



***Mentha pulegium* L. EKSTRAKTLARI KULLANILARAK
ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLÜNÜN YEŞİL SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU ve BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Edanur YENİYOL

Danışman

Doç. Dr. Dilek AKYIL

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

Temmuz 2023

Bu tez çalışması 22.FEN.BİL.14 numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Mentha pulegium* L. EKSTRAKTLARI KULLANILARAK ÇİNKO
OKSİT NANOPARTİKÜLÜNÜN YEŞİL SENTEZİ,
KARAKTERİZASYONU ve BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ**

Edanur YENİYOL

Danışman

Doç. Dr. Dilek AKYIL

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Temmuz 2023

TEZ ONAY SAYFASI

Edanur YENİYOL tarafından hazırlanan “*Mentha pulegium* L. Ekstraktları Kullanılarak Çinko Oksit Nanopartikülünün Yeşil Sentezi, Karakterizasyonu ve Biyolojik Aktiviteleri” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 07 / 07 / 2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Dilek AKYIL

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

Üye : Doç. Dr. Dilek AKYIL
Afyon Kocatepe Üniversitesi,
Fen Edebiyat Fakültesi

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

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun

..... /..... /..... tarih ve

..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. İbrahim EROL

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI
Afyon Kocatepe Üniversitesi

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

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

beyan ederim.

07 / 07 / 2023

İmza

Edanur YENİYOL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Mentha pulegium L. EKSTRAKTARI KULLANILARAK ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLÜNÜN YEŞİL SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU ve BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Edanur YENİYOL

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Dilek AKYIL

Lamiaceae familyasında yer alan *Mentha pulegium* L. bitkisi günlük hayatta yaygın olarak geleneksel tıpta ve beslenmede kullanılmaktadır. Bu sebeplerden yola çıkarak toksik etkilerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Bitkilerin kullanım alanlarındaki çeşitlilik, bitkinin mevcut aktivitelerinin artırılabilceğini göstermektedir. Bu çalışmada *Mentha pulegium* L. ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yoluyla çinko oksit nanopartikülleri (ZnO) sentezlendi. ZnO nanopartiküllerinin karakterizasyonu için Görünür Bölge Spektrofotometresi (UV-Vis), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR), X-Işını Difraksiyonu (XRD) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizleri yapıldı. ZnO nanopartiküllerinin UV-Vis maksimum absorpsiyon değeri 385 nm olarak tespit edildi. FT-IR analizinde ZnO nanopartikülleri 464 cm^{-1} değerinde pik gösterdi. XRD analizinde elde edilen sonuçlarda nanopartiküllerin 28.16 nm boyutunda olduğu belirlendi ve JCPDS (36-1451) modeline uyumlu bulundu. SEM analizindeki verilerde küresel ve altıgen şekle sahip olduğu görüldü. *Mentha pulegium* L. ekstraktı ve ZnO nanopartikülleri, A549 hücrelerine uygulanarak sitotoksik ve genotoksik etkileri 24 ve 48 saatlik uygulamalar yapılarak tespit edildi. MTT yöntemi ile belirlenen sitotoksikite sonuçlarında LD_{50} değeri 5 mg/mL olarak saptandı. Komet yöntemi ile belirlenen genotoksikite sonuçlarında ise en yüksek DNA hasarı 3.75 mg/mL konsantrasyonunda görüldü. ZnO nanopartiküllerinin antimikrobiyal aktivitesi belirlenirken *Escherichia coli* (ATTC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATTC 29213), *Candida albicans* (ATTC 90028), *Klebsiella pneumoniae* (ATTC 700603) ve *Salmonella enteritidis* (ATTC 13076) mikroorganizma suşları üzerinde disk difüzyon testi kullanıldı.

İnhibisyon değerlerinde en düşük konsantrasyonda *S. aureus* (12.5 mg/mL) ve en yüksek konsantrasyonda *C. albicans* (30 mg/mL)'a etki gösterdiği belirlendi. Disk difüzyon testinde 15.6-500 mg/mL konsantrasyonları aralığında doz uygulaması yapıldı ve tüm konsantrasyonlarda inhibisyon zonu oluştuğu görüldü.

Elde edilen sonuçlar, *M. pulegium* L. ekstraktları ve sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin antibakteriyel ve antifungal etkileri ve farklı kanser tiplerine karşı alternatif tedavi geliştirilmesinde etkili olabileceğini göstermektedir.

2023, xiii + 85 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal aktivite, Çinko oksit nanopartikülü, *Mentha pulegium* L., Sitotoksosite ve genotoksosite, Yeşil sentez.

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

GREEN SYNTHESIS, CHARACTERIZATION and BIOLOGICAL ACTIVITIES of ZINC OXIDE NANOPARTICLE USING *Mentha pulegium* L. EXTRACTS

Edanur YENİYOL

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dilek AKYIL

Mentha pulegium L. plant, which is in the Lamiaceae family, is widely used in traditional medicine and nutrition in daily life. In this study, zinc oxide nanoparticles (ZnO) were synthesized by green synthesis using *Mentha pulegium* L. extract. Visible Region Spectrophotometer (UV-Vis), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), X-Ray Diffraction (XRD) and Scanning Electron Microscopy (SEM) analyzes were performed for the characterization of ZnO nanoparticles. UV-Vis maximum absorbance value of ZnO nanoparticles was determined as 385 nm. In FT-IR analysis, ZnO nanoparticles showed a peak of 464 cm⁻¹. The results obtained in the XRD analysis determined that the nanoparticles were 28.16 nm in size and were found to be compatible with the JCPDS (36-1451) model. The data in the SEM analysis showed that it has a spherical and hexagonal shape. *Mentha pulegium* L. extract and ZnO nanoparticles were applied to A549 cells and their cytotoxic and genotoxic effects were determined by 24-hour and 48-hour applications. In the cytotoxicity results determined by the MTT method, the LD₅₀ value was 5 mg/mL. In the genotoxicity results determined by the comet method, the highest DNA damage was observed at the concentration of 3.75 mg/mL. The antimicrobial activity of ZnO nanopartiküllerinin were determined that on *Escherichia coli* (ATTC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATTC 29213), *Candida albicans* (ATTC 90028), *Klebsiella pneumoniae* (ATTC 700603) and *Salmonella enteritidis* (ATTC 13076) microorganism strains with disc diffusion test. It was determined that the lowest concentration of *S. aureus* (12.5 mg/mL) and the highest concentration of *C. albicans* (30 mg/mL) were effective on inhibition values. In the disk diffusion test, doses were applied

in the range of 15.6-500 mg/mL concentrations and inhibition zones were observed at all concentrations.

The results show that *M. pulegium* L. extract and synthesized ZnO nanoparticles can be effective in the development of alternative treatments against antibacterial and antifungal effects and different types of cancer.

2023, xiii + 85 pages

Keywords: Antimicrobial activity, Zinc oxide nanoparticle, *Mentha pulegium* L., Cytotoxicity and genotoxicity, Green synthesis.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her koşulda yanımda olan, emek veren, desteğini esirgemeyen, sevgisiyle motive eden sevgili danışmanım Sayın Doç. Dr. Dilek AKYIL'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasında büyük katkıları olan, özgün fikirleri ile yol gösteren değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. İbrahim Hakkı CİĞERCİ'ye, Sayın Doç. Dr. Arzu ÖZKARA'ya, Sayın Doç. Dr. Hakan TERZİ'ye ve Sayın Arş. Gör. Saliha AYDIN'a, ayrıca birlikte çalıştığım ekip arkadaşlarıma yardımlarını esirgemedikleri için çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 22.FEN.BİL.14 nolu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın her anında yanımda olarak bana güç veren, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen babam Salih YENİYOL'a, annem Feza YENİYOL'a ve kardeşim Semih YENİYOL'a sonsuz teşekkür ederim.

Edanur YENİYOL
Afyonkarahisar 2023

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1 Lamiaceae Familyası	3
2.1.1 <i>Mentha</i> L. Cinsi Özellikleri.....	4
2.1.2 <i>Mentha pulegium</i> L. Türünün Taksonomisi.....	6
2.1.3 <i>Mentha pulegium</i> L. Bitkisinin Günlük Hayatta Kullanımı.....	6
2.2 Nanopartiküller	8
2.2.1 Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri	10
2.2.1.1 Yeşil Sentez Yöntemi ile Nanopartikül Sentezi	12
2.2.2 Çinko Oksit Nanopartiküllerin Kullanım Alanları.....	13
2.2.3 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	15
2.2.3.1 pH Ölçümü	16
2.2.3.2 Ultraviyole Görünür Işık Spektroskopisi (UV-Vis)	16
2.2.3.3 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FT-IR)	17
2.2.3.4 X Işını Kırınım Yöntemi (XRD)	17
2.2.3.5 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	18
2.3 Kanser	19
2.3.1 Akciğer Kanseri	22
2.3.2 Akciğer Karsinomu Hücreleri (A549)	25
2.4 Hücre Kültürü	25
2.4.1 MTT ile Sitotoksosite.....	27
2.4.2 Tek Hücre Jel Elektroforez Testi (Komet Testi, SCGE) ile Genotoksosite..	28
2.5 Antimikrobiyal Aktivite.....	30
2.5.1 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)	30

2.5.2 Disk Difüzyon Testi	31
3. MATERYAL ve METOT	33
3.1 Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	33
3.1.1 Kimyasallar	33
3.1.1 Cihazlar	34
3.2 <i>Mentha pulegium</i> L. Bitkisinin Temini ve Bitki Ekstraktının Hazırlanması.....	35
3.3 Çözeltilerin Hazırlanması	36
3.3.1 Çinko Asetat Çözeltisinin Hazırlanması	36
3.3.2 Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisinin Hazırlanması.....	36
3.4 Çinko Oksit Nanopartiküllerin Sentezlenmesi	37
3.5 Sentezlenen ZnO Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	38
3.5.1 pH Ölçümü	38
3.5.2 UV-Vis Spektrum Analizi.....	38
3.5.3 FT-IR Analizi	38
3.5.4 XRD Analizi	38
3.5.5 SEM Analizi.....	39
3.6 Hücre Kültürü	39
3.6.1 Malzemelerin Sterilizasyonu.....	39
3.6.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması	39
3.6.3 A549 Hücrelerinin Çözdürülmesi ve Ekilmesi	40
3.6.4 A549 Hücrelerinin Pasajlanması.....	40
3.6.5 Tripan Blue Boyama Yöntemi ile Hücre Sayımı	41
3.6.6 A549 Hücrelerinin Dondurularak Sıvı Azotta Saklanması.....	42
3.7 MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi.....	43
3.7.1 MTT'nin Hazırlanması.....	43
3.7.2 MTT Yöntemi ile <i>Mentha pulegium</i> L. Ekstraktı ve Çinko Oksit Nanopartikülünün LD ₅₀ Dozunun Belirlenmesi	43
3.8 Komet Yöntemi ile Genotoksitenin Belirlenmesi	45
3.9 Antimikrobiyal Aktivite.....	48
3.9.1 Kullanılacak Malzemelerin Sterilizasyonu	49
3.9.2 Besiyeri ve Çözelti Hazırlanması.....	49
3.9.2.1 Nutrient Broth Sıvı Besiyerinin Hazırlanması	49
3.9.2.2 Nutrient Agar Katı Besiyerinin Hazırlanması	49
3.9.2.3 Antibiyotik Çözeltisinin Hazırlanması.....	50

3.9.3 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Belirlenmesi	50
3.9.4 Disk Difüzyon Yöntemi	50
3.10 İstatistiksel Analiz.....	51
4. BULGULAR	52
4.1 ZnO Nanopartiküllerinin Sentezi.....	52
4.2 ZnO Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	52
4.2.1 pH Ölçümü Sonuçları.....	52
4.2.2 UV-Vis Analizi Sonuçları	52
4.2.3 FT-IR Analizi Sonuçları.....	53
4.2.4 XRD Analizi Sonuçları	53
4.2.5 SEM Analizi Sonuçları	54
4.3 Sitotoksisite Sonuçları	56
4.3.1 MTT Testi	56
4.4 Genotoksisite Sonuçları	58
4.4.1 Komet Testi.....	58
4.5 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	59
4.5.1 MİK Testi	59
4.5.2 Disk Difüzyon Testi	60
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	63
6. KAYNAKLAR.....	72

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
CO ₂	Karbondioksit
dH ₂ O	Distile su
mA	Miliamper
mL	Mililitre
mM	Milimolar
rpm	Dakikadaki devir sayısı
mg	Miligram
g	Gram
NaCl	Sodyum klorür
nm	Nanometre
LD ₅₀	%50 öldürücü doz
m	Metre
cm	Santimetre
kg	Kilogram
OH ⁻	Hidroksit
ZnO	Çinko oksit
Zn	Çinko
NaOH	Sodyum hidroksit
NaCl	Sodyum klorür
V	Volt
ppm	Milyonda bir
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
±	Artı ya da eksi
<	Küçüktür
>	Büyüktür
≥	Büyük eşittir
=	Eşittir

Kısaltmalar

A549	Akciğer kanser hücresi
DMEM	Dulbecco's Modifiye Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
FBS	Fetal bovine serum
LMA	Düşük erime noktalı agaroz
NP	Nanopartikül
ZnONP	Çinko oksit nanopartikülü
MPE	<i>Mentha pulegium</i> L. ekstraktı
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür

NMA	Normal erime noktalı agaroz
NB	Nutrient broth
PBS	Fosfat tamponlu salin
RNA	Ribonükleik asit
NA	Nutrient agar
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SP	Sisplatin (cis-diamindikloroplatinum(II))
UV	Ultraviyole
U-Vis	Görünür Bölge Spektrofotometresi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WVR	Pess membran filtre
XRD	X-Işını Kırınımı
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1 <i>Mentha pulegium</i> L. türünün ülkemiz sınırları üzerindeki yayılışı.....	7
Şekil 2.2 <i>Mentha pulegium</i> L.	7
Şekil 2.3 Organik yapılı nanopartiküller (A.Dendrimer, B.Lipozom, C.Misel, D.Ferritin)	9
Şekil 2.4 Karbon bazlı nanopartiküller (A. Fulleren, B. Karbon siyahı C.Karbon kuantum noktaları)	10
Şekil 2.5 Nanopartiküllerin sentezlenmesindeki yaklaşımlar (Khanna vd. 2019).	11
Şekil 2.6 Bitki ekstraktları kullanılarak yapılan yeşil sentez yönteminin aşamaları.....	13
Şekil 2.7 ZnO nanopartiküllerin kullanım alanlarına örnekler.....	14
Şekil 2.8 UV-Vis düzeneği ve bileşenleri.	17
Şekil 2.9 XRD tekniği ve bileşenleri.....	18
Şekil 2.10 SEM cihazının yapısı ve bileşenleri.....	19
Şekil 2.11 Kanser gelişiminde rol oynayan süreçler.	20
Şekil 2.12 MTT'nin kimyasal bileşimi.	27
Şekil 2.13 MTT basamakları.....	28
Şekil 2.14 Komet testinin basamakları.....	29
Şekil 2.15 Komet testinde normal ve DNA hasarı içeren iki hücreye ait floresan mikroskop görüntüleri.....	30
Şekil 2.16 MİK ve MBK değerlerinin analizi.	31
Şekil 2.17 Disk difüzyon testi ve inhibisyon zonunun çapının ölçümü.	32
Şekil 4.1 ZnO nanopartiküllerinin UV-Vis sonucu.....	52
Şekil 4.2 ZnO nanopartiküllerinin FT-IR sonucu	53
Şekil 4.3 ZnO nanopartiküllerinin XRD sonucu.....	54
Şekil 4.4 ZnO nanopartiküllerinin SEM sonucu.	55
Şekil 4.5 ZnO nanopartiküllerinin EDX sonucu.	56
Şekil 4.6 ZnO nanopartiküllerinin (ZnONP) MTT sonucu.....	57
Şekil 4.7 <i>M. pulegium</i> L. ekstraktının (MPE) MTT sonucu.....	57
Şekil 4.8 MİK sonuçları.	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Türkiye florasında bulunan <i>Mentha</i> L. taksonları.....	5
Çizelge 2.2 <i>Mentha pulegium</i> L. türünün biyokimyasal bileşenleri	8
Çizelge 2.3 Nanopartikül sentezinde kullanılan çeşitli yöntemler.....	12
Çizelge 2.4 Çeşitli bitki ürünleri kullanılarak sentezlenen ZnO nanopartiküller.....	15
Çizelge 2.5 Nanopartikül karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan yöntemler. ...	16
Çizelge 2.6 Akciğer kanserinin histolojik tipleri ve çeşitli klinik özellikleri Akciğer kanserinin histolojik tipleri ve çeşitli klinik özellikleri.....	23
Çizelge 2.7 Hücre kültürünün tarihsel gelişimi.....	26
Çizelge 3.1 0.1 M Çinko asetat çözeltisinin hazırlanması	36
Çizelge 3.2 1 M NaOH çözeltisinin hazırlanması	36
Çizelge 3.3 0.1 M NaOH çözeltisinin hazırlanması	36
Çizelge 3.4 Elektroforez tamponunun hazırlanması.	45
Çizelge 3.5 Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması.	46
Çizelge 3.6 Lizis çözeltisinin hazırlanması.....	46
Çizelge 3.7 NMA hazırlanması.....	46
Çizelge 3.8 LMA hazırlanması.	47
Çizelge 3.9 Etidyum bromür hazırlanması.....	47
Çizelge 3.10 Nutrient Broth sıvı besiyerinin hazırlanması.	49
Çizelge 3.11 Nutrient Agar katı besiyerinin hazırlanması	49
Çizelge 4.1 A549 hücrelerinde Komet yöntemi ile DNA hasarının belirlenmesi.....	58
Çizelge 4.2 ZnO nanopartiküllerinin disk difüzyon testi inhibisyon zonlarının ölçüm sonuçları (mm).	61

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa
Resim 3.1 Bitki ekstraktının hazırlanması.	35
Resim 3.2 Çinko oksit nanopartiküllerin hazırlanması.	37
Resim 3.3 (a) A549 hücrelerinin flaska ekildiği andaki görüntüsü, (b) A549 hücrelerinin inkübasyon sonrası pasaja hazır haldeki görüntüsü.	41
Resim 3.4 ZnO nanopartikülü ve <i>M. pulegium</i> L. ekstraktı uygulanan A549 hücrelerinin MTT görüntüsü.	45
Resim 4.1 <i>M. pulegium</i> L. ekstraktının ve ZnO nanopartiküllerinin A549 hücre hattı üzerindeki etkilerinin Komet görüntüleri.	59
Resim 4.2 Farklı bakteri suşları üzerinde ZnO nanopartikülünün antimikrobiyal aktivitesinin görüntüleri.	62

1. GİRİŞ

Canlılar, yaşamın devamı için bitkiler ile doğrudan ya da dolaylı olarak ilişki içindedir. Bitkilerin olmadığı bir hayatın yeryüzünde devam etmesi mümkün değildir. İnsanlar çok eski dönemlerden beri beslenme, hastalıkların tedavisi, savunma, barınma gibi temel ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla bitkilerden yararlanmaktadırlar. Hastalık tedavisi amacıyla kullanılan bitkiler, tıbbi bitki olarak adlandırılmakta olup bitkilerin yaprak, meyve, kök gibi çeşitli kısımları farklı işlemlerden geçirilerek bazı hastalıklar tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Bu hastalıklar arasında soğuk algınlığı, baş ve diğer vücut bölgelerinde meydana gelen çeşitli ağrılar, yaralanmalar, kardiyovasküler sorunlar, infertilite ön sırada gelmektedir. Gelişmiş ülkelerde yaşayan insanların yaklaşık %80'i alternatif tıp uygulamalarına bağlılığını devam ettirmektedir (Abdala vd. 2012).

Günümüzde bilim ve teknoloji alanındaki ilerlemeler ile bitkilerden çeşitli yollarla nanopartikül elde edebilmek mümkün hale gelmiştir. Nanopartiküller, boyutları 1-100 nm arasında değişen yapılar olup üstün maddesel özellikler sergilemektedirler. Nanopartiküller sahip olduğu sıra dışı özellikler nedeniyle farklı birçok alanda kullanılmaktadır (Ensafi vd. 2010). Tıp, kozmetik, tekstil, gıda, elektronik ve uzay endüstrisi başta olmak üzere birçok alanda nanopartiküllerden yararlanılmaktadır. Nanoteknoloji alanında yapılan çalışmalardan elde edilen veriler nanopartiküllerin hem kanserli hücrelerin ortadan kaldırılmasında hem de mikroorganizma canlılığını sonlandırmada kullanılabilir olduğunu açıkça göstermektedir. Bu özellikleri sayesinde karsinogenezi önleme çalışmalarında ve bakteriyel enfeksiyonu ortadan kaldırma gibi tıbbi uygulamalarda nanopartiküller tercih sebebidir. Ayrıca ilaç sensörü geliştirme, doku mühendisliği çalışmaları, hastalıkların teşhisinde görüntüleme aşamaları, nörodejeneratif hastalıkların tanı ve tedavisi, bakteriyel ve viral enfeksiyonların sonlandırılması, gen terapisi gibi çok sayıda tıbbi uygulama için nanopartikül kullanım alanı gittikçe yaygınlaşmaktadır (Chandra vd. 2020).

Nanopartiküllerin elde edilmesinde fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikte çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Patil 2020). Yeşil sentez, tüm bu yöntemler içinde birçok özelliği nedeniyle oldukça tercih edilebilir bir yöntem çeşididir. Bitkilerin çeşitli kısımlarından elde edilen ekstraktların kullanılmasıyla nanopartikül üretiminin sağlandığı

yeşil sentez yöntemi, kolay ve hızlı olmasının yanı sıra sentez sırasında çevreye zarar vermeye neden olabilecek etkilerin oluşmaması gibi özelliklerinden dolayı çevre dostu bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Karnani ve Chowdhary 2013). Yeşil sentez yöntemiyle elde edilen nanopartiküllerin daha kararlı yapılar sergilediği bilinmektedir (Taiolor vd. 2020).

Hem ülkemizde hem de dünyada geniş yayılım gösteren *Mentha* cinsinin üyeleri, Lamiaceae familyasında yer almaktadır (Mahboubi ve Haghi 2008). Nane olarak da bilinen *Mentha* cinsinin çeşitli türleri gıda endüstrisi ve tıbbi açıdan oldukça önemli olup alternatif tıpta birçok komplikasyonun giderilmesi amacıyla insanlar tarafından günlük hayatta sıkça kullanılan bitki çeşitleri arasında yer almaktadır. Yarpuz ya da filiskin isimleriyle de bilinen *Mentha pulegium* L. bitkisi ülkemizde yaygın olarak bulunan bir *Mentha* türüdür (Eryiğit 2006). Diğer bir adı Pennyroyal olan bitki günümüzde hem gıda alanında hem de bronşit, tüberküloz, kolera, sinüzit, soğuk algınlığı, gıda zehirlenmeleri gibi hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Filiskin antienflamatuar, antibakteriyel, antifungal, antihelmintik ve spazmolitik özelliklere sahip olduğu için geniş bir kullanım alanına sahiptir (Piras vd. 2019, Sebai vd. 2021).

Bu tez çalışmasında, *Mentha pulegium* L. türünden hazırlanan ekstraktlar kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle çinko oksit nanopartikül (ZnONP) eldesi gerçekleştirilmiştir. Bu nanopartiküllerin karakterizasyonu için UV-Vis spektrofotometre, FT-IR, XRD ve SEM analiz yöntemlerinden yararlanılmıştır. Ayrıca yeşil sentez ile elde edilen ZnO nanopartiküllerin akciğer kanseri hücresi olan A549 hücre hattı ile sitotoksik ve genotoksik aktivite belirlemek amacıyla hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Diğer yandan ise antimikrobiyal aktivite belirlemek amacıyla *Escherichia coli* (ATTC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATTC 29213), *Candida albicans*(ATTC 90028), *Klebsiella pneumoniae* (ATTC 700603) ve *Salmonella enteritidis* (ATTC 13076) mikroorganizmaları kültüre edilerek disk difüzyon test yöntemi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçların karsinogenez ve mikrobiyal enfeksiyon süreçlerine karşı ZnO nanopartiküllerin terapötik olarak kullanılabilirliği açısından literatüre katkı sağlaması beklenmektedir.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Lamiaceae Familyası

Lamiaceae familyası, diğer adıyla Ballıbabagiller olarak da bilinir. Magnoliidae sınıfında yer alan çiçekli bitkileri içerir. Günümüzde yaklaşık olarak 245 cins içeren bu familyada 7000'den fazla tür çeşidi olduğu bilinmektedir. Bu türler arasında otsu ve çalı formlar yaygın olarak görülmektedir. Ayrıca yarı çalimsı, bodur, sarmaşık ve ağaç formlarında olan türler de bulunmaktadır. Bu familyanın üyeleri kutuplar dışında dünyanın hemen her yerinde geniş bir yayılım alanına sahiptir (Abdelhalim ve Hanrahan 2021).

Lamiaceae üyelerinde yapraklar basit ve bileşik yapılı olup karşılıklı ve çevresel şekilde diziliş gösterir. Gövde yapısı yaygın olarak dört köşelidir. Gövdelerde bulunan kollenkima demetleri bu familya için spesifiktir. Yumru ve kazık formunda köklere rastlanır. Hermafrodit ya da ginodioik olan çiçekler yaprak koltuklarında ve başaklarda yer alır ve kümelenmeler gösterir. Sepaller ve petaller beş adet olup bir ya da iki dudaklı yapı gösterirken üyelerin bazılarında bu dudaklar körelmiş durumdadır. Pistil sayısı bir adet olmakla birlikte dört loplulu, iki lokuslu ve karpelli yapıdaki üst konumlu ovaryum yapısı izlenir. Stamen sayısı iki ya da dört olup korollaya bağlı bir durumda ve didinam düzenindedir. Anter tekası bir ya da iki keseli bir yapılanma gösterir. Tohum taslakları ovaryum içerisinde eksensel ya da bazal yerleşim gösterir. Dört nukse ayrılan meyve yapısı bu familya için ayırt edici bir özelliktir (Davis 1982, Seçmen vd. 1995, Baytop 1999, Tanker vd. 2007, Temel vd. 2015).

Lamiaceae, ülkemizdeki en büyük üçüncü familya olmakla birlikte %44.5 oranında endemizm göstermektedir (Kahraman vd. 2009). Ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkeleri ile ayrıca Güney Amerika ve Güney Batı Asya bölgelerinde yoğun olarak bulunmaktadır. Lamiaceae familyası hem sağlık alanında hem de gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan çok sayıda ekonomik ve tıbbi açıdan önemli olan türleri içermektedir (Gökşen 2016, Ayaz 2021, Çatak ve Atalay 2022). Lamiaceae familyasının başta gelen gen merkezlerinden biri olan Türkiye'de bu familyaya ait yaklaşık 46 cins ile 844 türün yayılım gösterdiği bilinmektedir (İnt. Kyn. 1).

Bu familyada yer alan *Mentha* (Nane), *Salvia* (Adaçayı), *Thymus* (Kekik), *Sideritis* (Dağçayı) ve *Ajuga* (Mayasilotu) cinsleri ülkemizde geniş kullanım alanı olan türleri barındırmaktadır. Lamiaceae üyeleri çok çeşitte ve multifonksiyonel sekonder metabolitler içermektedir. Bu bitkilerin ürettiği farklı terpenoitler, steroidler, esansiyel lipitler ve flavonoidler tıbbi açıdan önemli olan antioksidan, antimikrobiyal, antifungal, antienflamatuar özellikte biyolojik aktiviteler gösterdiğinden bu bitkiler tüm dünyada yaygın olarak hem gıda hem de çeşitli hastalıkların tedavisi için geniş kullanım alanı bulmaktadır (Fecka ve Turek 2008).

Lamiaceae familyasındaki türlerin çoğu hem Türkiye hem de diğer dünya ülkeleri açısından tıbbi ve ticari önemi olan bitkilerdir. Lamiaceae familyasına ait birçok tür enflamasyon, kanser, regl sorunları, bakteriyel enfeksiyon, gastrointestinal sorunlar ve sıtma gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek amacıyla dünya genelinde yıllardır kullanılmaktadır (Kamatou vd. 2010).

2.1.1 *Mentha* L. Cinsi Özellikleri

Lamiaceae familyasının önemli cinslerinden biri olan *Mentha*, nane türlerini içeren bir takson olup çok yıllık, otsu, tüylü ve mor ya da morumsu çiçekli ve sürünücü gövdeli olan bitkileri içermektedir. *Mentha* cinsine ait türlerin en belirgin özelliklerinden biri hem taze hem de kurutulmuş formdaki yapraklarından ve yaprak sapından yayılan hoş kokularıdır. Bu özellikleri sayesinde dünya genelinde yemeklerden alınan lezzeti arttırmak amacıyla kullanılmaktadır (Başer 1997, Baytop 2007).

Türkiye başta olmak üzere Avustralya, Avrasya ve Güney Afrika bölgelerinde yaygın olmakla birlikte kutup bölgeleri hariç yeryüzünün hemen her bölgesinde yerleşim gösteren önemli bir istilacı taksondur. Ekolojik hoşgörüsü yüksek olan bu cinsin üyeleri değişik ortam koşullarında yaşayabilen ve hızlı yayılış gösteren bitkiler olup aynı zamanda melezleşme potansiyelinden dolayı tanımlanması zordur (Dorman vd. 2003, Kumar vd. 2011). *Mentha* türleri hem ekonomik hem de tıbbi açıdan oldukça değerlidir. Toprak üstü organlarında üretilen farklı esansiyel yağlar bakımından zengin olan nane türleri geleneksel tedavide yıllardır kullanılmaktadır. Esansiyel yağların içerikleri aynı

bitkinin farklı organlarında bile çeşitlilik göstermekte olup, bitkinin yaşadığı bölgeye ve bu bölgenin coğrafik özelliklerindeki farklılıklara bağlı olarak değişmektedir (Bayaz 2013). Dünya genelinde *Mentha* cinsine ait 61 tür tanımlanmış olup, bu cins Türkiye florasında 10 tür ile temsil edilmektedir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Türkiye florasında bulunan *Mentha* L. taksonları.

Takson adı	Türkçe adı
<i>Mentha aquatica</i>	Su nanesi
<i>Mentha arvensis</i>	Kır nanesi
<i>Mentha longifolia</i>	Pünk
<i>M. longifolia subsp. longifolia</i>	Pünk
<i>M. longifolia subsp. noeana</i>	İt nanesi
<i>M. longifolia subsp. typhoides</i>	Dere nanesi
<i>Mentha pulegium</i>	Yarpuz (Filiskin)
<i>Mentha spicata</i>	Eşek nanesi
<i>M. spicata subsp. condensata</i> (Briq.) Greuter & Burdet	Kıvırcık nane
<i>M. spicata subsp. spicata</i>	Eşek nanesi
<i>Mentha suaveolens</i>	Kaba nane
<i>Mentha x dumetorum</i>	Deli nane
<i>Mentha x piperite</i>	Nane
<i>Mentha x villosa-nervata</i>	Delikara
<i>Mentha x rotundifolia</i>	Marşama

Ülkemizde *Mentha longifolia* türünün üç, *Mentha spicata* türünün ise iki alt türü mevcuttur (Çizelge 2.1) (İnt. Kyn. 2). Sonuç olarak altısı hibrit olmak üzere Türkiye sınırları içinde toplamda *Mentha* cinsine ait 15 takson yayılış göstermektedir (Başer vd. 2012). *Mentha* türlerindeki bu çeşitlilik ve ayrıca melezleşme kapasitesi ve dünya üzerindeki geniş yayılış alanları dikkate alındığında bu bitkilerdeki farklı sekonder metabolitlerin varlığı, *Mentha* cinsinin üyelerinin tıbbi ve ekonomik açıdan önemini gözler önüne sermektedir. *Mentha* cinsine ait bitkiler, epidermal kısımlarda bulunan uçucu yağların ve çeşitli fenolik bileşiklerin, tanenlerin, terpenlerin, terpenoidlerin, kinonların, kumarinlerin, flavonoidlerin, alkaloidlerin, sterollerin ve saponinlerin kaynağıdır. Bu bileşenlerin antimikrobiyal, antifungal ve antienflamatuar aktiviteler

göstermesi nedeniyle, diğer aromatik bitkiler gibi *Mentha* türleri de tıbbi açıdan önem taşımaktadır (Fatiha vd. 2015). Türkiye florasında *Mentha pulegium* L., *Mentha piperita*, *Mentha longifolia*, *Mentha aquatica*, *Mentha arvensis* ve *Mentha suaveolens* türleri yaygın olarak bulunmaktadır (Güllüce vd. 2007).

2.1.2 *Mentha pulegium* L. Türünün Taksonomisi

Tıbbi ve aromatik bir bitki olan *Mentha pulegium* L. türü hem ekolojik hem de ekonomik açıdan değerli ve önemlidir. Ülkemizdeki yaygın *Mentha* türlerinden biri olan *Mentha pulegium* L. bitkisi çok yıllık ve otsu bir bitki olup Tracheophyta (damarlı bitkiler) şubesinde yer alır. Spermatophytina (tohumlu bitkiler) alt şubesinin Magnoliopsida (kapalı tohumlular) sınıfının bir üyesidir. *Mentha pulegium* L. türünün günlük hayatta kullanılan adı yarpuz (filiskin, pennyroyal) olup detaylı bilimsel taksonomisi aşağıda verilmiştir (İnt. Kyn. 3).

Kingdom: Plantae

Division: Tracheophyta

Subdivision: Spermatophytina

Class: Magnoliopsida

Suporder: Asteranae

Order: Lamiales

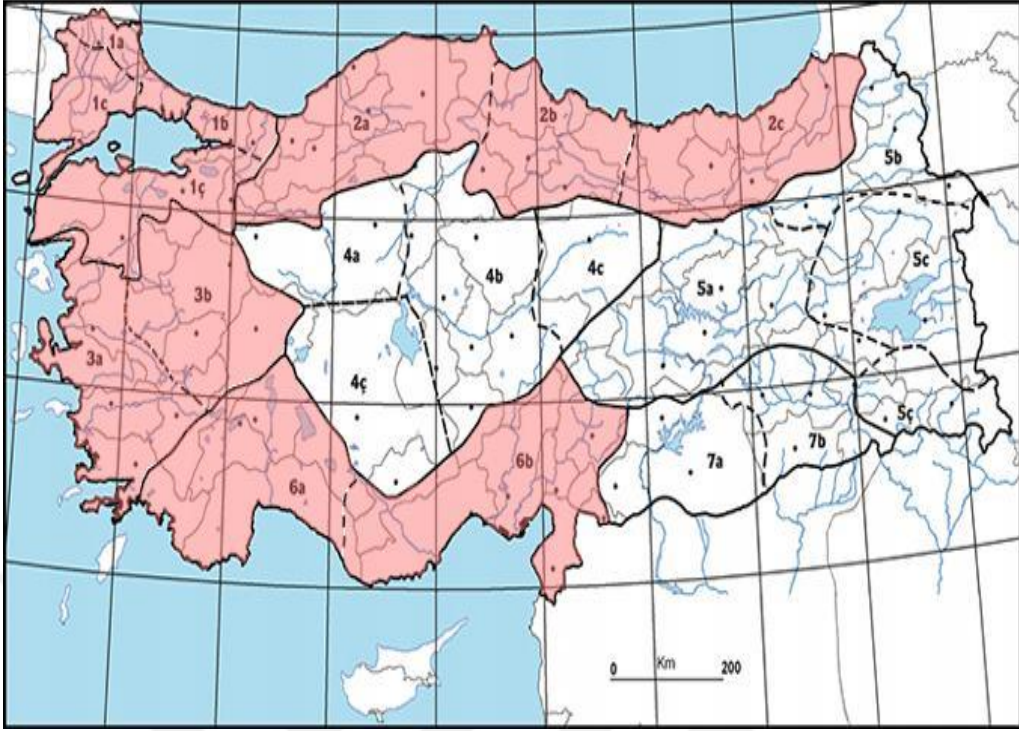
Family: Lamiaceae

Genus: *Mentha* L.

Species: *Mentha pulegium* L. (pennyroyal)

2.1.3 *Mentha pulegium* L. Bitkisinin Günlük Hayatta Kullanımı

Mentha cinsinin birçok türü uzun yıllardır bitki çayı, diyet bileşeni ve tıbbi bitki olarak kullanılmaktadır (Nickavar vd. 2008). Yarpuz bitkisi Çatalca, Istanca, Ergene, Güney Marmara, Batı ve Orta Karadeniz, Ege, İç Batı Anadolu, Antalya ve Adana bölgelerinde yayılış göstermektedir. *Mentha pulegium* L. türünün ülkemizdeki yerleşimi Şekil 2.1’de gösterilmiştir (İnt. Kyn. 4).



Şekil 2.1 *Mentha pulegium* L. türünün ülkemiz sınırları üzerindeki yayılışı (İnt. Kyn. 4).

Çok yıllık olan *Mentha pulegium* L. bitkisi oldukça keskin kokulu ve otsu formdadır. Gövde 10-30 cm uzunluğunda olup yapraklar 8-30 cm uzunluğunda ve 4-12 mm kalınlığındadır. Eliptik şekilli ve dar olan yapraklar tabanda daralır, kenarları hafif dişli olan yaprakların sapları ise kısadır. 0-1300 yükseklikte yerleşim gösteren bu bitki Haziran-Eylül döneminde çiçekli formu Şekil 2.2’de göstermektedir (İnt. Kyn. 5).



Şekil 2.2 *Mentha pulegium* L (İnt. Kyn. 5).

Mentha pulegium L. içerdği birçok biyoaktif madde sayesinde tıbbi olarak hastalıkların tedavisinde oldukça etkilidir. Bu bitkinin toprak üstü kısımlarının soğuk algınlığının tedavisi, akciğer enfeksiyonları, gıda zehirlenmeleri, kolera, sinüzit tedavisinde uzun yıllardır kullanıldığı bilinmektedir. Öksürüğü kesme, balgam ve idrar söktürme, adet gecikmesinde menstruasyonu tetikleme gibi etkileri yönüyle önemli bir *Mentha* türüdür. *Mentha pulegium* L. türünün biyokimyasal içeriği Çizelge 2.2’de verilmiştir (Mahboubi ve Haghi 2008).

Çizelge 2.2 *Mentha pulegium* L. türünün biyokimyasal bileşenleri

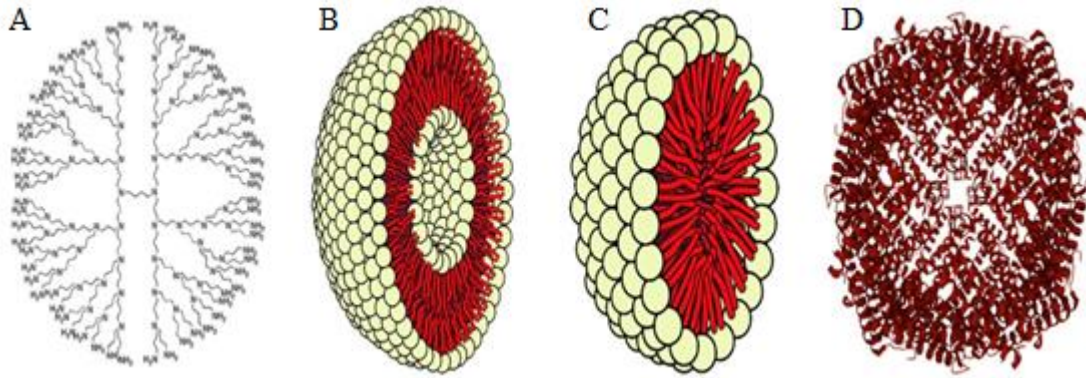
Bileşenler	Özellikleri
1,8 Cineole	Antibakteriyel, temizlik ürünleri
Menthone	Aromatik tatlandırıcı
Borneol	Aromatik tatlandırıcı ve parfümeri
Terpineol	Koku ve tatlandırıcı
m-Ethyl cumene	Antiseptik
Pulegone	Aromatik tatlandırıcı, antibakteriyel, insektisit
Carvol	Antioksidan, antiiskemik
Piperitone	İnsektisit
Bornyl acetate	Antiinflamatuvar, antibakteriyel
Piperitenone	Aromatik tatlandırıcı, gıda katkı maddesi
Piperitenone oxide	Aromatik tatlandırıcı
1-Phenyl - 1,4 butanediol	Endüstriyel çözücü
trans - Caryophyllene	Antiseptik, koku maddesi

2.2 Nanopartiküller

Multidisipliner bir bilim dalı olan nanoteknolojinin temelini oluşturan ve boyutları 1 ile 100 nm arasında değişen partiküllere nanopartikül adı verilir (Raveendran vd. 1970). Nanopartiküller, sahip oldukları eşsiz ve sıra dışı özellikler sayesinde insan ve çevre için oldukça önemli olan materyallerdir. İnsanların yaşam kalitesinin artırılması, çeşitli sağlık sorunlarının giderilmesi ve çevrenin sürdürülebilirliği açısından birçok kullanım alanı olan nanopartiküllerin üretimine olan ilgi günden güne artmaktadır. Nanopartiküllerin kullanılmasıyla tasarlanan nano ölçekteki çeşitli materyaller ise günümüzde bilim ve

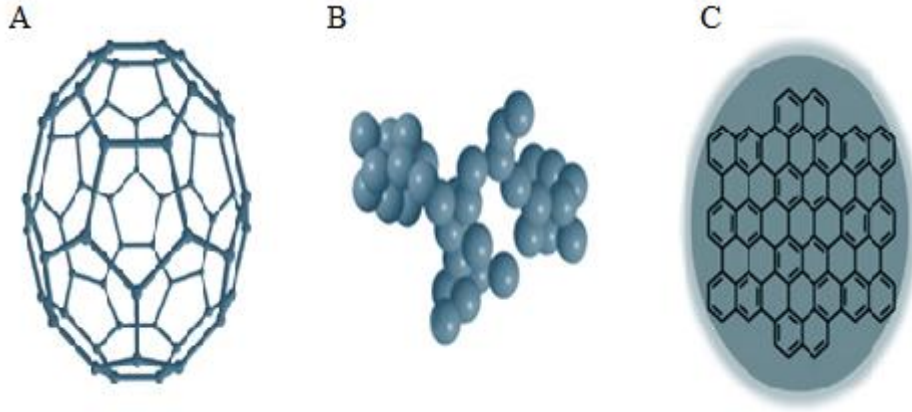
teknoloji başta olmak üzere birçok alanın ilgi odağıdır. Nanopartikül temelli materyaller sahip oldukları son derece küçük boyutları, yüksek yüzey alanları ve biyouyumluluk düzeyi yüksek kimyasal yapıları nedeniyle canlı ve hatta hücre içi kısımlarda aktivite gerektiren biyo-görüntüleme ve ilaç dağılımı gibi biyomedikal uygulamaları açısından umut vaat etmektedir. Antikanser ilaçların ve biyo-görüntülemede kullanılan kontrast maddelerin hedefe gönderilebilmesi, günümüzde mortalitesi yüksek olan kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkların tanı ve tedavi süreçlerinde nanopartiküller, tıp ve sağlık alanında heyecan verici gelişmelerin orjini niteliğindedir (Sanna ve Sechi 2012).

Nanopartiküller; organik, karbon bazlı ve inorganik nanopartiküller olmak üzere üç gruba ayrılarak sınıflandırılmaktadır. Organik nanopartiküller non-toksik olan ve biyo-bozunur özellikteki nanopartiküller olup protein, lipid ve karbonhidrat gibi çeşitli organik bileşiklerden köken almaktadır. Termal ve elektromanyetik radyasyona duyarlı olan bu nanopartiküllere en iyi örnekler Şekil 2.3’de verilmiştir (Joudeh ve Linke 2022).



Şekil 2.3 Organik yapı nanopartiküller (A.Dendrimer, B.Lipozom, C.Misel, D.Ferritin) (Joudeh ve Linke 2022).

Karbon bazlı nanopartiküller yalnızca C atomlarından ibaret olan partiküller olup elektrik iletkenlikleri ve dayanıklılıkları yüksek olan ve sahip oldukları ekstrem optik, termal ve absorpsiyon özellikleri sayesinde geniş bir kullanım alanı bulan nanopartiküllerdir. Karbon bazlı nanopartiküllere Şekil 2.4’te örnekler verilmiştir (Joudeh ve Linke 2022).



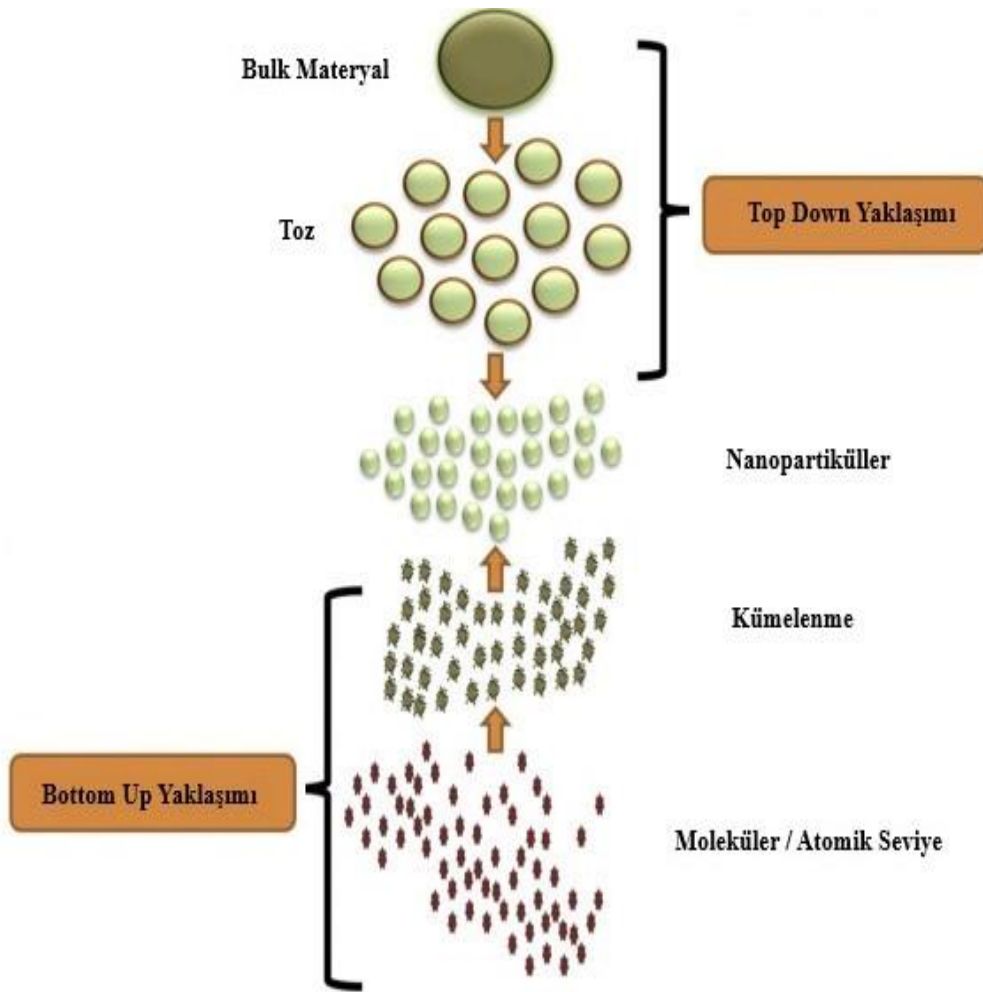
Şekil 2.4 Karbon bazlı nanopartiküller (A. Fulleren, B. Karbon siyahı C. Karbon kuantum noktaları) (Joudeh ve Linke 2022).

Bir diğer sınıf olan inorganik yapı nanopartiküller ise C ve organik bileşen içermeyen nanopartiküller olup metal, seramik ve yarı iletken olarak üç alt sınıfa ayrılmaktadır. Metalik nanopartiküller tamamen metal öncüllerinden meydana gelen mono, bi ve poli metalik şeklinde çeşitlere sahip olup, rezonans yapılarından dolayı üstün optik ve elektriksel özellikleri bulunmaktadır. Ayrıca termal, manyetik ve biyolojik özellikler de taşımaktadırlar. Dolayısıyla sahip oldukları bu özellikler sayesinde metalik nanopartiküller birçok alanda kullanılabilecek olan nano cihazların geliştirilmesi için başlıca kaynak olarak görülmektedir. Seramik nanopartiküller karbonat, kalbür, fosfat, metal oksit ve kalsiyum temelli metaloitlerden meydana gelen inorganik katılardır. Sahip oldukları yüksek stabilite ve yük kapasiteleri onları biyomedikal uygulamalar için kullanılabilir kılmaktadır. Yarı iletken nanopartiküller ise geniş bant aralığına sahip olmalarından dolayı kaynaklı optik, fotokataliz ve elektronik cihazlar için önemli materyallerdir (Joudeh ve Linke 2022).

2.2.1 Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri

Nanopartiküller birçok alanda önemli olan materyaller olduğu için üretim yolları son yıllarda bilim insanlarının ilgi odağı haline gelmiştir. Metal nanopartikül sentezi yapılabilen yöntemler iki farklı kategoride toplanmaktadır. Top-down (yukarıdan aşağı) yaklaşımı fiziksel ve fizikokimyasal metotları içerirken bottom-up (aşağıdan yukarı) yaklaşımı ise kimyasal ve biyolojik metotları içermektedir (Jamkhande vd. 2019). Bu iki

yaklaşımın temel yönleri Şekil 2.5’te gösterilmektedir. Yukarıdan aşağı yönlü yaklaşımı hacim olarak yığınsal malzemeye fiziksel veya kimyasal yöntemler uygulayarak bu materyalin nano boyuttaki parçacıklara indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Aşağıdan yukarı yaklaşımında ise atomik ya da moleküler düzeydeki yapıların birleştirilmesi sonucu nanopartikül eldesi sağlanmaktadır (Daniel ve Astruc 2004). Yeşil sentez yöntemi aşağıdan yukarı yaklaşım içinde yer alan biyolojik metotlardan biri olup, son yıllarda bilim insanlarının ilgi odağı haline gelmiştir. Fiziksel ve kimyasal metotlara göre birçok avantajı olan yeşil sentez uygulaması ekolojik açıdan çevre dostu bir yöntem olması yönüyle günümüzde tercih sebebidir (Shanmuganathan 2019, Xu vd. 2020).



Şekil 2.5 Nanopartiküllerin sentezlenmesindeki yaklaşımlar (Khanna vd. 2019).

Top-down ve bottom-up yaklaşımlarında etkin olan çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik metotlar Çizelge 2.3’de gösterilmiştir (Hussain vd. 2016, Khanna 2019, Yaprak 2019).

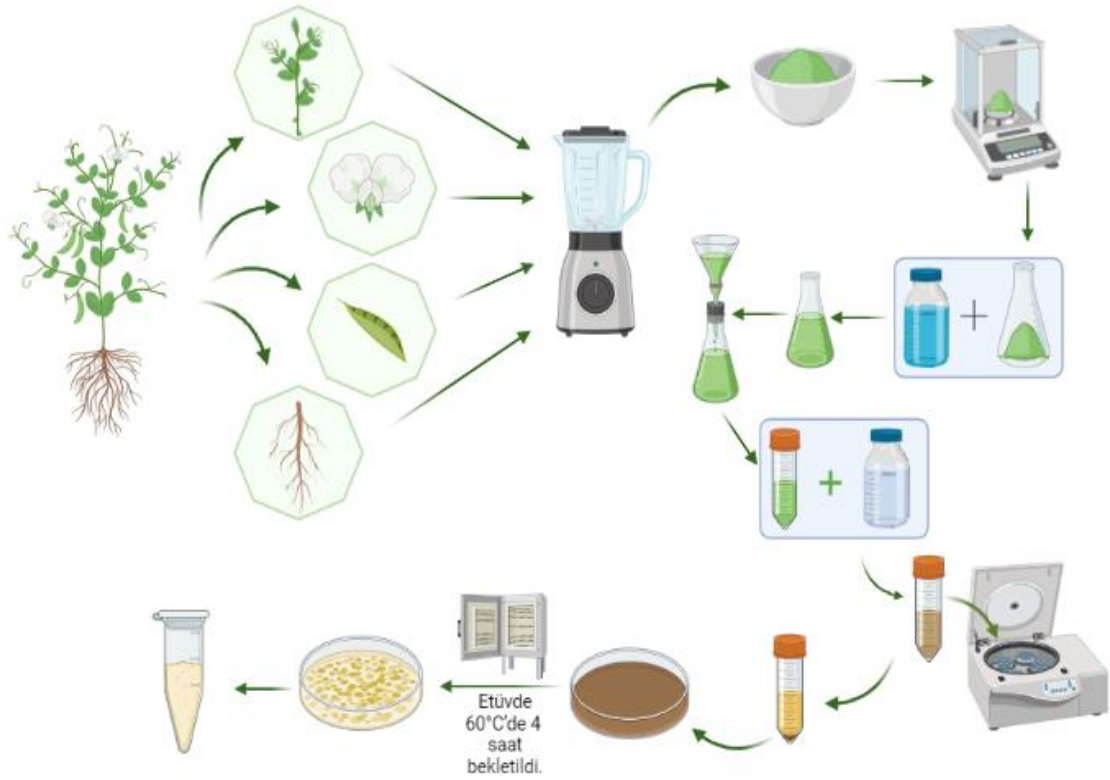
Çizelge 2.3 Nanopartikül sentezinde kullanılan çeşitli yöntemler.

Top - down (yukarıdan aşağı)	Bottom - up (aşağıdan yukarı)
Mekanik öğütme	Aerosol prosesleri
Bilye öğütme	Lazer pirolizi
Püskürtme	Sprey prolizi
Lazer uzaklaştırma	Sol-jel prosesleri
Kimyasal aşındırma	Buhar biriktirme
	Kimyasal / Elektrokimyasal çökeltme
	Atomik / Moleküler yoğunlaşma
	Yeşil sentez

2.2.1.1 Yeşil Sentez Yöntemi ile Nanopartikül Sentezi

Nanopartikül sentezi günümüzde önemli bir çalışma alanı olup bilim insanları fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikteki birçok çeşitli yöntemi kullanarak nanopartikül elde edebilmektedir. Çevrenin sürdürülebilirliği, yeryüzündeki tüm canlıların yaşam hakkının korunması için oldukça elzemdir. Günümüzde tüm alanlarda yapılan faaliyetlerin çevreye olan olumsuz etkilerini minimuma indirmeye çalışmak araştırmacıların hassas noktalarının başında gelmektedir. Nanopartikül sentezinde kullanılan birçok yöntem nanopartikül eldesi hususunda başarı sağlasa da sentez sürecinde kullanılan maddeler ve oluşan yan ürünler çevreyi olumsuz etkilemekte ve ekolojik dengeyi tehdit etmektedir. Bu sebeplerden dolayı çevre dostu biyolojik yöntemlere olan ilgi gün geçtikçe artmaktadır (Karnani ve Chowdhary 2013).

Yeşil sentez yöntemi; bir bitkinin yaprak, çiçek gibi kısımlarından elde edilen özütün üretilmek istenilen nanopartikül çeşidine ait metal tuzu ile karıştırılıp uygun sıcaklıkta yeterli süre bekletildikten sonra kullanılan metal tuzunun nanopartiküllere indirgenmesi sürecine dayanmaktadır (Rónavári vd. 2021). Yeşil sentez yönteminin aşamaları Şekil 2.6’da gösterilmiştir.



Şekil 2.6 Bitki ekstraktları kullanılarak yapılan yeşil sentez yönteminin aşamaları.

Klasik yöntemlerle nanopartikül sentezi maliyeti yüksek, zaman gerektiren, karmaşık ve çevreye zarar veren bileşenlerin kullanıldığı bir yöntem olduğu için günümüzde bu yöntemin yerine yeşil sentez yöntemi tercih edilmektedir. Geleneksel yöntemlere nazaran yeşil sentez yöntemi sade, ucuz ve çabuk sonuç veren, çevre dostu bir uygulamadır ve elde edilen nanopartiküller farmakolojik ve biyomedikal uygulamalarda kullanılabilir özelliktedir (Mourdikoudis vd. 2018). Bu yöntemde bitkilerin yaprak, meyve, çiçek ve kök gibi çeşitli kısımlarında yer alan alkaloid, terpenoid, şeker, protein ve alkol gibi metabolitler, metal tuzlarını indirgeyebilen ve nanopartiküllere dönüşmelerini sağlayan indirgeyici ajan görevi görmektedir (Khan vd. 2021).

2.2.2 Çinko Oksit Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

Nano bilim ve teknoloji son yıllarda hızla önem kazanmaktadır. Nanopartiküller, yüksek yüzey/hacim oranı, oldukça küçük boyutları ve eşsiz fizikokimyasal özelliklere sahip olmalarından dolayı, nanopartiküller ile tasarlanan nano ölçekteki malzemeler yeni nitelik

ve özelliklere sahip olup, birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Önemli bir ağır metal olan çinko (Zn), bütün canlı organizmaların ihtiyaç duyduğu temel bir besin kaynağı olup, aynı zamanda canlılık için gerekli olan biyokimyasal reaksiyonlarda görev alan enzimlerin çalışmasında işlevsel olan bir kofaktördür. Yetişkin insanlarda günlük olarak diyetle vücuda alınması gereken Zn miktarı 8-10 mg düzeyindedir. ZnO günümüzde yaygın olarak çalışılmakta olan yarı iletken bir materyaldir (Palmgren vd. 2008, Arıç 2010, Kevenk ve Koluman 2021).

Günümüzde biyomedikal, endüstriyel ve çevresel birçok uygulamada ZnO nanopartiküllerden yararlanılmaktadır. Bu partiküllerin antikanser, antibakteriyel, antifungal ve antidiyabetik aktiviteler sergilemesi nedeniyle onları çeşitli tıbbi uygulamalarda ve çeşitli hastalıklara aranan tedavi prosedürlerinin geliştirilmesi süreçlerinde vazgeçilmez kılmaktadır. Aynı zamanda ZnO nanopartiküllerin hücre içindeki biyoyumlu davranışlar göstermeleri ve toksik olmayışları sayesinde çeşitli biyolojik görüntüleme uygulamalarında ve hedeflenen bölgelere ilaç gönderimlerinde bu partiküller kullanım alanı bulmaktadır. ZnO nanopartiküllerin kullanıldığı bazı uygulamalar Şekil 2.7’de verilmiştir (Liao vd. 2020).



Şekil 2.7 ZnO nanopartiküllerin kullanım alanlarına örnekler (Liao vd. 2020).

Bazı bitkiler ile yapılan çeşitli çalışmalar ve elde edilen ZnO nanopartiküller ile bu partiküllerin özellikleri Çizelge 2.4’te verilmiştir (Prasad vd. 2021)

Çizelge 2.4 Çeşitli bitki türleri kullanılarak sentezlenen ZnO nanopartiküller.

Kaynak	Kısım	Boyut	Şekil / Morfoloji
<i>Aloa vera</i>	Yaprak	15 nm	Küresel, oval ve altıgen
<i>Polygala tenuifolia</i>	Kök	33 – 73 nm	Küresel
<i>Vitex negundo</i>	Yaprak	75 – 80 nm	Küresel
<i>Anchusa italic</i>	Çiçek	8.14 nm	Altıgen
<i>Black tea</i>	Atık	19.5 nm	Çubuk
<i>Costus woodsonii</i>	Yaprak	20 – 25 nm	Küresel ve dikdörtgen
<i>Carissa edulis</i>	Meyve	50 – 55 nm	Çiçek şeklinde
<i>Azardachta indica</i>	Yaprak	9 – 25 nm	Küresel

2.2.3 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Laboratuvar koşullarında çeşitli yöntemler kullanılarak elde edilebilen nanopartiküllerin kullanılabilirliği açısından karakterize edilmesi gerekmektedir. Özellikle biyolojik sıvılarda nanopartiküllerin diğer biyolojik sıvılar ile etkileşime girebilme ve özelliklerini kaybedebilme ihtimali bulunmaktadır. Bu açıdan elde edilen nanopartiküllerin; morfolojisi, boyut ve dağılımı, kristal yapısı ve bileşimi, kimyasal yapısı, zeta potansiyeli, optik özellikleri ve yüzey yükü gibi çeşitli özellikleri bakımından incelenmesi gerekmektedir (Machado vd. 2015).

Küçük boyutlu nanopartikül elde edebilmek nanopartikül sentezinin başlıca hedefleri arasında yer almaktadır. Nanopartiküllerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan yöntemler Çizelge 2.5’te listelenmiştir (Selmani vd. 2022).

Bu tez çalışmasında, nanopartiküllerin karakterizasyonunda Ultraviyole-Görünür Spektrofotometrisi (UV-Vis), Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM), pH analizi, Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometre (FT-IR) ve X Işını Difraksiyon (XRD) spektroskopisi tekniklerinden yararlanıldı.

Çizelge 2.5 Nanopartikül karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan yöntemler.

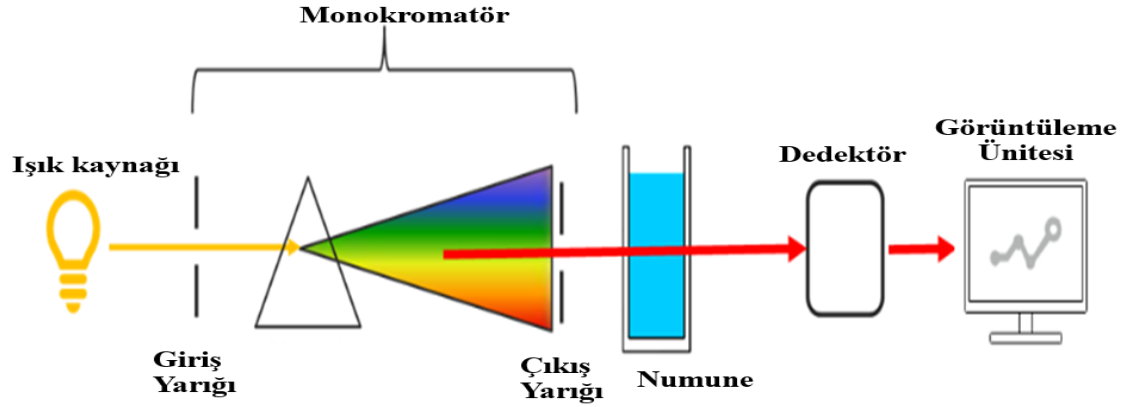
Analiz	Teknik	Analiz edilebilen özellikler
Elektron mikroskopisi	TEM	Morfoloji, temel bileşim boyut
	SEM	Morfoloji, boyut
Spektroskopi	XRD	Bileşim, kristal yapı, kristalit boyutu
	FT-IR	Yüzey kimyasal bileşimi, bağlar ve işlevsellik
	Raman	Kimyasal yapı, kristallik ve moleküler etkileşimler
	UV-Vis	Optik özellik, boyut, konsantrasyon ve aglomerasyon
Saçılma teknikleri	DLS	Boyut, boyut dağılımı, aglomerasyon
	NTA	Boyut, boyut dağılımı
	SAXS	Boyut, boyut dağılımı, büyüme kinetiği
Yüzey yükü tayini	ELS	Zeta potansiyeli
	Akış Potansiyeli	Zeta potansiyeli
Yüzey analizi	BET	Belirli yüzey alanı

2.2.3.1 pH Ölçümü

Yeşil sentez tekniği ile ZnO nanopartiküller sentezi, çözeltinin pH değişimine neden olmaktadır. Yapılan literatür araştırmalarında bitki ekstraktı ve çinko tuzu kullanılarak yeşil sentezlenmiş ZnO nanopartiküllerin ortamın pH değerini yükselttiği görülmektedir. Bu tez çalışmasında *Mentha pulegium* L. ekstraktı ve çinko asetat çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen ZnO nanopartiküllerin pH değerini yükseltmesi, nanopartikül sentezinin başarıyla gerçekleştiğinin göstergesidir (Dutta ve Sugumaran 2021).

2.2.3.2 Ultraviyole Görünür Işık Spektroskopisi (UV-Vis)

Ultraviyole görünür ışık spektroskopisi, 200-400 nm aralığındaki UV ışığın molekül tarafından absorbe edilmesine dayanmakta olan bir tekniktir. UV-Vis düzeneği Şekil 2.8’de gösterilmiştir (İnt. Kyn. 6).



Şekil 2.8 UV-Vis düzeneği ve bileşenleri (İnt. Kyn. 6).

Bu yöntemde ışık kaynağı tarafından gönderilen demetler, mercekler tarafından toplanır, odaklanır ve numune üzerine yansıtılır. Bu teknikle materyallerde meydana gelen elektriksel geçişler, nanoparçacık boyutları, konsantrasyonu, toplanma dereceleri ve kararlılıkları gibi özellikleri izlemek ve değerlendirmek mümkündür (İnt. Kyn. 6).

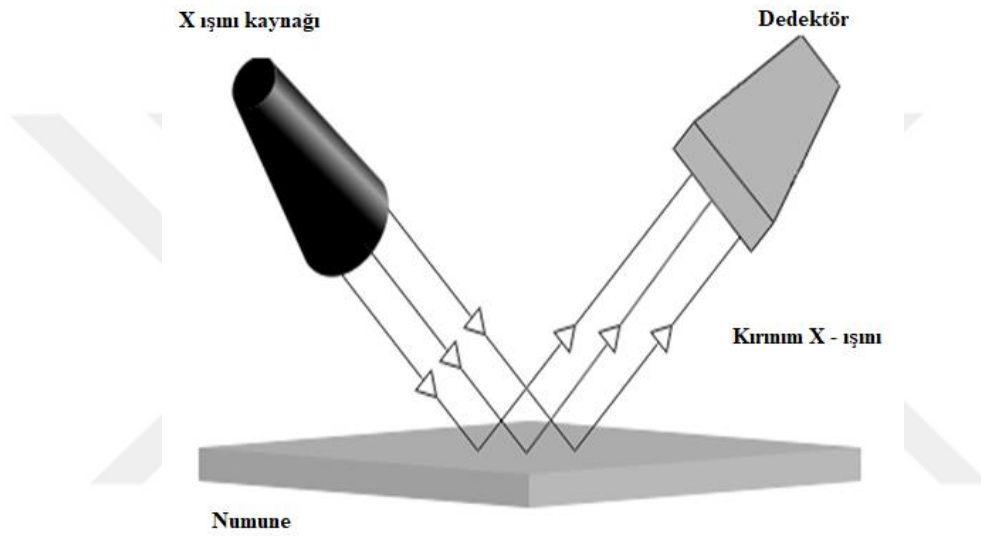
2.2.3.3 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FT-IR)

Nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılan önemli yöntemlerden biri FT-IR tekniğidir. FT-IR ile nanopartiküllerin konsantrasyon tayini, yüzey analizi ve fonksiyonel grupların tespiti gerçekleştirilebilmektedir (Mourdikoudis vd. 2018, Khan vd. 2021). Kızıl ötesi ışıkla etkileşen dipol momente sahip bir maddenin içinde bulunan bağların titreşimleri FT-IR tekniği ile analiz edilebilmektedir. Bu teknik sayesinde incelenen örnekteki makro moleküllerin işlevsel gruplarının titreşimlerine bağlı olan yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel bilgilerin analizini sağlamaktadır. FT-IR tekniği ile mevcut bağlar tanımlanarak nanopartiküllerin yüzey kimyasal bileşimi, bağları ve işlevselliklerinin tespit edilmesi sağlanmaktadır (Ateş 2018).

2.2.3.4 X Işını Kırınım Yöntemi (XRD)

X ışını kırınım yöntemi, materyallerin kristal yapıları, tane boyutu, gerinimleri gibi özellikleri hakkında bilgi veren ve kristal materyallerin karakterizasyonu için yaygın

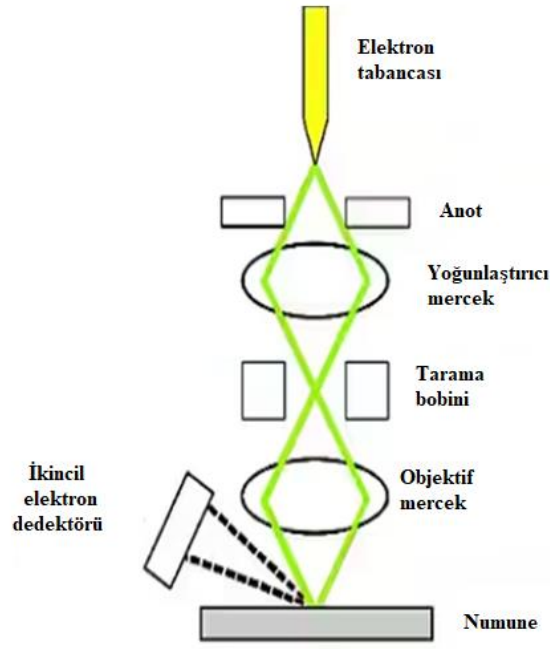
olarak kullanılan bir yöntemdir. XRD desenindeki yansımanın yoğunluğu, şekli ve pozisyonu takip edilerek nanomateriyallerin şekil yapılarında meydana gelen farklılaşmalar anlaşılabilir. Prensipinde katot ışın tüpünde üretilen ışınlar monokromatik radyasyon üretmek amacıyla filtre edildikten sonra yoğunlaştırılarak numune üzerine iletilmektedir. Bir sonraki aşamada ise kırılan ışınlar saptanarak sayılmakta ve işlenmektedir. XRD çalışma prensibi Şekil 2.9’da gösterilmektedir (Yakut ve Kum 2022).



Şekil 2.9 XRD tekniği ve bileşenleri (Yakut ve Kum 2022).

2.2.3.5 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu nano ölçeklerdeki yapıların morfolojik yapılarının ve boyutlarının incelenmesinde ilk sırada tercih edilen yöntemlerden biridir. SEM, düşük enerjili elektron demetleri ile materyal yüzeylerini tarayarak üç boyutlu görüntü elde edilmesine olanak sağlamaktadır. SEM ölçümleri 1 nm boyutundaki yüksek çözünürlüğe ve 400.000X değerindeki büyütmeye sahiptir. Bu yüksek çözünürlük potansiyeli nano skaladaki materyallerin çalışılmasını mümkün kılmaktadır (Dudkiewicz vd. 2011). Elektronlar materyaldeki atomlarla etkileşime girerek kristal yapı, boyut, kimyasal bileşim gibi özellikler hakkında bilgi edinmeyi sağlamaktadır (Dudkiewicz vd. 2011, Shanks 2013, Sadık vd. 2014, Mayeen vd. 2018). SEM cihazının yapısı ve bileşenleri Şekil 2.10’da gösterilmektedir (İnt. Kyn. 7).



Şekil 2.10 SEM cihazının yapısı ve bileşenleri (İnt. Kyn. 7).

2.3 Kanser

Çok hücreli organizmalarda, somatik hücreler kendilerine özgü fonksiyonları yerine getirerek yaşamı devamlı kılan temel canlılık birimleridir. Kendisinden önceki hücrenin bölünmesiyle meydana gelen hücreler yaptıkları önemli işler sayesinde canlının çevre ile denge konumuna geçmesini sağlamakta ve biyolojik aktivitelerin devamlılığı için gerekli olan biyokimyasal reaksiyonların kesintisiz sürdürülmesine imkân vermektedir. Bazı hücreler sınırlı bir yaşama kapasitesine sahip olup, görevleri bittiğinde çeşitli mekanizmaların kontrolünde ölürken, sinir ve kas gibi sistemlere ait bazı hücreler ise organizmanın yaşamı boyunca hayatta kalmaktadır. Hücrelerin ölümü de yaşaması da canlılık ve homeostazinin devamı için oldukça gerekli olaylardır. Kanser, hücre siklusunu düzenleyen mekanizmaların bozulması sonucu kontrol edilemeyen anormal düzeyde hücre bölünmesi ile karakterize ve dünya genelinde yüksek mortalite ve morbidite oranlarına neden olan tehlikeli bir hastalıktır. Kanserin nedenleri ve tedavi yöntemlerini aydınlatmaya yönelik çalışmalar günümüzde tüm hızıyla sürmektedir. Bir hastalığı tedavi edebilmek için o hastalığın iyi analiz edilmesi, nedenlerinin ve olası etkenlerinin araştırılması elzemdir. Hanahan tarafından (2022) yapılan çalışmada kanserin özellikleri detaylıca gözler önüne serilmektedir. Hücrenin sürekli olarak maruz kaldığı proliferatif

sinyaller, büyümeyi engelleyen faktörlere karşı kayıtsız kalma, hücresel metabolizmadaki düzensizlikler, hücre ölümüne karşı kazanılan direnç, genomik kararsızlık ve mutasyonlar, tümöre neden olan inflamasyon gelişimi, hücresel yaşlanmaya karşı koyma, invazyon ve metastaz gelişimi, immün sistemden kaçış, damar sistemindeki düzensizlikler ve anjiyogenez gelişimi gibi olaylar kanserin ortaya çıkmasında etkili olan süreçlerin başlıcalarıdır. Kanser gelişiminde rol oynayan süreçler Şekil 2.11’de gösterilmiştir (Hanahan 2022).



Şekil 2.11 Kanser gelişiminde rol oynayan süreçler (Hanahan 2022).

Kanserin genetik temeli iki önemli gen grubu ile yakından ilişkilidir. Bunlar sağlıklı hücrenin sağkalımı ve çoğalmasını kontrol eden “proto-onkogenler” ile işlevi son bulan ya da genetik bir kararsızlık taşıyan ve bozulmuş, yaşlanmış, hasar almış ve ortadan kaldırılması kaçınılmaz olan hücrelerin bölünmesini engelleyen ve gerekli durumlarda

ortadan kaldırılması için gereken süreçleri denetleyen tümör baskılayıcı genlerdir (Anderson vd. 2005).

Hücrelerin hayatta kalmasını ve çoğalmasını kontrol eden genlere “proto-onkogen” adı verilmektedir. Bu genlerin ifadesi sonucu üretilen çeşitli RNA molekülleri translasyona uğradığında bölünmeyi kontrol eden protein ve enzimler sentezlenerek hücre siklusunun sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi sağlanmaktadır. Bu genlerin başlıca ürünleri arasında transkripsiyonel faktörler, büyüme faktörleri, büyüme faktörü reseptörleri, apoptozisin baskılanması, kromatin yapısının yeniden modellenmesini sağlayan faktörler, hücre içi haberleşmeden sorumlu sinyal faktörler ve hücre membranı ile ilişkili çeşitli G proteinleri yer almaktadır (Macleod 2000).

Kanserin nedenlerinden biri proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlardır. Mutasyona uğrayan bir proto-onkogen artık “kansere neden olan gen” anlamına gelen onkogen adını alır. Bu genlerin aşırı ifade edilmesi hücrenin kontrolsüzce bölünmesine neden olmaktadır. Diploid canlılarda bir kromozomun iki takımı bulunurken, bu iki kromozomdan birindeki proto-onkogen allelinin aşırı ifadesi kanser gelişimi için gerekli süreçlerin meydana gelmesinde baskınlık göstermektedir (Adamson 1987).

Tümör baskılayıcı genler, kanser gelişimiyle yakından ilişkili olan diğer bir gen grubudur. Bu genlerin temel işlevi hücre siklusunu kontrol altında tutarak ihtiyaç dışında meydana gelebilecek bir hücre bölünmesini engellemektir. Hasarlı hücrelerde siklusu bloke etmek ve hasarı onarılamayan hücreleri apoptozise yönlendirmek gibi hayati rolleri vardır. Genomik stabilizasyonun sağlanması, minimal mutasyonun hedeflenmesi ve olası DNA onarımları aşamalarında hata oranını düşürerek yeni kuşak hücrelere hasarlı DNA aktarımının engellenmesinden sorumlu olan genleri içermektedir. Tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimiyle ilişkilidir, ancak onkogenlerden farklı olarak bu mutasyonun her iki allelde de olması gerekmektedir. Fakat heterozigosite kaybı sonucu karsinogenez baskılanması devre dışı kalabilmektedir (Macleod 2000).

Nokta mutasyonları, tümör baskılayıcı genleri inaktive eden süreçlerden biridir. Epigenetik süreçlerden biri olan metilasyon organizmanın genlerinin inaktive edilmesini

sağlayan ve gereksiz ifadesini önleyen bir mekanizmadır (Kulis ve Esteller 2010). Anormal şekilde meydana gelen ve tümör baskılayıcı genleri sessizleştiren metilasyon artışı da kanser gelişimine neden olan diğer bir süreçtir (Bishop 1991).

Kanser gelişimine temel hazırlayan süreçlerin başında mutasyonlar gelmektedir. Kötü huylu olarak bilinen malign tümör gelişimi genellikle birden fazla mutasyonun eşlik etmesiyle oluşan süreçlerin bir ürünüdür. Hücrenin yönetiminden sorumlu nükleik asit olan DNA molekülünde meydana gelen değişimler mutasyon olarak tanımlanmakta ve mutasyona neden olan maddeler ise mutajen olarak adlandırılmaktadır. Birçok mutajen ajanın kansere neden olduğu bilinmektedir. Kansere neden olan etkilere karsinojen olarak adlandırılmakta, ancak her mutajen kansere neden olmazken her karsinojen aynı zamanda mutajen olarak da tanımlanmaktadır (İnt. Kyn. 8).

Bilim insanları, insanın ölümüne sebep olan bu hastalığın nedenlerini ve tedavi yollarını ciddi bir disiplinle araştırmaktadır. Tüm dünyada başlıca sağlık sorunları arasında ön sıralarda yer alan kanser hastalığı, tedavi yollarının araştırılması için yapılan çalışmalar ve hastaların tedavi süreçleri ülkelerin ekonomik bütçelerini olumsuz yönde etkilemektedir (Torun ve Kutlar 2018).

2.3.1 Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, akciğerdeki dokuları oluşturan hücrelerin çeşitli nedenlerle kontrol dışı ve anormal şekilde çoğalarak tümör oluşturması sonucu gelişen kanser çeşididir. Dünya genelinde ölüm oranı en yüksek kanser tiplerinin başında gelen ciddi bir sağlık sorunudur. Özellikle sigara tüketiminin yaygın hale gelmesi hem ülkemizde hem de dünya genelinde akciğer kanserine bağlı olarak meydana gelen ölüm oranlarında ciddi artışlara sebep olmaktadır. Türkiye için yıllık insidans erkeklerde yüz binde 61.6 kadınlarda yüz binde 5.1 olarak hesaplanmıştır (Alar ve Şahin 2012).

Akciğer kanserinin başlıca nedenleri arasında tütün ve tütün ürünlerinin kullanımı, radon, asbest, silika, ağır metaller, klorometil eterler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve hava kirliliği gibi etkenler yer almaktadır. Sigara kullanan kişilerde akciğer kanserine

yakalanma riskinin kullanmayan kişilere kıyasla 20-50 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Tütün ürünü kullanmayan bir bireyin dışarıdan maruz kaldığı pasif içicilik faktörü de akciğer kanserine yol açabilmektedir (Malthora vd. 2016). Akciğer kanserinin başlıca iki ana tipi bulunur. Bunlar küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseridir. Akciğer kanserinin histolojik tipleri, radyolojik ve klinik bulguların farklarına göre sınıflandırılması Çizelge 2.6’da gösterilmiştir (Ergelen ve Çağatay Çimşit 2013).

Çizelge 2.6 Akciğer kanserinin histolojik tipleri ve çeşitli klinik özellikleri akciğer kanserinin histolojik tipleri ve çeşitli klinik özellikleri.

Akciğer kanseri tipleri	Özellikleri
Adenokarsinom	En sık görülür Sigara içmeyen kadın hastalarda görülür Periferik yerleşim gösterir Radyolojik olarak hava bronkogramları şeklinde prezente olabilir
Skumöz hücreli kanser	İkinci en sık rastlanan tip Sigara ile yakın ilişkili Sıklıkla santral yerleşimli Kaviteleşme gösterebilir
Büyük hücreli kanser	En nadir görülen tür Sıklıkla periferik yerleşimli
Küçük hücreli akciğer kanseri	Sigara ile yakından ilişkili Sıklıkla santral yerleşimli Mediastinal lenfadenopati birlikteliği sıktır En kötü prognozlu tip

Bütün akciğer kanseri vakalarının yaklaşık olarak %85-90’ını oluşturan küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin üç alt tipi bulunmaktadır. Bunlar adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinomdur (Herbst vd. 2008).

Adenokarsinom, bu alt tiplerin içinde en yaygın görüleni olup, diğer akciğer kanseri tiplerinden farklı olarak sigara kullanımı ile ilişkisi düşüktür ve sigara içmeyen kadınlarda yaygın olarak görülmektedir. Genellikle skar dokusunun zemininde gelişmekte ve terminal bronşiyol epitelinden köken almaktadır. Histopatolojik olarak kompleks ve heterojen bir yapı sergileyen tümör yapısı lepidik, papiller, asiner, mikropapiller ve solid paternlerin bir ya da birkaçını içermektedir (Diniz vd. 2017).

Skuamöz hücreli karsinoma, ana bronşlarda santral yerleşim gösteren ve sigara ile yakından ilişkili tümörlerin gelişimiyle karakterize olan bir akciğer kanseri tipidir. Akciğerdeki hava yollarının iç kısımlarını örten yassı şeklindeki skuamöz hücrelerin erken formlarından gelişmektedir. Periferik yerleşimlilerde nodüler büyüme, kavitasyon ve santral nekroz gözlenmektedir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olarak görülen olguların %20-30'unu oluşturmaktadır (Yener ve Apa 2014, Demiray ve Yaren 2016).

Büyük hücreli kanser genellikle periferik yerleşim göstermektedir. Sitolojik diferansiyasyon göstermeyen ve küçük hücreli karsinomun sitolojik izlenimlerini taşıyan bu kanser tipi sigara ile yakın ilişkilidir. Morfolojik açıdan skuamöz veya glandüler ayrımlaşma göstermeyen, büyük hacimli, iri ve poligonal nükleus içeren ve bu nükleusların belirgin olduğu hücrelerden meydana gelen tümörlerdir. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin %3-5'ini büyük hücreli kanser tipi oluşturmaktadır (Korkut 2018).

Küçük hücreli akciğer kanseri, bütün akciğer kanseri olgularının yaklaşık %10-15'ini oluşturur ve agresif seyirli olan nöroendokrin kökenli, sigara kullanımı ile yakından ilişkili bir tümördür (İnt. Kyn. 9). Tanı sırasında çoğu hastalarda metastaz ve ileri evre kanser görüldüğünden cerrahi tedavi şansı oldukça düşüktür. Tümörü meydana getiren hücrelerde ince ve granüler kromatin yapısı izlenirken nükleus fuziform küçük yapıda, nükleolus ise yuvarlak veya belirsizdir. Olgularda nekroza ve azzopardi etkisine sık rastlanmaktadır. Damar duvarındaki tümör hücrelerinden çıkan artmış miktardaki DNA materyalinden kaynaklanan bazofilik görünüm "azzopardi etkisi" olarak tanımlanmakta olup küçük hücreli akciğer kanseri için tipik bir olgu kabul edilmektedir (Travis 2012).

2.3.2 Akciğer Karsinomu Hücreleri (A549)

Günümüzde akciğer kanseri ile ilgili yapılan hücre kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılan A549 hücreleri ilk olarak 1972 yılında 58 yaşındaki erkek bir hastanın tümör dokusundan Dr. D.J. Giard tarafından alınarak kültüre edilmiştir. A549 hücreleri, küçük hücreli olmayan akciğer kanserine ait, erkeklerde sık olarak gelişen skuamöz hücreli karsinom tipte hücrelerden biridir. Bu hücreler, hipotriploid insan alveolar bazal epitel hücreleri için bir *in vitro* model oluşturmaktadır. Tek tabaka halinde yapışarak büyüyen hücreler transfeksiyon konakçısı olarak uygunluk göstermektedir. Yüksek miktarda doymuş yağ asidi ve lesitin sentezleyen hücreler membrandaki fosfolipitlerin muhafaza edilmesini sağlayarak direnç kazanmakta ve dayanıklı hale gelmektedirler (Giard vd. 1973, Cooper vd. 2016).

Tümör baskılayıcı gen olan p53 geninin yabanıl tipine sahip olan A549 hücrelerinin çoğunda iki tane X ve bir tane Y kromozomu bulunur. Bu hücrelerde 2. ile 6. kromozomları için birer kopya bulunurken N12 ve N17 için genellikle dört kopya bulunmaktadır. Uzun yıllardan beri A549 hücre hattı solunum yollarında gelişen kanserler ile ilgili yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kanser araştırmalarının yanı sıra solunum sisteminde meydana gelen enfeksiyonlar ve viroloji alanındaki çalışmalar için de uygun olan bir çalışma materyali olarak da kabul edilmektedir (Ulasli vd. 2013, Cooper vd. 2016, Günay vd. 2016).

2.4 Hücre Kültürü

Canlıdan izole edilerek doğal ortamından alınan hücrelerin kontrollü şartlar altında çeşitli uygulamalar yapmak amacıyla büyütülüp çoğaltıldığı ve dondurularak saklandığı laboratuvar uygulamalarına hücre kültürü adı verilmektedir. Hücre kültürü çalışmaları günümüzde bilim insanlarının kanser başta olmak üzere birçok konuda araştırma yapmak amacıyla başvurduğu önemli tekniklerden biridir. Ayrıca hayvan deneylerine olan gereksinimi karşılaması yönünden de tercih edilir bir yöntemdir. Tarihte ilk kez Amerikalı bir embriyolog olan Harrison'un 1907 yılında kurbağa sinir liflerinin büyümesini sağlaması hücre ve doku kültürünün başlangıcı olarak kabul edilmektedir.

Hücre kültürünün tarihsel ilerleyişinde meydana gelen gelişmeler Çizelge 2.7’de verilmiştir (Griffiths 2007, Esmer Duruel vd. 2021).

Çizelge 2.7 Hücre kültürünün tarihsel gelişimi.

Hücre kültüründeki ilerlemeler	Bilim insanları
<i>In vitro</i> kurbağa embriyonu sinir lifi üretimi	Harrison 1907
Tavuk bağ dokusunun eksplantları	Carrel 1912
Fibroblastik hücre soylarının subkültürü	Carrel ve Ebeling 1923
Doku kültüründe antibiyotik kullanımı	Keilova 1948
İlk devamlı hücre soyları	Earle vd. 1943
Hücre kültüründe virüsün üretilmesi	Enders vd. 1949
Subkültürde tripsin kullanımı	Dulbecco 1952
Servikal karsinomadan ilk insan hücre soyu, HeLa	Gey vd. 1952
HeLa’nın klonlanması	Puck ve Marcus 1955
Medyanın geliştirilmesi	Eagle 1959
Çin hamster hücrelerinin serumsuz klonlanması	Ham 1965
Laminer akım kabinlerinin geliştirilmesi	Kruse vd. 1991
Özel hücre soylarının geliştirilmesi	Peehl ve Ham 1980
Erişkin insan mezenkimal kök hücresinin kültürü	Caplan 1991
İnsan embriyonik kök hücre kültürü	Thomson vd. 1998
İnsan genom projesi: genomiks, proteomiks	Dennis vd. 2001

Hücre kültürü, farklı deney koşulları çerçevesinde belirli bir biyolojik süreci araştırabilmek için laboratuvar koşullarında hücrelerin büyümesine olanak sağlayan modellerdir. Bu yöntem ilk haliyle iki boyutlu (2B) bir uygulama iken, bilim ve teknoloji alanındaki ilerlemeler ile günümüzde üç boyutlu (3B) şekilde de uygulanabilmektedir (Duval vd. 2017). Hücre kültürü çalışmaları sırasında hücrelerin büyüüp çoğalmak için ihtiyaç duydukları biyomolekülleri içeren ve ilk defa Fischer tarafından 1948 yılında hazırlanan ortama vasat adı verilmektedir. Diyalize uğratılmış serum içerisine bazı amino asitleri ilave ederek hücrelerin metabolik açıdan desteklenebileceği gösterilmiştir. 1955 yılında ise Eagle tarafından Fischer’in yöntemi temel alınarak tasarlanan ve hücrelerin ihtiyaç duyduğu biyomolekülleri minimum düzeyde içeren EMEM (Eagle’s Modified

Essential Medium) adındaki kimyasal olarak ilk kez tanımlanmış vasat geliştirilmiştir. EMEM içerisinde glikoz ve galaktoz gibi çeşitli karbonhidratlar, amino asitler, vitaminler, lipitler, yağ asitleri, bakır ve çinko gibi eser elementler, serum ve hücre büyümesi için gerekli olan çeşitli katkı maddeleri bulunmaktadır. Ayrıca Eagle, farklı hücrelerin ihtiyaç duydukları amino asit çeşitlerini tespit ederek minimum temel ortamı (MEM) geliştirmiştir. Günümüzde yaygın olarak tercih edilen birçok hücre kültürü vasatının temelini EMEM oluşturmaktadır. Dulbecco ve Freeman'ın tasarladığı DMEM, EMEM'e göre dört kat daha fazla vitamin ve amino asit konsantrasyonu içeren Eagle ortamının yeniden düzenlenmiş bir versiyonudur (Esmer Duruel vd. 2021).

2.4.1 MTT ile Sitotoksiste

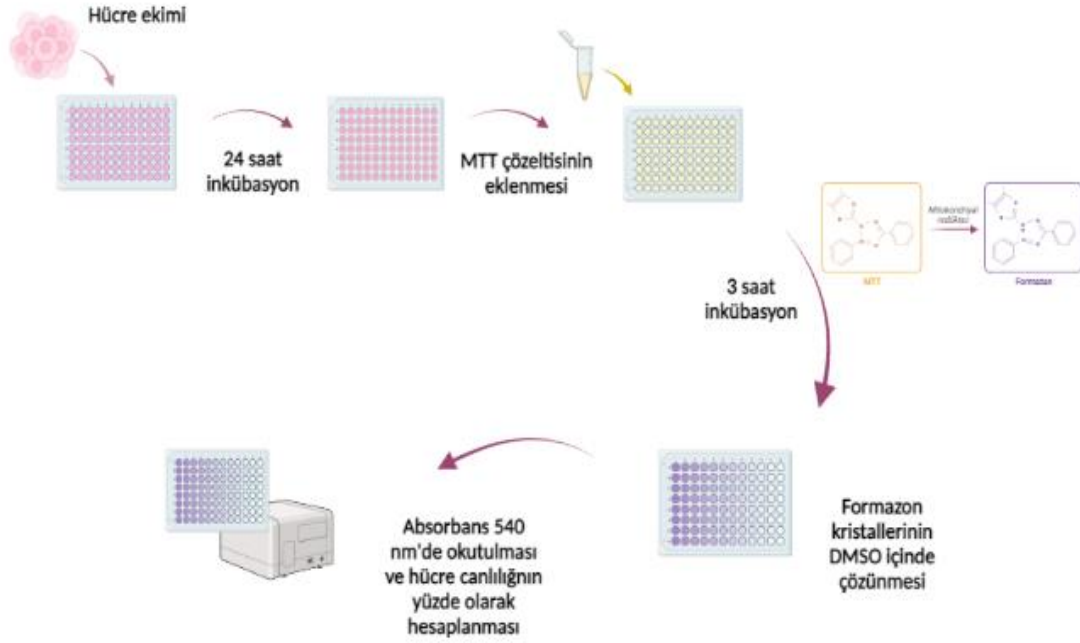
Tetrazolyum halkasının mitokondri tarafından parçalanıp MTT formazana çevirimine bağlı meydana gelen renk değişikliği izlenerek hücre canlılığı hakkında veri elde etme düşüncesi Mossman tarafından 1983 yılında gündeme gelmiştir (Mossman 1983). Günümüzde geçerliliğini koruyan ve yaygın olarak kullanılan sitotoksiste testlerinin başında gelmektedir. Sarı renge sahip olan MTT bir formazan tuz olup kimyasal bileşimi Şekil 2.12'de verilmiştir (Erkekoğlu ve Baydar 2021).



Şekil 2.12 MTT'nin kimyasal bileşimi (Erkekoğlu ve Baydar 2021).

Hücrelerin proliferasyonundaki artış mitokondriyel dehidrojenaz enzim aktivitesindeki artışa neden olarak, MTT'yi apolar özellikteki mor renkli formazan kristallerine çevirmektedir. Oluşan kristaller ise dimetil sülfoksit (DMSO) ya da izopropil alkol içinde

çözünmeye uğramaktadır. MTT analizi sonucu elde edilen boya yoğunluğu ile canlı hücre sayısı doğrudan ilişkilidir (Erkekoğlu ve Baydar 2021).

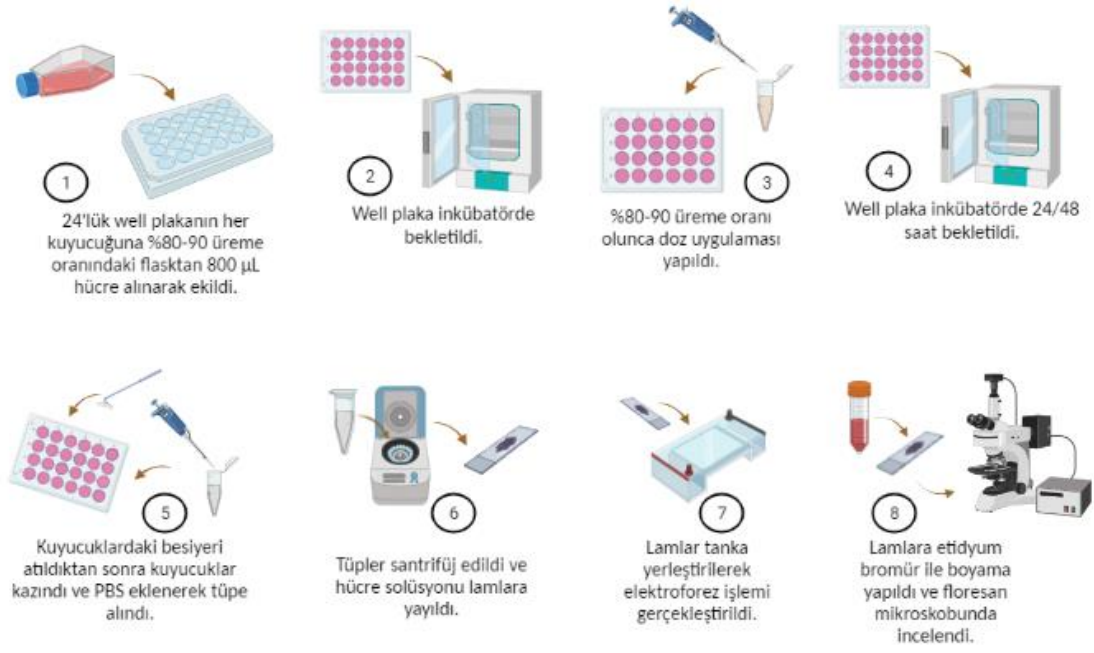


Şekil 2.13 MTT basamakları.

2.4.2 Tek Hücre Jel Elektrophorez Testi (Komet Testi, SCGE) ile Genotoksisite

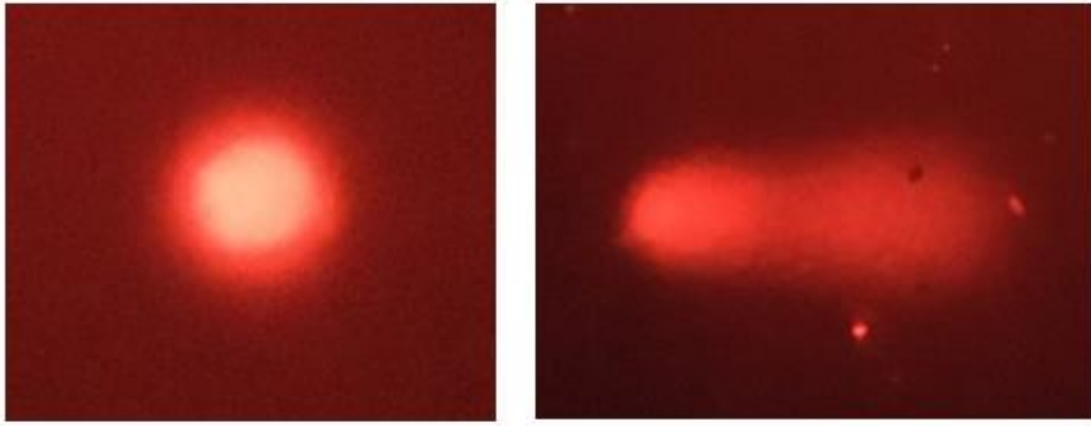
Hücrenin yaşamı için gerekli olan biyokimyasal reaksiyonların yönetimini gerçekleştiren kalıtım materyali olan DNA molekülünde strese neden olan faktörlerin bozulmaya neden olup olmadığını anlamak amacıyla yapılan testler genotoksisite testleri olarak adlandırılmaktadır (Atlı Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

Komet testi (kuyruklu yıldız deneyi) olarak da bilinen “tek hücre jel elektrophorez” yöntemi günümüzde DNA hasarlarının ve ayrıca mevcut hasarların oranlarının saptanmasında yaygın olarak kullanılan testlerin başında gelmektedir (Møller vd. 2020). Komet yönteminin basamakları Şekil 2.14’te verilmiştir.



Şekil 2.14 Komet testinin basamakları.

Bu teknik elektroforez sırasında hücre içerisindeki dışarıya çıkan denatüre DNA parçalarının miktarının ölçümüne dayanmaktadır. Yapılan analizler ile DNA fragmentlerine ait hasar seviyesi tespit edilmektedir. İncelenecek olan DNA moleküllerini içeren hücreler izole edildikten sonra slaytlar hazırlanarak hücreler lizis edilmektedir. Elektroforez uygulaması ile DNA'lar yürütülerek devamında nötralizasyon yapılmakta ve boyama işlemi sonrasında floresan mikroskop incelemesi ve komet analizi gerçekleştirilmektedir. DNA'ların agaroz jel içindeki elektroforetik ortamda yürütülmesi sırasında hasar içermeyen DNA molekülleri kuyruk oluşturmazken, farklı elektriksel yüklere ve molekül ağırlıklarına sahip olan hasarlı DNA fragmentleri farklı hızlarda göç ettikleri için kuyruklu yıldız formunda bir görüntü meydana getirmektedirler. Floresan olarak boyanmış DNA molekülleri mikroskop altında incelenerek kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti, kuyruklu hücrelerin yüzdesi, kuyruktaki DNA yüzdesi gibi parametreler değerlendirilmektedir. Normal ve hasar içeren farklı DNA moleküllerinin floresan mikroskop inceleme görüntülerine örnekler Şekil 2.15'te verilmiştir (Gurung vd. 2010, Dikilitaş ve Koçyiğit 2010, Güner ve Muranlı 2013, Deniz 2017).



Şekil 2.15 Komet testinde normal ve DNA hasarı içeren iki hücreye ait floresan mikroskop görüntüleri.

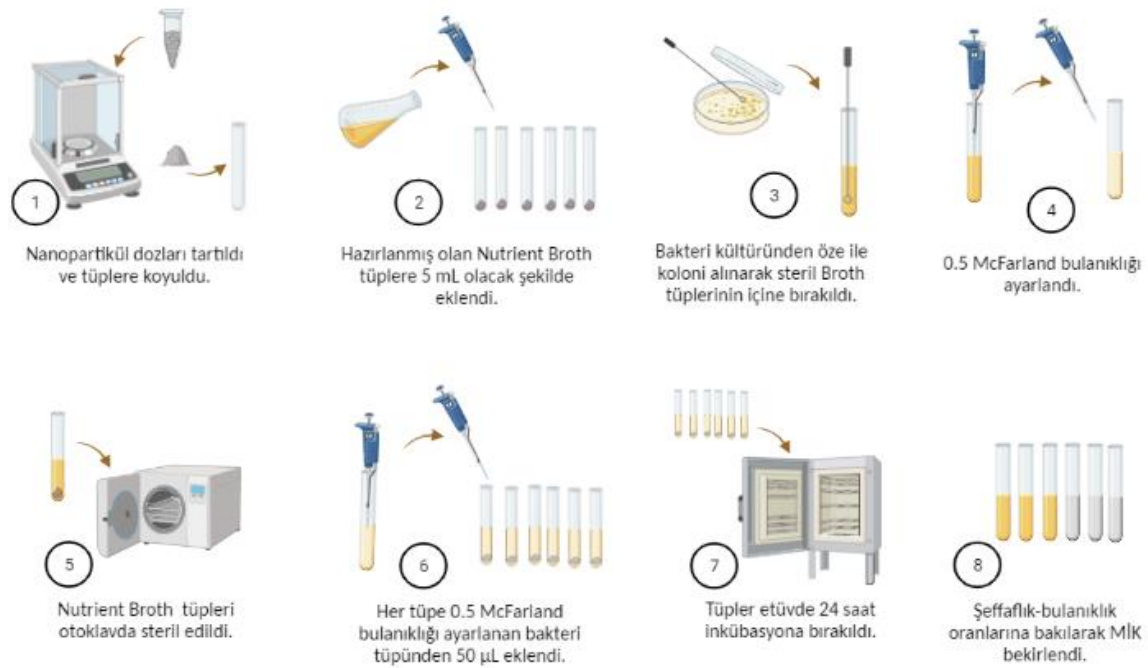
2.5 Antimikrobiyal Aktivite

Bakteri ve fungus gibi mikrobiyal organizmaların etkinliğini azaltan ve durduran aktiviteler antimikrobiyal aktivite olarak tanımlanmaktadır. Bir maddenin ya da etkenin antimikrobiyal etkinliğinin ölçülmesi amacıyla gerçekleştirilen testlere “Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri” (ADT) adı verilir. ADT; enfeksiyona sebep olan etkenlere karşı tedavi için antibiyotiklerin etkinlikleri ve dozları hakkında önemli bilgilerin elde edilmesini sağlamaktadır. Etkene yönelik uygun ve doğru antibiyotiğin seçiminde ADT uygulamaları oldukça önemlidir. Yaygın olarak kullanılan ADT arasında disk difüzyon testi, gradient difüzyon testi (E-test, MICE), katı ya da sıvı besiyerlerinde seyreltme olarak bilinen dilüsyon yöntemleri ve antimikrobiyal etkinlik gösteren maddeleri inhibe eden enzimlerin tespiti yer almaktadır (Behera vd. 2019).

2.5.1 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

Antimikrobiyal bir maddenin mikrobiyal gelişimini tamamen durdurduğu en düşük konsantrasyon MİK olarak adlandırılmaktadır. Katı agar veya sıvı besi ortamlarında antimikrobiyal dilüsyonlar kullanılarak MİK tayini yapılabilmektedir. MİK değerinin belirlenmesinde inkübasyon sıcaklığı ve inokulum miktarı gibi etkenler önemlidir. Bioscreen Microbiological Growth Analyzer ekipmanı ile eş zamanlı olarak çok sayıda mikroorganizma ve antimikrobiyal madde çalışılabilmektedir. Minimum bakterisidal

konsantrasyon (MBK), inokulumun %99.9'unu öldüren en düşük antibiyotik konsantrasyonudur. Minimum ölümcül konsantrasyon (MÖK) olarak da adlandırılan bir antibakteriyel ajanın MBK, son berrak MİK tüpünün büyüme ortamına alt kültürlenmesi ve bakteriyel büyümenin incelenmesiyle belirlenmektedir (Kim vd. 1995, Lambert ve Pearson 2000, Tassaou vd. 2004, Aslan 2019, İnt. Kyn. 10). MİK tespitine bir örnek Şekil 2.16'da gösterilmiştir.



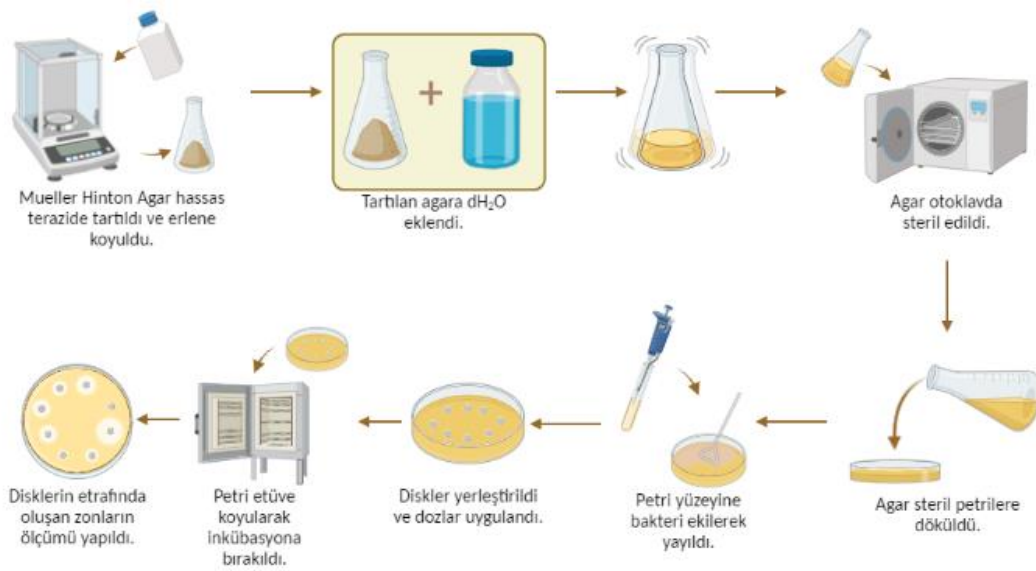
Şekil 2.16 MİK değerlerinin analizi.

2.5.2 Disk Difüzyon Testi

Disk difüzyon testi, antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu düşünülen ya da bilinen bir maddenin antimikrobiyal aktivitesini tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen ADT arasında yaygın kullanılan bir yöntemdir. Kirby-Bauer disk difüzyon testi olarak da bilinen bu teknik ilk kez 1961 yılında W.M.M. Kirby tarafından uygulanmaya başlanmıştır (Hudzicki 2009).

Bu yöntemde belirli miktarlarda antimikrobiyal etkinliği araştırılacak olan madde ile emdirilmiş kağıt diskler sterilize edilmiş bir pens yardımıyla mikroorganizmaların bulunduğu besiyerlerine yerleştirilerek kağıt disklerdeki antibiyotiğin,

mikroorganizmaların olduğu ortama difüze olması sağlanmaktadır. 18-24 saat süreyle ve 37°C’de inkübasyona bırakılan besiyerleri içindeki diskler çözünerek agara doğru difüze olmaktadır. Bir süre sonra ise antimikrobiyal maddenin inhibisyon konsantrasyonlarına erişen diskin çevresinde mikroorganizmanın gelişmediği berrak bir zon oluşmaktadır. Mikroorganizmanın çalışılan maddeye duyarlılığı ile disk çevresinde meydana gelen inhibisyon bölgesinin genişliği yakından ilişkilidir. Testin verimliliği açısından diskler konumlandırılırken petri kabı ile disk arasında 14 mm ve iki disk arasında 22 mm uzunluğunda mesafe ayarlanmalıdır (Fidan 2016). Şekil 2.17’de disk difüzyon testine ve inhibisyon zonunun çapının ölçümüne bir örnek verilmiştir.



Şekil 2.17 Disk difüzyon testi ve inhibisyon zonunun çapının ölçümü.

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kimyasallar

- Sisplatin (Sigma, USA)
- Çinko Asetat Dehidrat (Sigma, USA)
- DMEM High (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma, USA)
- DMSO (Dimetil sülfoksit) (Sigma, China)
- EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) (Sigma, USA)
- Etidyum Bromür (Vivantis, USA)
- Etil Alkol (Sigma-Aldrich, Germany)
- FBS (Fetal Bovine Serum) (Sigma, USA)
- PBS (Fosfat Saline Buffer) (Sigma, Germany)
- L-glutamin Solüsyonu (Sigma, USA)
- LMA (Low Melting Agarose) (Sigma, USA)
- MTT (3- (4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür) (Sigma, USA)
- Mueller Hinton Agar (Sigma, USA)
- NaCl (Sigma-Aldrich, Germany)
- NaOH (AppliChem, Germany)
- NMA (Normal Melting Agarose) (Sigma, USA)
- Nutrient Agar (Sigma, USA)
- Nutrient Broth (Sigma, USA)
- Penisilin / Streptomisin (Sigma, USA)
- Saf Su
- Siproflaksosin (Sigma, USA)
- Tripa Blue Solüsyonu (Sigma, USA)
- Tripsin-EDTA solüsyonu (Sigma, USA)
- Trisma Base (Sigma, USA)
- Triton X-100 (Sigma, USA)

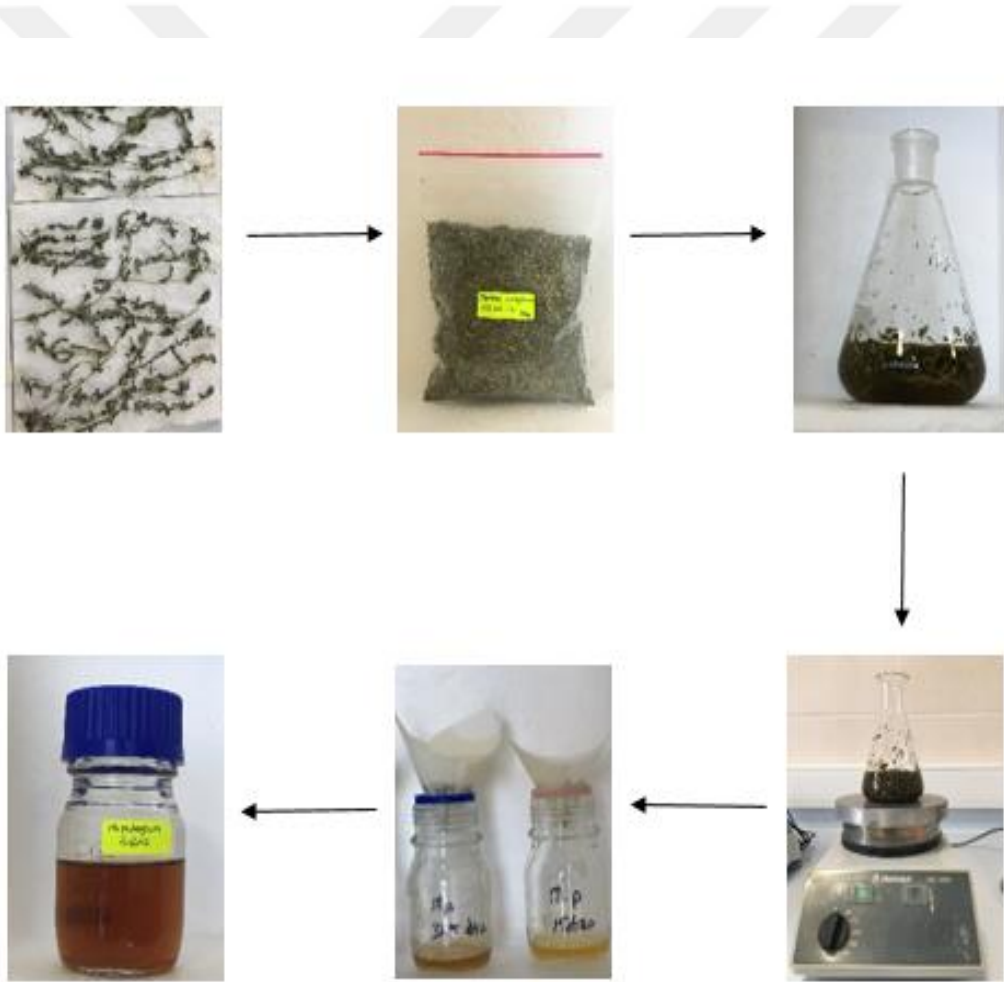
3.1.1 Cihazlar

- Azot Tankı
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- CO₂ İnkübatörü (Panasonic, Japan)
- Elektroforez (Thermo Scientific EC 1000-90, USA)
- ELISA Cihazı (Absorbance Reader Elx800)
- Etüv (Panasonic, Japan)
- Floresan Mikroskop (Olympus, Japan)
- Hassas Terazı (Sartorius, Germany)
- Hücre Görüntüleme Cihazı (JULI Br, Korea)
- Isıtıcı Plaka
- İnkübatör (Panasonic, Japan)
- Laminar Akım Kabini (JSR, Korea)
- Manyetik Karıştırıcı
- Mikroplak Okuyucu Spektrofotometre (μ -Quant, BioTek Instrument, USA)
- Otoklav (Jeio tech, Korea)
- Öğütücü (Warning Commercial Blender, Romania)
- pH Metre (Hanna instrument, Romania)
- Saf Su Cihazı (GFL 2102, Germany)
- Santrifüj (Hettich, Germany)
- Sıcak Su Banyosu (Mettmert WNB10, Germany)
- Ultrasonik Su Banyosu
- Ultraviyole-Görünür Spektroskopi (Uv-1700 Pharmaspec, Japan)
- Vakum Pompası (KNF Neuberger, Germany)
- Vortex (IKA, USA)

3.2 *Mentha pulegium* L. Bitkisinin Temini ve Bitki Ekstraktının Hazırlanması

Mentha pulegium L. bitkisinin toprak üstü kısımları, çiçeklenme döneminde Kırşehir ilinin Uzunaliuşağı köyünden, 2021 yılının ağustos ayında toplandı.

Bitkiler laboratuvar ortamında kurutuldu ve öğütücüden geçirilerek toz haline getirildi. Bir kaba alındı ve 5 gr *M. pulegium* L. bitkisi tartılıp behere koyuldu. Üzerine 100 mL dH₂O eklendi ve manyetik ısıtıcı üzerinde 60°C’de 15 dk boyunca bekletildi. Elde edilen bitki özütü daha sonra Whatmann No:1 filtre kâğıdından süzülerek deneyde kullanıma hazır hale getirildi ve çalışmada kullanılabilecek kadar +4°C’de saklandı.



Resim 3.1 Bitki ekstraktının hazırlanması.

3.3 Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1 Çinko Asetat Çözeltisinin Hazırlanması

Çizelge 3.1 0.1 M Çinko asetat çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
Çinko asetat	4.38 g
dH ₂ O	200 mL

Çinko asetat çözeltisi, çinko oksit nanopartiküllerinin sentezlenmesinde kullanılmak üzere 0.1 M olacak şekilde hazırlandı. Çinko asetat 4.38 gr tartılarak balon jojeye alındı. Üzerine dH₂O eklenerek 200 mL'ye tamamlandı.

3.3.2 Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisinin Hazırlanması

Çizelge 3.2 1 M NaOH çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
NaOH	20.0 g
dH ₂ O	500 mL

1 M NaOH çözeltisi hazırlamak için, 20.0 g NaOH hassas terazide tartılarak erlen içine koyuldu. Üzerine 500 mL dH₂O eklendi ve manyetik karıştırıcıda ısı uygulanmadan homojen bir şekilde karışana kadar bekletildi. Erlen parafilmle kapatılarak +4°C'de saklandı.

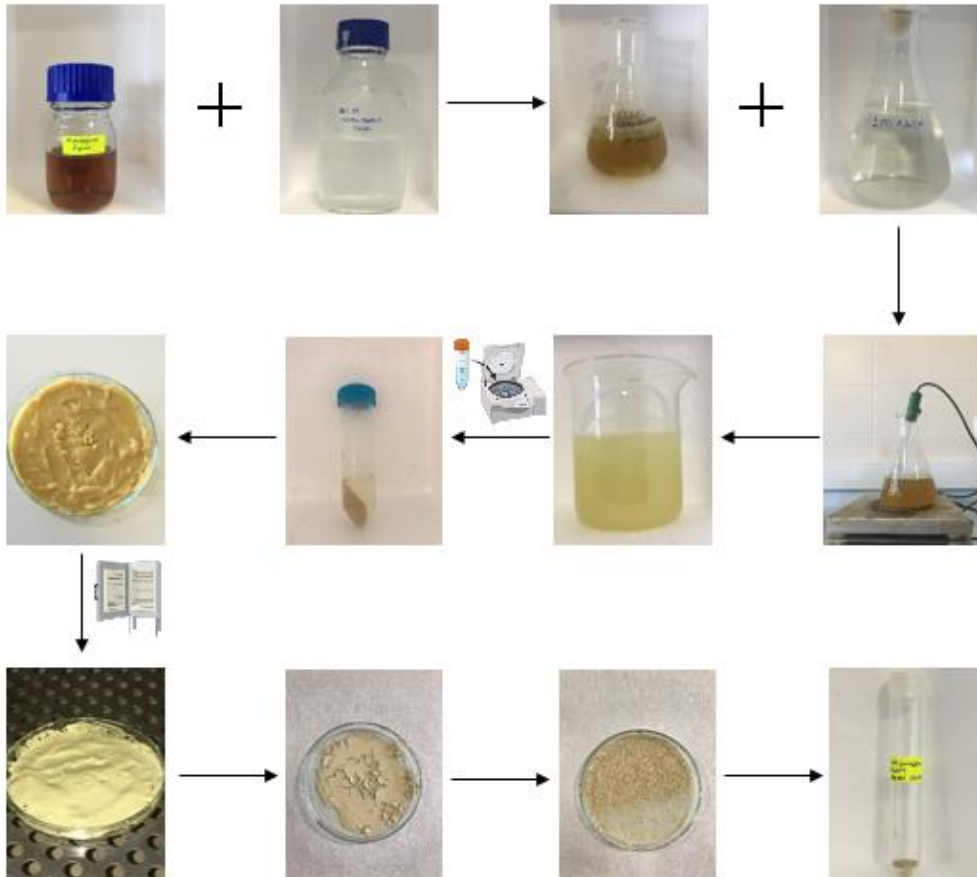
Çizelge 3.3 0.1 M NaOH çözeltisinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
NaOH	2.0 g
dH ₂ O	500 mL

2.0 g NaOH hassas terazide tartılıp üzerine 500 mL dH₂O eklendi ve manyetik karıştırıcı üzerinde ısı uygulanmadan homojen şekilde karışana kadar bekletildi. Erlen parafilm ile kapatılarak +4°C'de saklandı.

3.4 Çinko Oksit Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

Elde edilen bitki ekstraktından 20 mL alınarak bir behere koyuldu. Üzerine 100 mL çinko asetat çözeltisi eklendi. Isı uygulanmadan manyetik karıştırıcı üzerinde 1 saat karıştırıldı. Karışımın pH'ını ayarlamak için 1 M ve 0.1 M NaOH çözeltileri kullanıldı. Karışım 50 mL'lik falkonlara koyularak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj bittikten sonra süpernatant kısımları atıldı. Falkonların üzerine 5 mL dH₂O eklenerek tekrar santrifüj edildi. Bu şekilde iki kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Son olarak santrifüjden çıkan falkonların süpernatant kısımları atıldı ve üzerine 2 mL etanol eklenerek santrifüj edildi. Böylelikle karışımın saflığı sağlandı. Santrifüj sonrası süpernatant kısımları atılarak dipte kalan pellet kısımları cam petrilere ince bir tabaka halinde yayıldı. Petriler etüve koyularak 60°C'de 4 saat boyunca kurumaya bırakıldı. Pelletler kuruduktan sonra petrilerin yüzeyinden kazınarak falkonlara alındı. Çalışmalarda kullanılmak üzere oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda bekletildi.



Resim 3.2 Çinko oksit nanopartiküllerin hazırlanması.

3.5 Sentezlenen ZnO Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

ZnO nanopartiküllerin karakterizasyonu pH, UV-Vis Spektrum Analizi, FT-IR, XRD ve SEM testleri kullanılarak belirlendi.

3.5.1 pH Ölçümü

M. pulegium L. bitkisinin ekstraktının ve çinko asetat çözeltisinin manyetik karıştırıcı üzerinde homojen bir şekilde karıştığından emin olduktan sonra 1 M ve 0.1 M NaOH çözeltileri ile birlikte pH değeri ölçümü yapıldı.

3.5.2 UV-Vis Spektrum Analizi

Sentezlenmiş olan ZnO nanopartiküllerinin özellikleri, UV-1700 Pharmaspec cihazı aracılığıyla UV-Vis spektrumları 190 ve 900 nm aralığında ölçüm yapılarak belirlendi (Rad vd. 2019).

3.5.3 FT-IR Analizi

Sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin bağlanma özelliklerinin belirlenmesi, yapılan FT-IR analizi ile değerlendirildi. Bu karakterizasyon analizi 4000-400 cm^{-1} spektral aralık kullanılarak Perkin Elmer BX-II FTIR spektrometre cihazında gerçekleştirildi (Darvishi vd. 2019).

3.5.4 XRD Analizi

ZnO nanopartiküllerinin XRD desenleri, 1.5406 radyasyon dalga boyu ile Bruker marka D8 Advance model cihaz kullanılarak belirlendi. Elde edilen pikler 2θ açılarda kaydedildi. En üst seviyedeki pik konumları, kristal fazın belirlenmesi için standart ölçümlerle karşılaştırıldı (Rajeshkumar vd. 2018).

3.5.5 SEM Analizi

Toz haline getirilen ZnO nanopartiküllerinin taramalı elektron mikroskopik görüntüleri LEO 1430 VP model SEM cihazı ile incelendi. Parçacıkların büyüklüğü ve yapısal formu SEM analiz yöntemiyle kaydedildi (Rad vd. 2019).

3.6 Hücre Kültürü

Bu çalışma kapsamında öncelikle deney yapılacak ortam ve malzemeler steril edildi. Hücre kültürü çalışmalarında kontaminasyon riski yüksek olduğundan dolayı cihaz ve kimyasalların sterilizasyonuna ekstra özen gösterildi ve A549 hücre hattı kullanıldı. İnkübatörün, yapılan işlemlerin tamamında 37°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ seviyesinde olmasına dikkat edildi. Böylelikle hücrelerin üremesi için optimum koşullar sağlandı. Deney süresince çalışmada kullanılan kimyasal, çözelti ve dozlar sıcak su banyosunda 37°C’de bekletildi. Santrifüj cihazı kullanıldığı tüm işlemlerde 800 rpm’de 5 dakika çalıştırıldı.

3.6.1 Malzemelerin Sterilizasyonu

Deneylerde kullanılacak olan pipet uçları ve dH₂O otoklav cihazında 121°C’de 15 dakika steril edildi. Deney ortamında kullanılacak cihazlar %70’lik alkol ile silinerek steril olması sağlandı. Çalışma yapılmadığı zamanlarda UV lamba kullanılarak laboratuvar ortamı ve biyogüvenlik kabini steril edildi.

3.6.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

Hücrelerin yeterli besinleri alarak çoğalabilmesi için gerekli olan besiyeri, 0.22 µm gözenek boyutunda olan vakum pess membran filtre ile hazırlandı. Besiyeri hazırlanmasında kullanılacak olan Fetal Bovine Serum (FBS) %10 (v/v) oranında, penisilin/streptomisin %1 (v/v) oranında ve L-glutamin %1 (v/v) oranında eklendi.

500 mL’lik (DMEM) High Glukoz besiyeri, pess membran filtre içine alındı. Sonra üzerine 50 mL FBS, 5 mL penisilin/streptomisin ve 5 mL L-glutamin eklendi. Filtre

vakum pompasına bağlanarak çalıştırıldı ve besiyerinin süzülmesi sağlandı. Hazırlanmış olan besiyeri, steril 50 mL'lik falkonlara alınarak +4°C'de saklandı. Çalışma yapılacağı zaman 37°C'de sıcak su banyosunda en az 30 dakika bekletilerek kullanıldı.

3.6.3 A549 Hücrelerinin Çözdürülmesi ve Ekilmesi

Sıvı azot tankı içinde donuk halde saklanan hücreler çıkartılarak 15 dakika -20°C'de bekletildi. Sonra sıcak su banyosunda bir iki dakika bekletilerek buzunun çözülmesi sağlandı ve kabin içine alındı. 15 mL'lik falkona 1 mL besiyeri koyularak üzerine çözünmüş tüpteki hücrenin tamamı eklendi. Yavaş bir şekilde pipetaj yaparak hücre ve besiyerinin karışması sağlandı. Falkon santrifüj cihazına koyularak 800 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj işlemi sonrasında falkonun üst kısmında kalan besiyeri, dip kısmında biriken hücreleri hareket ettirmeden atık kabına atıldı. Dipteki hücrelerin üzerine 1 mL besiyeri koyulup pipetaj yapılarak tekrar 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden çıktıktan sonra tekrar üstte kalan besiyeri atılarak 1 mL besiyeri eklendi ve ekim işlemi için hazır hale getirildi.

Ekim yapılacak flask 25 cm² boyutunda ise 4 ile 7 mL arası besiyeri, 75 cm² boyutunda ise 7 ile 10 mL arası besiyeri flask içine koyuldu. Falkon içindeki hücreler pipet ile alınarak flask içindeki besiyerine homojen bir şekilde yayıldı. Ekim yapılmış olan flask, hücrelerin üreyebilmesi için inkübatöre kaldırıldı.

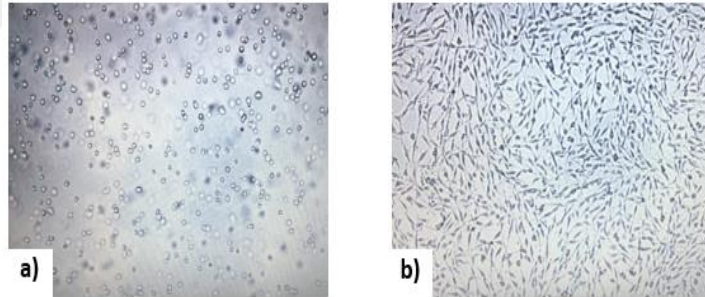
3.6.4 A549 Hücrelerinin Pasajlanması

A549 hücreleri, inkübatörden çıkarılarak görüntüleme cihazında flask tabanındaki üreme/yapışma oranına bakıldı. Bu oran en az %80-90 olduğunda hücre pasajı işlemine başlandı.

- Pasaj için besiyeri, FBS ve Tripsin-EDTA sıcak su banyosunda bekletilerek ısınması sağlandı ve kabin içine alındı. Flaskın içindeki besiyeri atık kabına atıldı.
- Flaska 3 mL Tripsin-EDTA koyularak hücrelerin flask yüzeyinden kalkması için inkübatörde 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda flask, görüntüleme cihazına

alınarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığına bakıldı. Ayrılmamışsa flaska yavaş bir şekilde vurularak ayrılması sağlandı.

- Flask kabine alındı ve içinde var olan 3 mL Tripsin-EDTA'nın üzerine 1:1 oranında olacak şekilde 3 mL besiyeri eklendi. Sonra flaskın içindeki hücre, besiyeri ve Tripsin-EDTA karışımı falkona alınarak santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi sonrasında falkonun üst kısmında olan besiyeri, dip kısmındaki hücreleri hareket ettirmeden pipetle alınarak atıldı.
- Dipteki hücrelerin üzerine 1 mL besiyeri koyularak yavaş bir şekilde pipetaj yapıldı ve tekrar santrifüj edildi.
- Santrifüjden çıktıktan sonra üstteki besiyeri atılarak dipteki hücrelerin üzerine 1 mL besiyeri koyularak yavaşça pipetaj yapıldı.
- 25 cm² boyutundaki flaskın içine 4-7 mL arası besiyeri koyuldu ve üzerine falkon içindeki hücre-besiyeri karışımından pipet ile 500 µL çekilerek homojen bir şekilde flaskların yüzeyine eklendi.
- Pasajlanmış olan flasklar inkübatöre koyuldu.



Resim 3.3 (a) A549 hücrelerinin flaska ekildiği andaki görüntüsü, (b) A549 hücrelerinin inkübasyon sonrası pasaja hazır haldeki görüntüsü.

3.6.5 Tripan Blue Boyama Yöntemi ile Hücre Sayımı

İnkübatörden alınan flask, görüntüleme cihazına koyularak hücrelerin üreme/yapışma oranına bakıldı. Bu oran %80-90 olduğu zaman boyama yöntemiyle hücre sayımı gerçekleştirildi.

- Flask kabine alınarak içindeki besiyeri atık kabına atıldı. Flaskın içine 3 mL Tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin yüzeyden ayrılması için inkübatörde 5 dakika bekletildi.

- Hücrelerin flask tabanından ayrılması sağlandıktan sonra içinde var olan 3 mL Tripsin-EDTA'nın üzerine 1:1 oranı olacak şekilde 3 mL besiyeri eklendi ve falkona alınarak santrifüj işlemi yapıldı.
- İşlem sonrasında falkonun üst kısmındaki besiyeri atık kabına atıldı ve dipteki hücrelerin üzerine 1 mL besiyeri eklenerek tekrar santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası falkonun üst kısmındaki besiyeri atılarak dipteki hücrelerin üzerine 1 mL besiyeri eklendi ve yavaş bir şekilde pipetaj yapıldı.
- Ependorf tüp içerisine 90 µL besiyeri, 10 µL Tripan Blue ve 10 µL falkon içindeki hücre-besiyeri karışımı eklendi. Pipetaj yapılarak tamamen karışması sağlandı.
- Thoma lamı görüntüleme için hazırlandı ve ependorf tüp içindeki karışımdan 10 µL alınarak koyuldu.
- Thoma lamı görüntüleme cihazında incelenerek canlı hücrelerin sayısı belirlendi.
- Canlı hücrelerin sayısı hesaplanırken;

$$(\text{Toplam hücre sayısı (mL)} = \text{ortalama hücre sayısı} \times 10^4 \times \text{dilüsyon faktörü})$$
 formülü kullanıldı.

3.6.6 A549 Hücrelerinin Dondurularak Sıvı Azotta Saklanması

Flasktaki hücrelerin üreme/yapışma oranına görüntüleme cihazında bakıldı ve bu oran %80-90 olduğunda hücre dondurma işlemi için kullanılacak olan kriyotüp -20°C'ye koyuldu. Flasktaki besiyeri atık kabına döküldü ve flaska 3 mL Tripsin-EDTA koyulup inkübatörde 5 dakika bekletilerek hücrelerin tabandan ayrılması sağlandı. Sonra flaskta var olan Tripsin-EDTA'nın üzerine 1:1 oranında 3 mL besiyeri eklendi ve falkona alındı. Hücreler santrifüj edildi ve sonrasında üstteki besiyeri atık kabına dökülerek uzaklaştırıldı. Dipteki hücrelerin üzerine 1 mL besiyeri koyulup yavaşça pipetaj yapılarak santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası, üstteki besiyeri atılarak dipteki hücrelerin üzerine 750 µL besiyeri eklendi ve yavaş bir şekilde pipetaj yapıldı.

-20°C'de bekletilen kriyotüp kabin içine alındı ve falkon içerisinde hazırlanmış olan 750 µL hücre-besiyeri karışımı kriyotüpe koyuldu. Sonra kriyotüp içine 675 µL FBS eklendikten sonra 75 µL DMSO yavaş yavaş ilave edildi. Kriyotüp, -20°C'de 15 dakika bekletildikten sonra sıvı azot tankına kaldırıldı.

3.7 MTT Yöntemi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi

Bu çalışmada A549 hücrelerinin MTT yöntemi ile hücre canlılığı belirlenirken 24 ve 48 saatlik gözlemler yapıldı. Bu 24 ve 48 saatlik gözlemler için yapılan işlemlerin sırası ve kullanılan kimyasalların miktarları aynı tutuldu. Yapılan ölçümlerde hücrelerin canlılık oranları ve ölüm oranları karşılaştırılarak LD₅₀ dozları belirlendi.

3.7.1 MTT'nin Hazırlanması

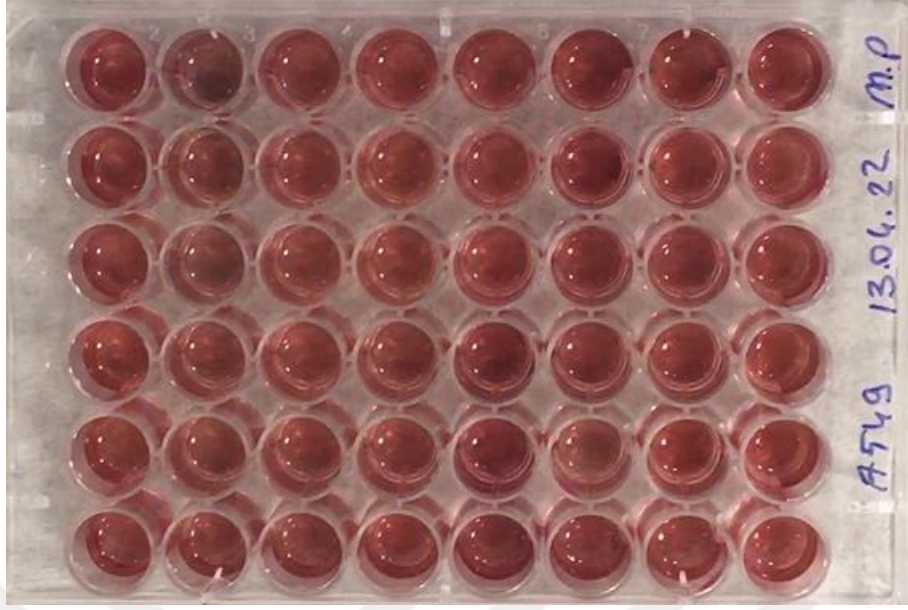
Toz halde olan MTT kimyasalı, hassas terazi üzerinde 10 mg tartıldı ve 10 kat seyreltilmiş olan Fosfat Buffer Salin (PBS) 10 mL eklenerek homojen şekilde çözünmesi sağlandı. Hazırlanan MTT solüsyonu, steril falkon içerisine 0.22 µm membran filtre kullanılarak aktarıldı. Çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de bekletildi.

3.7.2 MTT Yöntemi ile *Mentha pulegium* L. Ekstraktı ve Çinko Oksit Nanopartikülünün LD₅₀ Dozunun Belirlenmesi

Flasktaki hücrelerin üreme/yapışma oranı %80-90 olduğunda, 3 mL Tripsin-EDTA kullanılarak inkübatörde bekletilen hücrelerin flask tabanından ayrılması sağlandı. Hücrelere 3 mL besiyeri eklenerek santrifüj edilip üst kısımdaki besiyeri atık kabına atıldı. Falkona 1 mL besiyeri eklenerek tekrar santrifüj yapıldı. Falkonun üst kısmındaki besiyeri atık kabına atılıp dipteki hücrelerin üzerine 1 mL besiyeri eklendi. Böylelikle hücreler well plaka ekimi için hazır hale getirildi.

- MTT solüsyonu, canlılık analizinde kullanılmak üzere uygun sıcaklığa gelmesi için 37°C'deki sıcak su banyosuna koyuldu.
- Steril petri, kabine alınarak içerisine 20 mL besiyeri eklendi.
- Sonra thoma lamında sayılarak hesaplanan hücre sayısı kadar hücre-besiyeri karışımı, ekim için hazır edilmiş olan falkondan alınıp petrideki besiyerine koyuldu.
- Petrideki hücre dağılımının homojen olması için pipetaj yapıldı.

- 48'lik well plakanın her kuyucuğuna petriden 400 µL hücre-besiyeri karışımı alınarak ekildi.
- Well plaka inkübatörde 24 saat bekletildi ve hücrelerin üreme/yapışma oranı %50-60 olduğunda doz uygulaması yapıldı.
- Bitki ekstraktı, *M. pulegium* L. tartılıp dH₂O ile demleme yapılarak *M. pulegium* L. ekstraktı (MPE) hazırlandı.
- Dozlar MPE25 (25 mg/mL), MPE18.5 (18.5 mg/mL), MPE12.5 (12.5 mg/mL), MPE7.5 (7.5 mg/mL), MPE5 (5 mg/mL), MPE2.5 (2.5 mg/mL) ve MPE1.25 (1.25 mg/mL) konsantrasyonlarında hazırlanarak kuyucuklara 4 µL uygulama yapıldı.
- Nanopartikül dozları (NP) hassas terazide tartılıp DMSO eklenerek hazırlandı.
- Dozlar NP5 (5 mg/mL), NP3.75 (3.75 mg/mL), NP2.5 (2.5 mg/mL), NP1.5 (1.5 mg/mL), NP1 (1 mg/mL), NP0.5 (0.5 mg/mL) ve NP0.25 (0.25 mg/mL) konsantrasyonlarında hazırlanarak kuyucuklara 4 µL uygulama yapıldı.
- Hücrelere kontrol grubu için kuyucuktaki besiyerinin %1'i oranında DMSO kullanılırken, pozitif kontrol grubu için ise yine besiyerinin %1'i oranında sisplatin uygulandı.
- Doz uygulamalarının sonrasında well plakalar 24 ve 48 saatlik gözlemler için inkübatöre koyuldu.
- 24 saat sonrasında well plakanın tüm kuyucuklarına %10 oranında olacak şekilde 40 µL MTT solüsyonu eklenerek 3 saat inkübatörde bekletildi. 48 saatlik gözlem için de aynı işlem uygulandı.
- Well plakalar inkübatörden alındıktan sonra tabandaki hücrelere temas etmeden üst kısımdaki sıvı karışımı pipetle çekilerek atık kabına atıldı.
- Tüm kuyucuklara 400 µL DMSO eklenerek well plakanın 1-2 dakika çalkalayıcı üzerinde karışması sağlandı.
- Plaka, ELISA mikropalak okuyucu spektrofotometre kullanılarak 540 nm absorbans değerinde ölçümler yapıldı.



Resim 3.4 ZnO nanopartikülü ve *M. pulegium* L. ekstraktı uygulanan A549 hücrelerinin MTT görüntüsü.

3.8 Komet Yöntemi ile Genotoksisitenin Belirlenmesi

Bu çalışmada hücrelere doz uygulaması yapılarak, hücrelerde oluşmuş ya da oluşabilecek DNA hasarının 24 ve 48 saatlik sonuçları gözlemlendi. 24 saatlik gözlem için yapılan çalışmadaki işlem sırası, 48 saatlik çalışmada da aynı şekilde uygulandı.

Çalışma öncesi, çalışmada kullanılacak çözeltiler ve kimyasallar aşağıda verilen çizelgelerde belirtildiği gibi hazırlandı. Elektroforez tankı ve preparatların yerleştirileceği düz kutular, buzdolabında bekletilerek çalışma zamanına kadar soğuması sağlandı.

Çizelge 3.4 Elektroforez tamponunun hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı
NaOH	6.0 g
EDTA	0.18 g
dH ₂ O	500.0 mL

NaOH ve EDTA, hassas terazide tartılıp cam bir şişeye koyuldu ve üzerine 500 mL dH₂O eklendi. Homojen bir şekilde elde edilen çözeltinin pH'nın 13.2 olması sağlandı. Çözelti +4°C'de çalışma zamanına kadar saklandı.

Çizelge 3.5 Nötralizasyon çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı
Trizma Base	14.55 g
dH ₂ O	300.0 mL

Trizma Base, hassas terazide tartılarak cam bir şişeye koyuldu ve üzerine 300 mL dH₂O eklendi. Homojen olarak hazırlanan çözeltinin pH'ının 7.5 olması sağlandı.

Çizelge 3.6 Lizis çözeltisinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı
Trizma Base	0.6 g
EDTA	18.6 g
NaCl	73.5 g
Triton X-100	5.0 mL
DMSO	50.0 mL

Trizma Base, EDTA ve NaCl hassas terazide tartılarak balon jojeye koyuldu. Üzerine dH₂O eklenerek son hacmi 500 mL'ye tamamlandı. Homojen olması sağlanan çözelti, çalışma zamanına kadar +4 C'de bekletildi. Çalışmadan 1 saat önce oda sıcaklığına alınıp üzerine çözelti miktarının %1'i oranında olacak şekilde 5 mL Triton X-100 ve %10'u oranında olacak şekilde 50 mL DMSO eklendi. Çözeltinin pH'ının 10 olması sağlandı.

Çizelge 3.7 NMA hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı
NMA	0.03 g
PBS	3.0 mL

%1 oranında hazırlanacak olan NMA, hassas terazide tartılıp cam bir tüpe koyuldu. Üzerine 10 kat dilüe edilmiş olan PBS'den 3 mL eklendi. Cam tüp bek alevi üzerinde tutularak şeffaf bir NMA elde edilmesi sağlandı. Lamlar, ısıtıcı tabla üzerinde el yakmayacak kadar ısıtıldıktan sonra üzerine 110 µL NMA dökülüp pipetin uç kısmı ile ince tabaka halinde yayıldı. Hazırlanan lamlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Çizelge 3.8 LMA hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı
LMA	0.016 g
PBS	2.0 mL

%8 oranında hazırlanacak olan LMA, hassas terazide tartılıp cam bir tüpe koyuldu. Üzerine 10 kat seyreltilmiş olan PBS'den 2 mL eklendi. Cam tüp, bek alevi üzerinde tutularak saydam bir LMA elde edildi. Çalışma sırasında da sıcak su içerisinde bekletilerek jel haline gelmesi engellendi.

Çizelge 3.9 Etidyum bromür hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı
Etidyum bromür	0.01 g
dH ₂ O	50.0 mL

Etidyum bromür hassas terazide tartılarak steril bir falkon içine koyuldu. Üzerine 50 mL dH₂O eklenerek çözünmesi sağlandı. Falkon +4°C'de bekletildi ve çalışmada kullanılmak üzere 10 kat seyreltildi.

Bu çalışma için flasklara ekilip 24 saat inkübe edilen hücreler %80-90 oranında üreme/yapışma gösterdiği zaman, flasktaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra Tripsin-EDTA eklenerek hücrelerin tabandan ayrılması sağlandı. Falkona alınan tripsin-hücre karışımı santrifüj edilerek hücrelerin saflaşması gerçekleştirdi. Steril bir petri içine 20 mL besiyeri koyuldu. Daha sonra thoma lamında bakılıp belirlenen hücre sayısı kadar hücre-besiyeri karışımı falkon içerisinden alınarak petriye eklendi. 24'lük well plakanın her kuyucuğuna 800 µL ekim yapılarak inkübe edildi. Bu süre sonunda, MTT yöntemi ile belirlenmiş olan LD₅₀ dozları ile birlikte seçilen NP50 (5 mg/mL), NP37.5 (3.75 mg/mL) ve NP25 (2.5mg/mL) konsantrasyonlarındaki nanopartikül dozları ve *M. pulegium* L. ekstraktının MPE25 (25 mg/mL), MPE18.5 (18.5 mg/mL) ve MPE12.5 (12.5 mg/mL) konsantrasyonlarındaki dozları kuyucuk hacminin %1'i oranında uygulanıp 24 saat inkübatörde bekletildi. Aynı işlemler 48 saatlik gözlem için yapılan çalışmada da uygulandı.

- İnkübatörde beklemesi gereken sürenin sonunda well plaka dışarı alınarak kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırıldı ve dipteki hücreler kazıyıcı ile kazındı.
- Kuyucuklara 250 µL PBS eklendikten sonra tamamı çekilerek ependorfa alındı ve 1000 rpm’de 3 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi sonrası üst kısmı az miktarda çekilerek atıldı. Dipte biriken hücrenin yoğunluğuna bakılıp 10-12 µL çekilerek boş bir ependorf içine koyuldu ve 100-110 µL LMA ile karışması sağlandı.
- Ependorfun içindeki hücre-LMA karışımının tamamı çekilerek NMA yayılmış olan lamaların üzerine damlatıldı.
- Lamaların üzerine lamel kapatıldıktan sonra buz kasetlerinin üstünde 4-5 dakika kadar bekletilerek damlatılan örneklerin sabitlenmesi sağlandı. Bu süre sonunda lameller dikkatli ve özenli bir şekilde kaydırılarak çıkarıldı.
- Lamalar, düz kutulara dizilerek üzerini tamamen kaplayacak şekilde lizis çözeltisi döküldü ve 1 saat boyunca buzdolabında tutuldu.
- Bu süre sonunda lamalar, pens ile kutu içerisinden alınarak elektroforez tankına yerleştirildi ve lamaların üzerini kaplayacak şekilde elektroforez tamponu eklendi.
- 20 dakika bekledikten sonra tanka bağlı olan güç kaynağı çalıştırılarak 25 V ve 300 mA’de elektroforez işlemi gerçekleştirildi.
- İşlemden sonra lamalar nötralizasyon tamponu ya da dH₂O kullanılarak yıkandı ve 70 µL etidyum bromür damlatılıp lamelle kapatıldı.
- Boyanan lamalar, floresans mikroskop altında incelenerek her bir doz için 100 hücre sayımı yapıldı.

3.9 Antimikrobiyal Aktivite

Yeşil sentez yoluyla elde edilen ZnO nanopartiküllerin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla *Escherichia coli* (ATTC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATTC 29213), *Candida albicans* (ATTC 90028), *Klebsiella pneumoniae* (ATTC 700603) ve *Salmonella enteritidis* (ATTC 13076) mikroorganizma suşları kullanıldı. Suşlar her iki deneyde de kullanılmak üzere öncelikle Nutrient Broth sıvı besiyerine ekildi ve üremeleri için 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

3.9.1 Kullanılacak Malzemelerin Sterilizasyonu

Deneyde kullanılacak erlen, beher, pens, cam tüp ve pipet ucu otoklav cihazında 121°C’de 15 dakika süresince steril edildi. Eküvyon, drigalski, plastik petri ve antibiyogram diski steril paket içerisinde olup tek kullanımlık malzeme olarak kullanıldı.

3.9.2 Besiyeri ve Çözelti Hazırlanması

3.9.2.1 Nutrient Broth Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

Çizelge 3.10 Nutrient Broth sıvı besiyerinin hazırlanması.

Kimyasal	Miktarı
Nutrient Broth	4.0 g
dH ₂ O	500.0 mL

Sıvı besiyerini hazırlamak için Nutrient Broth tartılıp üzerine dH₂O eklenerek erlende homojen karışım elde edildi. Cam tüplerin her birinin içine 5 mL olacak şekilde serolojik pipet kullanılarak aktarıldı. Otoklav cihazına yerleştirildi ve 121°C’de 15 dakika süresince steril edildi. Çalışmada kullanılabilmesi için optimum sıcaklığa ulaşması beklendi.

3.9.2.2 Nutrient Agar Katı Besiyerinin Hazırlanması

Çizelge 3.11 Nutrient Agar katı besiyerinin hazırlanması

Kimyasal	Miktarı
Nutrient Broth	4.0 g
Nutrient Agar	7.5 g
dH ₂ O	500.0 mL

Katı besiyerini hazırlamak için Nutrient Broth ve Nutrient Agar tartıldı. Karışım 1000 mL’lik erlen içine koyuldu ve üzerine 500 mL dH₂O eklenerek homojen olması sağlandı. Sonra otoklav cihazına yerleştirildi ve 121°C’de 15 dakika süresince steril edildi.

Çalışma yapılacak alan %70'lik alkol ile steril edilerek plastik petriler steril alan üzerine dizildi. Besiyeri optimum sıcaklığa ulaştığında, bek alevinin yanında petrilere yaklaşık 20-22 mL olacak şekilde döküldü. Oda ısısında bir gün bekletilerek homojen bir şekilde katılaşması sağlandı. Uygulama zamanı kullanılmak üzere +4°C'de bekletildi.

3.9.2.3 Antibiyotik Çözeltisinin Hazırlanması

500 mg Siproflaksosin tableti havanda ezilerek toz haline getirildi ve erlen içine alındı. Üzerine 100 mL dH₂O eklendi. Erlen manyetik karıştırıcının üzerine alındı ve ısı uygulanmadan homojen bir şekilde karışana kadar bekletildi.

3.9.3 Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Belirlenmesi

- Minimum inhibisyon konsantrasyonunu (MİK) belirlemek için 24 saat öncesinde inkübasyona bırakılmış olan bakteri suşları sıvı besiyeri içerisinde 0.5 McFarland standardına ayarlandı.
- Daha sonra bu suşlara uygulanacak ZnO nanopartiküllerin dozları hesaplandı.
- İnhibisyonu belirleyebilmek için 50 mg/mL, 40 mg/mL, 30 mg/mL, 25 mg/mL, 20 mg/mL, 15 mg/mL, 12.5 mg/mL, 10 mg/mL, 7.5 mg/mL, ve 5 mg/mL olmak üzere toplam 10 doz belirlendi.
- Dozlar hassas terazide tartılıp cam tüplere alınarak her tüpe eşit miktarda olacak şekilde 5 mL Nutrient Broth koyuldu ve tüpler otoklav cihazında steril edildi.
- Steril edilen tüpler optimum sıcaklığa ulaştığında tüplere broth miktarının %1'i olacak şekilde 50 µL 0.5 McFarland standardına ayarlanmış bakteriler eklendi ve 24 saat etüvde inkübasyona bırakıldı.
- İnküasyon sonrasında cam tüplerde şeffaflık ve bulanıklık oranına bakılarak MİK değeri belirlendi.

3.9.4 Disk Difüzyon Yöntemi

Bu çalışmada disk difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite belirlenirken 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar değerlendirildi. Pozitif kontrol grubu için antibiyotik olarak Siproflaksosin kullanılırken, negatif kontrol grubu için dH₂O kullanıldı.

- ZnO nanopartiküllerin bakteri suşları üzerindeki etkisini belirlemek için ilk olarak 24 saat öncesinde inkübasyona bırakılmış olan bakteri suşları, sıvı besiyerinde 0.5 McFarland standardına ayarlandı.
- Daha sonra suşlara uygulanacak dozlar hesaplandı ve hassas terazide tartım işlemi yapıldı. Dozlar ependorflara alınarak üstüne 250 µL DMSO eklendi.
- Dozlar çalışmaya başlamadan 1 saat önce ultrasonik su banyosuna koyuldu ve dozların homojen bir şekilde karışımı elde edildi.
- Dozların aktivitesini belirleyebilmek için 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL ve 62.5 mg/mL, 31.2 mg/mL ve 15.6 mg/mL olmak üzere toplam 6 doz belirlendi.
- Uygulama yapılacak petriler kodlandı ve her bir katı besiyerinin yüzeyine 0.5 McFarland standardına ayarlanmış olan bakteri suşları 500 µL olacak şekilde ekim yapıldı.
- Petrilerin yüzeyine antibiyogram diskleri yerleştirildi. Disklere pozitif kontrol için 5 mg/mL antibiyotik, negatif kontrol için dH₂O ve uygulama dozlarından ise 10'ar µL uygulandı.
- Petriler etüvde 37°C'de inkübasyona bırakılarak 24, 48 ve 72 saatlik uygulamaların sonuçları ölçüldü.

3.10 İstatistiksel Analiz

Bu tez çalışmasındaki tüm deneyler en az üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı. MTT yöntemi kullanılarak elde edilen veriler % oranı olacak şekilde ifade edildi. LD₅₀ dozlarının belirlenmesinde probit analizi kullanılırken, komet çalışmasında gözlemlenen değerler Duncan testi kullanılarak ve anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edilerek yapıldı.

4. BULGULAR

4.1 ZnO Nanopartiküllerinin Sentezi

ZnO nanopartiküllerinin sentezinde *M. pulegium* L. bitkisinin ekstraktı ve 0.1 M çinko asetat çözeltisi karıştırılıp santrifüj işlemleri yapıldıktan sonra petri yüzeyine yayılarak etüvde kuruması sağlandı. Nanopartikül eldesi sırasında, ilk önce sarı olan rengin beyaza yakın bir renge dönüştüğü görüldü. Daha sonra kazınarak, 1.09 g nanopartikül elde edilmiş olup eppendorf tüpe alınarak oda sıcaklığında saklandı.

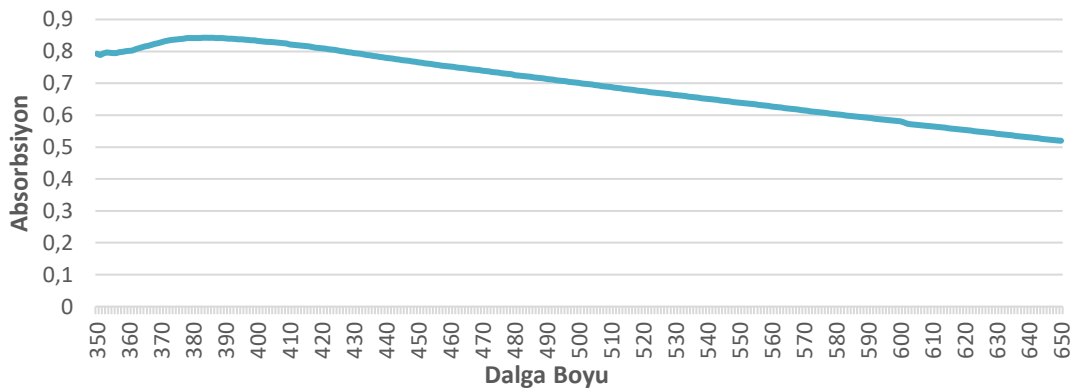
4.2 ZnO Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

4.2.1 pH Ölçümü Sonuçları

Elde edilen *M. pulegium* L. bitkisinin ekstraktı ve çinko asetat çözeltisi karıştırılarak ilk pH ölçümü 5.98 olarak saptandı. 1 M ve 0.1 M NaOH çözeltileri kullanılarak son pH değeri ölçümü 11.68 olarak belirlendi.

4.2.2 UV-Vis Analizi Sonuçları

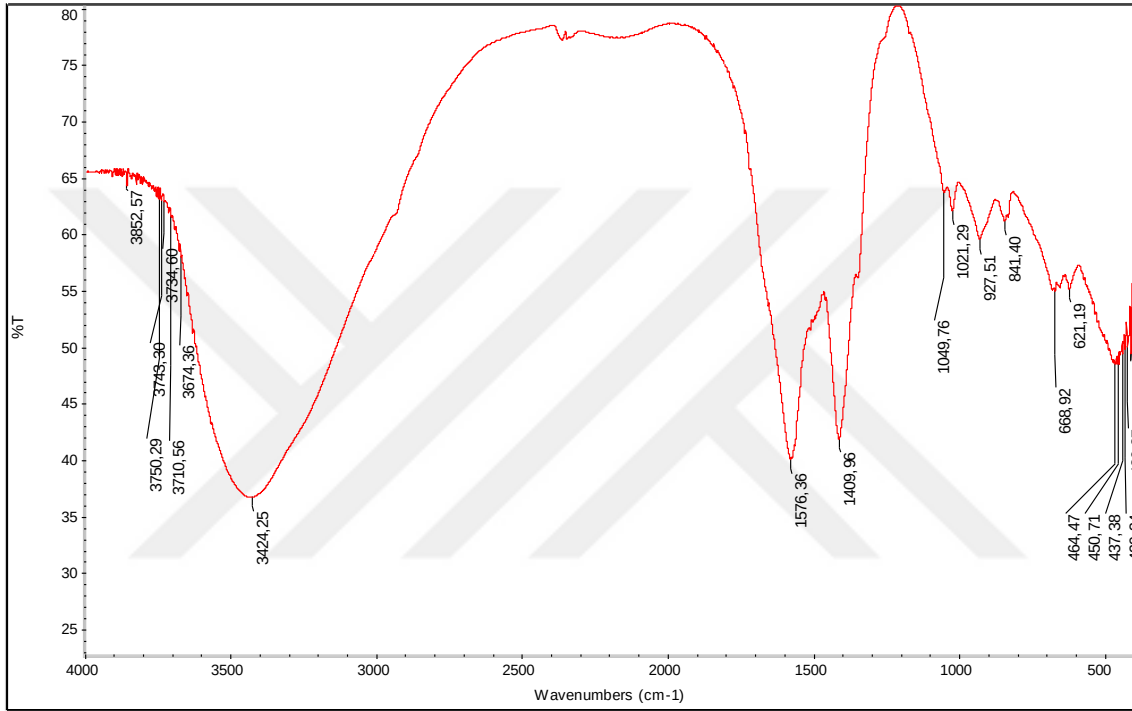
M. pulegium L. bitkisinin ekstraktı ve çinko asetat çözeltisi karıştırılarak sentezlenen ZnO nanopartiküller, 350 ve 650 nm aralığında ölçüm yapılarak UV-Vis spektrumları incelendi. Maksimum seviyedeki absorbans değeri 385 nm olarak belirlendi.



Şekil 4.1 ZnO nanopartiküllerinin UV-Vis sonucu.

4.2.3 FT-IR Analizi Sonuçları

Sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin FT-IR analizi 4000 cm^{-1} ve 400 cm^{-1} aralığında yapılmış olup 464 cm^{-1} 'de absorpsiyon bandı görüldü. 3424 cm^{-1} 'de görülen pik O-H gerilme titreşimleri, 1576 cm^{-1} 'de görülen pik C-O titreşimleri ve 1409 cm^{-1} 'de görülen pik aromatik C-C titreşimlerinin olduğu belirlendi (Rad vd. 2019, Erol vd. 2023).



Şekil 4.2 ZnO nanopartiküllerinin FT-IR sonucu.

4.2.4 XRD Analizi Sonuçları

Sentezlenen ZnO nanopartiküllerin XRD analizinde kristal yapısı ve boyutları incelendi. 2θ yansıma açısında ve 1.5406 dalga boyunda ölçüm yapıldı. Elde edilen pikler 100 (31.77°), 002 (34.42°), 101 (36.25°), 102 (47.53°), 110 (56.60°), 103 (62.86°), 200 (66.38°), 112 (67.96°), 201 (69.10°), 004 (72.56°) ve 202 (76.95°) olarak belirlendi. Bu ölçüm sonuçları literatürdeki ZnO nanopartikülünün JCPDS (36-1451) 2θ açılarıyla karşılaştırıldığında uyumlu bulundu. 2θ açısında en şiddetli pik 36.253 olarak belirlendi. Gözlemlenen pikler ve kristal boyutunun 28.16 nm olması, numunenin saf ZnO

nanopartikülü olduğunu doğruladı. Partikül boyutu hesaplanırken Deybe-Scherrer denklemi (5.1) kullanıldı.

$$d = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (5.1)$$

d = Partikülün boyutu (nm)

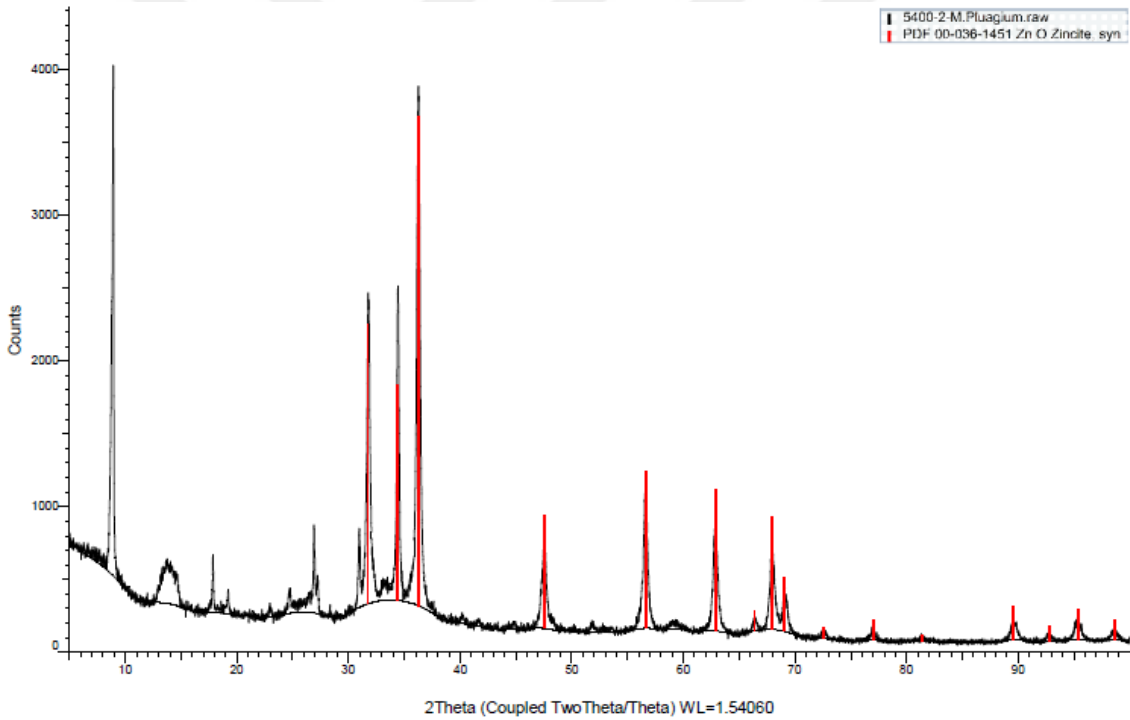
K = Deybe Scherrer sabiti (0.94)

λ = X-ışınının dalga boyu (1.54 Å°)

β = Maksimum pikin yarı uzunluğunun genişliği (FWHM)

θ = Maksimum pikin 2θ değerinden elde edilen Bragg açısıdır.

(Vijayaraghavan ve Ashokkumar 2017, Bozkurt 2022)

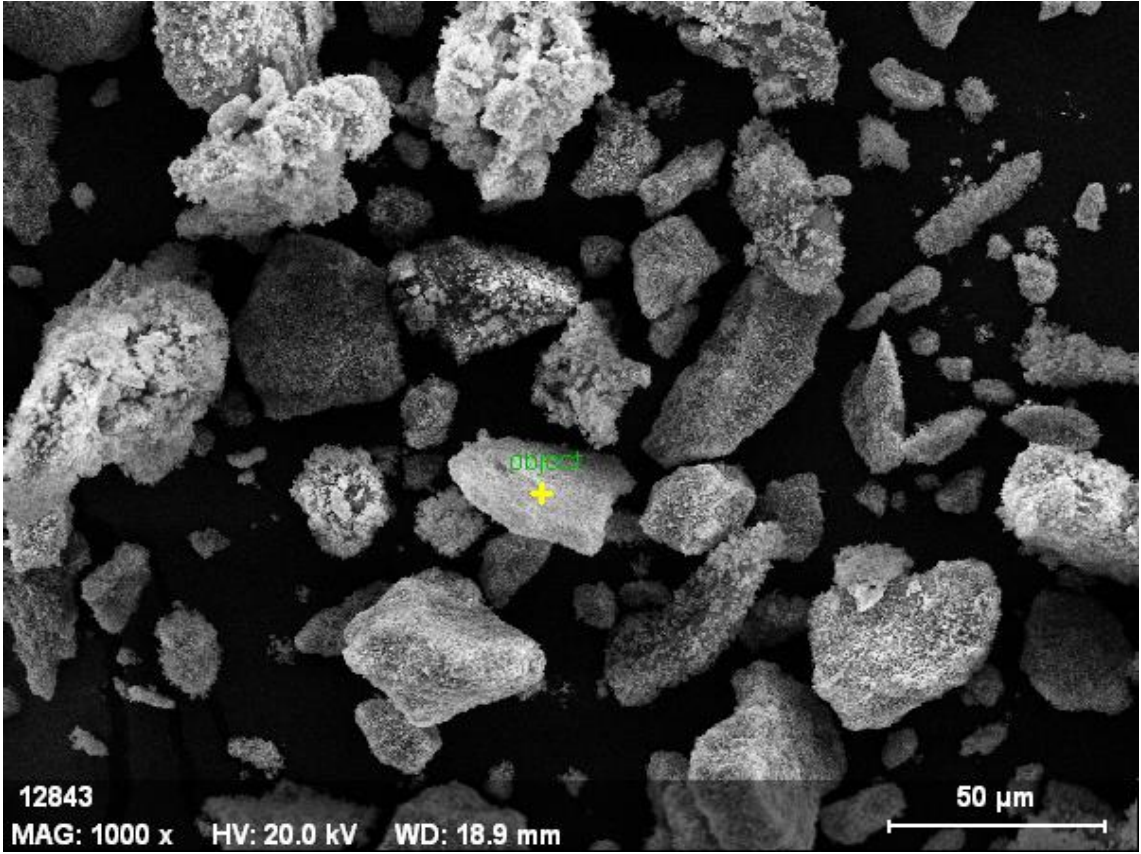


Şekil 4.3 ZnO nanopartiküllerinin XRD sonucu.

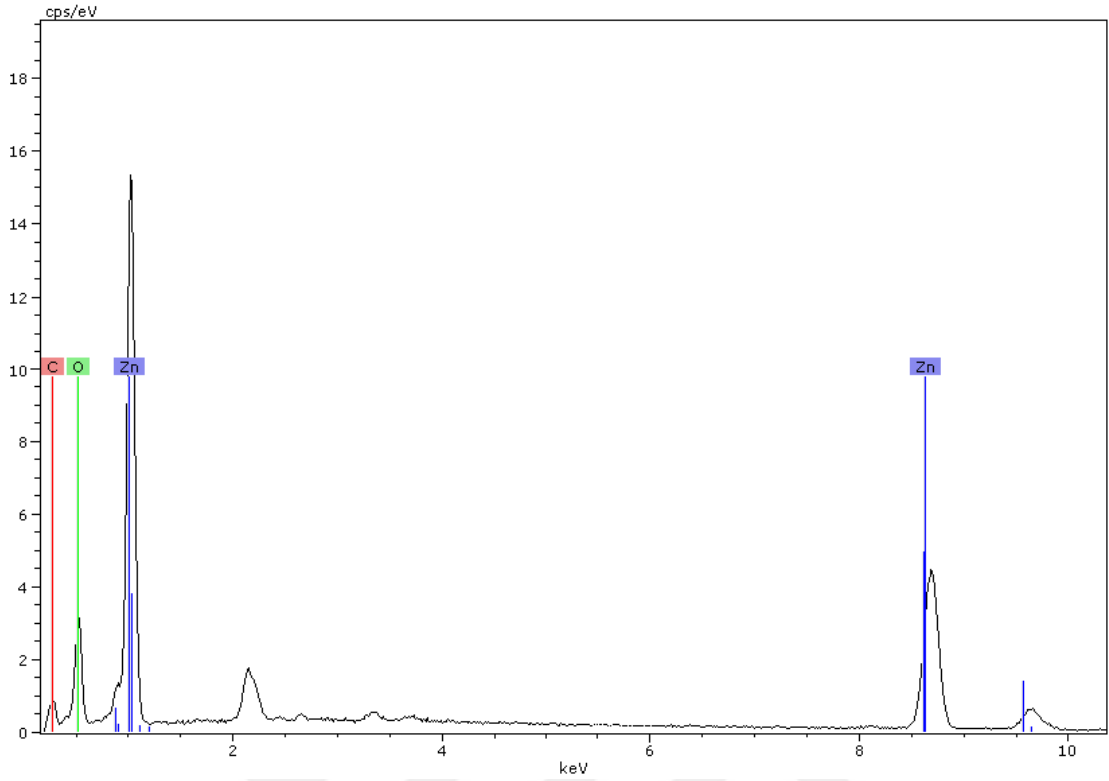
4.2.5 SEM Analizi Sonuçları

ZnO nanopartiküllerin SEM analizi sonrası elde edilen sonuçlarda küresel şekilde olduğu belirlendi. Sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin analizinde yapılan EDX ölçümleri sonrası kütesel olarak Zn atomu için %61.45 oranı görülürken O atomu için %30.76 oranı

ve C atomu için de %7.80 oranı görüldü. Analizin atomik değerlerine bakıldığında Zn atomu %26.77 oranında görülürken O atomu için %54.75 oranı ve C atomu için de %18.49 oranı görüldü. SEM analizi sırasında partikül boyutları farklılık göstermiş olup, ölçümlerdeki en şiddetli pikin 28.16 nm boyutundaki partiküle ait olduğu belirlendi ve Şekil 4.4’de verildi. Morfolojik olarak küresel, yüzeyi düz yapılı ve karakteristik özelliği olan altıgen şekline sahiptir.



Şekil 4.4 ZnO nanopartiküllerinin SEM sonucu.



Şekil 4.5 ZnO nanopartiküllerinin EDX sonucu.

4.3 Sitotoksosite Sonuçları

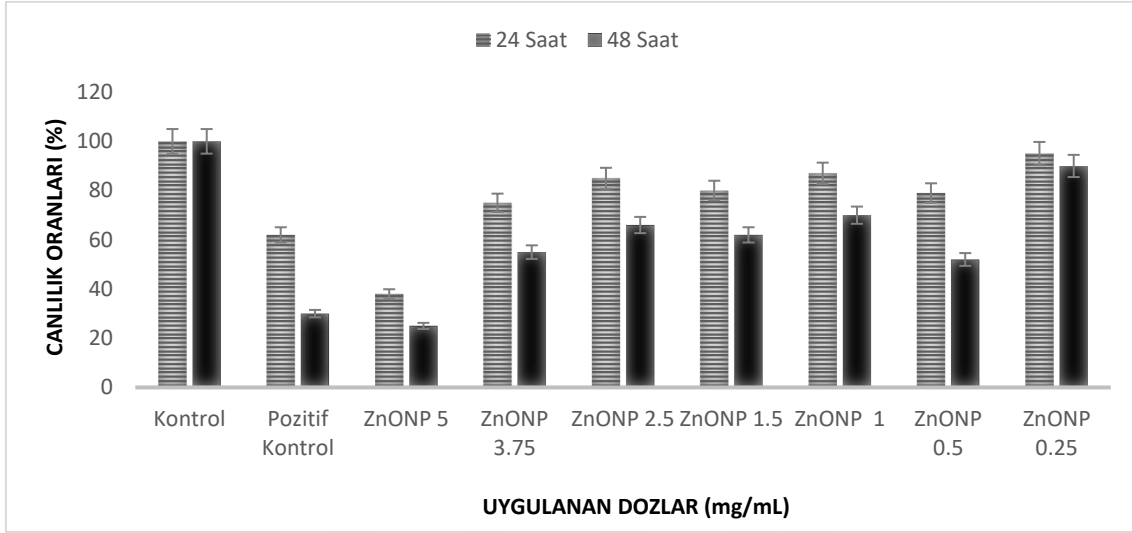
A549 hücreleri, *M. pulegium* L. ekstraktı ve ZnO nanopartikül dozlarına maruz bırakıldı. Oluşan sitotoksik etkiler 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda gözlemler yapılarak 540 nm’de ölçümler yapılarak belirlendi.

4.3.1 MTT Testi

A549 hücrelerine, *M. pulegium* L. ekstraktının 7.5-25 mg/mL aralığındaki yedi farklı konsantrasyonu ve ZnO nanopartikülünün 1.5-5 mg/mL aralığındaki yedi farklı konsantrasyonu uygulandı. Kontrol grubu ve pozitif kontrol grubu da dahil olmak üzere toplamda on altı farklı grubun ölçümleri alındı.

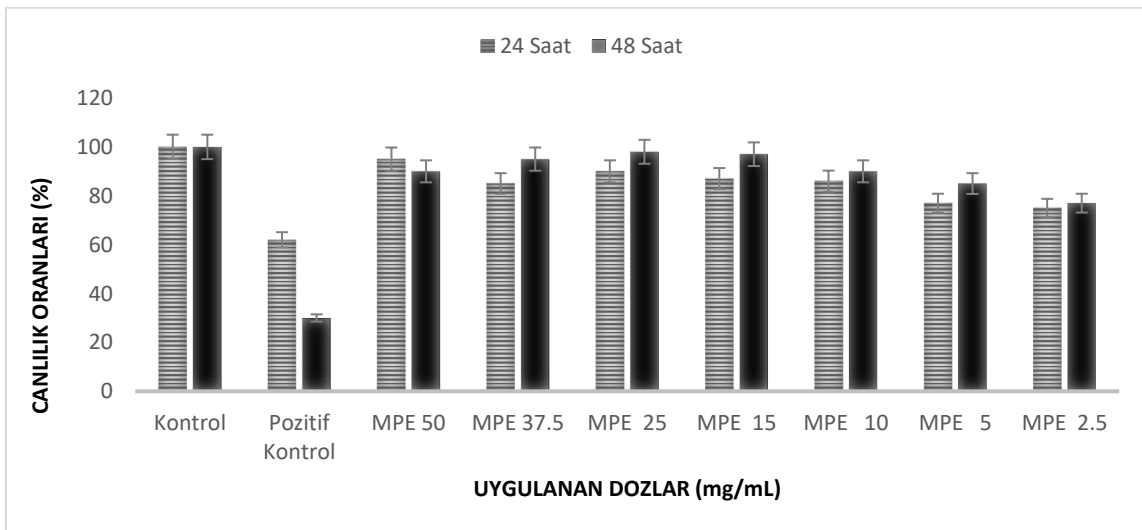
Sentezlenen ZnO nanopartikülleri (ZnONP), A549 hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulandı. Nanopartikül dozlarının yüzde hücre canlılığının azalmasında en az etkiyi 0.25 mg/mL dozu gösterirken, en fazla etkiyi 5 mg/mL dozu gösterdi. Uygulanan tüm

nanopartikül dozlarının, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığını azalttığı görüldü. ZnO nanopartiküllerinin A549 hücreleri üzerindeki LD₅₀ değeri 5 mg/mL olarak belirlendi. Sitotoksik etkilerinin 24 ve 48 saatlik sonuçları Şekil 4.6’da gösterildi.



Şekil 4.6 ZnO nanopartiküllerinin (ZnONP) MTT sonucu.

M. pulegium L. ekstraktı (MPE), A549 hücrelerine yedi farklı konsantrasyon olacak şekilde uygulandı ve en fazla hücre canlılığını azaltan dozun 2.5 mg/mL olduğu görüldü. MPE dozlarının hücre canlılığına etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yüzde canlılık oranını düşürdüğü görüldü. Bu uygulama sonrası MPE’nın sitotoksik etkilerinin 24 ve 48 saatlik sonuçları Şekil 4.7’de gösterildi.



Şekil 4.7 *M. pulegium* L. ekstraktının (MPE) MTT sonucu.

4.4 Genotoksisite Sonuçları

DNA hasarı analizi için A549 hücreleri, bitki ekstraktı ve ZnO nanopartikül dozlarına maruz bırakılarak ölçümleri yapıldı.

4.4.1 Komet Testi

A549 hücrelerine, *M. pulegium* L. bitkisinin ekstraktının (MPE) 12.5-25 mg/mL aralığındaki üç farklı konsantrasyonu ve ZnO nanopartikülünün (ZnONP) 2.5-5 mg/mL aralığındaki üç farklı konsantrasyonu uygulandı. Bitki ekstraktı ve nanopartikül dozlarına ek olarak kontrol grubu ve pozitif kontrol grubunda da genotoksik etkilerine bakıldı.

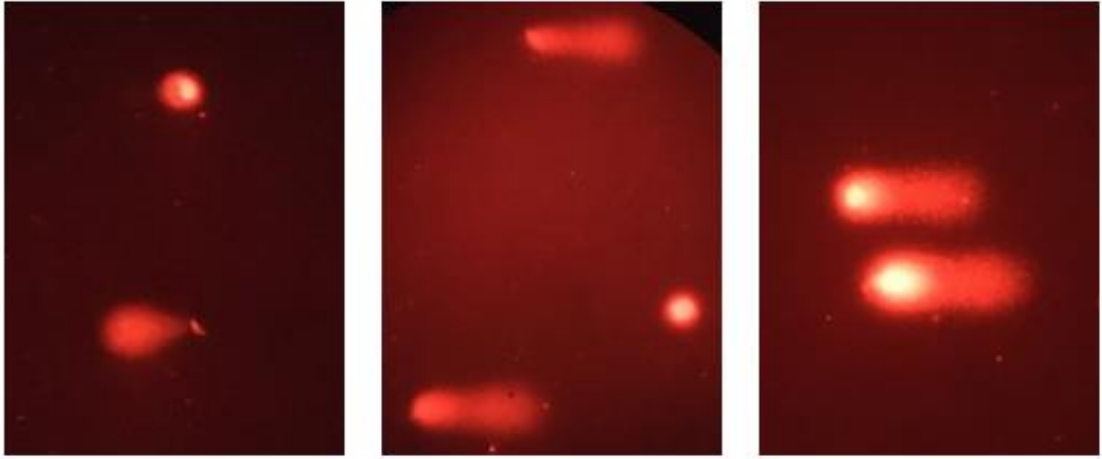
Çizelge 4.1 A549 hücrelerinde Komet yöntemi ile DNA hasarının belirlenmesi.

Uygulama	Konsantrasyon (mg/mL)	DNA Hasarı (Arbitrary Unit)	
		Ortalama $\pm$ Standart Sapma	
		24 Saat	48 Saat
Kontrol	-	31.00 $\pm$ 3.00 ^a	38.67 $\pm$ 0.58 ^{ac}
Pozitif Kontrol	0.5	52.33 $\pm$ 14.50 ^c	46.67 $\pm$ 11.55 ^c
ZnONP 50	5	55.00 $\pm$ 7.55 ^c	63.00 $\pm$ 13.00 ^d
ZnONP 37.5	3.75	60.67 $\pm$ 3.79 ^c	66.67 $\pm$ 10.79 ^b
ZnONP 25	2.5	17.67 $\pm$ 6.51 ^b	16.67 $\pm$ 1.53 ^b
MPE 50	25	31.67 $\pm$ 2.52 ^{ab}	28.33 $\pm$ 3.51 ^{ab}
MPE 37.5	18.5	26.67 $\pm$ 3.79 ^{ab}	25.33 $\pm$ 5.03 ^{ab}
MPE 25	12.5	21.00 $\pm$ 3.00 ^a	22.33 $\pm$ 2.52 ^b

* Sütunlarda belirtilen harfler $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde önemlidir (Duncan dağılım testi).

Sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin A549 hücreleri üzerindeki DNA hasarının en yüksek değeri (66.67 $\pm$ 10.79), 48 saatlik sonuçlarda 3.75 mg/mL doz uygulamasında görüldü. Bu sonuca en yakın bir diğer DNA hasarı (60.67 $\pm$ 3.79), 24 saatlik 3.75 mg/mL

doz uygulamasında görüldü. En az DNA hasarının görüldüğü değer (16.67 ± 1.53), 48 saatlik sonuçlarda 2.5 mg/mL doz uygulamasında belirlendi. Bu çalışmada kullanılan nanopartikül dozları, bitki dozlarına kıyasla A549 hücreleri üzerinde daha fazla DNA hasarı gösterdi.



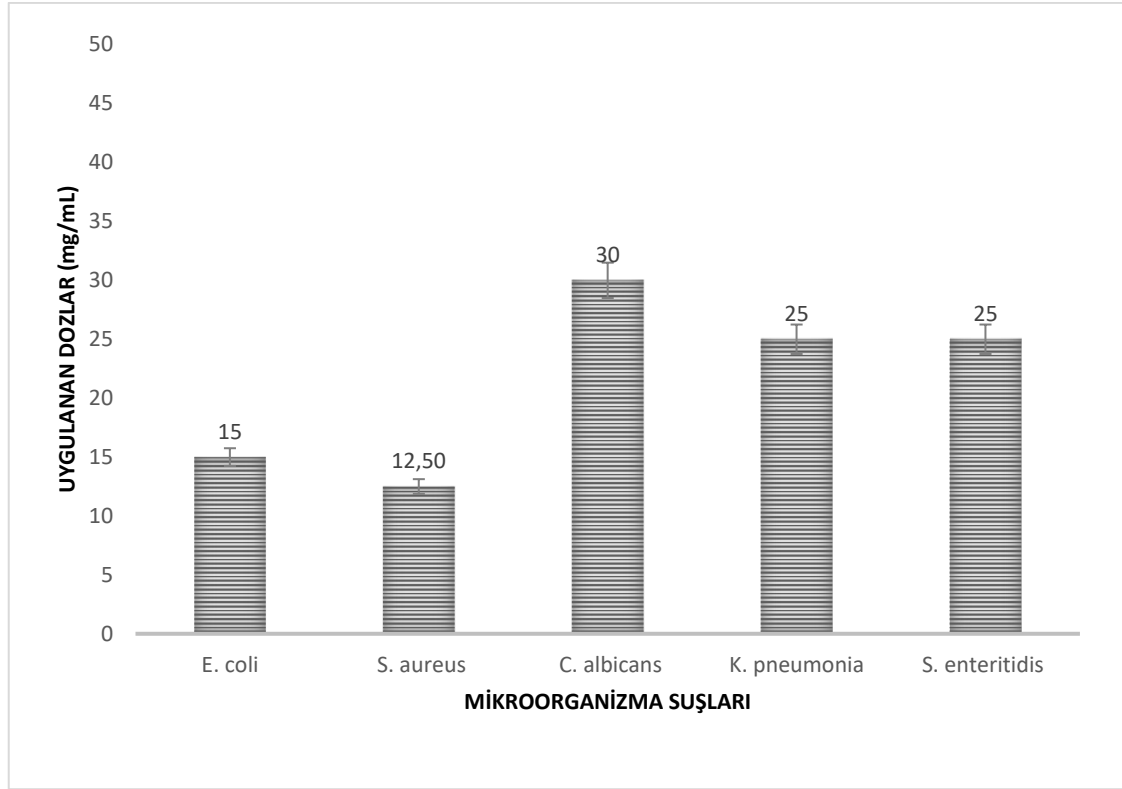
Resim 4.1 *M. pulegium* L. ekstraktının ve ZnO nanopartiküllerinin A549 hücre hattı üzerindeki etkilerinin Komet görüntüleri.

4.5 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

ZnO nanopartiküllerinin antimikrobiyal aktivitesi, MİK testi ve disk difüzyon testi kullanılarak belirlendi.

4.5.1 MİK Testi

ZnO nanopartiküllerinin MİK değeri, kullanılan *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *K. pneumoniae* ve *S. enteritidis* mikroorganizma suşlarına uygulanan dozlar sonucunda elde edilen veriler değerlendirilerek, nanopartiküllerin bakteri suşlarının üremelerini belirli oranlarda inhibe edici etkiye sahip olduğu görüldü. Bakteri suşlarının her birine 50 mg/mL, 40 mg/mL, 30 mg/mL, 25 mg/mL, 20 mg/mL, 15 mg/mL, 12.5 mg/mL, 10 mg/mL, 7.5 mg/mL, ve 5 mg/mL olmak üzere toplam on doz uygulandı. Bu dozların bakteri suşları üzerindeki etkisi ve MİK değerleri Şekil 4.8’de verildi.



Şekil 4.8 MİK sonuçları.

ZnO nanopartikülleri, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *K. pneumoniae* ve *S. enteritidis* mikroorganizma suşlarına on farklı konsantrasyonda uygulandı. MİK değerleri sırasıyla 15, 12,5, 30, 25 ve 25 mg/mL olarak belirlendi. Verilere göre inhibisyon değeri en yüksek *C. albicans*'da görülürken, en düşük *S. aureus*'da görüldü.

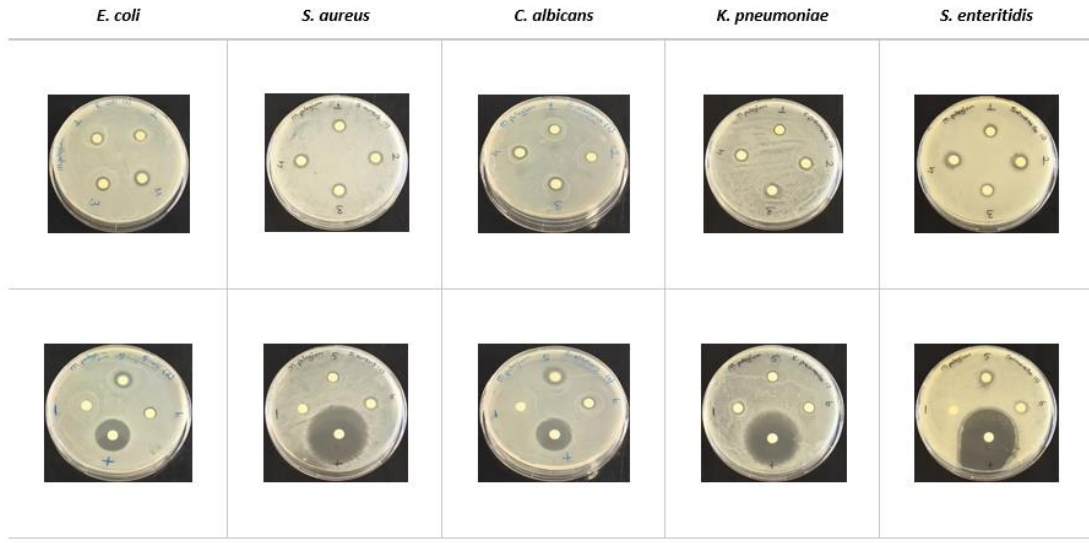
4.5.2 Disk Difüzyon Testi

ZnO nanopartikülleri, farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *K. pneumoniae* ve *S. enteritidis* mikroorganizma suşlarına uygulandı. Uygulanan dozların bu suşlara karşı gösterdiği etkiler ölçülerek belirlendi. ZnO nanopartiküllerinin bakteri suşlarına etkisine bakıldığında, nanopartiküllerin farklı oranda antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirlendi.

Çizelge 4.2 ZnO nanopartiküllerinin disk difüzyon testi inhibisyon zonlarının ölçüm sonuçları (mm).

Bakteri Suşları		Uygulanan Doz (mg/mL)						
		500	250	125	62.5	31.2	15.6	(+)
<i>E. coli</i>	24 saat	8±1.15	8.3±1.45	9.3±1.2	9±0.5	11.3±1.2	9±0.5	22±0
	48 saat	8±1.15	8.6±1.2	10±1	9.6±0.3	12.3±1.2	9.6±0.3	22.3±0.3
	72 saat	8.3±0.8	9±1.15	10.3±1.2	10±0	13±0.57	10±0.57	22.3±0.3
<i>S. aureus</i>	24 saat	10±0.57	9.6±0.33	9±0.57	9.33±0.3	9±0.57	8.6±0.6	22.6±0.6
	48 saat	10±0.57	10±0	9.33±0.6	9.6±0.3	9±0.57	9.3±0.6	22.6±0.6
	72 saat	10±0.57	10±0	9.6±0.3	10±0.57	9±0.57	10±0.57	22.6±0.6
<i>K. pneumoniae</i>	24 saat	9.6±0.3	10.3±0.3	9±0.57	9.6±0.3	8.3±0.3	8.6±0.3	22.3±0.3
	48 saat	10±0	10.6±0.3	9.3±0.6	9.6±0.3	8.6±0.3	9±0	22.3±0.3
	72 saat	10±0	10.6±0.3	9.6±0.3	9.6±0.3	9±0	9.3±0.3	22.3±0.3
<i>S. enteritidis</i>	24 saat	10.3±0.6	11.6±0.8	9.3±0.3	10.6±0.3	11.3±1.45	8.3±0.6	22.6±0.3
	48 saat	11.3±0.8	11.6±0.8	9.6±0.3	11±0	11.6±1.2	9±0	22.6±0.3
	72 saat	12.3±0.6	12±0.57	10±0	11.3±0.3	12±1	9±0	22.6±0.3
<i>C. albicans</i>	24 saat	7.3±0.3	7.6±0.3	9±0.57	10±0.57	10.6±0.8	8.6±0.8	22.6±0.3
	48 saat	8±0.57	8.3±0.3	9.6±0.3	10.6±0.3	12±1.15	9.6±0.8	23±0
	72 saat	8.3±0.3	8.6±0.3	9.6±0.3	11±0.5	12.6±0.6	10±0.5	23±0

ZnO nanopartikülleri, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *K. pneumoniae* ve *S. enteritidis* mikroorganizma suşlarına altı farklı konsantrasyonda uygulandı. Verilere göre en yüksek inhibisyon zonu *E. coli*’nin 31.2 mg/mL dozunun 72 saatlik uygulamasında görülürken, en düşük inhibisyon zonu ise yine *C. albicans*’ın 72 saatlik uygulamasının 31.2 mg/mL dozunda saptandı.



Resim 4.2 Farklı bakteri suşları üzerinde ZnO nanopartikülünün antimikrobiyal aktivitesinin görüntüleri.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

M. pulegium L. içeriğindeki birçok biyoaktif madde sayesinde alternatif tıpta hastalıkların tedavisinde oldukça yaygın olarak kullanılan bir bitki olup, toprak üstü kısımlarından soğuk algınlığı, akciğer enfeksiyonları, gıda zehirlenmeleri, kolera ve sinüzit gibi pek çok hastalığın tedavisinde uzun yıllardır faydalanılmaktadır. Buna bağlı olarak bu bitki üzerinde çeşitli deneysel çalışmalar yapılmakta ve farklı metotlar kullanılarak bitkinin hedef organizma ve hücreler üzerindeki etki mekanizmasına bakılmaktadır. Bu çalışmada *M. pulegium* L. bitkisinin hem yeşil sentez yoluyla elde edilen ZnO nanopartikülü hem de sulu ekstraktı kullanılmış olup bu iki metot arasından en yüksek seviyede aktivite gösteren formunun hangisi olduğunun araştırılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında, *M. pulegium* L. bitkisinin ekstraktı kullanılarak ZnO nanopartikülleri sentezlendi. Sentez sonrasında karakterizasyon analizleri, sitotoksosite testi, genotoksosite testi ve antimikrobiyal aktivite testleri yapıldı.

Bu çalışmada ZnO nanopartikülünün sentezinde kullanılan *M. pulegium* L. bitkisinin ekstraktı, kurutulmuş olan bitki yapraklarından 5 g tartılıp 100 mL dH₂O ile kaynatıldıktan sonra filtre kâğıdı ile süzülerek elde edildi.

Mata ve arkadaşları (2007), ZnO nanopartikülünün sentezinde kullanılan *M. pulegium* L. bitkisinin sulu ekstraktını hazırlarken 5 g kurutulmuş bitkiyi 100 mL dH₂O ile 20 dakika kaynatmış ve ardından süzerek kullanıma hazır hale getirmiştir. Çalışmada *M. pulegium* L. bitkisinin sulu ekstraktının ve etanol ekstraktının etkilerine bakılmıştır. Çalışma sonucunda bu iki ekstrakt karşılaştırıldığında sulu ekstraktın daha aktif olduğunu görmüşlerdir (Mata vd. 2007). Darvishi ve arkadaşları (2019), ZnO nanopartikülünün sentezi için *Juglans regia* L. bitkisinin kurutulmuş yapraklarından 2 g tartıp 100 mL dH₂O ile karıştırmıştır. Daha sonra 5 dakika 100°C’de ısıtmıştır ve filtre kâğıdı ile süzmüştür (Darvishi vd. 2019). Rad ve arkadaşları (2019), ZnO nanopartiküllerinin sentezinde kurutulan *M. pulegium* L. yapraklarından 5 g tartarak 100 mL dH₂O ile karıştırmıştır. Daha sonra 60°C’de 10 dakika kaynatarak filtre kâğıdından süzmüşlerdir (Rad vd. 2019). Elumalai ve arkadaşlarının (2023) kullandığı yöntemle göre ZnO nanopartikül sentezinde

20 g kurutulmuş *Moringa oleifera* yaprakları 100 mL çift dH₂O ile 60°C’de 20 dakika kaynatılmış ve filtre kâğıdından süzölmüştür (Elumalai vd. 2023). Majeed ve arkadaşları (2019), kurutulmuş *Artocarpus heterophyllus* yapraklarını 4 g tartarak 100 mL dH₂O ile karıştırmıştır. 10 dakika 60-80°C’de kaynatarak soğumaya bırakmış ve ardından filtre kâğıdı ile süzmüşlerdir (Majeed vd. 2019). Bu kaynaklarda göröldüğü gibi prosedürler üzerinde küçük farklılıklar olsa da genel hatlarıyla bu tezde uygulanan yöntemle benzer teknikler ile bitki ekstraktlarının eldesi sağlanabilmektedir.

Bu çalışmada ZnO nanopartikülleri elde edilirken 20 mL *M. pulegium* L. ekstraktı ile 100 mL çinko asetat çözeltisi karıştırıldıktan sonra pH’ı 11.63’e ayarlanıp santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında pellet kısımları petrilere yayılarak etüvde kurumaya bırakılmıştır.

Rad ve arkadaşları (2019) yaptığı çalışmada ZnO nanopartiküllerinin sentezinde 20 mL *M. pulegium* L. sulu ekstraktını 60-80°C’de kaynatmış, üzerine 2 g çinko nitrat heksahidrat eklemiş ve etüvde 400°C’de ısıtarak bu karışımı toz haline getirmişlerdir (Rad vd. 2019). Darvishi ve arkadaşları (2019), 20 mL *J. regia* L. bitkisinin ekstraktını 50°C’de 10 dakika ısıtmış ve üzerine 500 mL çinko asetat dihidrat eklemişlerdir. Karışımın sarımsı renginin krem rengine dönüşmesi reaksiyonun gerçekleştiğini belirtmektedir. Bu karışım 8000 rpm’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Çökelti iki kere dH₂O ile yıkanmıştır ve etüvde kurutulmuştur (Darvishi vd. 2019). Yapılan diğer çalışmalarda da ZnO nanopartikül sentezinde farklı bitkiler kullanılarak değişik kaynatma-kurutma süreleri ve sıcaklık değerleri uygulanmış olup aynı formda nanopartikül eldesine ulaşılmıştır (Qi vd. 2008, Majeed vd. 2019, Elumalai vd. 2023). Tüm bu çalışmalarda kullanılan teknikler tez çalışmamızdaki sentez yöntemi ile benzerlik göstermektedir.

Bu çalışmada sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin karakterizasyonu için UV-Vis spektrumları, FT-IR, XRD ve SEM analizleri gerçekleştirildi.

Çalışmamızda UV-Vis spektrumları için maksimum seviyedeki absorbands değeri 385 nm olarak belirlendi. Darvishi ve arkadaşları (2019), yeşil sentez ve kimyasal sentez yöntemi kullanarak elde ettikleri ZnO nanopartiküllerinin UV-Vis spektrumlarındaki keskin

absorbsiyon tepe noktasını 355-370 nm arasında olduğunu tespit etmişlerdir (Darvishi vd. 2019). Majeed ve arkadaşları (2019), *A. heterophyllus* ekstraktıyla sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin UV-Vis spektrofotometre sonuçlarında absorpsiyon zirvesinin 235 nm’de olduğunu belirlemişlerdir (Majeed vd. 2019). Rajeshkumar ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışmada ise *Mangifera indica* bitki ekstraktı kullanılarak sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin UV-Vis spektrumları 355 nm’de absorpsiyon tepe noktası gösterdiğini tespit etmişlerdir (Rajeshkumar vd. 2018). Bir diğer çalışmada ise; Rad ve arkadaşları (2019), *M. pulegium* L. ekstraktıyla elde edilen ZnO nanopartiküllerinin UV-Vis spektrumlarını 370 nm’de keskin absorpsiyon bandı olduğunu saptamışlardır (Rad vd. 2019). Yine Hoseinzadeh ve arkadaşları (2013), kimyasal sentez ile elde edilen ZnO nanopartiküllerinin UV-Vis spektrumlarını yaklaşık 245 nm’de yarı keskin tepe noktasına sahip olduğunu rapor etmişlerdir (Hoseinzadeh vd. 2013). Literatür çalışmaları göstermiştir ki farklı bitkilerle sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin UV-Vis spektrumları 235-370 nm aralıklarında değişkenlik göstermektedir. Çalışmamızda ise 385 nm olarak tespit ettiğimiz UV-Vis değerleri literatürle uyumluluk göstermektedir. Elde edilen farklı UV-Vis spektrumlarının çalışmalarda kullanılan farklı bitki ekstraktlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin FT-IR analizi sonuçlarına göre 464 cm^{-1} ’de absorpsiyon bandı görüldü. 3424 cm^{-1} ’de görülen pik O-H gerilme titreşimleri, 1576 cm^{-1} ’de görülen pik C-O titreşimleri ve 1409 cm^{-1} ’de görülen pik aromatik C-C titreşimlerinin olduğunu göstermektedir.

Darvishi ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada ZnO nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda 439 cm^{-1} ’de zirve yaptığı görülmüştür. O-H pik değeri 3244.27 ve 3417.68 cm^{-1} ’de yüksek yoğunlukta görülmüştür. Fenolik C-O piki 1087.85, aromatik C-H piki 1465.90 ve aromatik C-C piki 1624.06’de yoğunlaştığı belirlenmiştir (Darvishi vd. 2019). Rad ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada ise *M. pulegium* L. ekstraktıyla sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda Zn-O bağının karakteristik belirtisi olarak 495 cm^{-1} ’de absorpsiyon bandı görülmüştür. Yaprak ekstraktının analiz spektrumları 3440 ve 2890 cm^{-1} ’de pik göstermiştir. Organik halkalar ve fonksiyonel gruplar olduğu düşünülen 1591, 881 ve 1382 cm^{-1} ’de pikler görülmüştür (Rad vd. 2019).

Erol ve arkadaşlarının (2023) yaptığı çalışmada ise *M. pulegium* L. ekstraktının ZnO nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda küresel ZnO gerilme titreşimini temsil eden absorbsiyon bandı 520 cm^{-1} 'de görülmüştür. ZnO yüzeyinde oluşan O-H gerilme titreşimleri 3500 cm^{-1} 'deki geniş pikte görülmüştür. Aromatik C-C titreşimlerinin 1630 cm^{-1} 'de piki görülmüştür. Bitkinin aktif bileşenlerinden olan pulegon ve menton 1720 cm^{-1} 'de görülmüştür (Erol vd. 2023). Mohammad ve arkadaşları (2019), *Hyssops officinalis* L. ekstraktı kullanılarak sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda O-H gruplarına ait pik 3463 cm^{-1} 'de, C-H gruplarına ait pik 2917 cm^{-1} 'de, C-O gruplarına ait pikin 1029 cm^{-1} 'de olduğu ve organik safsızlık sebebiyle 1410 cm^{-1} 'de pik olduğu görülmüştür (Mohammad vd. 2019). Bu bağlamda elde edilen verilere bakıldığında, FT-IR spektrumlarının $439\text{-}520\text{ cm}^{-1}$ aralığında olduğu ve çalışmamızda sentezlenen ZnO nanopartikülünün FT-IR spektrumlarının bu aralıkta yer aldığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada sentezlenen ZnO nanopartiküllerin XRD analizinde elde edilen pikler 100 (31.77°), 002 (34.42°), 101 (36.25°), 102 (47.53°), 110 (56.60°), 103 (62.86°), 200 (66.38°), 112 (67.96°), 201 (69.10°), 004 (72.56°) ve 202 (76.95°) olarak belirlendi. Bu ölçüm sonuçları literatürdeki ZnO nanopartikülün JCPDS (36-1451) 2θ açılarıyla karşılaştırıldığında uyumlu bulundu. Gözlemlenen şiddetli pikler ve kristal boyutunun 28.16 nm olması, numunenin saf ZnO nanopartikülü olduğunu doğruladı.

Darvishi ve arkadaşlarının (2019) yaptıkları çalışmada, ZnO nanopartiküllerinin XRD analizinde 2θ 'de (100), (002), (101), (102), (110), (103), (112), (202) ve (023) değerlerine bakıldığında nano yapısında olduğu görülmektedir (Darvishi vd. 2019). Rajeshkumar ve arkadaşları (2018), ZnO nanopartiküllerinin XRD analizinde 2θ değerlerindeki pikleri 31.86° , 34.72° , 36.57° , 47.66° , 56.89° , 61.74° , 68.69° olarak tespit etmiştir. Bu piklere karşılık gelen (100), (002), (101), (102), (110), (103), (112) değerler literatürdeki JCPDS değerleriyle benzerlik göstermektedir. Nanopartikülün saflığı (100), (002) ve (101) piklerinde görülmüştür. Nanopartikülün ortalama boyutu 47.70 nm olarak belirlenmiştir (Rajeshkumar vd. 2018). Erol ve arkadaşları (2023) yaptıkları çalışma ile ZnO nanopartiküllerinin XRD analizinde karakteristik tepe noktaları ile nanopartikülün altıgen yapısını doğrulamıştır. Bu durum literatürdeki 36-1451 numaralı JCPDS verileriyle uyum

göstermiştir. Nanopartiküllerin kristal boyutunun 34.17 nm olduğu belirlenmiştir (Erol vd. 2023). Rad ve arkadaşlarının (2019) yaptığı çalışmada ise ZnO nanoparçacıklarının XRD modelinde 2θ açılarındaki piklerin 31.74° , 34.41° , 36.23° , 47.53° , 56.60° , 62.86° , 66.43° , 67.96° , 69.10° , 72.54° olduğu görülmüştür. Bu piklere karşılık gelen değerlerin de (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004) ve (202) düzlemleri olduğu tespit edilmiştir. Nanopartiküllerin ortalama boyutu 44.94 nm olarak saptanmıştır (Rad vd. 2019). Sevlakumari ve arkadaşları (2015) ise, ZnO nanopartiküllerinin XRD analizinde görülen piklerin literatürdeki JCPDS verilerine uyumlu olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada da nanopartiküllerin saflığı belirlenmiş ve altıgen yapısıyla uyumlu olduğu görülmüştür. Ortalama boyutu yaklaşık olarak 16-17 nm olarak belirlenmiştir (Sevlakumari vd. 2015). Tüm bu literatürlerle karşılaştırıldığında çalışmamızda sentezlenen nanopartikülün altıgen yapısında ve kristal boyutunun 28.16 nm olması numunenin saf ZnO nanopartikülü olduğunu doğrulamıştır.

Bu çalışmada yapılan SEM analizi sonucunda ZnO nanopartiküllerin küresel şekilde olduğu belirlendi. Sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin analizinde yapılan EDX ölçümleri sonrası kütleli olarak Zn atomu için %61.45 oranı görülürken, O atomu için %30.76 oranı ve C atomu için de %7.80 oranı görüldü. Analizin atomik değerlerine bakıldığında Zn atomu %26.77 oranında görülürken, O atomu için %54.75 oranı ve C atomu için de %18.49 oranı görüldü.

Rad ve arkadaşları (2019), ZnO nanopartiküllerinin SEM analizi verilerine göre partiküllerin yarı küre şeklinde ve parçacık çaplarının 38-49 nm olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada yüksek çinko değerinin %56.26 ve oksijen değerinin %43.74 olduğu görülmüştür (Rad vd. 2019). Majeed ve arkadaşları (2019), ZnO nanopartiküllerin SEM analizi partiküllerinin yüzeylerinin pürüzsüz olduğunu göstermiştir. Yapılan EDX ölçümlerinde kütleli olarak C atomu %27.32, O atomu %51.68 ve Zn atomu %20.99 olduğu saptanmıştır. Atomik değerlerin ise C atomu %39.05, O atomu %55.44 ve Zn atomu %5.51 olduğu görülmüştür (Majeed vd. 2019). Rajeshkumar ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışmaya göre ise ZnO nanopartiküllerin SEM analizinde küresele yakın altıgen şeklinde olduğu tespit edilmiş ve bu analiz sonucunda boyutun yaklaşık 60 nm olduğu görülmüştür (Rajeshkumar vd. 2018). Yaptığımız çalışmada Zn, O ve C

atomlarının yüzde oranları, şekilsel yapısı, nanomateryalin kütle ve atomik değerleri diğer çalışmalardaki verilerle uyumlu bulunmuştur.

Biyolojik, fiziksel ve kimyasal faktörler hücreleri farklı derecelerde etkileyerek sitotoksositeye neden olabilmektedir. Hücreler, herhangi bir sitotoksik maddeye maruz kaldığında otofaji, apoptoz ve nekroz gibi sebeplerden dolayı ölebilir ya da proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler (Galluzzi vd. 2009). Sitotoksosite çalışmaları sayesinde test edilen herhangi bir maddenin sitotoksik etkileri hakkında fikir sahibi olunabilir (Riss vd. 2006). Bu çalışmada sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin karakteristik analizlerinin yanı sıra sitotoksik ve genotoksik etkileri de değerlendirilmiştir. A549 hücrelerine, *M. pulegium* L. ekstraktının 7.5-25 mg/mL aralığındaki yedi farklı konsantrasyonu ve ZnO nanopartikülünün 1.5-5 mg/mL aralığındaki yedi farklı konsantrasyonu uygulanarak 24 ve 48 saatlik uygulamalar sonucunda MTT testi ile sitotoksik etki belirlendi. Nanopartikül dozlarının yüzde hücre canlılığının azalmasında en az etkiyi 0.25 mg/mL dozu gösterirken, en fazla etkiyi 5 mg/mL dozu gösterdi. MPE dozlarının hücre canlılığına etkisi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yüzde canlılık oranını düşürdüğü görüldü. Hücre canlılığını önemli ölçüde azaltan dozun 2.5 mg/mL olduğu belirlendi. Bu uygulama sonrası ZnO nanopartiküllerinin LD₅₀ değeri 5 mg/mL olarak tespit edildi.

Rajeshkumar ve arkadaşlarının (2018) yaptıkları çalışmada ZnO nanopartiküllerinin 1-100 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarının sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Uyguladıkları nanopartikül konsantrasyonunun artışına bağlı olarak antikanser aktivitesinde artış olduğu görülmüştür. MTT analizi sonucunda ZnO nanopartiküllerinin sitotoksik aktivitesi değerlendirilirken doza bağlı dalgalanmalar olduğu tespit edilmiştir (Rajeshkumar vd. 2018). Nikounezhad ve arkadaşları (2014), A549 hücre hattına *M. pulegium* L. ekstraktını sulu, etanol ve metanol olmak üzere üç farklı şekilde uygulayarak sitotoksik etkilerine bakmışlardır. Ekstraktlar arasında sulu ekstraktın, en fazla antikanser aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. A549 hücre hattındaki canlılık oranı 25, 15, ve 2.5 µg/ml sulu fraksiyonunun üzerindeki konsantrasyonlarda görülmüştür (Nikounezhad vd. 2014). Alarifi ve arkadaşları (2013), A375 hücrelerine ZnO nanopartikülünü 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarında uygulayarak MTT analizi yapmışlardır. Hücre canlılığındaki düşüşün 24 saatlik sonuçları sırasıyla %2.4, %16 ve

%58.6 olduğu görülürken, 48 saatlik sonuçlarda %3.2, %38 ve %76.6 olduğu görülmüştür. A375 hücrelerinin canlılığındaki azalmanın 5 µg/ml ZnO nanopartikül konsantrasyonu ile başladığı anlaşılmaktadır (Alarifi vd. 2013). Sharma ve arkadaşları (2012), HepG2 hücrelerinde ZnO nanopartikülünün MTT testi ile sitotoksitesini belirlerken 0.8-20 µg/mL konsantrasyon aralığındaki nanopartikül dozlarını uygulamışlardır. 12 saat sonucunda canlılık yüzdesi, 14 ve 20 µg/mL dozlarında sırasıyla %80 ve %74 olarak belirlenmiştir. 24 saat sonucunda ise bu canlılık yüzdelерinin sırasıyla %53 ve %43'e gerilediği görülmüştür (Sharma vd. 2012). Jeng and Swanson (2006), CCL-131 fare nöroblastomu hücreleri üzerinde ZnO nanopartikülünün 10, 25, 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonlardaki dozlarını uygulamışlardır ve sitotoksik etkilerini MTT testi ile analiz etmişlerdir. 24 saatlik sonuçlarda 100 µg/mL konsantrasyondaki ZnO nanopartikül dozu, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında mitokondriyal işlevi %80 oranında azalttığı görülürken, 10 µg/mL dozunda mitokondriyal fonksiyon üzerinde önemsiz etkiler göstermiştir (Jeng and Swanson 2006). Çalışmamızda doz artışına bağlı olarak canlılık oranlarında düşüş tespit edilmesi LD₅₀ değerine yakın olan konsantrasyonlarda antikanser aktivitenin varlığını düşündürmektedir.

Genotoksisite, çeşitli ajanların genetik materyal üzerinde oluşturduğu hasarın belirlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Genotoksisite testleri; kimyasal maddelerin DNA'ya zarar verip vermediğini belirlemek ve bu kimyasalların etki mekanizmalarını anlamak için uygulanan *in vivo* ve *in vitro* test yöntemleridir (Yüzbaşıoğlu vd. 2014). Bu çalışmada *M. pulegium* L. ekstraktı kullanılarak sentezlenen ZnO nanopartiküllerinin A549 hücre hattı üzerindeki genotoksitesini belirlenirken Komet yöntemi kullanıldı. 24 ve 48 saatlik doz uygulaması sonucunda DNA hasarının en fazla görüldüğü doz 3.75 mg/mL olarak belirlendi. Çalışma sonucunda nanopartikül dozlarının bitki dozlarından daha fazla genotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Sharma ve arkadaşları (2012), HepG2 hücrelerine ZnO nanopartikülünü 8, 14, 20 µg/mL konsantrasyonlarda uygulayıp Komet testi ile genotoksik aktivitesine bakmışlardır. Kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 14 ve 20 µg/mL dozları uygulanan hücrelerde, önemli ölçüde DNA hasarı görülmüştür. ZnO nanopartiküllerinden kaynaklanan bu ölümün apoptoz yoluyla olduğu belirlenmiştir (Sharma vd. 2012). Alarifi ve arkadaşları

(2013), A375 hücrelerine ZnO nanopartikülünü 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarında uygulayarak Komet analizi ile genotoksitesini tespit etmişler ve uyguladıkları bu nanopartikül dozlarının kontrol hücreleri ile kıyaslandığında önemli ölçüde DNA hasarı gösterdiğini saptamışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda hücrelerin nanopartikül dozlarına maruz kalma süresi arttıkça oluşan DNA hasarında da doğrusal olarak artış gözlenmiş ve en fazla DNA hasarı 20 µg/mL konsantrasyonundaki dozda görülmüştür (Alarifi vd. 2013).

ZnO nanopartikülleri, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *K. pneumoniae* ve *S. enteritidis* mikroorganizma suşlarına farklı konsantrasyonlarda uygulandı. MİK değerleri sırasıyla 15, 12.5, 30, 25 ve 25 mg/mL olarak belirlendi. İnhibisyon değeri en yüksek *C. albicans*'da görülürken, en düşük *S. aureus*'da görüldü. Hoseinzadeh ve arkadaşları (2013), ZnO nanopartikülünü *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis* ve *S. aureus* bakteri suşlarına (10.000, 5.000, 2.500, 1.250, 625, 312.5, 156.25, 78.125, 39.0625, 19.53, 9.765 ve 9.883 µg/mL) seri dilüsyon ile uygulayarak MİK belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlarda 156.25 µg/mL ile en yüksek konsantrasyona sahip MİK değeri *P. aeruginosa*'da, en düşük konsantrasyona sahip MİK değeri ise 1.250 µg/mL ile *E. coli* ve *S. aureus*'da görülmüştür.

Bu çalışmada ZnO nanopartikülünün antimikrobiyal aktivitesini belirlemek amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanıldı ve verilere göre en yüksek inhibisyon zonu *E. coli*'nin 31.2 mg/mL dozunun 72 saatlik uygulamasında görülürken, buna yakın ikinci en yüksek inhibisyon zonu ise *C. albicans*'ın 72 saatlik uygulamasının 31.2 mg/mL dozunda saptandı. Hoseinzadeh ve arkadaşları (2013), ZnO nanopartikülünü *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. epidermidis* ve *S. aureus* bakteri suşlarına 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25 ve 78.125 µg/mL konsantrasyonlarında uygulamışlardır. Disk difüzyon yöntemi ile inhibisyon bölgesinin boyutlarını belirlemişlerdir. *P. aeruginosa* bakterisinde 10000 ve 5000 µg/mL dozu, antibiyotik disklerde görülen değerden %4-7 daha yüksek olduğu görülmüştür. Buna benzer olarak *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *E. coli* bakterilerinde yaklaşık olarak 312.5 µg/mL dozu ve üzerindeki dozlarda inhibisyon bölgesi oluştuğu belirlenmiştir (Hoseinzadeh vd. 2013). Elumalai ve arkadaşları (2023), ZnO nanopartikülünü *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*

gibi çeşitli mikroorganizmalara ve *C. albicans* ve *Candida tropicalis* disk difüzyon yöntemi gibi mantar suşlarına karşı 200 µg/mL konsantrasyonunda uygulayarak antimikrobiyal aktivitesini belirlemişlerdir. *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* suşlarında 22.8 ± 0.76 ve 23.8 ± 0.76 mm aralığında değerler gözlenmiştir. *Proteus mirabilis*, *C. albicans* ve *Candida tropicalis* suşlarında ise 13.5 ± 0.50 ve 19.6 ± 0.76 mm aralığında değerler gözlenmiştir (Elumalai vd. 2023).

Bu çalışmada elde edilen bütün bulgular göz önüne alındığında, *M. pulegium* L. ekstraktını kullanarak uygulanan yeşil sentez tekniği ile üretilen ZnO nanopartiküllerinin çeşitli mikroorganizmalar üzerinde neden olduğu antimikrobiyal ve antifungal aktivitelerinin yeni ilaç geliştirme ve tedavi yöntemleri için temel bir çalışma olacağı kanaatindeyiz. Ayrıca bu nanopartiküllerin farklı kanser tiplerine karşı alternatif tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesinde etkili olabileceğini ve gelecekteki çalışmalar için bir basamak teşkil edeceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

- Abdala S, Martín-Herrera D, Benjumea D, Dévora Gutiérrez S, 2012, Diuretic activity of some *Smilax canariensis* fractions, *Journal of Ethnopharmacology*, 140, 277–281.
- Abdelhalim A, Hanrahan J, 2021, Biologically active compounds from Lamiaceae family: Central nervous system effects, In Rahman A (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, Elsevier, pp. 255–315.
- Adamson E D, 1987, Oncogenes in development, *Development*, 99, 449–471.
- Alar T, Şahin E M, 2012, Akciğer kanseri: birinci basamakta tanı, tedavi ve korunma, *Smyrna Tıp Dergisi*, 68–74.
- Alarifi, S., Ali, D., Alkahtani, S., Verma, A., Ahamed, M., Ahmed, M., & Alhadlaq, HA (2013). Çinko oksit nanoparçacıklarına maruz kaldıktan sonra malign bir insan derisi melanom hücre hattında oksidatif stres, DNA hasarı ve apoptozun indüklenmesi, *Uluslararası Nanotıp Dergisi*, 983–993.
- Anderson B, Peyster A D, Gad S C, Hakkinen P J, Kamrin M, 2005, *Encyclopedia of toxicology, Carcinogenesis*, Academic Press, 445–466.
- ArıÇ E, 2010, Nanoyapıda çinko oksit partiküllerinin üretimi ve karakterizasyonu, *İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 53s, İstanbul.
- Aslan M, 2019, Bazı Bitki Ekstraktlarının Gıda Kaynaklı Patojen Mikroorganizmalar Üzerine Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması, *Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 65s, Sakarya.
- Ateş M, 2018, Nanoparçacıkların ölçme ve inceleme teknikleri, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 11, 63–69.
- Atlı Şekeroğlu Z, Şekeroğlu V, 2011, Genetik toksisite testleri, *Tübav Bilim Dergisi*, 4, 221–229.
- Ayaz E, 2021, Farklı Nane (*Mentha x piperita* L. ve *Mentha pulegium* L.) Türlerinin Doğal ve Doku Kültürü Yardımıyla Geliştirilip Sekonder Metabolit ve Uçucu Bileşenlerinin Tespiti, *Uşak Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, 62s, Uşak.

- Başer K H C, 1997, Tıbbi ve aromatik bitkilerin ilaç ve alkollü içki sanayilerinde kullanımı, İstanbul Ticaret Odası, İstanbul, 1997, 39.
- Başer K H C, Kürkçüoğlu M, Demirci B, Özek T, Tarımcılar G, 2012, Essential oils of *Mentha* species from Marmara region of Turkey, *Journal of Essential Oil Research*, 24, 265–272.
- Bayaz M, 2014, Esansiyel yağlar: antimikrobiyal, antioksidan ve antimutajenik aktiviteleri, *Akademik Gıda*, 12, 45–53.
- Baytop T, 1999, Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Geçmişte ve Bugün, Nobel Tıp Kitabevleri, 2, 480, İstanbul.
- Baytop T, 2007, Türkçe Bitki Adları Sözlüğü (3. Baskı), Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu Türk Dil Kurumu Yayınları, 578s, Ankara.
- Behera B, Vishnu G A, Chatterjee S, Sreekumar N, Nagabhushan A, Rajendran N, vd., 2019, Emerging technologies for antibiotic susceptibility testing, *Biosensors and Bioelectronics*, 142, 111552.
- Bishop J M, 1991, Molecular themes in oncogenesis, *Cell*, 64, 235–248.
- Caplan A I, 1991, Mesenchymal stem cells, *Journal of Orthopaedic Research*, 9, 641–650.
- Carrel A, 1912, On the permanent life of tissues outside of the organism. *The Journal of Experimental Medicine*, 15, 5, 516–528.
- Carrel A, Ebeling A H, 1923, Action on fibroblasts of extracts of homologous and heterologous tissues, *The Journal of Experimental Medicine*, 38, 499–511.
- Chandra H, Kumari P, Bontempi E, Yadav S, 2020, Medicinal plants: Treasure trove for green synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101518.
- Çatak E, Atalay A, 2022, Lamiaceae (Labiatae) (Ballıbabagiller) Familya’sının Ekonomik ve Tıbbi Değerleri, *Euroasia Journal of Mathematics, Engineering, Natural & Medical Sciences*, 9, 150–157.
- Çöteli, E, Erden Y, Karataş F, 2013, Yarpuz (*Mentha pulegium* L.) bitkisindeki malondialdehit, glutatyon ve vitamin miktarları ile total antioksidan kapasitesinin

- araştırılması, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 17, 4–10.
- Daniel M C, Astruc D, 2004, Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, Chemical Reviews, 104, 293–346.
- Darvishi E, Kahrizi D ve Arkan E, 2019, Yeşil (*Juglans regia* L. yaprak ekstresi kullanılarak) ve kimyasal yöntemlerle sentezlenen çinko oksit nanoparçacıklarının farklı özelliklerinin karşılaştırılması. Journal of Molecular Liquids, 286, 110831.
- Davis P H, 1982, Lamiaceae, Flora of Turkey and East Aegean Islands Edinburgh University Press, Edingburg, 7.
- Demiray A G, Yaren A, 2016, Skuamöz hücreli akciğer kanserinin tedavisindeki yenilikler, Türkiye Klinikleri Tıbbi Onkoloji, 9, 70–74.
- Deniz Y, 2017, Spermatozoon DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Analiz Yöntemi, Türkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics, 3, 105–13.
- Dennis C, Gallagher R, Watson J D, 2001, The human genome, Nature, 140p, Londra.
- Dikilitaş M, Koçyiğit A, 2010, Canlılarda “tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi, Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 14, 77–89.
- Diniz G, Ünlü I, Kömürcüoğlu B, 2017, Histopathological and molecular features of lung cancer, Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi, 27, 77–87.
- Dorman H D, Koşar M Kahlos, K Holm Y, Hiltunen R, 2003, Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4563–4569.
- Dudkiewicz A, Tiede K, Loeschner K, Jensen L H S, Jensen E, Wierzbicki R, vd., 2011, Characterization of nanomaterials in food by electron microscopy, In TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 30, 28–43.
- Dulbecco R, Freeman G, 1959, Plaque production by the polyoma virus. Virology. 8, 3, 396– 397.

- Dutta G, Sugumaran A, 2021, Bioengineered zinc oxide nanoparticles: Chemical, green, biological fabrication methods and its potential biomedical applications, *Journal of Drug Delivery Science And Technology*, 66, 102853.
- Duval K, Grover H, Han L H, Mou Y, Pegoraro A F, Fredberg J, vd., 2017, Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture, *Physiology*, 32, 266-277.
- Eagle H, 1955, Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science (New York, N.Y.)* 122, 3168, 501–514.
- Earle W R, Schilling E L, Stark T H, Straus N P, Brown M F, Shelton E, 1943, The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 4, 2, 165–212.
- Elumalai K, Velmurugan S, Ravi S, Kathiravan V, & Ashokkumar S, 2015, RETRACTED: Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using *Moringa oleifera* leaf extract and evaluation of its antimicrobial activity.
- Enders J F, Weller T H, Robbins F C, 1949, Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues, *Science*, 109, 85–87.
- Ensafi A A, Taei M, Khayamian T, Karimi-Maleh H, Hasanpour F, 2010, Voltammetric measurement of trace amount of glutathione using multiwall carbon nanotubes as a sensor and chlorpromazine as a mediator, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 14, 1415–1423.
- Ergelen R, Çağatay Çimşit N, 2013, Akciğer tümörleri, *Bulletin of Thoracic Surgery/Toraks Cerrahisi Bülteni*, 4, 178–188.
- Erkekoğlu P, Baydar T, 2021, Güncel in vitro sitotoksikite testleri. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 41, 45–63.
- Erol I, Sivrier M, Cigerci I H, Özkara A, & Akyıl D, 2023, ZnO-containing nanocomposites produced from *Mentha pulegium* L. of a new HEMA-based methacrylate copolymer: improvement the thermal and antimicrobial effect. *Journal of Polymer Research*, 30(3), 103.

- Eryiğit F, 2006, *Mentha pulegium* L. ve *Salvia tomentosa* Miller bitkilerinin metanol özütlерinin in vitro antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 60s, Isparta.
- Esmer Duruel H E, Çağın N S, Işık S, Kayhan F E, 2021, Hücre Kùltürlerine Genel Bakış, Selçuk Üniversitesi Fen Fakùltesi Fen Dergisi, 47, 136–149.
- Fatiha B, Didier H, Naima G, Khodir M, Martin K, Léocadie K, vd., 2015, Phenolic composition, in vitro antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae), Industrial Crops And Products, 74, 722–730.
- Fecka I, Turek S, 2008, Erratum to “Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques”[Food Chem. 108 (3)(2008) 1039–1053], Food Chemistry, 4, 1051–1052.
- Galluzzi L, Aaronson S A, Abrams J, Alnemri E S, Andrews D W, Baehrecke E H, ... & Kroemer G, 2009, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death & Differentiation*, 16(8), 1093–1107.
- Giard D J, Aaronson S A, Todaro G J, Arnstein P, Kersey J H, Dosik H vd., 1973, In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors, Journal of the National Cancer Institute, 51, 1417–23.
- Gökşen N, 2016, *Mentha pulegium*, *Ziziphora tenuior* ve *Echinophora tenuifolia*’nın Esansiyel Yağlarının Antimikrobiyal Aktiviteleri ve Biyofilm Üzerine Etkisi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 60s, Tokat.
- Griffiths B, 2007, The development of animal cell products: history and overview. Medicines from Animal Cell Culture, John Wiley & Sons, Chichester, 1–14.
- Gurung R L, Lim S N, Khaw A K, Soon J F F, Shenoy K, Mohamed Ali S, vd., 2010, Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells, PloS One, 5, e12124.

- Güllüce M, Şahin F, Somken M, Özer H, Daferera D, Somken A, vd., 2007, Antimicrobial and Antioxidant Properties Of The Essential Oils and Methanol Extract From *Mentha longifolia* L. Sp. *longifolia*, Food Chemistry, 103, 1449–1456.
- Günay E, Çelik S, Ulasli S S, Özyürek A, Hazman Ö, Günay S, vd., 2016, Comparison of the Anti-inflammatory Effects of Proanthocyanidin, Quercetin, and Damnacanthol on Benzo(a)pyrene Exposed A549 Alveolar Cell Line, Inflammation, 39, 744–51.
- Güner U, Muranlı F D G, 2013, Balıklarda tek hücre jel elektroforezi (comet assay), Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi, 3, 103–114.
- Ham RG, 1963, An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. Experimental Cell Research, 29, 3, 515–526.
- Hanahan D, 2022, Hallmarks of cancer: new dimensions, Cancer discovery, 12, 31–46.
- Harrison R G, 1907, Observations on the living developing nerve fiber. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 4, 1, 140–143.
- Herbst R S, Heymach J V, Lippman S, 2008, Molecular origins of cancer, New England Journal of Medicine, 359, 1367–1380.
- Hoseinzadeh E, Alikhani M Y, Samarghandi M R, & Shirzad-Siboni M, 2014, Antimicrobial potential of synthesized zinc oxide nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria, Desalination and Water Treatment, 52(25–27), 4969–4976.
- Hudzicki J, 2009, Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol, American Society For Microbiology, 15, 55–63.
- Hussain I, Singh N B, Singh A, Singh H, Singh S C, 2016, Green synthesis of nanoparticles and its potential application, Biotechnology Letters, 38, 545–560.
- Jamkhande P G, Ghule N W, Bamer A H, Kalaskar M G, 2019, Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications, Journal of Drug Delivery Science And Technology, 53, 101174.

- Jeng H A ve Swanson J, 2006, Memeli hücrelerinde metal oksit nanoparçacıklarının toksisitesi. *Journal of Environment Science and Health Part A*, 41(12), 2699–2711.
- Joudeh N, Linke D, 2022, Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology*, 20, 262.
- Kahraman A, Celep F, Doğan, M, 2009, Morphology, anatomy and palynology of *Salvia indica* L.(Labiatae). *World Applied Sciences Journal*, 6, 289–296.
- Kamatou G P, Viljoen A M, Steenkamp P, 2010, Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLC analysis of South African *Salvia* species. *Food Chemistry*, 119, 684–688.
- Karnani R L, Chowdhary A, 2013, Biosynthesis of silver nanoparticle by eco-friendly method, *Indian Journal of NanoScience*, 1, 25–31.
- Keilová, H, 1948, The effect of streptomycin on tissue cultures, *Experientia*, 4, 483–484.
- Kevenk T O, Koluman A, 2021, Invitro decontamination effect of zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) on important foodborne pathogens, *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 32, 1–5.
- Khan M A R, Al Mamun M S, Ara M H, 2021, Review on platinum nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications, *Microchemical Journal*, 171, 106840.
- Khanna P, Kaur A, Goyal D, 2019, Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications, *Journal of Microbiological Methods*, 163, 105656.
- Kim J, Marshall M R, Wei C I, 1995, Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens, *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 43, 2839–2845.
- Korkut E, 2018, A549 insan akciğer kanseri hücre hattında trastuzumab ve 5-Fluorourasil kombine ilaç tedavisinin etkisinin incelenmesi, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 86s, Bilecik.

- Kruse R H, Puckett W H, Richardson J H, 1991, Biological safety cabinetry, Clinical microbiology reviews, 4, 207–241.
- Kulis M, Esteller M, 2010, DNA methylation and cancer. Advances in Genetics, 70, 27–56.
- Kumar P, Mishra S, Malik A, Satya S, 2011, Insecticidal properties of Mentha species: a review, Industrial Crops and Products, 34, 802–817.
- Lambert R J W, Pearson J, 2000, Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. Journal of Applied Microbiology, 88, 784–790.
- Liao C, Jin Y, Li Y, Tjong S C, 2020, Interactions of zinc oxide nanostructures with mammalian cells: cytotoxicity and photocatalytic toxicity. International Journal of Molecular Sciences, 21, 6305.
- Machado S, Pacheco J G, Nouws H P A, Albergaria J T, Delerue-Matos C, 2015, Characterization of green zero-valent iron nanoparticles produced with tree leaf extracts. Science of the Total Environment, 533, 76–81.
- Macleod K, 2000, Tumor suppressor genes, Current Opinion in Genetics & Development, 10, 81–93.
- Mahboubi M, Haghi G, 2008, Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil, Journal of Ethnopharmacology, 119, 325–327.
- Majeed S, Danish M, Ismail M H B, Ansari M T, & Ibrahim M N M, 2019, Anticancer and apoptotic activity of biologically synthesized zinc oxide nanoparticles against human colon cancer HCT-116 cell line-in vitro study. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 14, 100179.
- Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P, 2016, Risk factors for lung cancer worldwide. European Respiratory Journal, 48, 889–902.
- Mata A T, Proença C, Ferreira A R, Serralheiro MLM, Nogueira JMF ve Araújo MEM, 2007, Portekiz gıda baharatı olarak kullanılan beş bitkinin antioksidan ve antiasetilkolinesteraz aktiviteleri. Gıda Kimyası, 103 (3), 778–786.

- Mayeen A, Shaji L K, Nair A K, Kalarikkal N, 2018, Morphological characterization of nanomaterials. In *Characterization of Nanomaterials* (pp. 335–364). Woodhead Publishing.
- Møller P, Azqueta A, Boutet-Robinet E, Koppen G, Bonassi S, Milić M, vd., 2020, Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results. *Nature Protocols*, 15, 3817–3826.
- Mosmann T, 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63.
- Mourdikoudis S, Pallares R M, Thanh N T, 2018, Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties, *Nanoscale*, 10, 12871–12934.
- Nickavar B A, Alinaghi A, Kamalinejad M, 2008, Evaluation of the Antioxidant Properties of Five *Mentha* Species, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 7, 203–209.
- Nikounezhad N, Shirazi F H, & Kamalinejad M, 2014, Relative cytotoxicity of fractionated extract of arial parts of *Mentha pulegium* L. on three cancer cell lines. *American Journal of PharmTech Research*, 4(6), 215–223.
- Palmgren M G, Clemens S, Williams L E, Krämer U, Borg S, Schjørring J K, vd., 2008, Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends in Plant Science*, 13, 464–473.
- Patil S P, 2020, *Ficus carica* assisted green synthesis of metal nanoparticles: A mini review, *Biotechnology Reports*, 28, e00569.
- Peehl D M, Ham R G, 1980, Clonal growth of human keratinocytes with small amounts of dialyzed serum, *In Vitro*, 16, 526–540.
- Piras A, Porcedda S, Falconieri D, Maxia A, Gonçalves M, Cavaleiro C, Salgueiro L, 2019, Antifungal activity of essential oil from *Mentha spicata* L. and *Mentha pulegium* L. growing wild in Sardinia island (Italy), *Natural Product Research*, 35, 993–999.

- Prasad A R, Williams L, Garvasis J, Shamsheera K O, Basheer S M, Kuruvilla M, vd., 2021, Applications of phytogenic ZnO nanoparticles: A review on recent advancements, *Journal of Molecular Liquids*, 331, 115805.
- Puck T T, Marcus P I, 1955, A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 41, 432–437.
- Qi Q, Zhang T, Yu Q, Wang R, Zeng Y, Liu L, & Yang H, 2008, Properties of humidity sensing ZnO nanorods-base sensor fabricated by screen-printing, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 133(2), 638–643.
- Rad S S, Sani A M ve Mohseni, S, 2019, *Mentha pulegium*'un (L.) yaprak özünden çinko oksit nanoparçacıklarının biyosentezi, karakterizasyonu ve antimikrobiyal aktiviteleri, *Mikrobiyal Patogenez*, 131, 239–245.
- Rahimi Kalateh Shah Mohammad G, Homayouni Tabrizi M, Ardalan T, Yadamani S, & Safavi E, 2019, Green synthesis of zinc oxide nanoparticles and evaluation of anti-angiogenesis, anti-inflammatory and cytotoxicity properties, *Journal of Biosciences*, 44, 1–9.
- Rajeshkumar S, Kumar S V, Ramaiah A, Agarwal H, Lakshmi T, & Roopan S M, 2018, Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Mangifera indica* leaves and evaluation of their antioxidant and cytotoxic properties in lung cancer (A549) cells, *Enzyme and Microbial Technology*, 117, 91–95.
- Raveendran P, Fu J, Wallen S L, 2003, Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles, *Journal of the American Chemical Society*, 125, 13940–13941.
- Riss TL, Moravec RA, 2006, Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. In “Cell Biology”, Ed; Celis JE, Elsevier Academic Press, Burlington.
- Rónavári A, Igaz N, Adamecz D I, Szerencsés B, Molnar C, Kónya Z, vd., 2021, Green silver and gold nanoparticles: Biological synthesis approaches and potentials for biomedical applications, *Molecules*, 26, 844.

- Sadik O A, Du N, Kariuki V, Okello V, Bushlyar V, 2014, Current and emerging technologies for the characterization of nanomaterials, ACS Sustainable Chemistry and Engineering, 2, 1707–1716.
- Sanna V, Sechi M, 2012, Nanoparticle therapeutics for prostate cancer treatment, Maturitas, 73, 27–32.
- Sebai E, Abidi A, Serairi R, Marzouki M, Saratsi K, Darghouth M A, Sotiraki S, Akkari H, 2021, Essential oil of *Mentha pulegium* induces anthelmintic effects and reduces parasite-associated oxidative stress in rodent model, Experimental Parasitology, 225, 108105.
- Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E, 1995, Tohumlu bitkiler sistemiği Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, 116, 394, İzmir.
- Selmani A, Kovačević D, Bohinc K, 2022, Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond. Advances in Colloid and Interface Science, 102640.
- Selvakumari D, Deepa R, Mahalakshmi V, Subhashini P, & Lakshminarayan N, 2015, Anti cancer activity of ZnO nanoparticles on MCF7 (breast cancer cell) and A549 (lung cancer cell), ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences, 10(12), 5418–5421.
- Shanks R A, 2013, Characterization of Nanostructured Materials. In Nanostructured Polymer Blends (pp. 15–31), Elsevier Inc.
- Shanmuganathan R, Karuppusamy I, Saravanan M, Muthukumar H, Ponnuchamy K, Ramkumar V S, vd., 2019, Synthesis of silver nanoparticles and their biomedical applications-a comprehensive review, Current Pharmaceutical Design, 25, 2650–2660.
- Sharma V, Anderson D, & Dhawan A, 2012, Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2), Apoptosis, 17, 852–870.
- 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, 100848.

- Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M, 2007, Farmasötik Botanik, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 93, 1-458.
- Tassaou C C, Nycas J E, Scandamis P N, 2004, Herbs and spices, non-inhibitory concentration (NIC) values, Journal of Applied Microbiology, 88, 784–790.
- Temel M, Kargıoğlu M, Arı S, 2015, Afyonkarahisar'da Yayılış Gösteren *Stachys byzantina*'nın (Lamiaceae) Morfolojik, Anatomik ve Ekolojik Özellikleri, SDU Journal of Science (E-Journal), 10, 35–47.
- Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, Waknitz M A, Swiergiel J J, Marshall V S, vd., 1998, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, Science, 282, 1145–1147.
- Torun P, Kutlar A, 2018, Türkiye’de Kanserin Ekonomik Maliyetleri: Bir Hesaplanabilir Genel Denge Modeli Yaklaşımı, Hacettepe Sağlık İdaresi Dergisi, 21, 31–39.
- Travis W D, 2012, Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas, Modern Pathology, 25, 18–30.
- Ulaşlı S S, Çelik S, Günay E, Özdemir M, Hazman O, Özyürek A vd., 2013, Anticancer Effects of Thymoquinone, Caffeic Acid Phenethyl Ester and Resveratrol on A549 Non-Small cell lung Cancer Cells Exposed to Benzo(a)pyrene, Asian Pac J Cancer Prev, 14, 6159–6164.
- Vijayaraghavan K, Ashokkumar T, 2017, Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles: A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications, Journal of environmental chemical engineering, 5, 4866–4883.
- Xu L, Yi-Yi W, Huang J, Chun-Yuan C, Zhen-Xing W, Xie H, 2020, Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety, Theranostics, 10, 8996.
- Yakut M, Kum M, 2022, Nanoteknolojide Karakterizasyon Teknikleri, İksad Yayınevi, 110s, Ankara.
- Yaprak E, 2019, Yeşil sentez metoduyla karabaş otundan (*Lavandula stoechas* L.) bakır nanopartikül sentezi, karakterizasyonu ve antimikrobiyal aktivitesinin

değerlendirilmesi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 48s, Erzurum.

Yener N A, Apa D D, 2014, Akciğer kanserinde morfolojik tanı ve sınıflama, Türk Radyoloji Seminerleri, 2, 281–289.

Yüzbaşıoğlu D, Zengin N, Ünal F, 2014, Gıda Koruyucuları ve Genotoksisite Testleri, Gıda, 39, 179–186.

İnternet Kaynakları

- 1- <https://www.bizimbitkiler.org.tr/v2/hiyerarsi.php?f=Lamiaceae>, 20.12.2022
- 2- <https://www.bizimbitkiler.org.tr/v2/hiyerarsi.php?c=Mentha>, 20.12.2022
- 3- https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=32270#null, 20.12.2022
- 4- <https://bizimbitkiler.org.tr/yeni/demos/technical/map1.php?id=8354>, 20.12.2022
- 5- <http://ibuflora.ibu.edu.tr/tur/mentha-pulegium>, 20.12.2022
- 6- <https://www.smacgigworld.com/blog/principle-uv-vis-spectroscopy-.php>, 20.12.2022
- 7- <https://www.thermofisher.com/blog/materials/what-is-sem-scanning-electron-microscopy-explained/>, 20.12.2022
- 8- <https://www.drugwatch.com/health/cancer/carcinogens/>, 20.12.2022
- 9- <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/about/key-statistics.html>, 20.12.2022
- 10- <https://microbeonline.com/minimum-inhibitory-concentration-and-minimum-bactericidal-concentration-mbc/>, 20.12.2022