proteini de apoptoza neden olabilir (Solakoğlu, 2009). Apoptozda temel olarak görev alan Bcl-2 protein ailesi anti-apoptotik, pro-apoptotik ve BH bölgesi olmak üzere üç gruptur. Bcl-2, Bcl xL, Bcl-w, Mcl-1 ve A1/Bfl-1 antiaoptotik ve Bax, Bak ve Bok/Mtd ise pro-apoptotik alt protein ailesine ait genlerdir (Martinau ve Youle, 2011). Apoptoz bu anti-apoptotik ve pro-apoptotik genlerin ifadesindeki dengeyle düzenlenir. Son birkaç on yıldır, kanserli hücreleri ortadan kaldıran apoptoz mekanizmasını geliştirmeye yönelik yeni çalışmalar oldukça ilgi çekici olmuştur. Apoptoz mekanizmasında yer alan başlatıcı ve efektör kaspazların nasıl çalıştığıyla ilgili çalışmalar, hücrelerin fenotipini etkileyen ve aynı zamanda hücrelerin sağ kalımıyla ilgili süreçlerin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Bunların dışında kanserli hücrelerin çoğalmasında etkili olan kinazları etkisiz hale getirmeye yönelik tedavi yaklaşımları da geliştirilmiştir. Apoptoz ile ilgili bir diğer araştırma konusu ise apoptoz ile otofajinin etkileşimidir. Apoptozu hedef alan tedavilerin üzerinde çalışılması, özgün direnç mekanizmaları, çeşitli kanser türleri için özgün tedavi verilmesi ve kemoterapötik ilaçların bir takım toksisite içermesi gibi nedenlerden dolayı oldukça önemlidir (Carneiro ve El-Deiry, 2020)



Şekil 2.5 Apoptozun mitokondriyal ve ölüm reseptörleri yolağı şeması

2.10. Metalik nanopartiküllerin antikanser aktiviteleri

Kanser dünya çapında ölüme neden olabilen bir hastalık olması sebebiyle yeni tedavi yolları aranmaktadır. Kanser tespitinde kullanılan nanopartiküller sayesinde hücresel ve moleküler düzeyde görüntülemeler kanserin daha detaylı araştırılmasını sağlamıştır.

Metalik nanopartiküller sahip oldukları bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri sayesinde ilaç taşınımı ve hedefleme için son zamanlarda dikkat çekici hale gelmiştir. Çinko oksit nanopartiküllerinin kanser tedavisindeki olası uygulamaları ilgi çekicidir. Çinko oksitin sahip olduğu geniş bant aralıklı yarı iletken özellik ROS oluşumunu tetiklemesi onun birçok alandaki uygulamalarda kullanılmasına teşvik etmiştir. Çinko oksit nanopartiküllerin boyutlarının 100 nm'den küçük olması onların ilaç dağılımı uygulamalarında tercih edilebilir hale getirir. Altın nanoparçacıklar son zamanlarda eşsiz özellikleri nedeniyle farklı uygulamalarda kullanılmaktadır. Fototermal dönüştürücüler, radyo duyarlaştırıcılar, görüntüleme problemleri, kanser teranostiği gibi ilaç taşıyıcılığı gibi alanlarda kullanılmıştır. Demir oksit nanoparçacıklar sahip olduğu süperparamanyetik özellikleri sayesinde manyetik rezonans görüntülemelerde kontrast ajanları olarak sıklıkla

kullanılmaktadır (Sharma ve ark. 2015). Altın, gümüş, platin gibi metal içeren nanopartiküller eşsiz optik, elektronik ve katalitik nitelikleri sayesinde çeşitli endüstrilerde ilgi çekici bir uygulama haline gelmiştir (Tailor ve ark., 2020). Nanopartiküller düşük sıcaklıkta erimeden kalabilen özelliklere sahip olduğu için kozmetik, elektronik, kaplama gibi alanlarda kullanımı yaygındır. Tipik olarak nanopartiküller, ışığın kritik dalga boyunun altında bir dalgaboyuna sahiptir. Nanopartiküller, DNA iplikçiklerine tahribatsız eklenebildiği için tıp alanında hastalıkların teşhisinde kullanılır (Thakkar ve ark., 2010).

Metalik nanopartiküllerin çeşitli kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik kapasitesine nekroz, sinyal yollarının uyarılması, lizozomal hasar, kaspaz aracılı sinyal iletimi ve apoptoz eşlik eder. Parçacık şekli, boyutu ve yüzey kimyası gibi çeşitli faktörler AgNP'lerin sitotoksik etkinliğini etkiler. Nanopartikülün boyutu ne kadar küçükse kanser hücresi proliferasyonunun inhibisyonu o kadar fazladır (Rao ve ark., 2016).

2.11. Metalik nanopartiküllerin toksisitesi

Metalik nanopartiküllerin toksisitesini oluşabilecek sağlık problemlerini belirlemek adına önemlidir. Metal nanopartiküllerin etki mekanizması ROS üretimi şeklindedir. Fakat aşırı oksidatif stres zararlı olabilir. Hücreler kendilerini tetikleyebilir, enzimatik ve ezimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmaları (örneğin glutatyon peroksidazlar, katalazlar ve süperoksit dismutazlar) gibi yüksek oksidatif strese yanıt olarak koruyucu mekanizmalarını tetikleyebilir. Bununla birlikte, bu koruyucu mekanizmalar hücrel redoks dengesini yeniden sağlayamadığında proteinler, lipitler DNA gibi hücrel makromoleküller zarar görür. Onarılamaz hasar daha sonra nekroza ya da apoptoza yol açabilir. Aşırı oksidatif stres ayrıca interlökin (IL)-2 ve tümör nekroz faktörü (TNF)-a'nın aktivasyonu gibi proinflamatuvar tepkileri de tetikleyebilir. Kronik inflamasyon, ateroskleroz, akciğer hastalıkları ve daha fazla kanser gibi hastalıklara yol açar. Ancak bu kavram ROS üretimi toksisitenin baskın mekanizmasıysa geçerlidir.

Metalik nanopartiküller ayrıca hücrel Ca^{+2} konsantrasyonunu bozabilir. Böylece hücrel metabolizma, sinyal iletimi ve gen eksresyonu gibi dengeli hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun düzenleyici rollerini bozabilir (Sharma ve ark. 2015).

2.12. AgNP'lerin antikanser aktiviteleri

Kanser dünyada ölüme sebep olan hastalıkların başında gelir. Her yıl dünya çapında milyonlarca insana kanser teşhisi konmaktadır. Açıklanan raporlara göre gelecek yıllarda günümüze kıyasla daha fazla sayıda insana kanser teşhisi konulacağı tahmin edilmektedir.

Tıp alanında gümüş nanopartiküller diğer nanopartiküllerin içinde eşsiz özellikleri sebebiyle en heyecan verici nanopartiküllerden birisidir. AgNP'lerin antikanser aktiviteleri, çeşitli kanser hücre hatlarında gösterilmiştir. Bitkiler, mantarlar gibi biyolojik kaynakların içerdiği fitokimyasallar kullanılarak gümüş nanopartiküller sentezlenebilmektedir. Uv-Vis spektrum cihazında AgNP'lerin sentezi doğrulanabilmektedir (Akther ve ark., 2019).

Gümüş nanoparçacıklar çarpan ışığın bir kısmını emen ve dağıtan plazmonik yapılardır. Kanser hücrelerine seçici olarak alındıktan sonra, emilen ışık termal öldürme için kullanılabilirken saçılan ışık görüntüleme için kullanılabilir. Gümüş de altın gibi eşit sayıda pozitif iyon iletim elektronu içeren bir serbest elektron sistemidir. Elektromanyetik bir dalga tarafından ısıma yapıldığında, serbest elektronlar bir plazma frekansında tutarlı bir salınım yapmak üzerinde elektrik alanı tarafından sürülür. Nicelenmiş plazma salınımları görünür ışıkla etkileşime girerek SRP(21) sentezler. Gümüş plazmon rezonansı görünür spektrumdaki herhangi bir dalga boyuna ayarlanabilen tek malzemedir. AgNP'lerin terapötik aktivitesi söz konusu olduğunda hücrelerle etkileşimden sonra ROS'un (glutatyon ve tioredoksin) nötralizasyonundan sorumlu proteinleri etkilerler. Böylece gümüş nanopartiküller, hücrenin antioksidan savunma mekanizmasını tüketerek ROS birikimine neden olur. ROS birikimi, inflamatuvar yanıtı ve pertürbasyonu başlatır ve mitokondrinin yıkımına yol açar (Sharma ve ark., 2015).

Gümüş nanopartiküller oksijen varlığında kolay bir şekilde oksitlenebilirler. Oksitlenmiş gümüş nanopartiküller ana toksisitenin asıl kaynağı olan gümüş iyonlarını açığa çıkarır. Gümüş nanopartiküller hücre içinde gümüş iyonları gibi davranır. Gümüş iyonları, oksidatif strese neden olur böylece hücre zarı, protein ve DNA gibi hücresel bileşenlere zarar verir. Bu da apoptotik ve nekrotik hücre ölümlerine yol açarak yakınındaki dokulara

veya hücrelere daha fazla zarar veren proinflamatuvar sitokinlerin salınımını tetikler. Bu durumda AgNP'lerin kullanıldığı tedavi yöntemlerinde AgNP'lerin dozu toksisiteyi en aza indirmek için önemlidir (Karuppaiah ve ark., 2020). AgNP'lerin artan konsantrasyonlarda artan sitotoksik etkinlikleri HeLa hücre hatlarında gösterilmiştir (Rao ve ark., 2016).

2.13. Biyolojik sentezlenen nanopartiküllerin karakter analiz yöntemleri

2.13.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) tekniği

Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy), tıp, biyoloji, madde bilimleri ve yeryüzü bilimleri gibi alanlarda kullanılan bir tekniktir. Bu bilim dallarından elde edilen örneklerin yüzey yapıları 100.000 büyütülerek örnek hakkında detaylı bilgiler edinilir (Kapakin,2006). SEM, ilk olarak 1935 yılında Almanya'da Knoll tarafından icat edilmiştir ve zamanla diğer araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. Taramalı elektron mikroskobunda elektron demeti ve örnek arasındaki etkileşim kullanılarak organik ve inorganik maddelere ait bilgiler elde edilir. Taramalı elektron mikroskobunda prensip, örneğin üzerinden yansıyan elektronların belli bir alanda toplanarak bir takım yansıtıcılar ile görüntü oluşturmaya dayanır. Dezavantaj olarak elektronların örneğin yüzeyinde birikmesi ile yeterli görüntü elde edilmemesi ya da örnekten elektronların yeterince yansımaması söz konusu olsa da örneklerin hazırlanma aşamasında kaplama maddeleri kullanılarak görüntü kayıplarının önüne geçilir. Alüminyum, altın, palladyum, gümüş gibi maddeler, kaplama görevi gören malzemelerde kullanılır (Büken ve ark., 2001).

2.13.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) tekniği

Transmisyon Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscopy), tıp, biyoloji, jeoloji ve fizik gibi birçok bilim dalında kullanılan bir görüntüleme yöntemidir. Elde edilen örnekleri 600.000 kez büyütürken içyapıları hakkında bilgi verir. Hücrelerin bileşenleri, yalnızca mikroskop ile görüntülenebilen organizmalar incelenir. Elektronlar hücrelerin içinden geçerek fosfofloresan ekranda iki boyutlu bir görüntü oluşturur. Görüntünün belirli bir bölgesinin parlaklığı örneğin içinden geçen elektronların sayısı ile orantılıdır. Elektron mikroskobunun ışık mikroskobuna göre avantajlı olmasının sebebi

ışık mikroskopunda kaynak olarak ışıık yerine vakumlu elektron demeti kullanılarak çok kk cisimcikler hakkında daha detaylı bilgi vermesidir. Elektron mikroskopları yüksek rezolüsyonlu yani daha büyük bir alan derinliği içerir (Kapakin, 2006).

2.13.3. Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) tekniği

Enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi tekniği ile rneği kaplayan bileşenlerin nicel ve nitel analizi SEM tekniği yardımı ile yapılmaktadır. SEM analizinde yüksek enerjili elektron demeti kullanılarak görüntüleme yapılır ve EDX tekniği ile sürekli olarak elektron altındaki katı numunenin yaydığı x-ışınının enerji yayma yeteneğini ler (Şişman, 2008).

2.13.4. UV-Vis / Görünür Absorpsiyon tekniği

UV-Görünür spektroskopisi çoğunlukla çözelti içindeki moleküllerin ya da inorganik iyon ve karışımın analizde kullanılan, 400 - 800 nm arası ışın absorpsiyonunu ölçen bir tekniktir. UV-Vis spektroskopisi, incelenen örneğin absorbe ettiği ve saçtığı ışığın miktarını ölçen analiz yöntemidir. Temel prensibi, fotodedektör ile ışık kaynağı arasına konan rneğin UV-Vis ışık demetinden geçmeden önce ve geçtikten sonraki yoğunluğunun ölçülmesidir (Ateş,2018).

2.13.5. X-ışını Kırınımı (XRD) tekniği

X-ışını kırınım spektroskopisi X-ışını kullanılarak yapılan analizi yöntemidir. Bu analiz yönteminde kullanılan enerji Ultraviyole ışınından daha güçlü olup Gamma ışınından daha azdır. XRD analizinde prensip, bir maddenin karakteristiği olan kırınım deseni ile ilgilidir. Kırınım desenleri, her kristal fazın X-ışını ile etkışiminde meydana gelen benzersiz çizimlerdir ve bu kırınım desenleri bir çeşit kimlik gibi o kristali ifade eder. Aynı dalga boyundaki X-ışınlarını benzersiz atom dizilimlerine sahip kristal fazlar kırar. XRD tekniğinde, 3-8 keV foton enerjisinde, X ışınlarıyla enregre moleküller ve kristaldeki atomların birbiri ile uzaklığı yaklaşık 0.15-0.40 nm olması gereklidir (Ateş, 2018).

2.13.6. Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR)

Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi, bileşiklerin karakterizasyonunda kullanılan bir analiz yöntemidir. FT-IR analizinde temel prensip kızılötesi ışığın araştırılmak istenen örnek madde tarafından soğurulmasına dayanır. Makro moleküllerin sahip olduğu fonksiyonel grupların titreşimiyle kompozisyonu, fonksiyonelleri hakkında bilgi verir (Ateş, 2018).

FT-IR maddelerin verdiği maksimum absorpsiyon, maddeyi oluşturan atomlar arasındaki bağların titreşimlerinin yarattığı frekanslara karşılık gelen numune ile ilgili bilgi sağlar. Optik izomerlerin dışında maddelerin sahip olduğu özgün spektrumlar maddelerin kimliği ile ilgili bilgi verir. Yapılan analizlerde her moleküler bağın titreşimi bir frekansa karşılık gelir. FT-IR yöntemi, katı, sıvı ve gaz örneklerin analizinde kullanılmaktadır (Büyüksırt ve ark., 2014).

2.13.7. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) tekniği

Dinamik Işık Saçılımı, nanoparçacıkların karakterizasyonunda kullanılan oldukça gerekli bir yöntemdir. Bu teknikte, düşük derişimli çözeltideki nanoparçacıkların yaydığı ışığın yoğunluğunun ve dalgalanmasının ölçülmesine dayanır. Yayılan ışığın yoğunluğundaki değişim, partikülün tutumu, boyutu, içinde bulunduğu sıvının akışkanlığına gösterdiği direnci, sıcaklığı ve tuz oranı ile ilişkilidir. Nanosizer cihazları nanoparçacıkların boyut analizinde kullanılan cihazlardır. DLS tekniğindeki temel prensip nanoparçacıkların brown hareketi denilen teoriye göre hızlarının ölçülmesidir. Bu da parçacıkların büyüklüğü ile ilişkilendirilir. Bu teknik, çözelti içindeki büyük parçacıkların kendisinden daha küçük parçacıklara göre daha yavaş hareket etmesini temel alır. Parçacığın boyutu küçüldükçe ve bulunduğu ortamın sıcaklığı arttıkça DLS analizinde kullanılan Brown çözeltisi içindeki parçacıkların, Brown hareketi hızlanır.

2.13.8. Zeta potansiyeli

Zeta potansiyeli, çözelti ile partiküller arasında oluşan ve partiküller arasındaki itme çekme kuvvetinden meydana gelir. Aynı yüke sahip parçacıklar birbirini iterken farklı

yüke sahip partiküller birbirini çeker. Zeta potansiyel ölçümü, partiküllerin dağılma mekanizmaları ve elektriksel yüklerin dağılımı hakkında detaylı bilgi verir. Zeta potansiyeli, doğrudan yüzeye bağlanarak yüzeyin yükünü belirleyen iyonların derişimine bağlıdır. Partiküllerin içinde bulunduğu sıvının pH değeri yüzey yükünün büyüklüğünü etkiler. Zeta potansiyeli, partiküllerin bulunduğu sıvının pH derecesi büyük ise negatif, küçük ise pozitif bir değere sahiptir. Parçacıkların kararlılığını belirlemede zeta potansiyeli önemlidir. Zeta potansiyeli ne kadar büyük ise parçacıklar o kadar kararlı demektir. (Ateş, 2018).

Zeta potansiyeli genellikle bir nanopartikülün yüzey yükünü, yani katyonik, anyonik veya nötr karakterini tahmin etmek için kullanılır ve nanopartikül yüzeylerini değerlendirmek için standart bir karakterizasyon tekniğı haline gelmiştir. Yararlı olmakla birlikte, zeta potansiyeli değerleri, yüzey yükü karakteri hakkında yalnızca çok genel sonuçlar sağlar (Smith ve ark., 2017).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Lepista nuda ve *Maramius oreades* mantar ekstraları kullanılarak gerçekleştirilen AgNP'lerin sentezinde kullanılan sarf malzemeler (Çizelge 3.1) ve kullanılan cihazlar (Çizelge 3.2) aşağıda gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Kullanılan sarf malzemeler

Materyal adı	Markası	Kullanım amacı
AgNO ₃		AgNP sentezinde kullanıldı.
FBS	Biological Industries	Hücre kültüründe besiortamı hazırlamada kullanıldı.
DMEM high glikoz	Biological Industries	Hücre kültüründe besiortamı hazırlamada kullanıldı.
Tripsin EDTA	Biological Industries	Hücre kültüründe kullanıldı.
PBS	Biological Industries	Hücre kültüründe kullanıldı.
Penicilin/streptomisin	Biological Industries	Hücre kültüründe besiortamı hazırlamada kullanıldı.
(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) MTT	SERVA	Hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanıldı.
L-Glutamin	Biological Industries	Hücre kültüründe besiortamı hazırlamada kullanıldı.
Trypan blue	Biological Industries	Hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanıldı.

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar

Materyalin adı	Markası	Kullanım amacı
Hasas terazi	Kern	Çalışmada yapılan tüm tartım işlemlerinde kullanıldı.
Manyetik karıştırıcı	Velp scintifica	Çözeltilerin uygun sıcaklıkta çalkalama işlemlerinde kullanıldı.
Uv-vis Spektroskopisi (Spektrofotometre)		AgNP'lerin absorbans ölçümünde kullanıldı.
FT-IR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)	Jasco	Sentezlenen AgNP'lerin sahip olduğu fonksiyonel grupların varlığıyla ilgili bilgi edinmek için kullanıldı.
Laminar kabin		Hücre kültüründe kontaminasyon riskini en aza indirmek için kullanıldı.
Mikropipet		Hücrelerin ve ekstraktların gereken ölçüde aktarılmasında kullanıldı.
Ultrasonikatör	Çalışkan	AgNP sentezinin ardından hazırlanan çözeltinin daha iyi çözünebilmesi amacıyla kullanıldı.
Destile su cihazı	Membrane	Çözelti hazırlamada ve tüm aşamalarda kullanıldı.
CO ₂ 'li İnkübatör	Zhigeng	Hücre kültürlerinin çoğalması ve saklanması amacıyla kullanıldı.

Çizelge 3.2 (Devam) Kullanılan cihazlar

Santrijüj	Alternatif	Deneyde faz ayrımını sağlamak için kullanıldı.
Çalkalamalı inkübatör		Mantar ekstratı hazırlamada kullanıldı.
pHmetre	İnolab	AgNO ₃ +mantar ekstraktının pH'ını ölçmede kullanıldı.
Plate okuyucu	Nanoquant	Mikroplateleri okumak için kullanıldı
Mikrodalga fırın	Arçelik	Optimizasyon çalışmalarında kullanıldı.
Ultrasantrifüj	Vision	Santrifüjde kullanıldı.

3.1. Mantar örneklerinin elde edilmesi ve hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan mantar örnekleri *L.nuda* ve *M. oreades* 2021 yılının mayıs ayında Tokat, Avlunlar bölgesinden toplandı. Tür tespiti Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Öğretim Üyesi taksonomi uzmanı Prof. Dr. İbrahim TÜRKEKUL tarafından yapıldı.

Mantar örnekleri toplandıktan sonra kuruma işlemi tamamlanana kadar Gaziosmanpaşa Üniversitesi laboratuvarında bekletildi. Kuruma işlemi gerçekleştirildikten sonra mantar ekstraları hazırlanmak üzere hazır hale getirildi.

3.2. Biyolojik yöntem ile sentezlenen AgNP'lerin yeşil sentezi

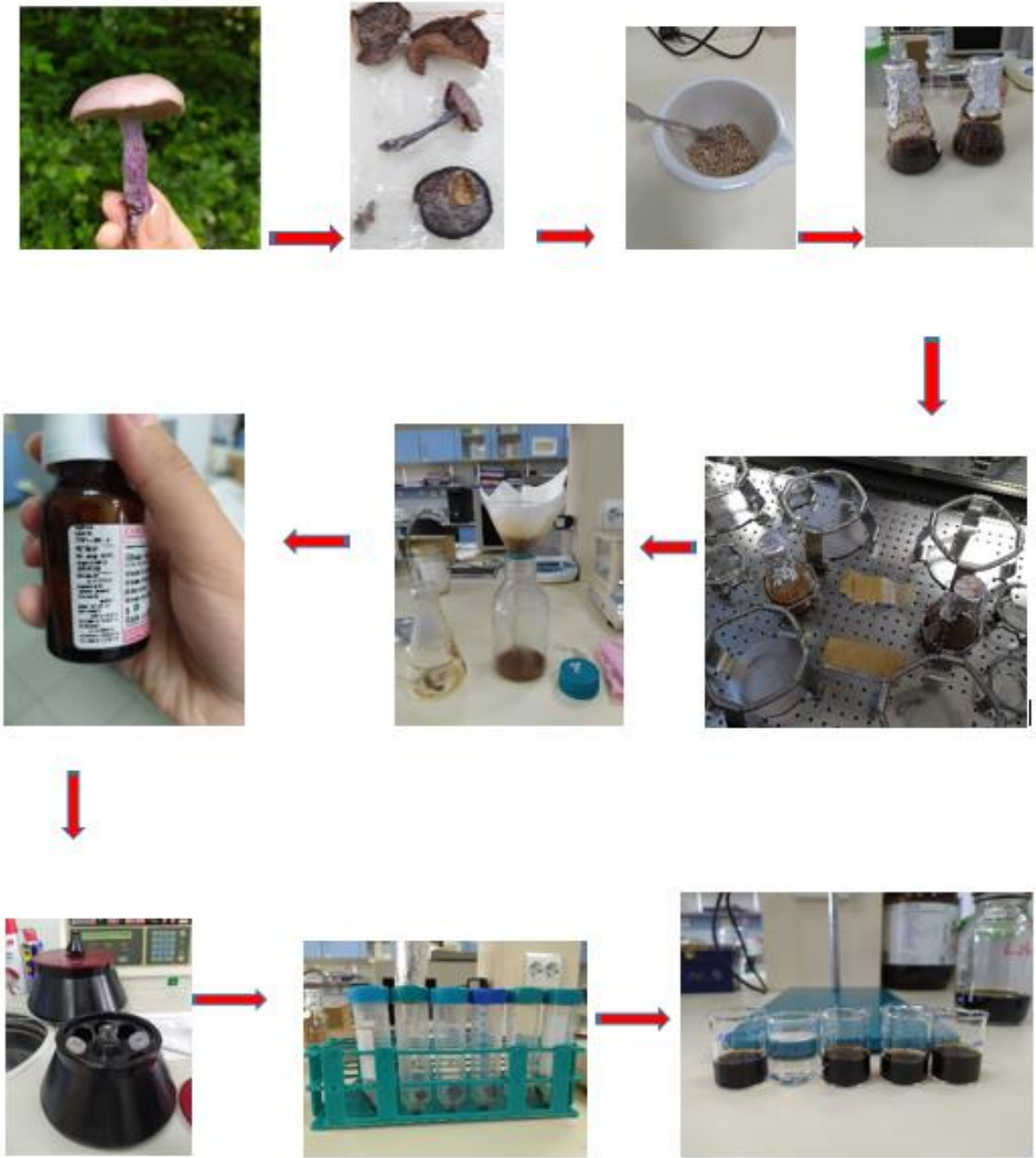
AgNP'lerin biyolojik sentezi Gaziosmanpaşa Üniversitesi Mühendislik Fakültesi laboratuvarında aşağıdaki yöntem ile gerçekleştirilmiştir.

- Kurutulmuş mantar ekstraları havanda dövülerek toz haline getirildi.

- Mantar ekstraksiyonu için toz haline getirilen mantarlardan 5.9 gr *L. nuda*'ya 59 mL distile su eklendi, 15 gr *M. oreades*'e ise 150 mL distile su eklendi.
- Daha sonra erlenlere alınıp çalkalamalı inkübatörde ağzı aliminyum folyo ile kapatılmış şekilde 60°C'de, 240 rpm'de 90 dakika boyunca inkübe edildi.
- İnkübatörden alınan mantar örnekleri kaba filtre kağıdından süzülerek kapaklı cam şişelere alındı ve sonraki gün optimizasyonda kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.
- AgNO₃ çözeltisi hazırlamak için molarite formülüne göre 4.24 gr AgNO₃ bileşiği hassas terazide tartılıp 250 mL suda manyetik karıştırıcı ile iyice çözdürüldü.
- 10 mM AgNO₃ çözeltisi nanopartikül sentezinde ve optimizasyon çalışmalarında farklı oranlarda kullanılmak üzere hazır hale getirildi.
- Renk değişiminin ardından sentezlenmiş AgNP karışımı diğer moleküllerden arındırılmak üzere ultrasantrifüj ile 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
- 4-5 kez santrifüj edilen karışım her seferinde süpernatant kısmı uzaklaştırılıp saf su eklendi.
- Santrifüj işlemi sonrası kalan kısım etüvde kurutuldu.

3.3. AgNP'lerin optimizasyonu

- 10 mM AgNO₃ çözeltisi ile mantar ekstreleri uv-Vis spektrumunda pik vermesini sağlamak için optimizasyon uygulaması yapıldı.
- Uv-Vis spektrofotometre ile AgNP'lerin varlığı test edildi.
- Çözelti/ekstre konsantrasyon ve pH optimizasyonu, mikrodalga desteği ile yapıldı.
- Yapılan optimizasyon çalışması sonucunda *L. nuda* mantar örneğinin AgNO₃/*L.nuda* oranı 1/1 ve *M. oreades* mantar örneğinin AgNO₃ /*M.oreades* oranı ise 1/2 olmasına ve her iki AgNO₃ mantar ekstresi karışımının pH değerinin 12 olmasına karar verildi.



Şekil 3.1 Gümüş nanopartiküllerin biyolojik sentezi aşamaları

3.4. Sentezlenen AgNP'lerin karakterizasyonu

Yeşil sentez yöntemi ile sentezlenen AgNP'lerin karakterizasyonları Uv-Vis Spektroskopisi, DLS tekniği ve FT-IR Analizi (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.5. Kullanılan kanser hücre hatları

Bu çalışmada *L. nuda* ve *M. oreades* mantar ekstratları ve sentezlenen AgNP'lerin anti kanser aktivitelerini incelemek için MFC-7 ve MDA MB-231 insan meme kanseri hücre hatları kullanılmıştır.

3.6. Hücre kültürü

- Hücre kültürüne başlamadan önce ortamın sterilizasyonu sağlandı.
 - -80°C dondurucudan alınan krypto tüplerdeki MCF-7 ve MDA-MB -231 kanser hücre hatları 37°C'deki su banyosunda tüpün üstünde küçük bir buz parçası kalana kalana kadar mekanik kuvvet uygulanarak çözündürüldü.
 - Kryptöplerdeki MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarına ayrı ayrı DMEM, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin ve L-Glutamin ihtiva eden besiyerinden 5 mL eklendi ve hücrelerin hepsini çekmeden serolojik pipet ile 15'lik falkon tüplerine hızlı bir şekilde aktarıldı.
 - Daha sonra falkon içerisindeki hücreler 1200 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi.
 - Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısım atılarak geriye kalan süspanse edilmiş pellete her bir hücre hattı için serolojik pipet yardımıyla 5 mL uygun besiyerleri eklenerek dikkatli bir şekilde pipetaj işlemi yapıldı.
- Santrifürüj sonunda falkonlardan besiyerini dikkatli bir şekilde hücrelere değmeden pipetle çekilerek uzaklaştırıldı.
- Hücrelerin peletleri üzerine tekrar 5 mL besiyeri eklenerek hafifçe pipetaj yapılarak ikinci kez santrifüj işlemi yapıldı.

- Santrifüjden sonra hücrelerin üzerinde kalan besiyeri tekrar çekilerek hücreler DMSO'dan tamamen uzaklaştırıldı. Hücreler flasklara ekilmek üzere son kez 5 mL besiyeri içinde resüspanse edildi.
- T75 flasklara 7 mL hacminde besiyeri eklendi.
- Bu şekilde ekim için hazır hale getirilen flasklara hücreler pipet yardımıyla yavaşça eklenerek tekrar resüspanse edildi.
- Flaksların üzerine pasaj numarası, tarih isim ve hücrenin adı yazıldı ve etrafı alkol ile steril edildi.
- Flaskların kapağı sıkıca kapatılarak flaksa ekimi yapılan hücreler üremesi için 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.
- Daha sonra tripan blue kullanılarak hücrelerin canlılığı invert mikroskop altında incelendi. Mikroskopta incelenerek kontrolü sağlanan hücreler flaks yüzeyini %80 oranında kapladığında pasajlama yapıldı.

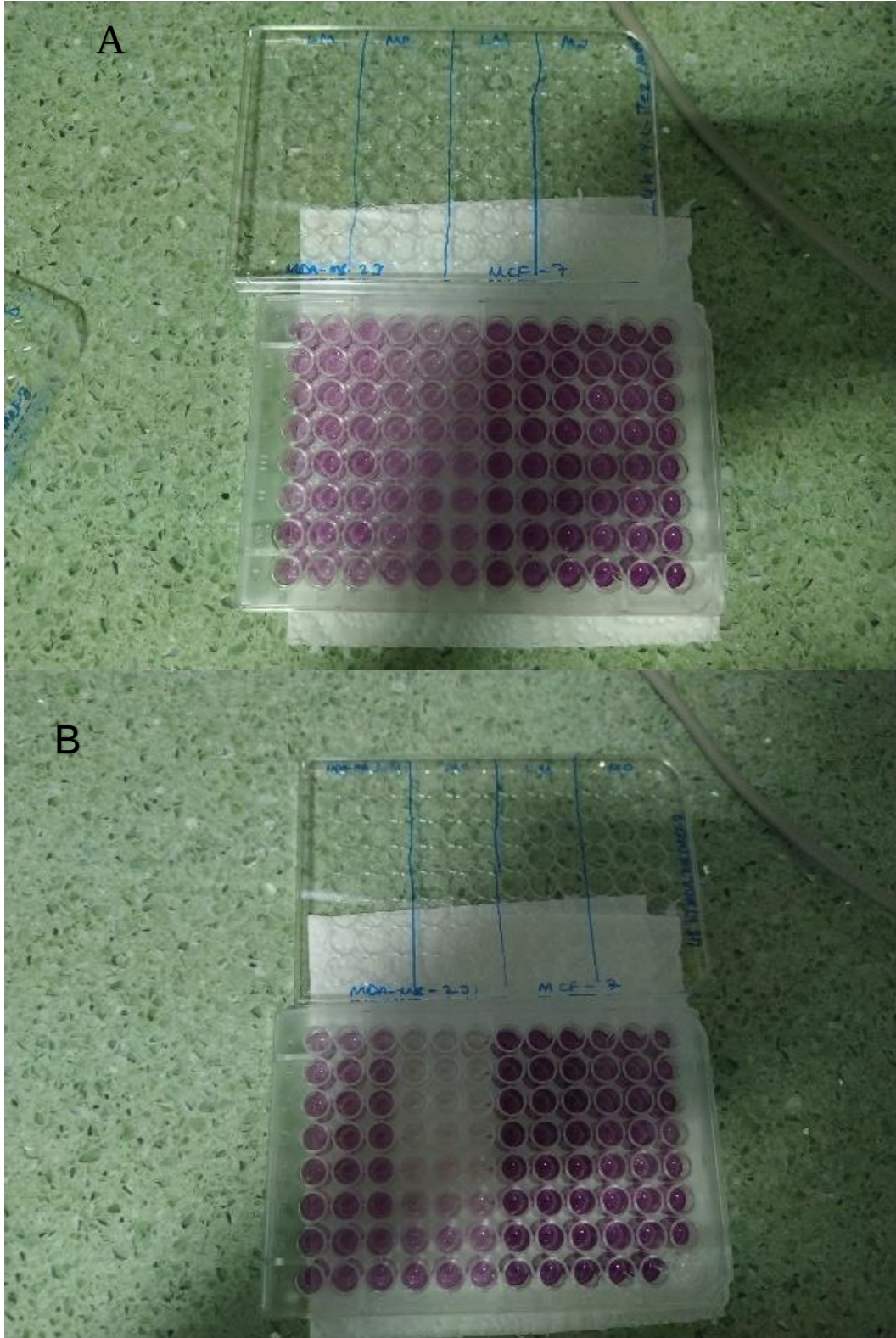
3.7. Hücrelerin pasajlanması

Pasajlama işlemine kullanılan flaksı ölü hücrelerden ve besiyerinden uzaklaştırmak amacıyla DPBS ile yıkanarak başlandı. Daha sonra flask yüzeyine yapışan hücreleri kaldırmak amacıyla Tripsin-EDTA ilave edilerek 1-2 dakika boyunca 37°C'de inkübe etmek için inkübatöre alındı. İnkübatörden alınan flakslar invert mikroskop altında tekrar kontrol edilerek hücrelerin flaks yüzeyinden ayrıldıkları gözlemlendi. Yaklaşık 5 mL kadar uygun besiyeri içeren steril falkon tüplerin içerisine alındı ve 5 dakika boyunca 1200 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından falkon tüpün içerisinden süpernatant kısım uzaklaştırılıp geri kalan pellet üzerine uygun besiyeri eklenip dikkatli bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra yeni flakslara yeni besiyeri eklendi. Flakslar aynı koşullar altında tekrar inkübe edilmiştir. Pasajlanan hücreler deneylerde kullanıldıktan sonra geriye kalan hücreler dondurma solüsyonu kullanılarak tekrar kullanılmak üzere donduruldu.

3.8. MTT hücre canlılık testi / Sitotoksikite testi

Mantar ekstraktı ve yeşil sentezlenmiş AgNP'lerin insan meme kanseri hücre hatları (MCF-7 ve MDA-MB-231) üzerinde sitotoksik değerlendirilmesi MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) hücre canlılık testi ile yapılmıştır. MTT hücre canlılık testi Mosmann tarafından 1983 yılında ilk kez tanımlanmış olup Alley ve arkadaşları tarafından 1988 yılında geliştirilmiştir.

İlk olarak hücreler PBS ile yıkandıktan sonra Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flasklara yapışan hücreler kaldırıldı. Hücreler falkon tüplere alınarak santrifüj edildi ve pellet kısmı uygun miktarda besiyeri ile çözüldü. Tripin blue ve hücre süspandiyonu aynı oranda alınarak thoma lamına aktarıldı ve daha sonra mikroskop altında hücrelerin sayımı gerçekleştirildi. Hücre sayımı sonrasında ölçülen miktarda hücre besiyerine eklenerek pipetaj işlemi yapıldı ve homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Besiyeri ile homojen karışan hücreler 96 kuyucuklu mikrolakların kuyucuklarına 5×10^4 hücre/mL olacak şekilde eklenerek inkübasyon işlemi için 24 saat boyunca 37°C 'de %5 CO_2 içeren inkübatöre alınarak inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyondan 24 saat sonrası besiyeri hücrelerden uzaklaştırıldı. Mikrolakadaki her bir kuyucuğa AgNP içeren karışımdan hücrelerin üzerine 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 6.25 $\mu\text{g/mL}$, 3.125 $\mu\text{g/mL}$ ve 1.56 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında eklendi. Daha sonra 24. Ve 48. saatteki hücre canlılıklarını test etmek için MTT protokolü uygulandı. Bu işlemler MTT solüsyonunun kimyasal yapısı ışıktaki bozulacağı için karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. MTT solüsyonunu uzaklaştırıldıktan sonra oluşan formazon tuzların çözülmesi için 100 μL DMSO (organik çözücü) eklendi. Bir miktar çözülmesi beklendi ve daha sonra mikrolak okuyuculara mikrolakalar yerleştirildi. Tecan firmasına ait mikrolak okuyucuda 570 nm'de absorpsiyona bakıldı.



Şekil 3.2 (A) 24 saat boyunca ve (B) 48 saat boyunca MTT solüsyonu ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin fotoğraf görüntüsü

MTT canlılık testinde temel prensip, elektron alarak tetrazolyum tuzlarının indirgenmesiyle formazan denilen yapıya dönüşmeleri ve böylece renk değişiminin gerçekleşmesidir. Heterosiklik yapıdaki tetrazolyum yalnızca canlı hücrelerdeki mitokondri aracılığıyla kırılır ve renk reaksiyonu yalnızca yaşayan hücreler tarafından sağlanır. Cansız hücrelerin mitokondrileri aktif olmadığından tetrazolyum tuzlarını indirgeyemezler ve renk reaksiyonu gerçekleşmez (Tokur ve ark, 2017).

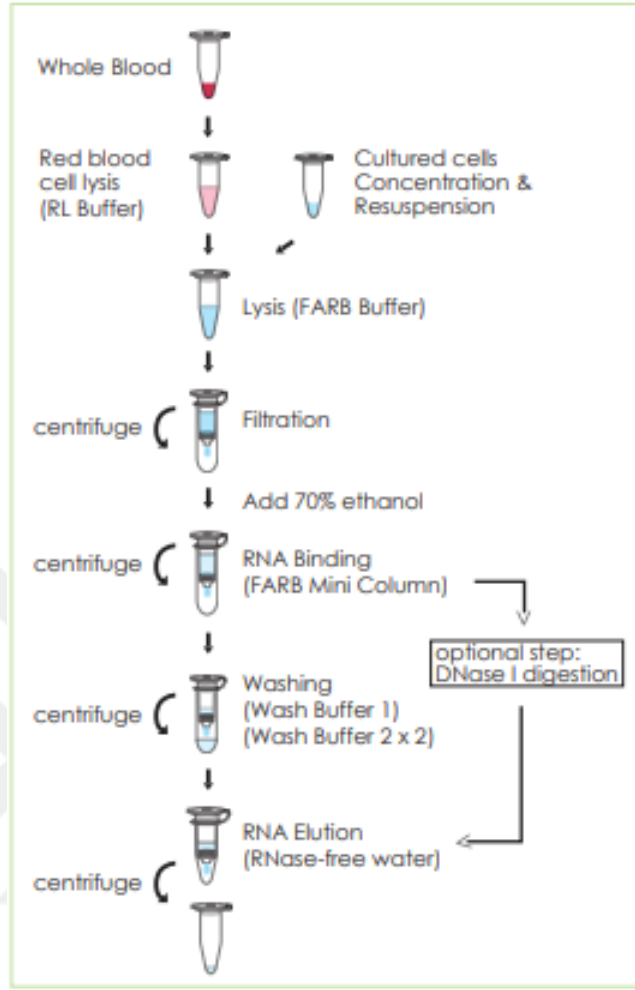
3.9. qRT-PCR analizi

3.9.1. Total RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için Favorgen adlı firmanın “FavorPrep Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit (100 preps)’i kullanılmıştır. Çalışmada MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarından RNA izolasyonunu sağlamak amacıyla üretici firmanın önerdiği prosedür uygulanmıştır. FavorPrep Blood/Cultured Cell Total RNA Purification Mini Kit’in içeriği aşağıdaki gibidir.

- FARB Buffer :45 mL
- RL Buffer : 240 mL
- Wash Buffer 1: 60 mL
- Wash Buffer 2: 35 mL
- RNase-free Water : 6 mL
- FARB Mini Column : 100 pcs
- Filter Column : 100 pcs
- Collection Tube : 200 pcs
- Elution Tube : 100 pcs
- User Manual : 1

Preparation of Wash Buffer 2 by adding ethanol (96 ~ 100%) ,Ethanol volume for Wash Buffer 140 mL.



Şekil 3.3 Favorgen internet sitesinden alınan RNA izolasyon şeması

3.9.2. Tamamlayıcı DNA / cDNA sentezi

cDNA sentezi Roche adlı firmanın 04379012001 katalog numaralı “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit”i kullanılarak üreticinin önerdiği prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Kit, RNA'dan birinci sarmal cDNA sentezi reaksiyonlarını gerçekleştirmek için gerekli tüm reaktifleri sağlar.



Şekil 3.4 Deneyde kullanılan Roche adlı firmanın Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit'in fotoğraf görüntüsü

cDNA sentez kitinde kullanılan ürünler;

- Kırmızı (1) : Transkriptör Ters Transkriptaz
- Renksiz (2) : Reaksiyon Tamponu, 5x kons.
- Renksiz (3) : Koruyucu RNaz İnhibitörü
- Sarı (4) : Deoksinükleotid Karışımı
- Mavi (5) : Anchored-oligo(dT) 18 Primer
- Mavi (6) : Rastgele Heksamer Astar

qReal-Time PCR analizi için MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinden RNA izole ettikten sonra cDNA sentezi gerçekleştirdi. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde kullandığımız LN-AgNP ve MO-AgNP'lerin apoptozda rol olan Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-9 genlerinin ifade düzeylerinde sağladığı değişimi görmek amaçlandı. qReal-Time PCR analizi ışına özelliğine sahip “SYBR Green qPCR Master Mix” kullanılarak yapıldı. Real-Time PCR analizi;

- 45 döngü,
- 90°C'de 15 saniye,
- 60°C'de 60 saniye protokolüne göre gerçekleştirildi.

Bu analizde kontrol grubuna kıyasla değişimi belirlemek için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanıldı ve referans gen olarak GAPDH housekeeping geni kullanıldı. Araştırılmak istenen genlere ait primerler aşağıda gösterilmiştir.

Kazpaz-9 :

Forward: 5'-GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT-3'

Reverse: 5'-CAACGTACCAGGAGCCACTCTT-3'

Bax :

Forward: 5'-TCAGGATGCGTCCACCAAGAAG-3'

Reverse: 5'-TGTGTCCACGGCGGCAATCATC-3'

Bcl-2 :

Forward: 5'-ATCGCCCTGTGGATGACTGAGT-3'

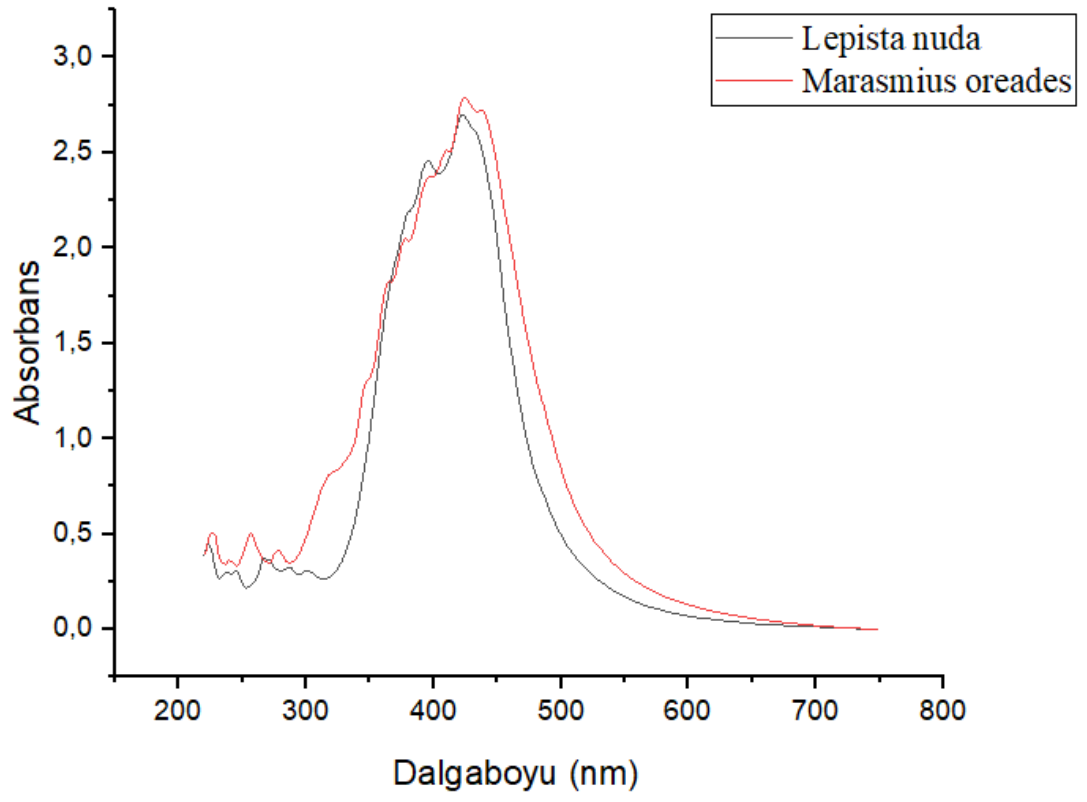
Reverse: 5'-GCCAGGAGAAATCAAACAGAGGC-3'

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Uv-Vis spektroskopisi analizi sonuçları

L. nuda ve *M. oreades* mantar ekstraktları kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin karakter analiz yöntemlerinden biri Uv-Vis spektroskopisidir. Literatürde AgNP'lerin absorpsiyon ölçümünün 350-450 nm olduğu bildirilmiştir (Esmeray ve Özata, 2019). Ashraf ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları, domateste fusarium solgunluğunun tedavisi için *Melia azedarach* kullanılarak AgNP'lerin mikrodalga destekli yeşil sentezi ve karakterizasyonu adlı çalışmada nanopartiküllerin 434 nm'de maksimum pik verdiği rapor edilmiştir (Ashraf ve ark., 2020). Das ve arkadaşlarının 2019'da yaptığı çalışmada *Cocos nucifera* L. meyvesinin dış kabuk lifi özleri kullanılarak AgNP'lerin foto aracılı optimize sentezi ve antioksidan, sitotoksikite ve antibakteriyel potansiyeli araştırılmıştır. Hindistan cevizi (*Cocos nucifera*) kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin, Uv-Vis spektrumunda 468 nm'de maksimum pik verdiği rapor edilmiştir (Das ve ark., 2019). Li ve arkadaşlarının 2020'de yaptıkları çalışmada diyet Myretin aracılı AgNP'lerin yeşil sentezi ve yeşil sentezlenen AgNP'lerin antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri değerlendirilmiştir. Sentezlenen AgNP'ler Uv-Vis spektrofotometrisinde yaklaşık 410 nm'de maksimum absorpsiyon göstermiştir (Li ve ark., 2020). Raghava ve arkadaşlarının 2021'de yaptıkları çalışmada *Rivina humilis* yaprağı ekstresi kullanılarak *Brucella* türlerinin ve diğer tehlikeli patojenlerin büyümesini engellemek amacıyla AgNP'lerin yeşil sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen AgNP'ler UV-Vis'de 440 nm'de maksimum pik vermiştir (Raghava ve ark., 2021).

Çalışmamızda *L. nuda* ekstraktı ile sentezlenen AgNP'lerin (LN-AgNP) Uv-Vis spektroskopisinde verdiği maksimum absorpsiyon 420 nm, *M. oreades* ekstraktı ile sentezlenen AgNP'lerin (MO-AgNP) maksimum absorpsiyonu ise 424 nm olarak belirlenmiştir. Literatüre bakıldığında elde ettiğimiz sonuçlar benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda elde edilen grafik aşağıda (Şekil 4.1) gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Sentezlenen AgNP'lerin UV-Vis absorpsiyon spektrumu

4.2. DLS analizi sonuçları

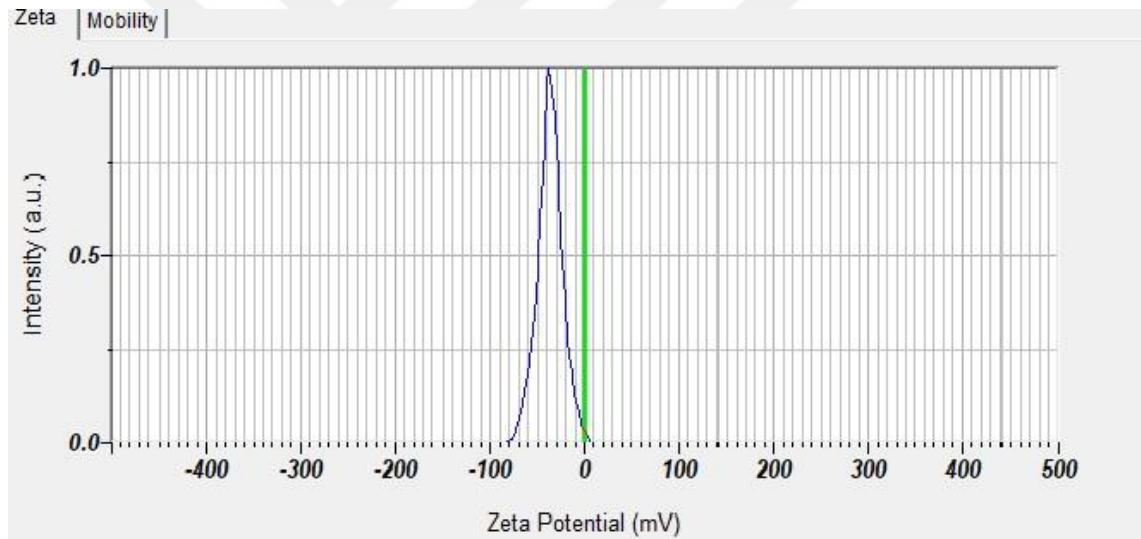
DLS analizinde sentezlenen AgNP'lerin boyut analizi gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin nasıl davrandıklarını optimize etmek için boyut analizi önemlidir. DLS yöntemi ile LN-AgNP'lerin ortalama boyutu 50.2 nm ve MO-AgNP'lerin ortalama boyutu ise 54.6 nm olarak bulunmuştur. Literatüre bakıldığında bulunan bu değerler, yapılan bazı çalışmalarla benzerlik gösterse de bazı çalışmalarda benzerlik göstermemektedir. Örneğin, Alkhulaifi ve arkadaşlarının 2020'de yaptıkları çalışmada nanopartiküllerin ortalama boyutu 59.74 nm olarak belirlenmiştir (Alkhulaifi ve ark.,2020). Bu bizim bulduğumuz değerle benzer bir sonuçtur. Öte yandan Elgamouz ve arkadaşlarının 2020'de yaptıkları çalışmada AgNP'lerin DLS analizinde ortalama boyutu 4.13 nm, Al-Obiti ve arkadaşlarının 2020'de yaptıkları çalışmada ise AgNP'lerin ortalama boyutu 104-140 nm olarak belirlenmiştir (Elgamouz ve ark., 2020; Al-obiti ve ark., 2020). Kambale ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları çalışmada üç Kongo bitki türü kullanılarak yeşil sentezini gerçekleştirdikleri AgNP'lerin 45-110 nm arasında değişen boyut dağılımına sahip olduğu rapor edilmiştir (Kambale ve ark.,2020). Mahiuddin ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları çalışmada *Piper chaba* kök estratları kullanılarak AgNP'lerin yeşil sentezi ve katalitik aktivitesi değerlendirilmiştir. Yeşil sentezi gerçekleştirilen AgNP'lerin ortalama partikül boyutu 19 nm olarak rapor edilmiştir (Mahiuddin ve ark., 2020).

Bulunan bu değerlerde görülen farklılıklar nanopartiküllerin sentezinde indirgeyici ajan olarak kullanılan biyolojik kaynağın türündeki farklılıklardan veya yapılan optimizasyon çalışmalarındaki farklılıklardan kaynaklanabilir.

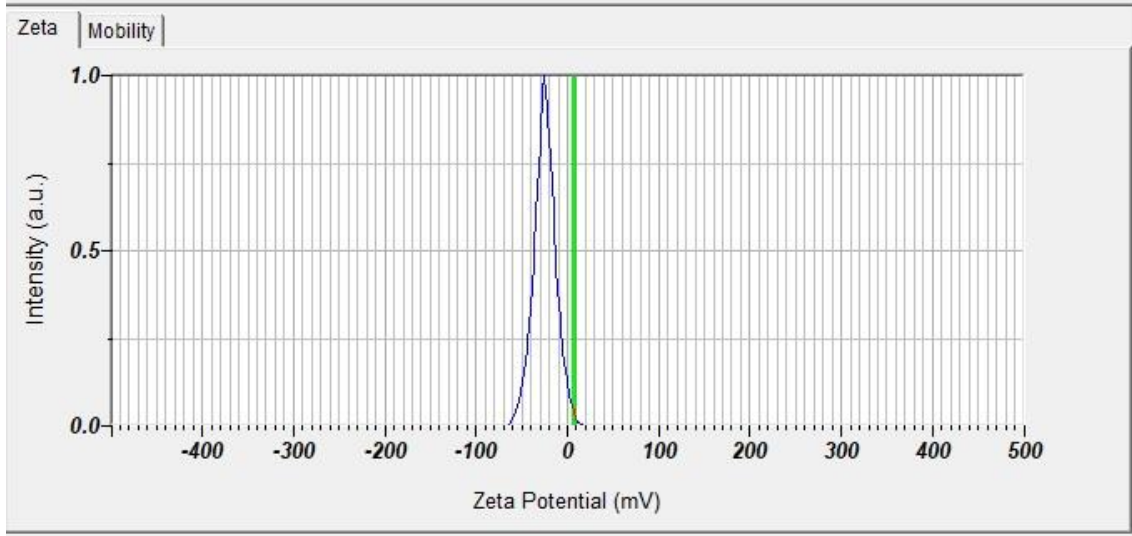
Sentezlenen nanopartiküllerin zeta potansiyeli (elektriksel yükü) zeta analizi ile belirlenmiştir. Zeta potansiyeli parçacığın yüzey yükünü, yani katyonik, anyonik veya nötr karakterini tahmin etmek için kullanılır. "HORİBA SZ-100" programı ile yapılan ölçüm sonuçlarına göre LN-AgNP'lerin zeta potansiyeli -36.8 mV, MO-AgNP'lerin zeta potansiyeli -29.1 olarak bulunmuştur. Negatif yönde düşük elektrik yükü ile partiküller arasında oluşan itme kuvveti partiküllerin kümelenmesinin önüne geçmekte olup, NP'nin kararlılığına işaret etmektedir. Rosman ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları

çalışmada deniz poliketi, *Marphysa moribidi* 'nin ham özü kullanılarak AgNP'lerin yeşil sentezi gerçekleştirilmiştir. DLS analizine göre orta düzeyde polidispersite örneği olduğu belirlenmiştir (Rosman ve ark., 2020). Yaptığımız DLS analizinde, sentezlenen AgNP'lerin monodispers yani kararlı parçacıklar olduğu belirlenmiştir. Parçacıkların monodispers olması onların birim hacimde şekil, boyut ve kütle dağılımı açısından tutarlı olduğunu göstermektedir ve dış etmenlere karşı yapılarının bozulmadan kalabilmesi açısından kararlı olması önemlidir.

Aşağıda (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3) sentezlenen AgNP'lerin zeta potansiyeli grafikleri gösterilmiştir. Grafiklerde elde edilen dar dağılım, moleküllerin monodisper yani kararlı olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 4.2 *Lepista nuda* + AgNP zeta potansiyeli (mV)



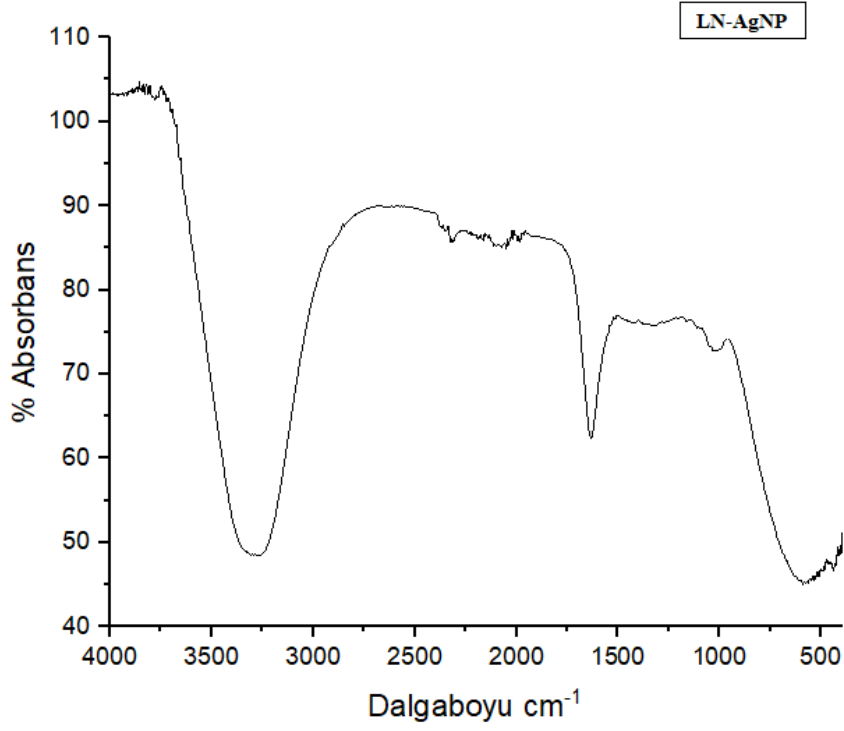
Şekil 4.3 *Marasmius oreades* + AgNP zeta potansiyeli (mV)

4.3. FT-IR analizi sonuçları

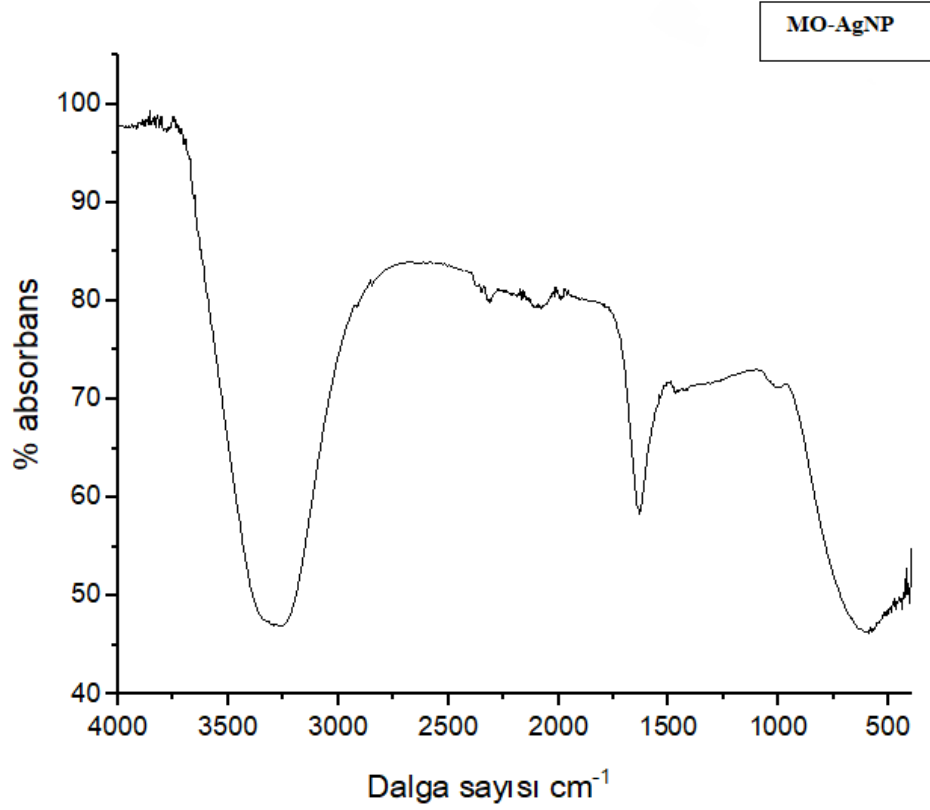
Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), tıraşım spektrofotometrisi olarak da adlandırılır. Bu analiz yönteminde numunedeki bileşiklerin moleküler bağlarının durumu, bağlanma yerleri, aromatik olup olmaması gibi özellikleri gösteren analiz yöntemidir. FT-IR analizini “JASKO FT-IR-4700” cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizin ardından “Graphpad Prism 8” yazılımı kullanılarak sonuçlar grafiğe dönüştürülmüştür. Grafikten elde edilen verilerde çalışmada kullanılan *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantar ekstraktlarının yüzeyinde bulunan -OH fonksiyonel grubuna ait yaklaşık değer olarak 3300 cm^{-1} deki kuvvetli asimetrik esneme bandı, alkoller ve fenollerin varlığına $\text{C}\equiv\text{C}$ ve $\text{C}\equiv\text{N}$ grubuna ait 2000 cm^{-1} ile 2500 cm^{-1} arasındaki kuvvetli asimetrik esneme bandı aromatik bileşiklerin varlığına işaret eder. $\text{C}=\text{O}$ fonksiyonel gruplarına ait 1600 cm^{-1} amid bandına ait ve karbonil bandındaki fonksiyonel gruplar üzerinde gerçekleştiğini söyleyebiliriz. Yaklaşık 1400 cm^{-1} ’deki bantların ise oldukça geniş olması indirgenmiş AgNP’lerin varlığına işaret eder. Şahin ve arkadaşlarının 2017’de yaptıkları çalışmaya göre nar özü kullanılarak AgNP’lerin yeşil sentezi gerçekleştirildi. FT-IR analizinde AgNP’ler H bağlı -OH, $\text{C}=\text{O}$, N-H, N-O bandına biyobileşiklerle kaplı AgNP’lerin oluşumunu göstermektedir. (Şahin ve ark., 2017).

Acharya ve arkadaşlarının 2020’ de yaptıkları çalışmada deniz yosunu *Chaetomorpha linum* ekstatından biyosentezlenmiş AgNP’lerin FT-IR analizinde 832 cm^{-1} 1469 cm^{-1} deki pikler uzun zincirli ineer alifatik yapılar içeren *C.linum*’da heptadien zincirinin polisakkarit ve aromatik bileşik titreşimlerinin varlığına işaret etmiştir. Amit gruplarında var olan N-H ve karbonil gruplarının absorpsiyon pikleri sırasıyla 1469 cm^{-1} ve 1758 cm^{-1} ’ye karşılık geldiği rapor edilmiştir (Acharya ve ark.,2020). Alkhulaifi ve arkadaşlarının 2020’de yaptıkları çalışmada *Citrus* limon kabukları kullanılarak AgNP’lerin yeşil sentezi gerçekleştirilmiş ve FT-IR analizinde 3303.05 cm^{-1} ’ deki pikin, alkollerin, fenoliklerin, mono-ikameli Alkinlerin, alifatik birincil aminlere sodyum tuzunun, aminoasit veya SIOH alkolün varlığına işaret olabileceği, 2198.40 cm^{-1} ’deki pikin, NH veya Alkinlere karşılık gelebileceği, 1987.95 cm^{-1} ’deki pikin ise aromatik benzenoid bileşimini gösteren kümülatif alkenlere karşılık gelebileceği rapor edilmiştir (Alkhulaifi ve ark., 2020). Viana ve arkadaşlarının 2020’de yaptıkları çalışmada indirgeyici ve stabilize edici bir ajan olarak mısır koçanı xylanı kullanan antileishmania ve antifungal AgNP’lerin yeşil sentezi gerçekleştirilmiştir. Nanoxylan ürününde hem gümüş hem de ksilanın varlığı FT-IR analiziyle doğrulanmıştır. 1400 cm^{-1} civarındaki bantlar indirgenmiş nanopartikülleri işaret eder. $1450\text{--}1215\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde gözlenen bantların CH gruplarının açısıl deformasyonuna ve CO’nun gerilme titreşimine bağlı olduğu bildirilmiştir. Bunun aksine, 1091 cm^{-1} and 1042 cm^{-1} ’deki titreşim modları, C-O-H’deki açısıl deformasyon C-O ve C-O-C’deki eksenel deformasyon, glikozidik halka ile ilişkili olduğu ve 866 cm^{-1} (ksilan) ve 837 cm^{-1} ’de (nanoksilan) titreşimlerin ise furan halkasının varlığını gösterdiği rapor edilmiştir (Viana ve ark., 2020).

Literatür araştırmasında da benzer şekilde bu fonksiyonel gruplar üzerinde sentezin gerçekleştiği gösterilmiştir. Fonksiyonel gruplar, biyomoleküllerin kimyasal reaksiyonlara giren, diğer biyomoleküller ile bağ kuran ve bir fonksiyonu yerine getiren kısımlar olduğu için nanopartiküllerde bulunması nanopartiküllerin çevre ile etkileşiminde önemli olabilir. Çalışmamızda elde ettiğimiz grafik aşağıdaki gibidir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).



Şekil 4.4 *Lepista nuda* mantar ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin FT-IR grafiği



Şekil 4.5 *Marasmius oreades* mantar ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin FT-IR grafiği

4.4. Sentezlenen AgNP'lerin sitotoksikite analizleri

Hücrelerin canlılığı test edilen yöntemler, toksisiteye karşı verdikleri cevap olarak hücrelerin metabolizmaları, sağ salımları hakkında bilgi verebilir (Aydın ve Pehlivanoğlu, 2019). Çizelge 4.1'de AgNP'lerin MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerindeki IC₅₀ değerleri verilmiştir

Çizelge 4.1 AgNP'lerin MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücreleri üzerinde IC₅₀ değerleri

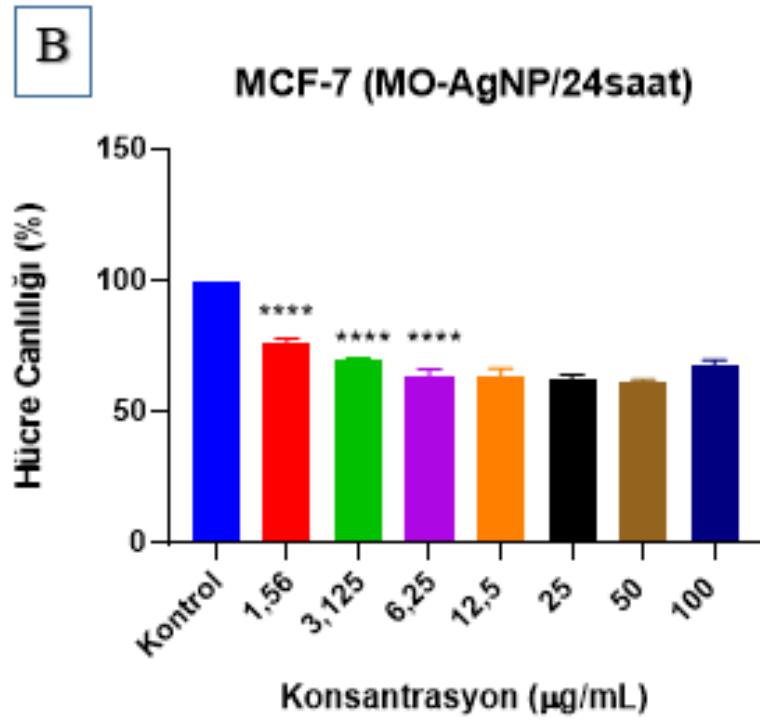
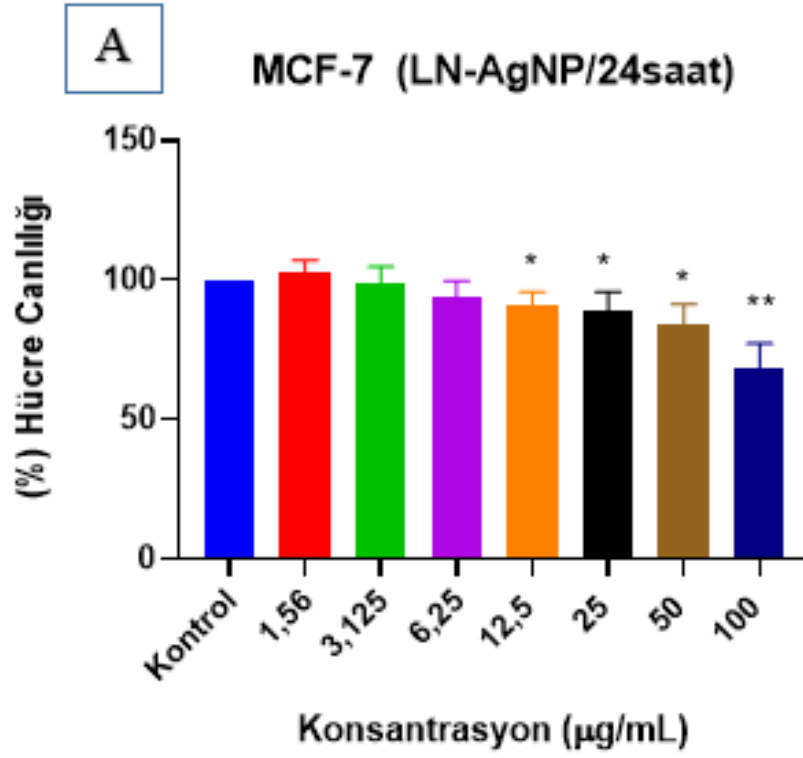
Hücre hattı	<i>Lepista nuda</i> +AgNP IC ₅₀ (µg/mL)	<i>Marasmius</i> <i>oreades</i> +AgNP IC ₅₀ (µg/mL)	<i>Lepista nuda</i> +AgNP IC ₅₀ (µg/mL)	<i>Marasmius</i> <i>oreades</i> +AgNP IC ₅₀ (µg/mL)
	24 saat		48 saat	
MCF-7	25.22	1.503	33.15	9.805
MDA-MB-231	6.400	3.213	29.10	2.109

Çalışmamızda biyolojik sentezi gerçekleştirilen AgNP'lerin sitotoksik aktivitelerini belirlemek amacıyla MTT testi yapılmıştır. Her iki mantar türü için ve her iki hücre hattı için ayrı ayrı, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.125 µg/mL ve 1.56 µg/mL konsantrasyonlarda AgNP'lerin, MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarında 24 saat ve 48 saat süreyle hücrelerin canlılığı incelenmiştir. Aşağıda hücre canlılığı grafiği verilen şekillerde yer alan yıldızlar istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir.

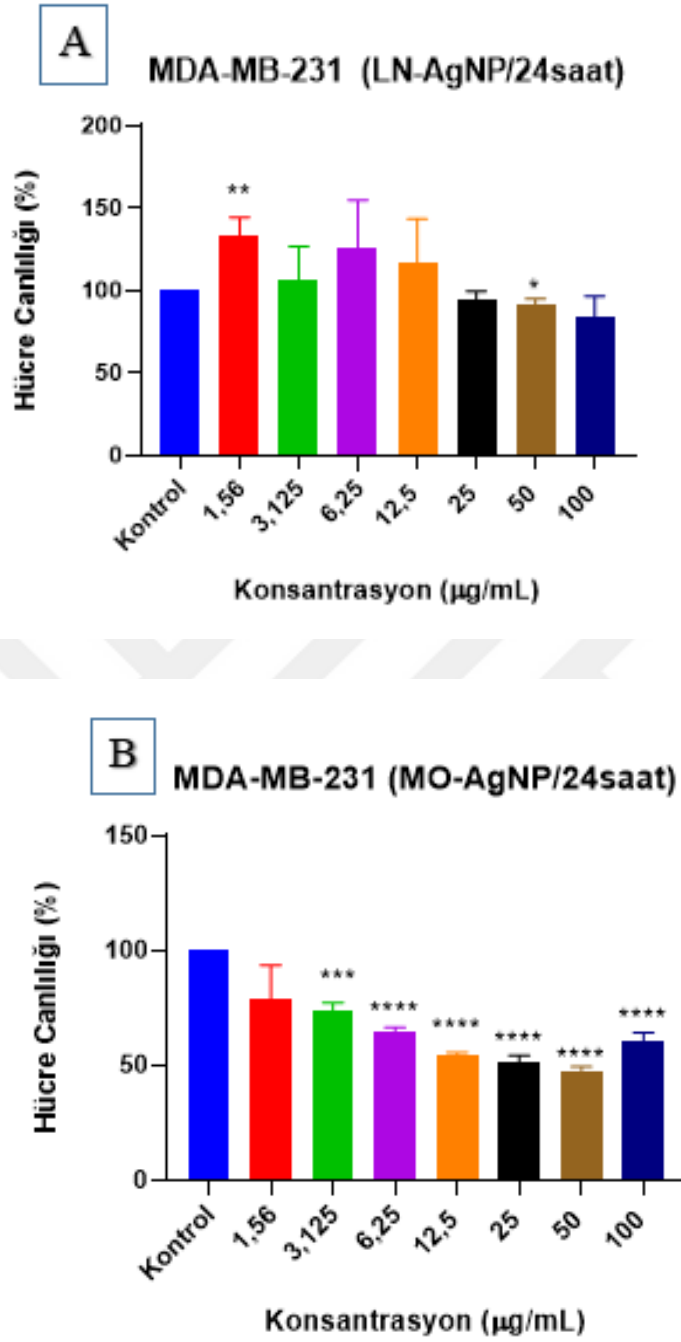
Şekil 4.6'da MCF-7 hücre hattı üzerinde *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantar ekstratları kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin 24 saat süreli MTT analizi sonucu sitotoksik aktiviteleri gösterilmiştir. 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.125 µg/mL ve 1.56 µg/mL konsantrasyonlardaki AgNP'lerin kontrol grubuna göre kıyaslandığında LN-AgNP'lerin MCF-7 hücre hattında doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. LN-AgNP'lerin MCF-7 hücre hattı üzerinde gösterdiği IC₅₀ değeri ise 25.22 µg/mL olarak bulunmuştur. *Marasmius oreades* ekstratlı AgNP'lerin MCF-7 hücre hattı üzerinde gösterdiği IC₅₀ değeri ise 1.503 µg/ml olarak bulunmuştur. MO-AgNP'ler sadece 1.56 µg/mL, 3.125 µg/mL ve 6.25 µg/mL konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı sitotoksik aktivite göstermiştir.

Şekil 4.7’de ise MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantar ekstratları kullanılarak sentezlenen AgNP’lerin 24 saat süreli MTT analizi sonucu sitotoksik aktiviteleri gösterilmiştir. 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.125 µg/mL ve 1.56 µg/mL konsantrasyonlardaki AgNP’lerin kontrol grubuna göre kıyaslandığında LN-AgNP’lerin ve MO-AgNP’lerin istatistiksel olarak anlamlı en yüksek sitotoksik aktivite 50 µg/mL konsantrasyon olarak bulunmuştur.





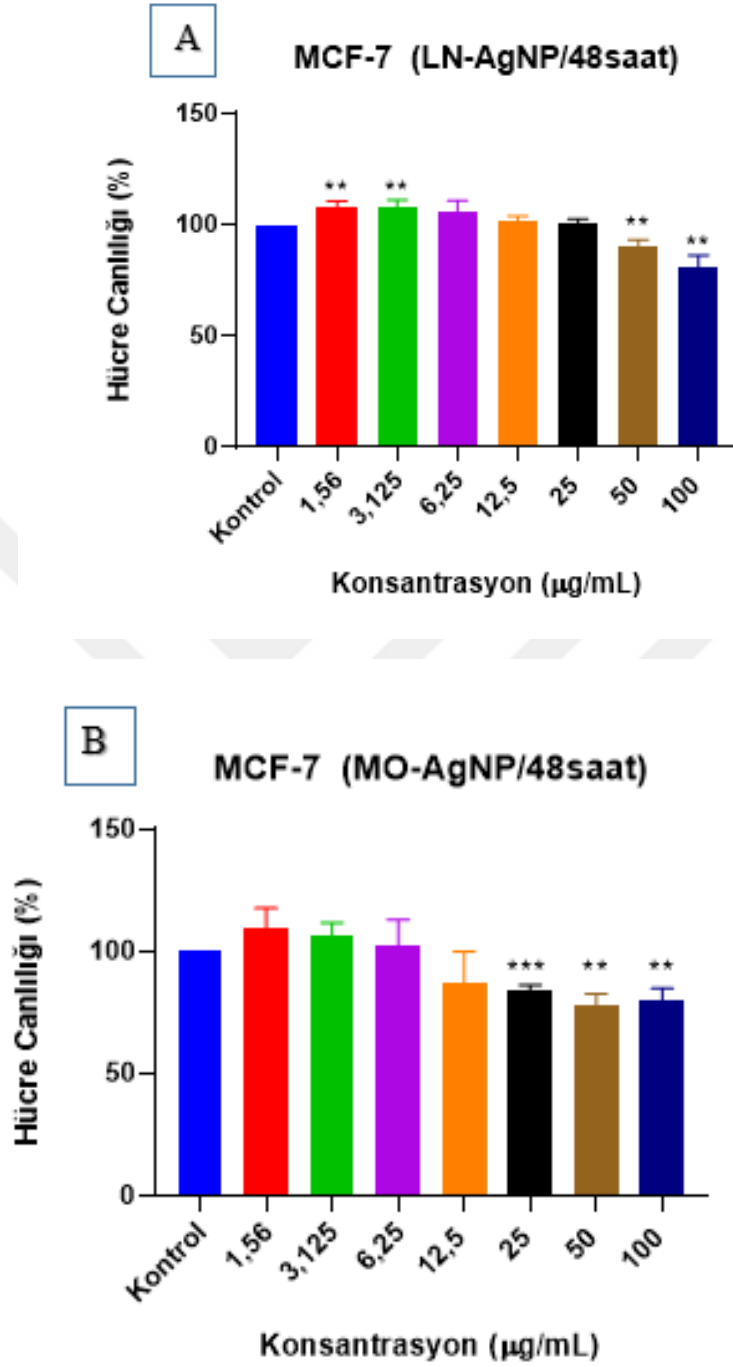
Şekil 4.6 *Lepista nuda* (A) ve *Marasmius oreades* (B) mantar ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarındaki 24 saat süreli sitotoksik aktivitesi



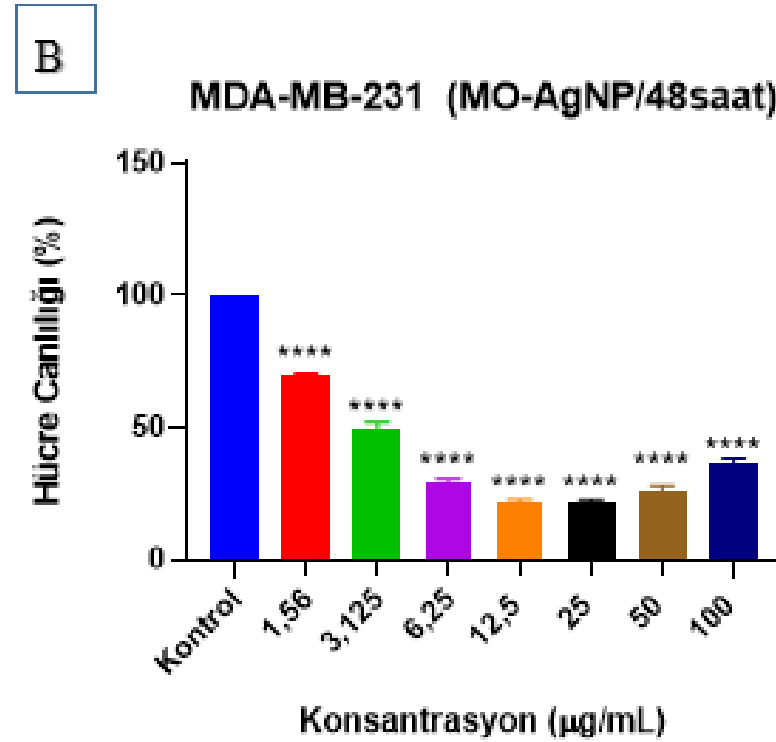
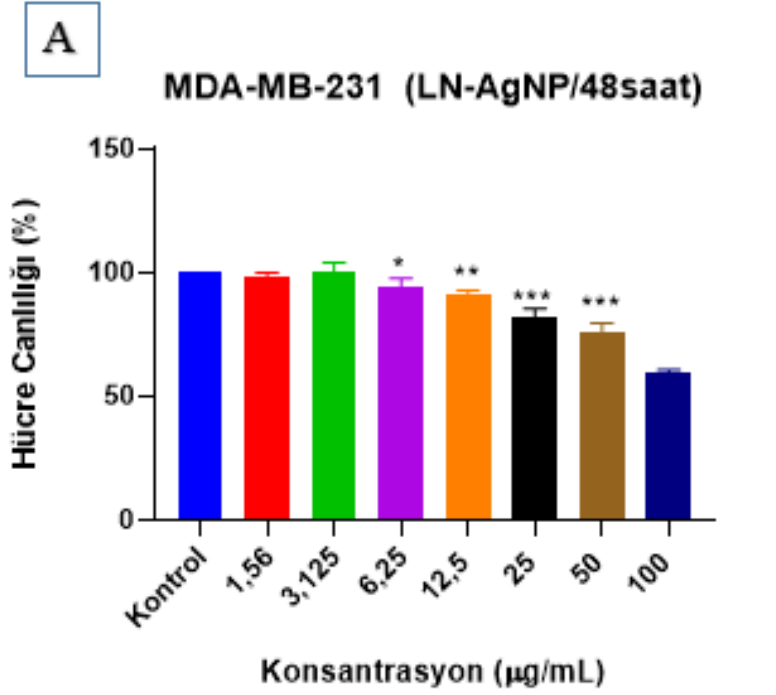
Şekil 4.7 (A) *Lepista nuda* ve (B) *Marasmius oreades* mantar ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarındaki 24 saat süreli sitotoksik aktivitesi

Şekil 4.8’de MCF-7 hücre hattı üzerinde *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantar ekstratları kullanılarak sentezlenen AgNP’lerin 48 saat süreli MTT analizi sonucu sitotoksik aktiviteleri gösterilmiştir. 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.125 µg/mL ve 1.56 µg/mL konsantrasyonlardaki AgNP’lerin kontrol grubuna göre kıyaslandığında LN-AgNP’lerin en yüksek sitotoksik aktiviteyi 100 µg/mL konsantrasyonda göstermiş olup IC₅₀ değeri 33.15 µg/mL olarak bulunmuştur. MO-AgNP’lerin gösterdiği en iyi sitotoksik aktivite 50 µg/mL konsantrasyonda gözlemlenmiş olup IC₅₀ değeri ise 9.805 µg/mL olarak bulunmuştur.

Şekil 4.9’de MDA-MB-231 hücre hattı üzerinde *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantar ekstratları kullanılarak sentezlenen AgNP’lerin 48 saat süreli MTT analizi sonucu sitotoksik aktiviteleri gösterilmiştir. 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL, 3.125 µg/mL ve 1.56 µg/mL konsantrasyonlardaki AgNP’lerin kontrol grubuna göre kıyaslandığında LN-AgNP’lerin en yüksek sitotoksik aktiviteyi 50 µg/mL konsantrasyon göstermiş olup IC₅₀ değeri ise 29.10 µg/mL olarak bulunmuştur. MO-AgNP’lerin gösterdiği en iyi sitotoksik aktivite ise 25 µg/mL konsantrasyonda olup IC₅₀ değeri 2.109 µg/mL olarak bulunmuştur. Tüm bu sonuçlara bakıldığında en iyi hücre ölümü, MO-AgNP ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hattında gerçekleşmiştir.



Şekil 4.8 *Lepista nuda* (A) ve *Marasmius oreades* (B) mantar ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin MCF-7 insan meme kanseri hücre hatlarındaki 48 saat süreli sitotoksik aktivitesi



Şekil 4.9 *Lepista nuda* (A) ve *Marasmius oreades* (B) mantar ekstresi ile sentezlenen AgNP'lerin MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarındaki 48 saat süreli sitotoksik aktivitesi

Metalik nanopartiküllerin çeşitli kanser hücre hatlarına karşı sitotoksik kapasitesine nekroz, sinyal yollarının uyarılması, lizozomal hasar, kaspaz aracılı sinyal iletimi ve apoptoz eşlik eder. Parçacık şekli, boyutu ve yüzey kimyası gibi çeşitli faktörler AgNP'lerin sitotoksik etkinliğini etkiler. Nanopartiküllerin boyutları antikanser aktivitelerini etkiler. Nanopartikülün boyutu ne kadar küçükse kanser hücresi proliferasyonunun inhibisyonu o kadar fazladır (Rao ve ark., 2016). Şahin ve arkadaşlarının 2017'de yaptıkları çalışmada nar özü kullanılarak gümüş nanoparçacıkların mikrodalga destekli yeşil sentezi gerçekleştirilmiş, artan nanoparçacık konsantrasyonu ile MCF-7 hücre hattındaki sitotoksik etkisinin arttığı gözlemlenmiştir. AgNP'lerin kontrol ve tedavi grupları arasında hücre canlılığı açısından farklılıklar görülmüştür. AgNP'lerin nar özü ile kombinasyonunda kanser hücrelerinde apoptotik değişikliklere neden olduğu gözlemlenmiştir (Şahin ve ark., 2017).

Akhter ve arkadaşlarının 2019'da yaptıkları çalışmada farmasötik olarak aktif AgNP'lerin mantar aracılı sentezi ve apoptoz yoluyla A549 hücrelerine karşı antikanser aktivitesi araştırılmıştır. Bu çalışmada mantarların genel olarak sahip olduğu metal iyonlarını metalik nanopartiküllere indirgeme yeteneğine sahip olan büyük miktarlarda ikincil metabolitler salgılama yeteneğinden yararlanılmış olup, gümüş nanoparçacıklar tıbbi bitki *Catharanthus roseus*'tan izole edilen bir endofitik mantar kullanılarak sentezlenmiştir. AgNP'lerin in vitro anti kanser aktivitesi A-549 hücreleri üzerinde test edilmiş ve sentezlenen AgNP'lerin, serbest radikalleri temizlemede etkili olduğu ve in vitro koşullar altında akciğer (A-549) kanser hücre dizilerinde nükleer ve DNA fragmentasyonu dahil olmak üzere apoptozun indüklenen ayırt edici özellikleri ortaya çıkmıştır. Çalışma sonuçları nanopartiküllere dahil edilen endofitik mantarlardaki doğal biyomoleküllerin, kanser hücrelerinde sitotoksik aktivite kazanmasından sorumlu olabileceğini göstermiştir. MTT analizine göre doza bağlı bir şekilde test edilen numunelerin artan konsantrasyonları ile temizleme aktivitesi artmıştır. AgNP'lerin 40 µg/mL'de en yüksek sitotoksikite IC'lerine sahip olduğu bulunmuştur. Sonuçlar sitotoksikitenin endositozdan kaynaklanabileceğini veya gümüş iyonlarının kanser hücresi kanser hücresi zarına nüfuz edebileceğini ve DNA parçalanma testi ile kanıtlandığı gibi DNA'ya zarar verebileceğini göstermiştir (Akhter ve ark., 2019). Alkhulaifi ve arkadaşlarının 2020'de yaptıkları çalışmada Citrus limon kabukları

kullanılarak AgNP'lerin yeşil sentezi gerçekleştirilmiş ve sitotoksik etkileri rapor edilmiştir. Yeşil sentezlenen AgNP'lerin sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesinde MFC-7 insan meme kanseri hücre hattı ve HCT-116 insan kolon kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Sonuçlar, konsantrasyonun hücre canlılığı ile doğrudan bir korelasyona sahip olduğu ortaya çıkarmıştır. MCF-7 hücre hattının IC₅₀ 23.4±0.97 µL/100 µL iken, HCT-116 hücre hattı 37.48±5.93 µL/100 µL olarak belirlenmiştir (Alkhulaifi ve ark.,2020). Das ve arkadaşlarının 2019'da yaptığı çalışmada *Cocos nucifera L.* meyvesinin dış kabuk lifi özleri kullanılarak AgNP'lerin foto aracılı optimize sentezi ve antioksidan, sitotoksik ve antibakteriyel potansiyeli araştırılmıştır. CS-AgNP'ler HepG2 hücrelerine karşı önemli sitotoksik aktivitesi göstermiştir. CS-AgNP'lerin IC₅₀ değeri 15.28 µg/mL (R²=0.8883) olarak bulunmuştur. Çalışmada CS-AgNP'lerin sitotoksik etki göstermesinin bir nedeni nanoparçacıkların çok küçük boyutları nedeniyle hücre içerisine girerek hücre içi organellere zarar vermek ve böylece hücre hasarına yol açarak hücre ölümüyle sonuçlanması olarak değerlendirilmiştir (Das ve ark., 2019).

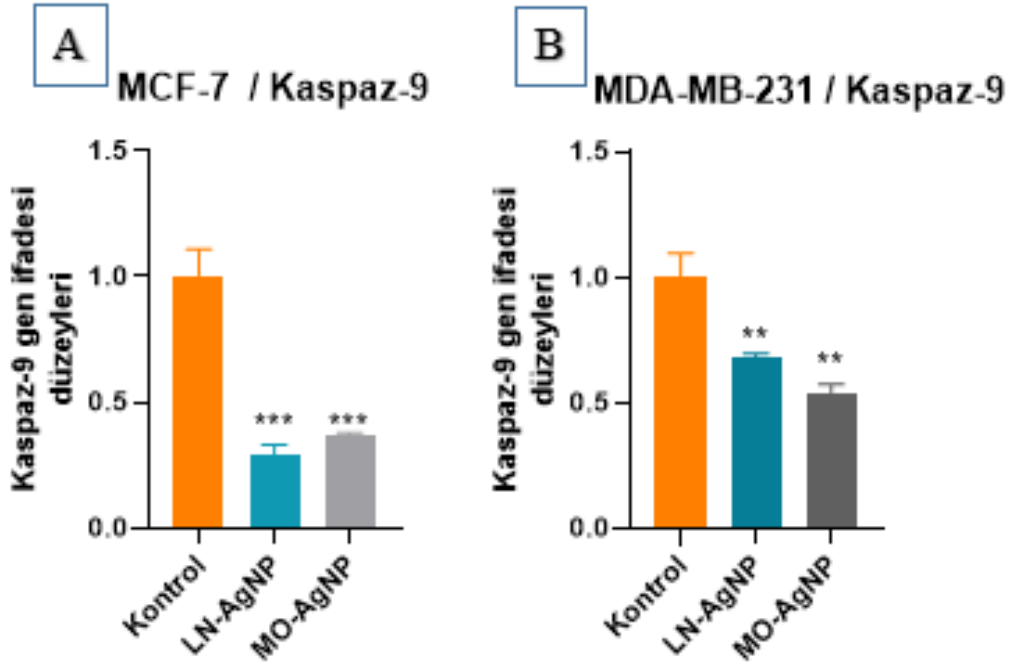
Elgamouz ve arkadaşlarının 2020'de yaptıkları çalışmada yeşil sentez yöntemi ile yosun ekstratı kullanılarak AgNP'lerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan yeşil alg (*Noctiluca scintillans*) özütü aracılığı ile sentezlenen AgNP'lerin MDA-MB-231 insan meme adenokarsinomunun tümör hücresi büyümesinde %50'lik bir azalma olduğu rapor edilmiştir (Elgamouz ve ark.,2020).

Elhawary ve arkadaşlarının 2020'de yaptıkları çalışmada çok önemli tıbbi ve endüstriyel çiçekli bir bitki olan *Jasmiun officinal L.* yaprakları kullanılarak gümüş nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada sentezlenen AgNP'lerin mesane (5637) ve meme kanseri (MCF-7) hücre hatlarına yönelik sitotoksik aktivitesi değerlendirilmiştir. JOLE-AgNP'ler 5637 ve MCF-7 hücre hatlarına karşı yüksek sitotoksik göstererek alternatif bir sitotoksik ilaç olabileceği rapor edilmiştir (Elhawary ve ark.,2020). Vijayakumar ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptıkları çalışmaya göre sarımsak kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin meme kanseri hücre hatlarında anti kanser aktiviteleri değerlendirilmiştir. G-AgNP'ler dikkate değer antikanser aktivitesi göstermiştir. MCF-7 hücrelerinin morfolojisinde belirgin bir değişiklik göstermiştir (Vijayakumar ve ark., 2019).

Literatüre bakıldığında, birçok çalışmada çeşitli biyolojik kaynaklar kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin sitotoksik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Yeşil sentezlenmiş AgNP'lerin, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde kontrol grubuna göre sitotoksik etki gösterdiğini belirledik. Çalışmadan elde ettiğimiz verilere göre *L. nuda* ve *M. oreades* mantarları ile sentezlenen AgNP'lerin, meme kanserinin tedavisinde antikanser ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Fakat elde ettiğimiz sonuçların uygulanabilir olduğunu görmek, insan vücudunda nasıl bir etki göstereceğini ve etki mekanizmalarını belirlemek amacıyla in vivo çalışmalara yer verilmesi gerekmektedir.

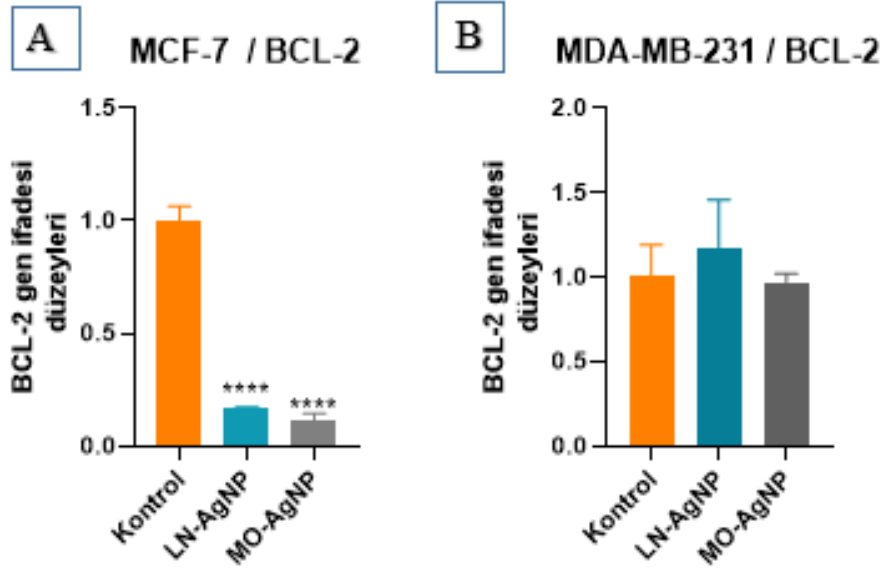
4.5 qRT-PCR analiz sonuçları

Çalışmamızda *L. nuda* ve *M. oreades* mantarları aracılığıyla sentezlenen AgNP'ler MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde Kaspaz-9 gen düzeyini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürmüştür ($P<0.05$). Kaspaz-9 ifadesinde artış gözlemlenmemesi her iki hücre hattında da kaspaz gerektirmeyen, kaspazlardan bağımsız hücre ölümünün gerçekleştiğine işaret etmektedir (Selvarathinam ve ark., 2023). Fakat Bax/Bcl-2 oranında artış olması (Şekil 4.13) ise hücrelerde mitokondriyal yolağın aktivasyonunun gerçekleştiğini desteklemektedir. Çalışmamızda elde edilen Kaspaz-9 gen ifadeleri grafikleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.10 (A) MCF-7 hücre hattında *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele hücrelerin kontrol grubuna göre Kaspaz-9 geni ifadeleri (B) MDA-MB-231 hücre hattında *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele hücrelerin kontrol grubuna göre Kaspaz-9 geni ifadeleri

Çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde her iki mantar ekstraktı kullanılarak sentezlenen AgNP'ler kontrol grubuna kıyasla Bcl-2 gen ifadesini istatistiksel olarak anlamlı derecede düşürmüştür ($P < 0.001$). MDA-MB-231 hücre hattında ise LN-AgNP'ler Bcl-2 gen ifadesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde değiştirmemiştir ($P = 0.4597$). MO-AgNP'ler, Bcl-2 gen ifadesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değiştirmemiştir ($P = 0.7317$). Literatüre bakıldığında hücreyi ölüme götüren apoptozda Bcl-2 gen ifadesinde azalma görülmüştür. Çalışmamızda LN-AgNP'ler sadece MCF-7 hücrelerinde Bcl-2 ifadesini azaltmış olup MDA-MB-231 hücre hattında herhangi bir etki göstermemiştir (Şekil 4.11).



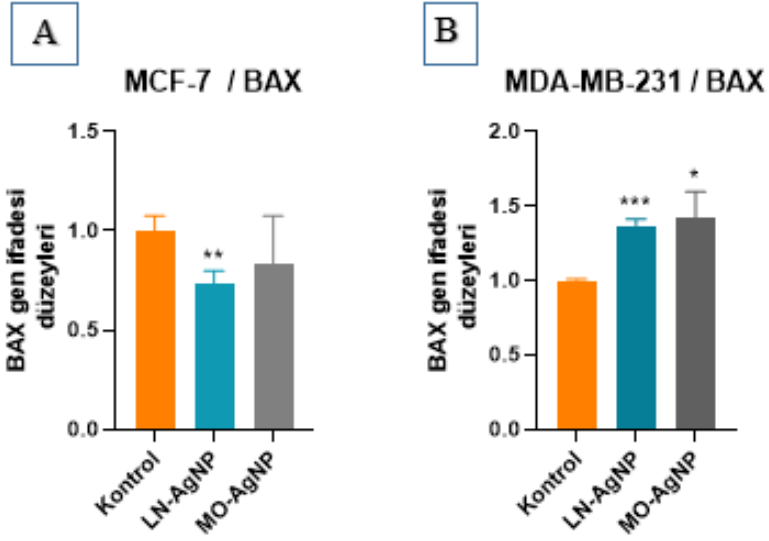
Şekil 4.11 (A) MCF-7 hücre hattında *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele hücrelerin kontrol grubuna göre Bcl-2 geni ifadeleri (B) MDA-MB-231 hücre hattında *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele hücrelerin kontrol grubuna göre Bcl-2 geni ifadeleri

Bax, Bcl-2 ile heterodimer oluşturarak mitokondriyal voltaja bağlı anyon kanalının açılmasını sağlar. Böylece apoptotik bir aktivatör olarak Bax, membran potansiyelini bozar ve sitokrom c'nin salınmasına neden olur (Vadde ve ark., 2015). Bax, hücrel stresine cevap olarak mitokondri dışı membran geçirgenliğini artırarak hücre ölümünü destekler. Bcl-2 ise Bax aktivitesini baskılayarak apoptozu önler. Yapılan çalışmalarda hücrelerin hayatta kalması ile artmış Bax ekspresyonu arasında bir bağlantı olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda ise Bax ve Bcl-2 ifadelerinin sırasıyla aşağı regülasyonu ve yukarı regülasyonu hücrelerin sağ kalımını olumlu yönde etkilemiştir (Khodapasand ve ark., 2015).

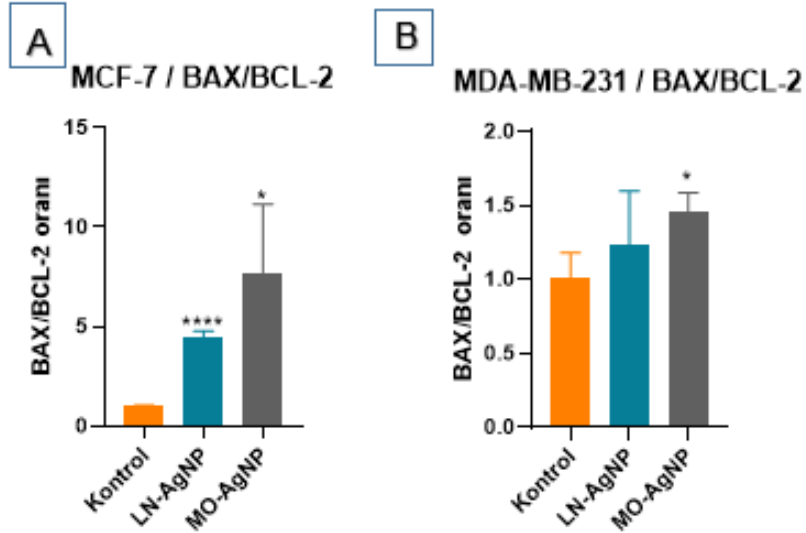
Delalat ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptıkları çalışmada *Onopordum acanthium* L. ekstraktından (AgNPs-OAL) sentezlenen AgNP'lerin antikanser aktivitesi araştırılmıştır. CAD ve pro-apoptotik Bax genlerinin ekspresyonu, AgNPs-OAL ile muamele edilmiş MDA-MB231 hücrelerinde sırasıyla 4.04 kat ve 1.38 kat arttığı

gösterilmiştir. Çalışmada, AgNPs-OAL'ye muamele edilen MDA-MB231 hücrelerinin hücresel DNA'sı, PI ile boyanmış olup, ardından DNA içeriği, akış sitometri tahlili yoluyla test edilmiştir. Burada, apoptotik hücre popülasyonu alt G1 fazında AgNPs-OAL'ye maruz kalan hücrelerin oranı, MDA-MB231 hücrelerinde %7.04'ten %12.58'e çıkarılmıştır. Annexin V/PI boyama ve hücre döngüsü sonuçlarının karşılaştırılması, MDA-MB231 hücrelerinin AgNPs-OAL ile maruz kalmasının, alt G1 fazının inhibisyonuna ve erken ve geç fazı artırarak apoptozun yukarı regülasyonuna neden olduğunu göstermiştir (Delalat ve ark., 2021).

Behboodi ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları çalışmada *Cichorium intybus* ekstraktından sentezlenen AgNP'lerin MCF-7 hücrelerinde antikanser etkileri araştırılmıştır. AgNP'lerin MCF-7 hücrelerine karşı önemli apoptoz aktiviteleri olduğunu belirtilmiştir. MCF7 hücrelerinin hücre döngüsü dağılımının akış sitometrik analizleri, AgNP tedavisinin, apoptoz yolunun bir göstergesi olan alt G1 tepe noktalarını arttırdığını gösterilmiştir. Bunun dışında son çalışmalar yeşil sentezlenmiş AgNP'lerin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesiyle hücre büyümesini tetikleyebileceğini göstermiştir. ROS üretimi, gen ekspresyonundaki değişiklik, DNA hasarı, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve apoptoz sinyal transdüksiyon yolağının teşviki gibi hücrelerdeki farklı süreçleri etkileyebileceği belirtilmiştir. Ayrıca Aceituno ve arkadaşlarının *Dendropanax morbifera* Léveille bitkisi ile sentezlenmiş AgNP'lerin A549 ve HepG2 kanser hücre hatlarında hücre proliferasyonunu azalttığı ve ROS üretimini arttırdığını, ROS oluşumunun p38 MAPK yolunun modifikasyonu ile ilgili olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca AgNP'lerin Bax ifadesini arttırdığını, Bcl-2 gen ekspresyonlarını ise azalttığını ve apoptotik A549 hücrelerinin yüzdesini arttırdığını bildirmişlerdir (Behboodi ve ark, 2018). Çalışmamızda elde edilen Bax geni ifadelerinin grafikleri Şekil 4.12'de verilmiştir. MCF-7 hücrelerinde Bax seviyesini, LN-AgNP'lerin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttığı, MDA-MB-231 hücrelerinde ise LN-AgNP ve MO-AgNP'lerin arttırdığı görülmektedir.



Şekil 4.12 (A) MCF-7 hücre hattında *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele hücrelerin kontrol grubuna göre Bax geni ifadeleri (B) MDA-MB-231 hücre hattında *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele hücrelerin kontrol grubuna göre Bax geni ifadeleri



Şekil 4.13 (A) MCF-7 hücre hattında *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele hücrelerin kontrol grubuna göre Bax/BCL-2 oranı (B) MDA-MB-231 hücre hattında *Lepista nuda* ve *Marasmius oreades* mantarları aracılığıyla sentezlenmiş gümüş nanopartiküllerle muamele hücrelerin kontrol grubuna göre Bax/BCL-2 oranı

Zheng ve arkadaşları, 2023 yılında yaptıkları çalışmada yumurtalık granüloza hücrelerinde silika nanopartiküllerin neden olduğu otofaji ve apoptoz arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Bu çalışmada silika nanopartiküllerin Bax/Bcl-2 oranını arttırdığını ve Kaspaz-3 seviyesini bölerek mitokondri aracılı kaspaz bağımlı apoptotik sinyal yolunun aktivasyonuna neden olduğunu bildirmişlerdir (Zheng ve ark., 2023).

Moradipour ve arkadaşları 2022 yılında yaptıkları çalışmada diyet flavonoid karvakrolun, p53/Bax/Bcl-2 eksenini yoluyla MCF-7 hücrelerinde apoptozu tetikleyebileceğini göstermiştir. Bu çalışmada Bax ve p53 ifadesinde artış olurken Bcl-2 seviyesinde azalma olduğu bildirilmiş ve bunun hücre canlılığında azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir.

p53 proteini tümör baskılayıcı etkisi ile apoptozu düzenleyen bileşenlerden biridir. p53 ifadesinde eksiklik tümör oluşumuyla ilişkilidir. p53'ün insan kanserlerinin %50'den fazlasında mutasyona uğradığı ve meme kanseri apoptoz mekanizmasında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Bu nedenle meme kanseri tedavisinde p53 protein miktarını arttırmak uygun bir yöntem olabilir. Bu artış, özellikle Bcl-2 ve Bax proteinlerini içeren apoptozu destekleyebilir. Bax proteini, bir p53 hedefidir. Bu protein, sitokrom c'nin mitokondriden sitozole salınmasını artırır ve Kaspaz-3'ü aktive eder. Bcl-2 gibi anti-apoptotik üyeler ise p53 tarafından transkripsiyonel olarak baskılanır ve mitokondri bütünlüğünü korur. Bax aşırı ekspresyonunun apoptozu tetiklediği bildirilmiştir. Böylece Bax/Bcl-2 oranının büyüklüğü, apoptoza uğramış hücreler için önemli bir faktör olabileceği bildirilmiştir (Moradipour ve ark., 2022).

Çalışmamızda elde edilen Bax/Bcl-2 oranı Şekil 4.13'de gösterilmiştir. Çalışmamızda MO-AgNP'lerin hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde kontrol grubuna göre Bax/Bcl-2 oranında artışa neden olduğu görülmüştür ($P < 0.05$). LN-AgNP'ler ise MCF-7 hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranını istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırırken ($P < 0.001$), MDA-MB-231 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır ($P = 0.3983$). Kontrol grubuna göre Bax/Bcl-2 oranında artış gözlemlenmesi, apoptozun kaspaz bağımlı mitokondri aracılı sinyal yolunu aktive ederek apoptoza yol açmış olabilir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda iki farklı mantar türü olan *L. nuda* ve *M. oreades* mantarlarının ekstraktlarını kullanarak gümüş nanopartikülleri yeşil sentez yöntemi de denilen biyolojik yöntem ile sentezleyerek antikanser aktivitelerini inceledik. Bu çalışmada mantar örneği kullanmamızın temel sebebi çevre dostu olmayan, maliyeti yüksek ve toksisitesi fazla olan kimyasallar yerine doğada bol miktarda bulunan, çevre dostu, düşük toksisiteye sahip biyolojik kaynakları tercih etmektir. Ayrıca mantarların sahip olduğu ikincil metabolitlerin metal indirgeme yeteneğinden yararlanılmıştır.

Çalışmamızda AgNP'lerin, MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hatlarındaki sitotoksik etkinliği belirlendikten sonra qRT-PCR analizi ile Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-9 genlerinin ifadelerine bakıldı. Bu genler hücre döngüsü ile ilgili proteinler olması sebebi ile çalıştığımız kanser hücre hatlarının canlılığını kaybetmesinin hangi ölüm şekli ile gerçekleştiği hakkında bilgi edinmemizi sağlamıştır. Yaptığımız qRT-PCR analizi sonuçlarına göre apoptozun mitokondriyal yolağını başlatan Kaspaz-9 geni ifadesinde kontrol grubuna göre her iki hücre hattında da azalma görülmüştür. Bu sonuç hücrelerin ölümüne sebep olan mekanizmanın apoptozun mitokondriyal yolağı olmadığını göstermekle birlikte protein düzeyinde ifadesini öngöremediğimiz için hücrelerin kesinlikle mitokondriyal yolağı kullanmadığını söyleyemeyiz. Çalışmamızda Bax ve Bcl-2 gen ifadeleri de aynı şekilde hücrelerin mitokondriyal yolağı kullanmadığına işaret edecek şekilde ifadesi gerçekleşirken bu genlerin de protein düzeyinde ifade edilip edilmediğini bilmediğimiz için kesin bir ifade kullanmamız mümkün değildir. Son olarak Bax/Bcl-2 oranında kontrole göre artış gözlemlenmesi literatüre göre hücrelerin apoptoza yöneldiğini göstermektedir. Bu artış hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 insan meme kanseri hücre hattında MO-AgNP'ler aracılığıyla gerçekleşmiş olup LN-AgNP'ler sadece MCF-7 hücrelerinde artışa sebep olarak MDA-MB-231 hücre hattında anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır.

Bunlarla birlikte gümüş metalinin eski çağlardan beri antibakteriyel, antiseptik vb. olduğu bilinmektedir. Gümüş metalinin hücrede oksidatif strese neden olarak ROS birikimini tetiklediği ve hücrelerin DNA'sında yapısal bozulmalara sebep olduğu literatürde bildirilmiştir. Çalışmamızda hücreleri gümüş nanopartiküllerle muamele ederek 24 saat ve 48 saat süreli MTT canlılık testi sonucunda canlılıklarında azalma tespit ettik. Bu hücre

ölümüne sebep olan mekanizmanın gen düzeyinde ifadelerine bakarak yorumladık fakat ifade edilen genler her zaman protein düzeyinde ifade edilmediğinden, protein düzeyinde ifadelerinin nasıl olduğunu görmek adına daha fazla çalışmaya yer verilmesi gerekmektedir. Ayrıca yapmış olduğumuz çalışmalar in vitro çalışmalar olup in vivo çalışmalar yapılması ve AgNP'lerin kanser hücrelerine spesifik olup olmadığı ve sağlıklı hücreler üzerindeki etkileri de çalışılmalıdır.



6. KAYNAKLAR

- Abdelhafez,O.S., Shehata Ali,T.F.,2021. Fahim,J.R., Desoukey,S.Y., Ahmed,S., Behery,F.A., Kamel,M.S., Gulder,T.AM., Abdelmohsen,U.R.,2021. Anti-Inflammatory Potential of Green Synthesized Silver Nanoparticles of the Soft Coral *Nephthea* Sp. Supported by Metabolomics Analysis and Docking Studies. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 5345–5360.
- Acharya,D., Satapathy,S., Somu,P., Parida,U.K., Mishra,G., 2020.Apoptotic Effect and Anticancer Activity of Biosynthesized Silver Nanoparticles from Marine Algae *Chaetomorpha linum* Extract Against Human Colon Cancer Cell HCT-116. *Biological Trace Element Research*, 199, 1812–1822.
- Aktepe,N.,2021. Gümüş nano materyallerin sentezi, karakterizasyonu ve antimikrobiyal aktiviteleri. *DÜMF Mühendislik Dergisi* ,12 (2), 347-354.
- Akther ,T., Mathipi, V., Kumar,N.S., Davoodbasha,M.A., Srinivasan,H.,2019. Fungal-mediated synthesis of pharmaceutically active silver nanoparticles and anticancer property against A549 cells through apoptosis. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 13649–13657.
- Akther,T., Mathipi,V., Kumar,N.S., Davoodbasha, M.A., Srinivasan,H.,2019. Fungal-mediated synthesis of pharmaceutically active silver nanoparticles and anticancer property against A549 cells through apoptosis. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 13649–13657.
- Alexis, F., Rhee, J.W., Richie, J.P., Radovic-Moreno, A.F., Langer, R., Farokhzad, O.C., 2008. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, (26), 74 – 85.
- Alkhulaifi,M.M., Alshehri,J.H., Alwehaibi,M.A., Awad,M.A., Al-Enazi,N.A., Aldosari,N.S., Hatamleh,A.A., Abdel- Raouf,N., 2020. Green synthesis of silver nanoparticles using Citrus limon peels and evaluation of their antibacterial and cytotoxic properties. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, 3434–3441.
- Al-Otibi,F., Al-Ahaidib,R.A., Alharbi,R.I., Al-Otaibi,R.M., Albasher,G.,2020.Antimicrobial Potential of Biosynthesized Silver Nanoparticles by *Aaronsohnia factorovskiy* Extract. *Molecules*, 26, 130.
- Ashraf,H., Anjum,T., Riaz,S., Naseem,S.,2020.Microwave-Assisted Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using *Melia azedarach* for the Management of *Fusarium* Wilt in Tomato. *Frontiers in Microbiology*, 11, 238.
- Atabay,A., Gül,Ü.D., 2021.Investigation of antimicrobial and antioxidant activities of fungi in terms of health biotechnology. *Acta Biologica Turcica*, 34 (1), 22-30.
- Ateş, M., Demir,V., İmamoğlu,H.,2013. Nanoparçacıkların Özellikleri ve Akuatik Çevreye Etkisi. *Ziraat Mühendisliği*, (360).
- Ateş, M.,2018. Nanoparçacıkların Ölçme ve İnceleme Teknikleri.*Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 11 (1), 63-69.

- Baran,M.F.,2019. Prunus avium kiraz yaprağı özütü ile gümüş nanopartikül (AgNP) sentezi ve antimikrobiyal etkisinin incelenmesi. DÜMF Mühendislik Dergisi, 10 (1), 221-227.
- Behboodi,S., Baghbani-Arani,F., Abdalan,S., Shandiz, S.A.S., 2019. Green Engineered Biomolecule-Capped Silver Nanoparticles Fabricated from *Cichorium intybus* Extract: In Vitro Assessment on Apoptosis Properties Toward Human Breast Cancer (MCF-7) Cells. Biological Trace Element Research, (187), 392–402.
- Beykaya, M.,Çağlar, A.,2016. Bitkisel Özütler Kullanılarak Gümüş-Nanopartikül (AgNP) Sentezlenmesi ve Antimikrobiyal Etkinlikleri Üzerine Bir Araştırma. AKU J. Sci. Eng. 16, 631-641.
- Biçer,M.,2008. Bakır Nanopartiküllerinin Sentezi Ve Karakterizasyonu.Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Büken B., Üner,B., Çetinkaya,Ü., Çağdır,A.S., Kırangil Ş.B.,2001. Adli Tıp’da Taramalı Elektron Mikroskobu (Sem) Uygulamaları. Adli Tıp Bülteni, 6 (1), 23-31.
- Büyüksırt,T.,Kuleşan,H.,2014.Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi Ve Gıda Analizlerinde Kullanımı.Gıda, 39 (4), 235-241.
- Carneiro, B.A., El-Deiry, W.S., 2020. Targeting apoptosis in cancer therapy. Nature Reviews / Clinical Oncology, (17), 395-417.
- Ceylan,İ.,2021. Çeşitli Mantar Türlerinin Hct116 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi. Kastamonu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Choi,J.H., Kawagishi,H.,2019. Green Science and Technology. Boca Raton,. Park,E.Y., Saito,T., Kawagishi,H., Hara M.,Shizuoka, Japan, 15.
- Çiftçi H.,Çalışkan, Ç.,Öztürk, K., Yazıcı,B.,2021. Yeşil Yöntemle Sentezlenen Biyoaktif Nanopartiküller. Black Sea Journal of Engineering and Science, 4 (1), 29-42.
- Das,G., Shin,H.S., Kumar,A., Vishnuprasad,C.N., Patra,J.K.,2021Photo-mediated optimized synthesis of silver nanoparticles using the extracts of outer shell fibre of Cocos nucifera L. fruit and detection of its antioxidant, cytotoxicity and antibacterial potential. Saudi Journal of Biological Sciences, 28, 980–987.
- Delalat,R., Shandiz, S.A.S., Pakpour, B., 2021. Antineoplastic effectiveness of silver nanoparticles synthesized from *Onopordum acanthium* L. extract (AgNPs-OAL) toward MDA-MB231 breast cancer cells. Molecular Biology Reports (49), 1113–1120.
- Demircan,G.,Mater,Y.,2019. İki Farklı Meme Kanseri Hücre Hattında Floresan İşaretli Maackia Amurensis-Lektin-1 Ve Wheat Germ Aglutin’in Hücre Yüzey Glikan Profillerindeki Farklı Etkileri. İst Tıp Fak Derg. 82 (2), 89-95.
- Du,J., Guo,H.B., Li,Q., Forsythe,A., Chen,X.H., 2018.Yu,X.D., Genetic diversity of *Lepista nuda* (Agaricales, Basidiomycota) in Northeast China as indicated by SRAP and ISSR markers. Plos One, 13 (8).

- Elgamouz, A., Idriss, H., Nassab, C., Bihi, A., Bajou, K., Hasan, K., Haija, M. A., Patole, S. P., 2020. Green Synthesis, Characterization, Antimicrobial, Anti-Cancer, and Optimization of Colorimetric Sensing of Hydrogen Peroxide of Algae Extract Capped Silver Nanoparticles. *Nanomaterials*, 10 (9), 1861.
- Elhawary, S., EL-Hefnawy, H., Mokhtar, F. A., Sobeh, M., Mostafa, E., Osman, E., Raey, M. E., 2020. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extract of *Jasminum officinal* L. Leaves and Evaluation of Cytotoxic Activity Towards Bladder (5637) and Breast Cancer (MCF-7) Cell Lines. *International Journal of Nanomedicine*, 15.
- Esmeray, E., Özata, O., 2019. Nanopartiküllerin Çevre Mühendisliği Alanında Kullanımı ve Temel Laboratuvar Malzemeleri ile Gümüş Nanopartikül (AgNPs) Sentezi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (16), 521-527.
- Genç, S., Pehlivanoglu, S., Acar, Ç., Yeşilot, Ş., 2021. Vitis Vinifera Çekirdek Özüü Kullanılarak Altın Nanopartiküllerin Yeşil Sentezi Ve Kolon Kanseri (Ht-29) Hücrelerinde Antikanser Özelliklerinin Değerlendirilmesi. *SDÜ Tıp Fak.Derg.*, 28 (3), 455-464.
- Güleş, Ö., Eren, Ü., 2008. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2), 73-78.
- Hasan, S., 2015. A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. *Research Journal of Recent Sciences*, (4), 1-3.
- Henríquez, L. C., Aguilar, K. A., Álvarez, J. U., Fernández, L. V., Vásquez, G. M. O., Baudrit, J. R. V., 2020. Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles from Plant Extracts and Their Possible Applications as Antimicrobial Agents in the Agricultural Area. *Nanomaterials*, 10, 1763.
- Hiltunen, M., Ament-Velasquez, S. L., Johannesson, H., 2021. The Assembled and Annotated Genome of the Fairy-Ring Fungus *Marasmius oreades*. *Genome Biol. Evol.*, 13 (7).
- Kambale, E. K., Nkanga, C. I., Mutonkole, B. P. I., Bapolisi, A. M., Tassa, D. O., Liesse, J. M. I., Krause, R. W. M., Memvanga, P. B., 2020. Green synthesis of antimicrobial silver nanoparticles using aqueous leaf extracts from three Congolese plant species (*Brillantaisia patula*, *Crossopteryx febrifuga* and *Senna siamea*). *Heliyon*, 6, 8.
- Karuppaiah, A., Siram, K., Selvaraj, D., Ramasamy, M., Babu, D., Sankara, V., 2020. Synergistic and enhanced anticancer effect of a facile surface modified non cytotoxic silver nanoparticle conjugated with gemcitabine in metastatic breast cancer cells. *Materials Today Communications*, 23, 100884.
- Khodapasand, E., Jafarzadeh, N., Farrokhi, F., Kamalidehghan, B., Houshmand, M., 2015. Is Bax/Bcl-2 Ratio Considered as a Prognostic Marker with Age and Tumor Location in Colorectal Cancer. *Iranian Biomedical Journal*, 19 (2), 69-75.
- Kütük, N., Çetinkaya, S., 2019. Yeşil sentez ile nanomalzeme üretiminin incelenmesi ve kullanım alanları.

- Lakkim,V., Reddy,M.C., Pallavali,R.R., Reddy,K.R Reddy,C.V., Inamuddin, Bilgrami,A.L., Lomada,D.,2020.Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Evaluation of Their Antibacterial Activity against Multidrug-Resistant Bacteria and Wound Healing Efficacy Using a Murine Model.Antibiotics, 9, 902.
- Li,Z., Ma,W., Ali,I., Zhao,H. e Wang,D., Qiu., 2020.Green and Facile Synthesis and Antioxidant and Antibacterial Evaluation of Dietary Myricetin-Mediated Silver Nanoparticles. ACS Omega, 5 (50), 32632-32640.
- Mahiuddin, Md., Saha,P., Ochiai.,B.,2020. Green Synthesis and Catalytic Activity of Silver Nanoparticles Based on Piper chaba Stem Extracts. Nanomaterials, 10, 1777.
- Maity, P., Sen,I.K., Chakraborty I., Mondal,S., Bar,H., Bhanja,S.K., Mandal,S., Maity G.N.,2021. Biologically active polysaccharide from edible mushrooms: A review. International Journal of Biological Macromolecules, 172, 408–417.
- Marslin,G., Siram, K., Maqbool, Q., Selvakesavan, R.,K., Kruszka, D, Kachlicki, P., Franklin, G.,2018. Secondary Metabolites in the Green Synthesis of Metallic Nanoparticles. Materials, 11, 940.
- Martinou, J.C., Youle, R.J., 2011. Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. Developmental Cell, 21.
- Moradipour, A., Dariusnejad, H., Ahmedizade, C., Laşgaryan, H.İ., 2022. Dietary flavonoid carvacrol triggers the apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells via the p53/Bax/Bcl-2 axis. Medical Oncology, 40 (46)
- Ormanoğlu,N., Emekci,M., Ferizli, A.G.,2021. Böceklerle Mücadelede Nanoteknoloji. 35 (1), 181-202.
- Oylar,Ö., Tekin,İ.,2011. Kanserin teşhis ve tedavisinde nanoteknolojinin önemi. Uludağ Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi, 16 (1).
- Özdağ,M.,2018.Sıvı Kültürde *Lepista nuda* Tarafından Miselyal Biyokütle ve Ekzopolisakkarit Üretimi İçin Karbon ve Azot Kaynaklarının Belirlenmesi. Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 6 (5), 581-585.
- Öztürk, C., Atila F.,2021. Mantarların Biyolojik Aktiviteleri İle İlgili İn Vitro, İn Vivo Ve Klinik Değerlendirmeler. Ankara Ecz. Fak. Dergisi, 45 (2), 344-378.
- Öztürk,Yılmaz, B., Öztürk,D., 2020. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticle using *Tilia rubra* DC. extract and antifungal activity. Biological Diversity and Conservation, 13(3), 244-251.
- Phytochemicals and Biogenic Metallic Nanoparticles as Anticancer Agents. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 15 page.
- Raghava, S., Mbae, K.M., Umesha,S.,2021. Green synthesis of silver nanoparticles by *Rivina humilis* leaf extract to tackle growth of *Brucella* species and other perilous pathogens. Saudi Journal of Biological Sciences, 28, 495–503.
- Rai.,M., Yadav, A., Gade, A.,2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances, 27, 76–83.

- Rao,P.V., Nallappan,D. Madhavi,K., Rahman,S.,3 Wei,L.J., Gan,S.H., 2016.
- Razaq,A., Ilyas,S., Khalid,A.N.,2013.Molecular Identification Of *Marasmius Oreades* - An Edible Mushroom From Pakistan Based On Its-rDNA Sequence Data. Pak. J. Agri. Sci., 50 (3), 415-419.
- Rosman, N. S. R., Harun, N.A., Idris, I., Ismail, W.I.W.,2021. Eco-friendly silver nanoparticles (AgNPs) fabricated by green synthesis using the crude extract of marine polychaete, *Marphysa moribidii*: biosynthesis, characterisation, and antibacterial applications. Heliyon, 6.
- Selvarathinam, K., Subramani, P., Thekkumalai, M., Vilwanathan, R., Selvarajan, R., Abia, A. L. K., 2023. Wnt Signaling Pathway Collapse upon β -Catenin Destruction by a Novel Antimicrobial Peptide SKACP003: Unveiling the Molecular Mechanism and Genetic Activities Using Breast Cancer Cell Lines. Molecules, 28, (930).
- Sevindik,M.,Bal,C.,Baba,H.,Akgül,H.,2019. Yenilebilir Mantar *Lepista nuda*'nın Tıbbi Özellikleri. Uluslararası Gıda, Tarım Ve Hayvancılık Kongresi,Gaziantep,
- Shalini,S., Dorstyn,L.,Dawara,S., Kumar,S.,2015. Old, new and emerging functions of caspases. Cell Death and Differentiation, 22, 526–539.
- Sharifi-Rad,M., Pohl, P., Epifano,F., Álvarez-Suarez, J.M., 2020. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Astragalus tribuloides* Delile. Root Extract: Characterization, Antioxidant, Antibacterial, and Anti-Inflammatory Activities. Nanomaterials, 10, 2383.
- Sharma,H.,. Mishra, P., K., Talegaonkar,S., Vaidya, B.,2015. Metal nanoparticles: a theranostic nanotool against cancer. Drug Discovery Today, 20 (9).
- Smith, M.C., Crist,R.M., Clogston J.D., McNeil,S.E.,2017.Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 409, 5779–5787.
- Solakoğlu, Z., 2009. Apoptozun varlığı ya da yokluğu hastalık nedeni. Klinik gelişim.
- Şahin,B., Demir,E., Aygün,A., Gündüz,H., Şen,F.,2017. Investigation of the effect of pomegranate extract and monodisperse silver nanoparticle combination on MCF-7 cell line. Journal of Biotechnology, 260, 79-83.
- 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, 10084.
- Terim, Kapakin, K.A., 2006. Scanning- Elektron Mikroskobu. YYÜ Vet Fak Dergisi, 17 (1-2), 55-58.
- Terim, Kapakin, K.A., 2007.Transmission Elektron Mikroskobu. YYÜ Vet Fak Dergisi, 18 (1), 105-110.
- Thakkar, K. N., Mhatre S. S., Parikh, R.Y.,2010. Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, 257–262.

- Tokur,O., Aksoy,A., 2017.İn Vitro Sitotoksisite Testleri. Harran Üniv Vet Fak Derg, 6 (1), 112-118.
- Turgut, B., Demir,T., Celiker, Ü., 2006. Oftalmolojide Apopitoz. Frat Tıp Dergisi, 11 (1), 006-011.
- Tüylek,Z.,2021. Nano-medicine and The New Treatment Methods. Eurasian Journal Of Health Sciences, 4 (2), 121-131.
- Tüylek,Z.,2021. Reflections to our Lives in Nanotechnology Applications. Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences, 4 (2), 69-79.
- Ulukaya, E., Acilan, C., Yılmaz, Y., 2011. Apoptosis: why and how does it occur in biology?. Cell Biochemistry And Function, 29, 468-480.
- Uyanıkgil,E.Ö, Salmanoğlu,D.,2020. Metalik nanopartiküllerin hedeflendirilmesi, Ege Tıp Dergisi, 59 (1), 71-81.
- Vadde, R., Radhakrishnan,S., Reddivari, L., Vanamala, J. K. P., 2015. Triphala Extract Suppresses Proliferation and Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Stem Cells via Suppressing c-Myc/Cyclin D1 and Elevation of Bax/Bcl-2 Ratio. BioMed Research International. (2015).
- Viana, R.L.S., Fidelis, G.P., Medeiros, M.J.C., Morgano,M.A., Alves, M.G.C.F., Passero,L.F.D., Pontes,D.L., Theodoro,R.C., Arantes,T.D., Sabry, D.A., Sassaki, G.L., Melo-Silveira, R.F., Rocha, H.A.O., 2020. Green Synthesis of Antileishmanial and Antifungal Silver Nanoparticles Using Corn Cob Xylan as a Reducing and Stabilizing Agent. Biomolecules, 10, 1235.
- Vijayakumar,S.,Malaikozhundan,B.,Saravanakumar,K.,DuránLara,EF.,Wang,M.H.Vase eharn,B.,2019.Garlic clove extract assisted silver nanoparticle Antibacterial, antibiofilm, antihelminthic, anti-inflammatory, anticancer and ecotoxicity assessment. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 198, 111558.
- Wasser,S.P.,2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol, 60, 258–274.
- Yeşilbaş, Y.,2015. Küre Dağları Milli Parkı’nın Bartın İli Sınırlarında Kalan Bölümünün Makrofungus Florası.Yüksek Lisans Tezi, Bartın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Zheng, Z., Zuo, W., Ye, R., Grunberger, J.W., Khurana, N., Xu, X., Ghandehari,H., Chen, F., 2023. Silica Nanoparticles Promote Apoptosis in Ovarian Granulosa Cells via Autophagy Dysfunction. Int. J. Mol. Sci., 24 (6), 5189.