

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**α -KİMOTRİPSİN İLE HAZIRLANAN GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLERİN (Ag-CT) H₂O₂ İLE İNDÜKLENMİŞ
SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA OKSİDATİF
STRES PARAMETRELERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Rumeysa BAŞARAN

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİMDALİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. BÜLENT KAYA

BİNGÖL-2024



T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**α -KİMOTRİPSİN İLE HAZIRLANAN GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLERİN (Ag-CT)
H₂O₂ İLE İNDÜKLENMİŞ SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA
OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Doç. Dr. Bülent KAYA danışmanlığında, Rumeysa BAŞARAN tarafından hazırlanan bu çalışma 09/09/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof.Dr. Sibel DUMAN	<i>İmza</i> :
Üye	: Prof.Dr. İlhami TÜZÜN	<i>İmza</i> :
Üye	: Doç. Dr. Bülent KAYA	<i>İmza</i> :

Yukarıdaki sonuç;
Enstitü Yönetim Kurulunun// tarih ve /
nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer ŞİAR
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖNSÖZ

Öncelikle yüksek lisans eğitimim süresince benden desteklerini, engin bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Doç.Dr. Bülent KAYA'ya, tüm eğitim hayatım boyunca varlıklarını ve desteklerini hissettiren kıymetli aileme, süreç boyunca manevi destekleri ile ilerlememi sağlayan arkadaşım Mine GÜÇDEN'e ve beni hiç yalnız bırakmayan kıymetli dostlarıma hayatıma ve dahi tezime kattıkları anlamdan dolayı en kalbi teşekkürlerimi iletirim. Deneylerimi gerçekleştirirken bilgi, beceri ve deneyimlerini esirgemeyen KAYA Lab Grubu'na ve ilk günümde bu güne eğitimimde ve hayatımda etkisi olan her bir hocama da müteşekkir olduğumu kayda geçmek isterim.

Ayrıca süreç boyunca bursiyeri olduğum TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı'na verdikleri destekten ötürü şükranlarımı iletmek isterim.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Nanomalzemeler ve Çeşitleri	2
1.2. Nanopartikül Sentez Yöntemleri	2
1.2.1. Yukarıdan Aşağı Yaklaşım (Top –Down).....	3
1.2.2. Aşağıdan Yukarı Yaklaşım (Bottom Up).....	4
1.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri	4
1.3.1. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM).....	4
1.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	5
1.3.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)	5
1.3.4. X-Işını Kırınımı (XRD).....	6
1.3.5. X- Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)	6
1.3.6. Kütle Spektrometresi (MS)	6
1.3.7. Zeta Potansiyeli	7
1.3.8. UV-Görünür Spektrofotometri (UV-Vis).....	7
1.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres	7
1.5. Nörodejeneratif Hastalıklar ve Oksidatif Stres.....	10

1.6. Alzheimer ve Oksidatif Stres.....	11
1.7. Alzheimer’da Antioksidan Temelli Tedavi Yaklaşımları	13
1.8. α -Kimotripsin Enzimi ve Alzheimer	14
2. KAYNAK ÖZETLERİ	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Gümüş Nanopartikül Sentezi.....	20
3.2.2. Nanopartikül Karakterizasyonu.....	21
3.2.3. Hücre Kültürü.....	21
3.2.3.1. Hücre Sayımı	21
3.2.3.2. XTT ile Hücre Canlılık Testi	22
3.2.3.3. H ₂ O ₂ ile <i>In Vitro</i> Nörodejenerasyon Modelinin Oluşturulması.....	22
3.2.3.4. <i>In Vitro</i> Nörodejenerasyona Karşı Ag-CT’lerin Doz Aralıklarının Belirlenmesi	22
3.2.4. Antimikrobiyal Aktivite Belirleme	23
3.2.4.1. Test Mikroorganizmalarının Seçimi	23
3.2.4.2. Agar Disk Difüzyon Yöntemi.....	23
3.2.5. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS)	24
3.2.6. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS)	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
4.1 Gümüş Nanopartikül Karakterizasyonu	26
4.1.1. FT-IR Analizi	26
4.1.2.UV/Vis Analizi.....	27
4.1.3. Micro RAMAN Analizi.....	28
4.1.4. XPS Analizi.....	29
4.1.5. XRD Analizi.....	30

4.1.6. FE-SEM Analizi	31
4.1.7. Zeta Potansiyeli Analizi	32
4.2. Hücre Canlılık Testi (XTT) Sonuçları.....	32
4.2.1. H ₂ O ₂ ile SH-SY5Y Hattında <i>In Vitro</i> Nörodejenerasyon Modelinin Oluşturulması ve LD ₅₀ Değerinin Hesaplanması.....	32
4.2.2. SH-SY5Y Hücre Hattında Farklı Ag-CT Dozlarının Nörotoksik Etkilerinin İncelenmesi	33
4.2.3 H ₂ O ₂ ile <i>In Vitro</i> Nörodejenere Edilen Hücrelere Ag-CT Uygulaması	34
4.3. Antimikrobiyal Aktivite	36
4.4. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) Sonuçları	37
4.5. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) Sonuçları	38
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	48
EKLER.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

α	: Alfa
β	: Beta
ε	: Epsilon
μ	: Mikro
θ	: Theta
$^{\circ}$: Derece
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat derece
%	: Yüzde
A549	: İnsan Adenokarsinom Hücre Hattı
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
Ag-CT	: Gümüş-Kimotripsin
AgNP	: Gümüş Nanopartikül
ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
Apo-E	: Apolipoprotein
APP	: Amiloid Prekürsor Protein
A β	: Amiloid Beta Proteini
Bax	: Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bcl-2	: B Hücreli Lenfoma Proteini 2
cm	: Santimetre
Cryo-EM	: Kriyojenik Elektron Mikroskopisi
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Drd-2	: Dopamin Reseptör 2
EDX	: Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi
ERK	: Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz
eV	: Elektronvolt
Gap-43	: Büyüme İlişkili Protein 43
HepG2	: İnsan Karaciğer Kanseri Hücre Hattı
HHE	: 4-hidroksi-2-heksenal

HNE	: 4-hidroksi-2-nonenal
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
kDa	: Kilo Dalton
LoVo	: İnsan Kolon Kanseri Hücre Hattı
Map-2	: Mikrotübül İlişkili Protein 2
MCF-7	: İnsan Adenokarsinom Hücre Hattı
MDA	: Malondialdehit
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mL	: Mililitre
MPO	: Miyeloperoksidaz
MS	: Kütle Spektrometresi
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
nm	: Nanometre
NOX	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz
NP	: Nanopartikül
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
pH	: Hidrojenin gücü
PLGA	: Polilaktikoglikolik asit
PSEN	: Presenilin
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SH-SY5Y	: İnsan Nöroblastoma Hücre Hattı
TAS	: Toplam Antioksidan Seviyesi
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskobu
TOS	: Toplam Oksidan Seviyesi
UV-Vis	: UV-Görünür Spektrofotometri
WI-38	: Diploid İnsan Hücre Hattı
XOR	: Ksantin Oksidoredüktaz
XRD	: X-Işımı Kırınımı
XPS	: X- Işımı Fotoelektron Spektroskopisi

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Nanoteknoloji kullanım alanları (Malik vd., 2023'e göre yeniden düzenlenmiştir).....	1
Şekil 1.2.	Nanopartikül sentezinde yukarıdan aşağı ve aşağıdan yukarı yaklaşımlar (Indiarto vd., 2022).....	3
Şekil 1.3.	Enzimatik ve enzimatik olmayan süreçlerle ROS oluşumu ve ROS'ların bazı etki alanları (Bayr, 2005).....	8
Şekil 1.4.	Nörodejeneratif hastalıklar ve oksidatif stres ilişkisi (Singh vd., 2019)	10
Şekil 3.1.	Nanopartikül sentez ve santifrüj aşamalarına ait görüntüler.....	20
Şekil 4.1.	Ag-CT ve α -kimotripsinin 450-4000 cm^{-1} dalgaboyu aralığında FT-IR ölçümlerinin %Transmitans grafikleri.....	27
Şekil 4.2.	Ag-CT 380-480 nm ve 180-1100 nm aralığında UV/Vis absorbands grafikleri.....	28
Şekil 4.3.	Ag-CT 0.5mWatt 0-4000 nm Micro RAMAN ölçüm grafiği.....	29
Şekil 4.4.	Ag-CT nanopartikülünün XPS grafikleri.....	30
Şekil 4.5.	Ag-CT XRD grafiği.....	30
Şekil 4.6.	Ag-CT nanopartiküllerinin FE-SEM görüntüsü.....	31
Şekil 4.7.	Ag-CT nanopartiküllerinin EDX grafiği ve elementlerin yüzde grafikleri.....	32
Şekil 4.8.	Ag-CT nanopartiküllerinin zeta potansiyeli grafiği.....	32
Şekil 4.9.	SH-SY5Y hattında H_2O_2 ile LD_{50} değerinin belirlenmesi.....	33
Şekil 4.10.	SH-SY5Y hattında farklı konsantrasyonlarda Ag-CT uygulanması sonucu XTT absorbandsları.....	34
Şekil 4.11.	Önce farklı Ag-CT konsantrasyonları sonra LD_{50} değerinde H_2O_2 uygulanması sonucu XTT absorbands değerleri.....	35
Şekil 4.12.	Önce LD_{50} değerinde H_2O_2 sonra farklı Ag-CT konsantrasyonları uygulanması sonucu XTT absorbands değerleri.....	35
Şekil 4.13.	Ag-CT antimikrobiyal uygulamasına ait görseller.....	36

Şekil 4.14.	Farklı Ag-CT konsantrasyonlarının SH-SY5Y toplam antioksidan seviyeleri üzerine etkisi.....	38
Şekil 4.15.	Farklı Ag-CT konsantrasyonlarının SH-SY5Y toplam oksidan seviyeleri üzerine etkisi.....	39

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1. Antimikrobiyal aktivite alan çapı (mm) ölçüm sonuçları.....	37
Tablo 5.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında <i>in vitro</i> H ₂ O ₂ indüklü sitotoksitede çeşitlilik (Othman & Yabe, 2015).....	44
Tablo 5.2. TAS Referans Değerleri ve Açıklamaları.....	46
Tablo 5.3. TOS Referans Değerleri ve Açıklamaları.....	46

α -KİMOTRİPSİN İLE HAZIRLANAN GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLERİN (Ag-CT) H₂O₂ İLE İNDÜKLENMİŞ SH-SY5Y NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Nanoteknoloji gelişen dünyamızda hemen her alanda yeniliklere neden olmaktadır. Nanopartiküller çok farklı disiplinlerde ve çok farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin kullanım alanlarından biri de sağlık ve ilaçlardır. Nanopartiküller küçük boyutları ile hücre içine kolaylıkla girebilmeleri nedeniyle terapötik uygulamalar için oldukça umut vericidir. Bu çalışmada AgNO₃ α -kimotripsin aracılı indirgenmesi ile yeşil sentezlenen Ag-CT'lerin SH-SY5Y hücre hattı üzerinde oksidatif stres parametreleri üzerine etkisini incelenmiştir. Öncelikle sentezlenen Ag-CT'lerin FT-IR, RAMAN, Uv/Vis, XPS, XRD, SEM ve Zeta potansiyeli analizleri ile karakterizasyonu gerçekleştirildi. SEM analizi sonucu Ag-CT'lerin 26-28 nm boyutlarında kübik formda oldukları tespit edildi. SH-SY5Y hücre hattında H₂O₂ indüklü oksidatif stres oluşturuldu ve hücrelerin yarısının yaşadığı LD₅₀ değeri 400 μ M olarak belirlendi. SH-SY5Y hücre hattında sentezlenen Ag-CT'lerin canlılık üzerine etkisi incelendi ve 1 mg/ml konsantrasyonu ideal doz olarak belirlendi. Bu çalışmaların ardından LD₅₀ değerinde H₂O₂ ve Ag-CT birbirini ardına uygulandı. Buna göre Ag-CT dozu arttıkça H₂O₂'nin hücre üzerindeki öldürücü etkisinde azalma görüldü. Hücrelere önce Ag-CT uygulanması, önce H₂O₂ uygulamasına kıyasla yakın değerler vermekle birlikte daha yüksek canlılık oranı ile sonuçlandı. Disk difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilen antimikrobiyal testler sonucunda Ag-CT'nin *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. Albicans* ve *S. cerevisiae* üzerinde değişken düzeylerde alan açtığı görüldü. Yapılan TAS/TOS deneylerinin birbirini destekleyici verilerine göre Ag-CT, SH-SY5Y'de antioksidan etkinliğini artırarak oksidan seviyelerinde düşüslere neden oldu. Sonuç olarak yeşil sentezlenen Ag-CT, SH-SY5Y üzerindeki oksidan yükünü azaltıcı etki göstermiştir. Literatürde genellikle küresel olan AgNP'lere karşın Ag-CT'nin kübik formu onu daha az toksik kılmaktadır. Ag-CT'nin *in vitro* ve *in vivo* etkilerinin anlaşılması için daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Gümüş Nanopartikül, α -Kimotripsin, Ag-CT, Oksidatif Stres.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES (Ag-CT) PREPARED WITH α -CHYMOTRYPSIN ON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN H₂O₂-INDUCED SH-SY5Y NEUROBLASTOMA CELL LINE

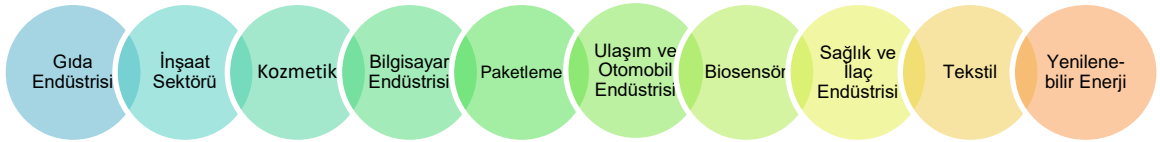
ABSTRACT

Nanotechnology causes innovations in almost every field in our developing world. Nanoparticles are used in many different disciplines and for many different purposes. One of the nanoparticle using disciplines is health and medicine. Nanoparticles are quite promising for therapeutic applications due to their small size and ability to easily enter the cell. In this study, the effect of α -chymotrypsin-mediated green synthesized Ag-CT by AgNO₃ reduction on oxidative stress parameters on SH-SY5Y cell line was investigated. First of all, the synthesized Ag-CTs were characterized by FT-IR, RAMAN, Uv/Vis, XPS, XRD, SEM and Zeta potential analyses. As a result of SEM analysis, it was determined that Ag-CT was in cubic form with dimensions of 26-28 nm. H₂O₂-induced oxidative stress was created in SH-SY5Y cell line and the LD₅₀ value experienced by half of the cells was determined as 400 μ M. The effect of Ag-CT synthesized in the SH-SY5Y cell line on viability was investigated and 1 mg/mL concentration was determined as the ideal dose. Following these studies, H₂O₂ and Ag-CT were applied one after the other at the LD₅₀ value. Accordingly, as the Ag-CT dose increased, a decrease in the lethal effect of H₂O₂ on the cell was observed. Applying Ag-CT to the cells first resulted in higher viability rates, although giving similar values compared to applying H₂O₂ first. As a result of the antimicrobial tests performed with the disk diffusion method, it was observed that Ag-CT opened up zones on *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. Albicans* and *S. cerevisiae* at variable levels. According to the supporting data of the TAS/TOS experiments, Ag-CT increased the antioxidant activity in SH-SY5Y and caused decreases in oxidant levels. As a result, green synthesized Ag-CT showed a reducing effect on the oxidant load on SH-SY5Y. In contrast to the generally spherical AgNPs reported in the literature, the cubic form of Ag-CT makes it less toxic. More comprehensive studies are needed to understand the in vitro and in vivo effects of Ag-CT.

Keywords: Silver Nanoparticle, α -Chymotrypsin, Ag-CT, Oxydative Stress.

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji gelişen dünyamızda hemen her alanda yeniliklere neden olmaktadır. En basit ifadeyle nano boyutta teknoloji olarak tanımlanmaktadır. Ancak bu tanımından 1-100 nm aralığını anlamak doğru bir çıkarım yapmaya engel olacaktır. Bu kargaşanın önüne geçmek adına nanoteknoloji, kısaca atomik hassasiyette teknoloji veya atomik hassasiyette mühendislik olarak da ifade edilebilir (Nasrollahzadeh, Sajadi, vd., 2019). Oldukça farklı alanlarda (Şekil 1.1) kullanılan nanopartiküllerin tanımı, malzemeye, kullanılacağı alana ve ilgili uygulamalara göre farklı sınıflandırılabilir. Daha dar anlamda, malzemenin fiziksel özelliklerinde büyük değişimin yaşandığı 10-20 nm boyutundan küçük parçacıklar olarak kabul edilir (Hosokawa vd., 2008). Öte yandan 1-1000 nm arası parçacıklar da nanopartikül olarak kabul edilse de görünür ışığın dalga boyunun yarısı (400 nm) alt sınır olacak şekilde bunlara mikron altı parçacıklar, daha altındaki boyutlara ise nanopartikül denir (Hosokawa vd., 2008). Bununla birlikte malzeme en az %50'si 1-100nm boyutunda olan ve en az 1 veya daha fazla dış boyutu olan parçalardan oluşmalıdır (Modena vd., 2019).



Şekil 1.1. Nanoteknoloji kullanım alanları (Malik vd., 2023'e göre yeniden düzenlenmiştir)

Nanopartikül malzemeler, daha büyük boyutlu malzemelerden farklı optik, elektriksel, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler göstermektedir (Modena vd., 2019; Nasrollahzadeh, Sajadi, vd., 2019). Aynı hacimde daha fazla yüzey alanı sağladığı için nanopartiküller büyük malzemelerden daha yüksek çözünürlük ve reaksiyon oranları gösterirler (Modena vd., 2019). Bu sayede katalizör olarak da kullanılabilirler (Nasrollahzadeh, Sajadi, vd., 2019). Bu nedenlerle boyut ve yapısal özelliklerin yanında yeni özellikler ve daha iyi verim elde etmek için malzemeler nano boyutta

yapılandırılmalıdır. Zira aynı uygulamalar için aynı malzemenin kaba formuna kıyasla nano yapılandırılmış formu daha iyi performans göstermektedir (Nasrollahzadeh, Sajadi, vd., 2019).

1.1. Nanomalzemeler ve Çeşitleri

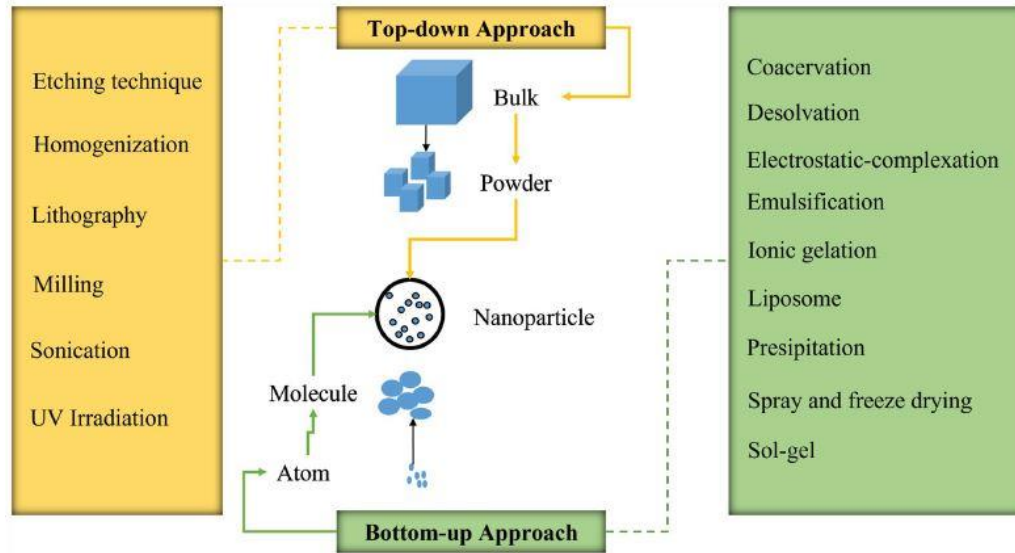
Nano malzemeler genel olarak inorganik, organik, kompozit ve karbon bazlı nanoyapılı malzemeler olarak dört ana başlıkta değerlendirilebilir (Nasrollahzadeh, Issaabadi, vd., 2019). Lipozomlar, dendrimerler, miseller ve polimerik kapsüller organik nanopartiküllere, kuantum noktaları, metal nanopartiküller, silika nanopartiküller, demir oksit nanopartiküller ve benzeri de inorganik nanopartikül yapılara örnek verilebilir (Wuttke vd., 2017).

Kompozit nanoyapılar, nanoboyutlu parçacıkların başka nanopartiküller veya daha kaba malzemelerle birleştirilmesiyle oluşan kompozitlerdir. Karbon bazlı nanoyapılar ise elmaslar, fullerenler, karbon nanotüpler, grafen ve karbon nanofiberlerdir. Bunların dışında nanokristaller, nanofiberler, nanogözenekli malzemeler, nanokablolar ve nanoçiçekler gibi pek çok farklı çalışma alanları günümüzde hâlâ popülerliğini korumaktadır (Nasrollahzadeh, Issaabadi, vd., 2019). Bu gibi nanomalzemeler yukarıda saydığımız özellikleri nedeniyle biyomateryal olarak sağlık alanında ve ilaç dağıtımında, korozyon önleyici, hava temizleyici etkisi ile inşaat sektöründe, çürümeye karşı antimikrobiyal ajan olarak gıda endüstrisinde, kozmetikten yenilenebilir enerji kaynaklarına kadar çok farklı alanlarda kullanılmak üzere araştırılmaktadır (Alshemary vd., 2016; Hanus & Harris, 2013; Malik vd., 2023).

1.2. Nanopartikül Sentez Yöntemleri

Nanopartikül terimi yukarıda belirttiğimiz üzere çok farklı disiplinlerde ve çok farklı amaçlarla kullanıldığından çok çeşitli üretim ve sentez yöntemleri vardır. Nanopartikül sentez yöntemleri fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak gruplandırılmaktadır. Fiziksel ve kimyasal sentez yöntemlerinin kullanımı daha yaygın olmakla birlikte toksisite ve verimlilik gibi sınırlılıkları mevcuttur (Kumari vd., 2023). Biyojenik üretim yollarının geliştirilmesi basit, çevre dostu olmasının yanı sıra klasik yöntemlerle üretilemeyen

spesifik bileşimli kontrollü nanopartiküllerin üretilmesine olanak sağladığı için giderek daha çok ilgi görmektedir (Popescu vd., 2010). Daha özel olarak bakacak olursak metal nanopartikül sentez yöntemlerini (Şekil 1.2) genel olarak aşağıdan yukarı (bottom up) ve yukarıdan aşağı (top down) olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür (Pacioni vd., 2015).



Şekil 1.2. Nanopartikül sentezinde yukarıdan aşağı ve aşağıdan yukarı yaklaşımlar (Indiarito vd., 2022)

1.2.1. Yukarıdan Aşağı Yaklaşım (Top –Down)

Büyük malzemelerin parçalanmasıyla nanopartikül elde edildiği yöntemler yukarıdan aşağıya yöntemler içerisinde kabul edilmektedir. Önceleri kırma ve öğütme gibi kaba fiziksel işlemler kullanılırken daha sonraları mikroakışkanlar ve litografi gibi daha karmaşık yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır (Kumari vd., 2023). Mekanik enerji, yüksek enerji lazerleri, termal ve litografik yöntemler yukarıdan aşağıya nanopartikül üretim yöntemleridir (Pacioni vd., 2015). Atomizasyon, Odaklanmış İyon Işını Litografisi ve Lazer Ablasyon bunlara birkaç örnek olarak sayılabilir. Mikron boyutunda malzeme üretimine göre bir gelişme olarak kabul edebileceğimiz yukarıdan aşağıya yöntemlerde malzemenin yüzey yapısında kusurlar mevcuttur (Kumari vd., 2023). Ayrıca bu yöntemlerle daha büyük partikül boyutları elde edilmektedir (Indiarito vd., 2022).

1.2.2. Aşağıdan Yukarı Yaklaşım (Bottom Up)

Atom ve moleküller gibi en küçük yapı taşlarından nanopartikülün üretildiği yöntemler aşağıdan yukarıya yöntemler olarak değerlendirilmektedir. Katı-sıvı-gaz fazı ve biyolojik yöntemler bu gruba ait sentez yöntemleridir (Pacioni vd., 2015). Kimyasal buhar biriktirme ve atomik tabaka biriktirme gaz fazı yöntemlerine aitken, metal tuzlarının indirgenmesi, sol-jel işlemleri, şablonlu sentez ve elektrodepozisyon sıvı faz yöntemlerine örnekler olarak verilebilir. Bu çalışmada sıvı faz yöntemlerinden olan kimyasal indirgenme yöntemlerinden olan metal tuzlarının indirgenmesi yöntemi ile gümüş nanopartiküller sentezlenmiştir. Bu yöntemde iki öncü çözelti karıştırılarak küçük boyutlu inorganik nanopartiküller sentezlenebilmektedir (Kumari vd., 2023). Aşağıdan yukarı yaklaşımlar yüzey yapısı ve partikül boyutu konusunda daha iyi sonuç sağlamaktadır (Indiarito vd., 2022). Ayrıca yukarıdan aşağıya yöntemlere göre uygun maliyetlidir (Kumari vd., 2023).

1.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyon Yöntemleri

Birbirinden farklı geniş çalışma alanlarını ilgilendiren nanomalzemelerin karakterizasyonları, gösterdikleri özellikler ile doğrudan ilişkili olduğundan önemlidir. Bu bağlamda nanomalzemelerin, boyut, şekil, yüzey yükü ve gözeneklilik gibi özelliklerinin analizlerini yapmak için çeşitli karakterizasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Karakterizasyon için farklı yöntemler olmakla birlikte bunlardan bazıları daha geniş yelpazede malzeme grubuna hitap eden ve yaygın kullanılan yöntemlerdir.

1.3.1. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM)

TEM, en önemli ve yaygın kullanılan nanopartikül karakterizasyon yöntemlerinden biridir. Numuneler 200 nm'den ince olacak şekilde hazırlanır. Numuneye elektron ışınları düşürülmesi ile numunenin mikrografi 0,05-0,1 nm hassasiyette çözünürlük ile elde edilir. TEM genel olarak boyut ve şekil hakkında bilgi verse de ışınların odaklanmasıyla bölgesel olarak kristal yapı hakkında da bilgi sunabilir. Bununla birlikte boyut dağılımını hesaplamak için yaklaşık olarak 1000 partikülün boyu ölçülür. Bu işlem manuel olarak sayımla veya otomatik parçacık analiz programları vasıtasıyla gerçekleştirilir. Bu

yöntemle ölçülmek istenen nanopartikülün yüksek vakum ve ışın enerjisine dayanabilmesi gerekmektedir. Bu yüksek enerjili ışın organik, hibrit ve polimer numunelerde hasara neden olabilir. Bunun önüne geçmek için başka bir yöntem olan Cryo-EM yöntemi kullanılabilir veya hızlanma voltajı düşürülebilir (Modena vd., 2019).

1.3.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobunda elektron ışınları numuneye gönderilir ve numuneden çıkan ikincil elektronlar tespit edilerek numune yüzeyi görüntülenmektedir. Ancak burada kullanılan elektron ışınının enerjisi TEM'e göre daha düşüktür. Bu ışının derinlere nüfuz edememesine neden olur. Sonuç olarak TEM numune yüzey ve hacmi hakkında bilgi verebilirken SEM sadece numune yüzeyi hakkında bilgi vermektedir. SEM mikrograflarda ışın enerjisinin nispeten düşüklüğüne bağlı olarak çözünürlük >2-3 nm ile sınırlıdır. Yüksek çözünürlük sağlamak için iletken alt tabakalar kullanılmalıdır. Numune iletken değilse analizden önce 5-10 nm kalınlığında metal film ile kaplanmalı ancak mikrograflar yorumlanırken bu film de hesaba katılmalıdır. Numune hasarı oluşma ihtimalinin azlığı ve >100 nm kalınlıktaki numunelerden de ölçüm alınabilmesi düşük ışın enerjisinin SEM'de sağladığı avantajlardır. SEM cihazlar numune yüzeyi ve elektron ışınlarının etkileşimi sonucu elektronların saçılım durumuna göre numune yüzeyinin bileşimi hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca SEM, TEM'e göre hem daha hızlı hem de daha ekonomiktir (Modena vd., 2019).

1.3.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

Atomik kuvvet mikroskobu atom boyutunda nesnelere yüzeylerini araştırmak ve görselleştirmek için kullanılan prob taramalı bir mikroskoptur. Konsolun ucu nesne yüzeyini tarar ve bu esnada oluşan etkileşimler konsolun ucundaki fotodiyotlar vasıtasıyla kaydedilir. AFM genel olarak 3 farklı mod ile kullanılır. Temas modunda prob numune yüzeyine doğrudan temas eder. Numune yüzeyinin yapısına bağlı olarak yüzeydeki atomlar ve probun itilmeleri konsolda dikey sapmalara neden olur ve bu sapmalarla yüzey görselleştirilir. Konsol yanıl sapmaları yanıl kuvvet mikroskobu tarafından ölçülebilmekte ve genellikle iki farklı malzemenin sınırındaki sürtünme kuvvetlerini ölçmede kullanılmaktadır. Temassız modda uç yüzeyin üzerinde seyrederek ve

numune yüzeyi - prob etkileşimlerindeki değişiklikler üzerinden numune yüzeyi hakkında bilgi sahibi olunur. Dokunma modu veya kesikli modda ise uç numune üzerinde seyrederken aralıklarla numuneye temas eder. Dokunma modu sıvı numunelerde de kullanılabilir. Manyetik kuvvetler, kimyasal kuvvetler ve yüzey potansiyeli gibi farklı parametreler de AFM ile ölçülebilmektedir (Modena vd., 2019).

1.3.4. X-Işını Kırınımı (XRD)

X-ışını kırınımı, kristal yapıdaki numunelerin çeşitli özelliklerini araştırmak için kullanılan bir yöntemdir. Atomik düzlemlere düşürülen X ışınları, kırılım, emilim, saçılım ve kırınım uğrar (Titus vd., 2019). Yüksek voltaj altında X ışınlarının oluşturulduğu kaynak, numune ve detektör bulunur. Kaynaktan çıkan X ışınları her yöne yayılır. Kaynak- numune ve numune- detektör arasında yarıklar yerleştirilerek gürültü miktarı azaltılır. Detektör tarafından yakalanan X ışını sinyalleri mikroişlemci tarafından işlenir. Bu işlemler 3 elemanın açıları değiştirilerek tekrarlanır ve tarama tamamlanır. Atomların düzen ve tiplerine göre X ışınları her element tarafından farklı şekilde kırılır. Böylece her bir kristal yapının kendine özgü atomik dizilimleri farklı bir kırınım profili sergiler. Bu kırınım profilleri numunenin kristal yapısı, kristalleşme derecesi ve element oranları hakkında bilgi verir (Modena vd., 2019; Titus vd., 2019).

1.3.5. X- Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

Bir malzemenin element bileşimini tahmin etmek için kullanılan bir yüzey analiz yöntemidir. Ayrıca numunedeki kirleticileri saptamak için de kullanılabilir (Titus vd., 2019). Malzeme yüzeyine gönderilen X ışını ile elektronlar çekirdek yörüngelerinden uyarılarak kopartılır. Kopan elektron sayısı, X ışının enerjisi ve bağlanma enerjisi gibi verilerden yararlanılarak bir denklem üzerinden element bileşimi tahmin edilir.

1.3.6. Kütle Spektrometresi (MS)

Kütle spektrometresi birkaç nanometreden yüzlerce nanometreye ulaşan çaplarda nanopartiküllerin analizini yapabilmektedir. MS yöntemi, nanopartiküllerin boyut dağılımları ve element bileşimleri hakkında bilgi verir. MS yönteminin belki de en

önemli özelliği yumuşak dokuyu iyonize edebilmesi sayesinde toksikoloji çalışmalarında nanopartikül çözeltilerin organlar tarafından alınımı ve biyodağılımını inceleme olanağı sağlamasıdır (Modena vd., 2019)

1.3.7. Zeta Potansiyeli

Bir elektrik alan altındaki parçacığın hızına zeta potansiyeli denir. Numuneye ait parçacıklar kırılma indisi bilinen bir solvent içinde süspansiyon edilir. Daha stabil malzemeler daha yüksek elektrik alan uygulanmasına gereksinim duyar. Bu nedenle zeta potansiyelinin büyüklüğü parçacık kararlılığı hakkında bilgi verir. Öte yandan solvent pH değeri de nanopartikülün yüzeyindeki yük büyüklüğünü etkileyebildiğinden önemli bir faktördür (Titus vd., 2019).

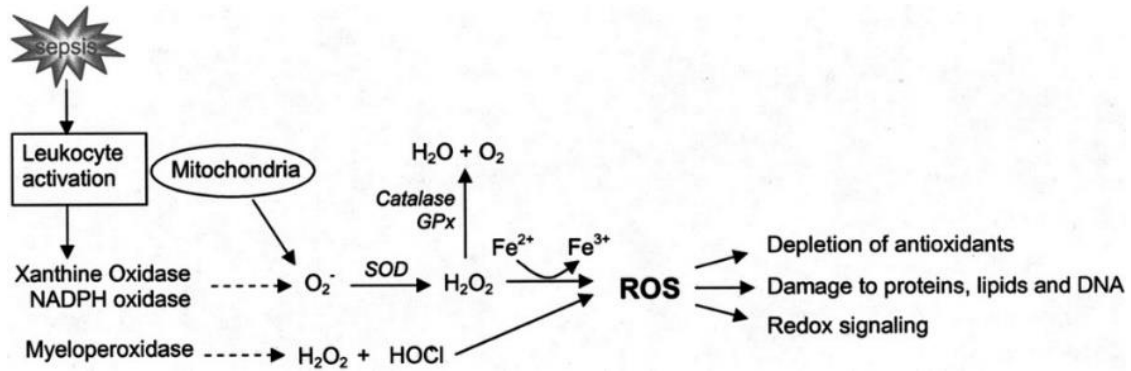
1.3.8. UV-Görünür Spektrofotometri (UV-Vis)

UV-Vis spektrofotometri, şeffaf bir sıvı içerisinde analiz edilecek numunenin konsantrasyonunu ölçmeye yarayan ve yaygın kullanılan bir yöntemdir. Yöntemin ucuz ve kolay olması, kolay temin edilmesi avantajlarındandır. Numunenin emilim özellikleri sıvı ile olan etkileşiminden etkilenebilir ve bu durum spektrum şekli üzerinde etkili olmaktadır (Shard vd., 2020).

1.4. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri veya kısaca ROS ifadesi hücrenin doğal fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri içerisinde oluşan eksik indirgenmiş oksijen türlerine atfen kullanılmaktadır (Kaya & Yıldırım, 2021; Yang vd., 2019). Hücrede bu ROS'ların miktarının fazla olması, ROS - antioksidan dengelerinin bozulması veya antioksidanların yetersizliği gibi durumlarda hücrenin bulunduğu durum itibarıyla yoğun ROS maruziyeti oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır. Hücrenin hayatta kalması, hücre ölümü ve farklılaşması, hücre sinyalizasyonu ve inflamasyonla ilgili faktörlerin oluşturulması bu fizyolojik ve biyokimyasal süreçlere örnekler olarak sayılabilirler (Dayem vd., 2017). Normal metabolik süreçlerle üretilen bu reaktif oksijen türleri sinyal iletimi, mitokondriyal elektron taşınması, nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ve gen ekspresyonu

gibi çeşitli işlevlerde etkili olmaktadır (Bayr, 2005). Reaktif oksijen türleri biyolojik sistemlerde enzimatik ve enzimatik olmayan süreçlerle üretilmektedir. Şekil 1.7’de gösterildiği gibi nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NOX), ksantin oksidoredüktaz (XOR) ve miyeloperoksidaz (MPO) gibi enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar bunlara örnekler olarak verilebilir (Bayr, 2005). NOX, NADPH’dan oksijene elektron transferini katalizlemekle görevlidir ve memelilerde en az 7 izoformu olduğu bilinmektedir (Kim vd., 2015). Bu izoformların herbirinin hücresel konumu, düzenlemesi ve işlevi kendine özgüdür. Ksantin oksidoredüktazın birbirine dönüşebilen formları ksantin dehidrogenaz ve ksantin oksidazdır. Ksantin oksidazlar pürinlerin katabolizmasında anahtar enzim olarak kabul görmektedirler. Çok sayıda substrat ile çalışabilir ve ürik asit, süperoksit ve hidrojen peroksit üretmek için elektronları oksijene geçirebilirler (Gandhi & Abramov, 2012). Bu enzimler aracılığıyla hücre içinde üretilen ROS’lar ayrıca endojen ROS olarak da adlandırılmaktadır. Eksojen ROS’ların üretimi ise UV, iyonlaştırıcı radyasyon ve ROS üretimi yoluyla etki eden ilaçların alınması ile gerçekleşir. Öte yandan çevresel toksin ve kimyasal alımı da metabolizmalarının yan ürünü olarak ROS üretilmesine neden olabilmektedir (Kim vd., 2015).



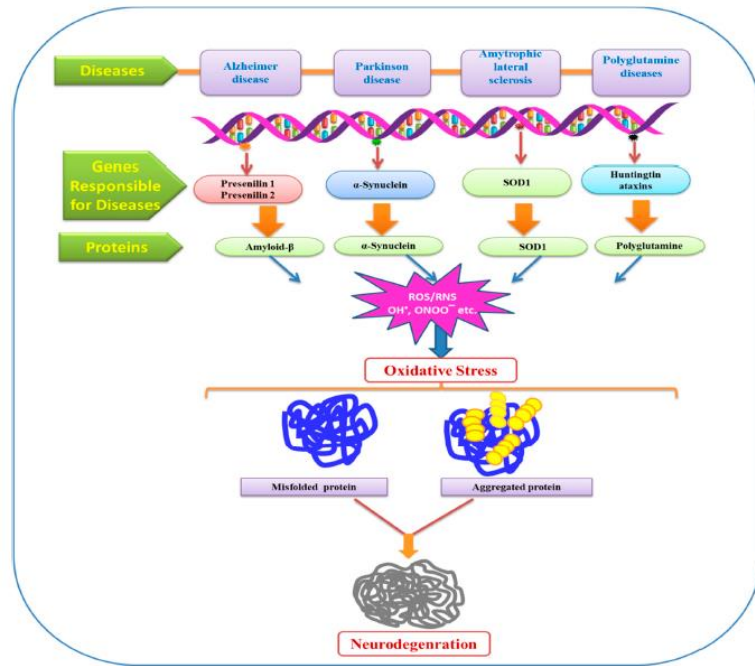
Şekil 1.3. Enzimatik ve enzimatik olmayan süreçlerle ROS oluşumu ve ROS’ların bazı etki alanları (Bayr, 2005)

Biyolojik olarak önemli olan reaktif oksijen türlerine örnek olarak süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$), singlet oksijen (1O_2) ve hidroksil radikali ($\bullet OH$), hidroperoksil (HO_2^{\bullet}), karbonat ($CO_3^{\bullet-}$), peroksil (RO_2^{\bullet}), alkoksil (RO^{\bullet}) gibi serbest radikaller, karbon dioksit radikali ($CO_2^{\bullet-}$), ve hidrojen peroksit (H_2O_2), hipobromik asit ($HOBr$), hipoklorik asit ($HOCl$), ozon (O_3), organik peroksit ($ROOH$), peroksinitrit ($ONOO^-$), peroksinitrat (O_2NOO^-),

nitrik oksit (NO), ve hipoklorit (OCl^-) gibi radikal olmayan oksitleyici türler sayılabilir (Dayem vd., 2017).

ROS'ların aşırı üretimi lipidler, proteinler ve DNA gibi hücrel biyomoleküller ve biyopolimerler üzerinde oksidatif hasarlara ve dolayısıyla damar sertliği, kanser, diyabet, sinir iletim sistemi bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklara neden olabilir (Collin, 2019; Kaya & Yıldırım, 2021). Proteinlerin ROS aracılı oksidasyonu, hidroksil gruplarının eklenmesi veya protein bazlı karbonillerin oluşuyla sonuçlanır. Karbonil grupları, amino asitlerin R gruplarının oksidasyonu veya peptid bağlarının kesilmesiyle proteine dahil edilebilmektedir. Öte yandan oksidasyona uğrayan lipid ve DNA gibi biyomoleküller reaktif karbonil türleri ve aldehytlerin üretilmesine neden olabilir ve bunlar da daha sonra proteinin yapısına dahil olabilir. Proteinlerin karbonillenmesinin ölçümünün, oksidatif stres, yaşlanma, fizyolojik bozukluklar ve Alzheimer gibi çeşitli durumlarda oksidatif hasarın boyutunun tahmin edilmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir (Gella & Durany, 2009).

Yağların peroksidasyonu malondialdehit (MDA), akrolein, 4-hidroksi-2-heksenal (HHE) ve 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) gibi reaktif aldehyt türlerinin oluşmasına neden olur. Bu reaktif aldehytlerden HNE zarda bulunur ve zar proteinleri ile etkileşerek sinir hücrelerinde sinyal iletimini engelleyebilir, hasara neden olabilir ve hatta bu durum hücre ölümü ile sonuçlanabilir. Ayrıca HNE, A β ile reaksiyona girerek senil plakların oluşumuna neden olmaktadır (O. De Castro vd., 2017). Yine bunların dışında HNE, kinaz aktivasyonu ve hücre içi kalsiyum sinyallemesinin düzensizliğine neden olarak protein modifikasyonlarına ve nihai olarak apoptozun indüklenmesine neden olur (Gella & Durany, 2009). Oksidatif stresten etkilenen diğer bir biyomolekül olan DNA'nın bazıları hidroksilasyon, protein karbonilasyonu ve nitrasyonuna karşı hassastır. Artan oksidatif stresin DNA üzerindeki diğer bir etkisi ise iplik kopmalarına neden olmasıdır (Gella & Durany, 2009).



Şekil 1.4. Nörodegeneratif hastalıklar ve oksidatif stres ilişkisi (Singh vd., 2019)

1.5. Nörodejeneratif Hastalıklar ve Oksidatif Stres

Beynin peroksidize olmaya yatkın yüksek doymamış yağlı içeriği, toplam vücudun %20-25'ine denk gelen yüksek oksijen tüketimine karşılık toplam vücut ağırlığının %2'si ağırlığında olması, antioksidan enzimlerin göreceli yetersizliği (örneğin beyindeki katalaz içeriği karaciğer ve kalbin sadece %10-20'sine karşılık gelir) beyni ROS'lara karşı savunmasız kılmaktadır (Nunomura vd., 2006). Nispeten çok daha az kütleli beyin yüksek oksijen tüketimi ve bu oksijenin kullanılması sonucu doğal olarak ortaya çıkan ROS'ları zararsız hâle getirecek enzimlerden göreceli yoksunluğunun bir sonucu olarak nöronların bu metabolik ve oksidatif stresten etkilenmeleri beyin yapısı gereği olağandır. Yukarıda saydığımız yağ asitlerinin peroksidasyonu, proteinlerin karbonilasyonu, DNA ve RNA hasarı Alzheimer, Parkinson ve Amyotrofik Lateral Skleroz(ALS) hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda oksidatif stresin biyobelirteçleridir (Collin, 2019). Bu oksidatif hasarların yol açtığı anormal protein birikimleri genellikle nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir. Parkinson hastalığında α-sinükleinin agregasyonu, Huntington proteini ve bakır/çinko süperoksit dismutazın toplanması sırasıyla Huntington hastalığı ve ALS, senil plaklar ve nörofibriler yumakların birikimi ise Alzheimer hastalığı ile karakterizedir. Parkinson'da beyin kara

maddesindeki çoklu doymamış serbest yağ asitlerinin konsantrasyonu azalırken lipid peroksidizasyon ürünleri olan MDA ve HHE seviyelerinde artış gözlenmektedir (Dalfó vd., 2005). Kara maddede nöronların yaygın mitokondriyal DNA delesyonlarında oksidatif hasarın etkili olabileceği (Reeve vd., 2008) ve yine oksidatif/nitratif hasarın kesin varlığı belirtilmiştir (Halliwell, 2001; Houldsworth, 2023).

Bir motor nöron hastalığı olan ALS'nin ailesel vakalarının çok az bir kısmının süperoksit dismutaz enzimini kodlayan gendeki mutasyonlar sonucu olmasına karşın sporadik ALS hastalarının idrarlarında, beyin omurilik sıvılarında ve kanlarında oksidatif stres biyobelirteçlerinin aşırı miktarda bulunduğu belirtilmiştir. ALS hastalığının nedenleri hâlâ tam olarak bilinmemekle birlikte mitokondriyal hasarın diğer faktörlerle birlikte etkili olduğu bilinmektedir (Singh vd., 2019). Mitokondriyal hasar ROS'lar ve oksidatif stres ile yakından ilişkilidir. Otozomal baskın geçişli ilerleyici bir nörodejeneratif hastalık olan Huntington hastalığı huntingtin geninde meydana gelen bir mutasyon nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Hastalığın temel nedeni bu mutasyon ile kanıtlanmış olsa da bunun yanında yanlış protein katlanmaları, anormal proteoliz, protein agregasyonu, eksitotoksik ve oksidatif stres de Huntington hastalığında nöron kayıpları ile ilişkilendirilmiştir (Singh vd., 2019). Huntington hastalığı literatürde oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir ve hastalıkta baskın bir oksidatif stres olayı görüldüğü de kesindir ancak oksidatif stresin hastalığın bir nedeni mi yoksa daha önceki meydana gelen olayların bir sonucu mu olduğu hâlâ tartışılmaktadır (A. Kumar & Ratan, 2016). Huntington hastalığı ile ilgili transgenik farelerde yapılan bir çalışma ise hastalıkta reaktif nitrojen türlerinin etkisini ortaya koymuştur (Halliwell, 2001).

1.6. Alzheimer ve Oksidatif Stres

Alzheimer'ın belirteçleri olan senil plaklar ve nörofibriler yumaklar ışık mikroskobu altında kolaylıkla teşhis edilebilmelerine karşın bu süreç hastalığın son aşamalarına tekabül etmektedir. Alzheimer'da oksidatif stresin mi yoksa A β oligomerlerinin mi daha önce olduğu oldukça tartışmalıdır. Zira A β 'nın bakır ve demir gibi metallerle yaptığı kompleksler ROS üretimini tetiklemektedir (Cheignon vd., 2018). Ancak yine de uzun süreli oksidatif hasar birikiminin A β birikimi ve nörofibriler yumakların oluşumuna neden olduğu bilinmektedir ve dolayısıyla oksidatif stresin A β birikiminden önce geldiği kabul

edilmektedir (Tamagno vd., 2021). A β 'nin antioksidan ve nörotrofik özellik gösterdiği bilinmektedir (Atwood vd., 2002; Kontush, 2001). Buna göre A β ₁₋₄₀ ve oligomerleşmesi engellendiği takdirde A β ₁₋₄₂'nin nöronları demir ve bakır kaynaklı toksisiteden koruduğu gösterilmiştir (Zou vd., 2002). Yine bu verilerle tutarlı olarak sıçan serebral korteksine eş zamanlı demir ve insan A β ₁₋₄₂ enjeksiyonu sadece demirin tek başına enjeksiyonundan daha az toksik olduğu gösterilmiştir (Bishop & Robinson, 2003). Öte yandan metal bağlama bölgesinden yoksun A β ₂₅₋₃₅ oksidasyonu engellemede daha az etkilidir (Kontush, 2001). Bütün bu veriler, A β 'nin bir metal şelatlayıcı görevi görerek hücreyi metal kaynaklı oksidasyonlardan koruyucu bir nöroprotektif olduğunu düşündürmektedir (Nunomura vd., 2006).

A β proteinin gösterdiği önemli antioksidan özelliklerin Tau proteini için de geçerli olabileceği öne sürülmektedir (Nunomura vd., 2006). Nörofibriler yumak oluşumunun Alzheimer'da oksidatif stresten sonra geldiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bilindiği üzere oksidatif stres glikojen sentaz kinaz-3 ve mitojenle aktive olan protein kinazlar gibi çeşitli kinazların aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu kinazlar tarafından fosforillenen tau proteinleri daha önce de belirtildiği gibi yumaklar oluşturma eğiliminde olmaktadır. Buna göre nörofibriler yumakların nöron oksidasyonunun bir sonucu olması muhtemeldir. Alzheimer'lı postmortem beyin dokularında nörofibriler yumak bulunduran nöronların bulundurmayanlara göre daha az nükleik asit oksidasyonuna uğradığını gösteren çalışma da bu önermeyi destekler niteliktedir (Nunomura vd., 2001).

Oksidatif modifiye makromoleküllerin Alzheimer'lı hastaların biyolojik sıvılarında görüldüğü bildirilmiştir (Smith vd., 2000). Oksidatif stres, senil plaklar ve nörofibriler yumakların oluşumundan önce hücreyi apoptoza veya yenilenmeye itmektir. Apoptoza giden süreç başarısız veya eksik ilerlemekte, rejenerasyon girişimi ise hücreyi tekrar hücre döngüsüne sokmakta ve bu süreç de hücrenin daha çok dejenerasyona uğramasına neden olmaktadır. Bu durumun genetik risk faktörlerini tetikleyerek hücreyi Alzheimer'a götürebileceği düşünülmektedir.

Ailesel/Erken başlangıçlı Alzheimer'a yol açan germ hattı mutasyonları da oksidatif strese neden olmaktadır. Buna göre APP, PSEN1 veya PSEN2 mutasyonlarına sahip hücrelerin oksidatif stres kaynaklı hücre ölümüne ve/veya azalmış antioksidan savunmalara karşı duyarlılıklarının arttığı bildirilmektedir. Ayrıca sporadik Alzheimer ile

ilişkili olan Apo-E gen alellerinden $\epsilon 4$ alleli de oksidatif stres ile ilişkilidir. Buna göre *in vitro* çalışmalarda Apo-E $\epsilon 2$ alelinin antioksidan aktivitesinin en yüksek, $\epsilon 4$ alelinin antioksidan aktivitesinin ise en düşük olduğu bildirilmiştir. Bu veriler Alzheimer'lı beyinlerin otopsi sonuçları ile de desteklenmiştir.

Azheimer'in çevresel etmenlerinden olan sigara kullanımı, yüksek kalori alımı, egzersiz eksikliği, alüminyum maruziyeti ve entelektüel aktivite eksikliği de yine reaktif oksijen türlerinin miktarında artış ve/veya endojen antioksidan kapasitenin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Nunomura vd., 2006). Deney hayvanlarıyla yapılan bir çalışmada birkaç ay boyunca diyet kısıtlamasına tabi tutulan sıçan ve farelerde nöroprotektif etkili protein seviyelerinin artması yoluyla eksitotoksik ve oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (Mattson vd., 2002). Diyet kısıtlamasının yanında egzersiz ve entelektüel aktivitenin de endojen antioksidan kapasitesini artırdığı belirtilmektedir (Mattson vd., 2002). Bu durumların her biri hafif düzeyde strese sebebiyet vermektedir. Stresle ilişkili proteinlerin üretilmesi ve daha sonrasında oksidatif stresi azaltıcı yolların dereye girmesi suretiyle hücrelerin hayatta kalması, nörogenez, sinaptik plastisite ve öğrenme ve hafızaya alma sağlanmış olur (Mattson vd., 2002).

1.7. Alzheimer'da Antioksidan Temelli Tedavi Yaklaşımları

Reaktif oksijen türlerinin, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir rol aldığı konusunda yukarıda daha ayrıntılı bir şekilde detaylandırıldığı üzere güçlenen bir fikir birliği oluşmuştur (Jia vd., 2014). Alzheimer'da erken değişikliklerden biri olan oksidatif stres ayrıca hafif bilişsel bozukluk ile de karakterizedir. Klinik öncesi Alzheimer hastaları ve hafif bilişsel bozukluk mağduru kişilerde lipid peroksidasyonu geliştiği ve bu oksidatif hasarın da Alzheimer patogenezinde erken rol oynayabileceğini gösteren veriler mevcuttur (Sahni vd., 2011). Oksidatif stres, hücre kültürlerinde intraselüler A β birikimini ve tau fosforilasyonunu indüklediği bilinmektedir. Bu bağlamda antioksidan takviyesi ile hastalığın erken evrelerinde tedavi umudu taşıyan yaklaşımlar vardır. Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde en çok incelenen antioksidan tedavi yaklaşımları beyindeki lipid peroksidasyonunun temizleyicisi E vitamini ve hücre içi indirgeyici molekül olarak C vitamini üzerine yoğunlaşmıştır (Gandhi & Abramov, 2012). Buna göre Alzheimer'lı farelerde E vitamini takviyesinin bilişsel işlevleri

iyileştirdiği ve A β birikimini azalttığı gösterilmiştir (Conte vd., 2004). Yine farelerle yapılan başka bir çalışmada ise E vitamininin etkinlik gösterebilmesi için hastalığın erken dönemlerinde alınması gerektiği, geç dönemlerinde ise etkili olmadığı belirtilmiştir (Sung vd., 2004).

1.8. α -Kimotripsin Enzimi ve Alzheimer

Alfa kimotripsin 3 polipeptidin disülfit bağlarıyla bağlanması ile oluşan 241 amino asit içeren ve 25kDa moleküler ağırlığa sahip bir serin endopeptidazdır. Enzim kodu EC 3.4.21.1'dir. Serin peptidazlar, hidrolazların bir alt grubu olup pek çok önemli biyolojik aktiviteye katılırlar ve tüm proteazların üçte biri olarak en bol görülen proteaz grubudur (Legerská vd., 2020; Özden, 2019). Serin endopeptidaz ailesinin ilk elemanı olan α -kimotripsinin fizyolojik görevi proteinlerin hidrolizini katalizlemektir (Bender vd., 1967). Bir endopeptidaz olması nedeniyle proteinleri ucundan değil içinden kesen α - kimotripsin, pankreastan zimojen olarak salgılanan, pankreas özsuyuyla duodenuma taşınan ve burada tripsin tarafından aktiveleştirilen kimotripsinojenden meydana gelir (Senousy vd., 2022). Peptid bağı, amid bağı ve amino asitlerin amidlerinin bölünmesini katalizler. Fenilalanin, Lösin, Tirozin ve Triptofan'ı karboksil ucundan hidrolizler. İnflamatuvar hastalıklarda önemli yeri olan enzim, akut hastalıklarda patojenik polipeptidlerin hidrolizi ve kronik durumlarda fibröz oluşumların tasfiye edilmesinde görev almaktadır (Coyas, 1963).

Kimotripsin gibi serin proteazları inhibe eden ve serpinler olarak adlandırılan protein grubunun ve insanda bilinen 37 türü bulunmaktadır (Sanrattana vd., 2019). Serin proteazlar ve inhibitörleri arasındaki dengenin bozulmasının patolojik sonuçlara yol açabildiği bildirilmiştir. Bu nedenle serpinlerin seviyeleri nörodejeneratif hastalıkların anlamlandırılmasında kritik bir faktör olarak kabul edilmektedir (Zhang & Janciauskiene, 2002a). Bu protein grubundan olan α_1 -antikimotripsin, Alzheimer'da amiloid plakların önemli bileşenlerinden biridir (Zhang & Janciauskiene, 2002b).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Mukherjee ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışmada alfa kimotripsin içeren gümüş nanopartiküllerinin yeşil sentezi için ultrasonikasyon ve ışık radyasyonu yöntemlerini denenmiş ve tek başına ultrasonikasyonun önemli miktarda AgNP oluşumunu sağlamadığını ve mutlaka bir tür ışığa maruz kalmanın gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Bunun yanında ultrasonikasyon süresini arttırılmasının nanopartiküllerin ortalama boyutunda bir artmayla sonuçlandığı ifade edilmiştir. Çalışmada ayrıca alfa kimotripsinin asidik ve alkali pH'larda pek çok enzimin aksine iyi çalışmasına rağmen pH 9-10 civarında aktivitesinin çok düşmesini proteinlerin alkali pH'da denatüre olması ve alfa kimotripsin enzimi özelinde otoliz ile açıklanmıştır (Mukherjee vd., 2013).

Pisarev ve arkadaşlarının (2016)'da kimotripsinin gümüş nanopartikül üzerine immobilizasyonu çalışmasında sodyum borhidrür indirgeyici ajan olarak kullanılmıştır. AgCT nanokompozit materyalin proteolitik ve bakterisidal etkilerinin reaktifinin ve ortamın pH değerinden önemli derecede etkilendiği belirtilmiştir. Asidik pH değerlerinde enzimin göreceli aktivitesinin nanokompozitin Ag miktarının azalması ile arttığı hatta pH < 6 civarında nanokompozitin doğal enzimden daha fazla göreceli aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir (Pisarev vd., 2016).

Plyushchenko ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan bir diğer çalışmada sodyum borhidrür yine indirgeyici ajan olarak kullanılırken nanopartikül üretiminde iki farklı yol denenmiştir. Birinci yolda gümüş nitrat, kimotripsin ve sodyum borhidrür aynı anda karıştırılarak nanopartikül sentezlenirken ikinci yolda öncelikle sodyum borhidrür ve gümüş nitrat karıştırılarak nanopartikül elde edildikten sonra ortama kimotripsin eklenmiştir. Birinci yol ile elde edilen nanopartiküllerin TEM verilerine göre boyutları 2-5 nm olarak ölçülmüştür. İkinci yol ile sentezlenecek nanopartiküller için yapılan diğer bir deneyde ise kimotripsinin eklenme zamanına göre nanopartikül boyutları incelenmiş olup ilk bir saate kadar her gecikmenin nanopartikül boyutunda büyüme ile sonuçlanırken bir saatten sonra çok belirgin bir fark görülmediği ifade edilmiştir. Enzimin proteolitik etkisinin pH 6.0 ve 11.0'de ikinci yol ile sentezlenen nanopartikülde hem birinci yol

ürününden hem de doğal enzimden daha fazla olduğu gösterilmiştir (Plyushchenko vd., 2019).

Dayem ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada AgNP'lerin SH-SY5Y hücrelerinin nöronal farklılaşmasını tetikleme potansiyellerini test etmişlerdir. SH-SY5Y hücrelerine biyolojik olarak sentezlenmiş AgNP'ler ile muamele edilmesinin, hücre morfolojik değişikliklerine ve nörit (dendrit/akson) uzunluğunda önemli bir artışa yol açtığını belirtmişlerdir. Ayrıca ROS üretiminde, ERK ve AKT gibi çeşitli kinazların aktivasyonunda artışın yanında Map-2, β -tubulin III, sinaptofizin, nörogenin-1, Gap-43 ve Drd-2 gibi nöronal farklılaşma belirteçlerinin de ekspresyonunun arttığını ifade etmişlerdir. Son olarak AgNP'lerin hücre içi sinyal yollarını modüle ederek nöronal farklılaşmaya yol açtığını ve kök hücre araştırmaları ve tedavisi için umut verici nanomateryaller olarak uygulanabileceğini öngörmüşlerdir (Dayem vd., 2014).

Alon ve arkadaşları (2014) yaptıkları çalışmada AgNP'leri, nöronal büyümeyi teşvik etmek için rejeneratif ajan olarak test etmişlerdir. AgNP ile kaplanmış substratlar üzerinde büyütülen nöroblastoma hücrelerinin kaplanmamış substratlara oranla 3 kat daha fazla nörit başlattığını ve uzama aşamasındaki nöritlerin AgNP'ler üzerinde büyümesinin arttığını belirtmişlerdir. Ayrıca AgNP ile kaplanmış substratlar üzerindeki büyümenin altın ve çinko oksit kaplı nanopartiküllerle kaplı substratlara kıyasla daha fazla başlatıcı nörite yol açtığını keşfetmişlerdir. Sonuçlarının AgNP'lerin nöronal onarım çalışmaları için antibakteriyel etkisi ile birlikte çift etkili güçlü bir nanomateryal olarak kullanılabilceğini gösterdiğini ifade etmişlerdir (Alon vd., 2014).

Lockman ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan çalışmada NP yüzey yüklerinin kan beyin bariyeri (KBB) bütünlüğü ve NP geçirgenliği üzerindeki etkisini incelenmiştir. Yüzey yükleri nötr, anyonik ve katyonik olarak hazırlanan NP'ler *in situ* sıçan beyin perfüzyonu ile değerlendirilmiş ve NP'lerin kan beyin bariyeri geçişi ve beyinde bölgesel dağılımları incelenmiştir. Buna göre düşük konsantrasyonlu nötr ve anyon NP'lerin KBB üzerinde akut bir etkisinin gözlemlenmediği ancak yüksek konsantrasyonlu anyonik ve katyonik NP'lerin KBB'ni bozduğu bildirilmiştir. Konsantrasyondan bağımsız olarak katyonik NP'lerin KBB üzerinde anında toksik etki gösterdiği, nötr ve düşük konsantrasyonlu NP'lerin beyne koloidal ilaç taşıyıcıları olarak kullanılabilceği ancak

toksosite ve beyin dağılım profillerini incelemek için NP yüzey yüklerinin dikkate alınması gerektiği belirtilmiştir (Lockman vd., 2004).

Youssif ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada *Lampranthus coccineus* ve *Malephora lutea* sulu ekstraktlarından gümüş nanopartikülleri sentezlemişlerdir. Çalışmada $AlCl_3$ indüklü Alzheimer hastası sıçanlarda nanogümüş sulu ekstraktların nöroprotektif aktivitesi ve antioksidan etkisi incelenmiştir. *Lampranthus coccineus* ve *Malephora lutea* nanopartiküllerinin kan beyin bariyerini geçebildiği ve asetikolinesteraz seviyelerini artırdığı gözlemlenmiştir. Nanogümüş sulu ekstraktın oksidatif strese karşı koyduğu ve Alzheimer tedavisi için kullanılabilirliği belirtilmiştir (Youssif vd., 2019).

Zhao ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada yüzeyine $A\beta$ bağlayıcı bir peptid entegre edilmiş bir nanokompozit tasarlamışlardır. Alzheimer'lı farelere uygulanan nanokompozit, nörotoksik etkili $A\beta$ çökelmeleri yerine nörotoksik olmayan $A\beta$ -nanokompozit çökelmelerinin meydana gelmesine yol açmıştır. $A\beta$ oligomerlerinin ortadan kalkmasıyla oligomer kaynaklı proinflatuar yanıtlar ve nöron hasarı azalmıştır. Proinflatuar sitokinlerin azalmasının endokranial mikrogliaların $A\beta$ temizleme yeteneklerini yeniden kazanmasını sağlayacağı belirtilmiştir (Zhao vd., 2019).

Li ve arkadaşları (2018) tarafından yapılan çalışmada SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattının gümüş nanopartiküllere uzun süreli maruz kalmasının sonuçları araştırılmıştır. Buna göre uzun süreli AgNP maruziyetinin Ca^{+2} homeostazisini bozduğu, endoplazmik retikulum ve mitokondrinin temas bölgelerinin uzamasına ve endoplazmik retikulum stresine neden olduğu belirtilmiştir. Mitokondriyal Ca^{+2} alım dengesinin bozulması, 12-48 saatlik süreçte Bax, Bcl-2 gibi pre-apoptotik proteinlerin ifadesini, 24-48 saatlik süreçte ise kesilmiş kaspaz 9 ve sitokrom c seviyelerinin artması ile AgNP'in mitokondriyal fonksiyonlara zarar verdiği ve mitokondriyal yolak üzerinden apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (L. Li vd., 2018).

Khaled ve diğerleri (2024) yaptıkları çalışmada berberin yüklü gümüş ve selenyum nanopartiküller sentezlemişlerdir. Bu nanopartiküllerin yanı sıra berberinin *in vitro* sitotoksik etkilerini insan karaciğer hücresi hattı HepG2 ve sağlıklı fare karaciğer hücrelerinde test etmişlerdir. Berberin ve her iki nanopartikülün Bax, Bcl-2 ifadelerinin

aşağı regüle edip apoptozu indüklediği belirtilmiştir. Yine her üç test ajanı oksidatif stresi yoğunlaştırarak antikanser ve antitümör etkiler göstermiştir. Burada berberin yüklü nanopartiküllerin berberine kıyasla daha iyi antikanser etkisi göstermesinin nedeni nanopartiküllerin gelişmiş çözünürlükleri ve biyoyararlılıklarının olabileceği ifade edilmiştir (Khaled vd., 2024).

Thakkar ve arkadaşları (2024) *D. sissoo* (DS) ve *A. calamus* L. ekstraktları ile gümüş nanopartikül sentezleyip kaplama maddesi olarak polivinilpirolidon kullanmışlardır. Sentezledikleri nanopartikülün antikanser özelliklerini insan akciğer hücre hattı A549 ve normal akciğer hücreleri WI-38 ile test etmişlerdir. Kanser hücrelerinde sağlıklı hücre hattına kıyasla önemli ölçüde daha düşük IC₅₀ değerlerinin görüldüğü ve bunun da antikanser potansiyele işaret ettiği belirtilmiştir. Nanopartiküllerin reaktif oksijen türlerinin üretimini teşvik ettiği, mitokondriyal membran potansiyelini değiştirdiği ve apoptozu indüklediği ifade edilmiştir. Çalışmada ayrıca nanopartiküllerin kanser hücresi istilasını önlediğine de değinilmiştir (Thakkar vd., 2024).

Graff ve arkadaşları (2014) tarafından yapılan çalışmada gümüş nanopartiküllere maruz kalmanın insan kolon karsinomu hücreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Buna göre insan bağırsağı LoVo hücre hattında nanopartikül alımının boyuta bağlı olduğu, 10nm boyutundaki gümüş nanopartiküllerin en yüksek ROS seviyelerini gösterirken istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte 100 nm AgNP'ler ile muamele edilen hücrelerin hep en düşük ROS seviyeleri gösterdiği belirtilmiştir. Böylece 10-100 nm aralığındaki nanopartiküllerin boyuta ve doza bağlı olarak sitotoksisteyi indüklediği ifade edilmiştir. Ayrıca gümüş nanopartiküllerin boyuttan bağımsız olarak proliferasyonu inhibe ettiğine değinilmiştir. Proteomik analizin *in vitro* toksisite verileri ile uyumlu olduğu da kaydedilmiştir (Miethling-Graff vd., 2014).

Patlolla ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada oral uygulanan AgNP'lerin akut toksisitesini için 5 erkekten oluşan 4 sıçan grubuna 5, 25, 50 ve 100 mg'lık dozlar şeklinde uygulayarak ve sonuçları kontrol grubu ile kıyaslayarak test etmişlerdir. Beş gün boyunca günde bir doz uygulamanın bitiminde 24 saat sonra kan ve karaciğer değerlendirilmiştir. Buna göre AgNP'lere maruz kalmanın ROS indüklenmesi, karaciğer enzim aktivitesinde artış, DNA hasarı ve karaciğer morfojisinde kontrol grubuna kıyasla

değişim gözlemlemiştir. Buna göre AgNP'lerin yüksek dozlarının kısa süreli uygulanmasının oksidatif stresin yanında organ toksisitesine neden olabileceğini öne sürmüşlerdir (Patlolla vd., 2015).

Kawmani ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada *Ochradenus arabicus* ekstraktı ile hazırladıkları AgNP'leri insan meme kanseri hücresi MCF-7'ye karşı sitotoksikite ve apoptoz indüklenme yeteneklerini incelemiştir. Çalışmada *O. arabicus* ile sentezlenen AgNP'lerin hücre proliferasyonunu önemli ölçüde azalttığı ve MCF-7 için oldukça toksik olduğu belirtilmiştir. Diğer araştırmalarla da uyumlu bir şekilde ROS seviyelerinde anlamlı artışın yanında doza bağlı olarak apoptoz ve otofaji oranlarında da artış görüldüğünü ifade etmişlerdir. Yine *O. arabicus*'dan elde edilen fitokimyasalların indirgeyici ajan olarak kullanılıp AgNP sentezlendiğinde ham ekstraktın antikanser etkisinin artması literatürde yer alan diğer çalışmalarla uyumludur. Son olarak gelişmiş biyoyararlanımları ve biyouyumlulukları nedeniyle, biyosentezlenmiş AgNP'lerin kanser dahil kronik hastalıklara yönelik terapötik uygulamalarda kullanım potansiyeli yüksek olduğu bildirilmiştir (Al-kawmani vd., 2020).

Miura ve Shinohara (2009) çalışmalarında gümüş nanopartikülün HeLA hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini araştırmışlardır. AgNP'ün, AgNO₃'a kıyasla IC₅₀ değerinin daha yüksek olduğu yani daha az sitotoksikiteye sahip olduğu belirtilmiştir. Gümüş iyonunun AgNP'den salınması ve bu iyonun sitotoksikiteyi, apoptozu ve strese yanıt veren genlerin indüksiyonunu indüklenme olasılığı olduğu ifade edilmiştir (Miura & Shinohara, 2009).

Li ve arkadaşları (2010) bu çalışmalarında gümüş nanopartiküllerin blastosist evresindeki fare embriyoları üzerindeki sitotoksik etkisini ve erken implantasyon sonrası embriyo gelişimi üzerinde etkilerini incelemiştir. 50 µM AgNP ile muamele edilen blastosistlerde önemli ölçüde artan apoptoz ve sonucu olarak hücre sayısında azalmalar gözlemlemiştir. Ayrıca 50 µM AgNP ile muamele, implantasyon sonrası fetal ağırlığın azalması ile ilişkili görülmüştür (P. Li vd., 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma kapsamında kullanılan materyal ve cihaz listesi Ekler bölümünde verilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Gümüş Nanopartikül Sentezi

Ag-CT nanopartiküllerinin sentezi için 90 mL 1 mM AgNO₃ çözeltisi distile su ile hazırlandı. Ardından pH 7.4 PBS tamponu ile 2,5 mg/mL konsantrasyonda 10 mL kimotripsin çözeltisi hazırlandı. Bu iki çözelti karıştırılarak sıcaklık 36.5°C'yi geçmeyecek şekilde kahverengi olana kadar en az 24 saat manyetik karıştırıcıda karışmaya bırakıldı (Şekil 3.1). Ardından 1.5 mL'lik eppendorf tüplere alınarak 14000 rpm hızında 10-15 dakika santifrüj yapıldı. Toplanan nanopartiküller 2 defa distile su bir defa %70'lik etil alkol ile yıkandı ve kurumaya bırakıldı.



Şekil 3.1. Nanopartikül sentez ve santifrüj aşamalarına ait görüntüler

3.2.2. Nanopartikül Karakterizasyonu

Nanopartikül karakterizasyonu için Bölüm 1.3'te mekanizmaları kısaca anlatılan karakterizasyon yöntemlerinden FT-IR, UV/Vis, Micro RAMAN, XRD, XPS, SEM/EDX ve Zeta Potansiyeli yöntemleri kullanılarak yapıldı.

3.2.3. Hücre Kültürü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Hücre Kültürü Laboratuvarında bulunan SH-SY5Y hücre hattı kullanılarak yapılacak çalışmada %5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de hücre kültür flasklarında belli bir yoğunluğa ulaşana kadar hücreler inkübe edildi. Yeterli yoğunluğa ulaşması beklenen hücrelerin gerektiğinde besiyerleri değiştirildi. Hücre sayımı ve diğer deneylerde kullanmak için hücrelerin flask yüzeyine tutunarak %70-80 yoğunluğa ulaşması beklendi.

3.2.3.1. Hücre Sayımı

Hücre kültürüne alınan ve yeterli yoğunluğa ulaşan hücreleri kaldırmak için 25 mL'lik flasklara 1.5 mL tripsin enzimi eklenip %5 CO₂'li inkübatörde 2-3 dakika inkübe edildi. Hücreler kalktıktan sonra tripsin miktarının 2 katı olacak şekilde 3 mL besiyeri de eklendi ve 50 mL'lik falkonlarda santifrüj işlemi yapılarak tripsin uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 3 mL temiz besiyeri eklendi ve homojenize edildi. Falkon tüpten 10 µL hücre alınıp ependorf tüpe konulduktan sonra eşit miktarda (10 µL) tripan blue eklendi. Daha sonra boyanmış hücrelerden 10 µL thoma lamına alındı ve mikroskopta hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplanarak gerekli olan hücre miktarı ve her kuyucuğa 100 µL'de 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapılabilmesi için gerekli olan yoğunluk belirlenerek falkondaki 3 mL besiyerinin üstüne bu hesaplama göre gerekli miktardaki besiyeri eklendi. 96 kuyucuklu plakada, planlanan doğrultuda kuyucuklara 100 µL ekim yapıldı.

Toplam hücre sayısı = Mikroskopta sayılan hücre adeti x 2 x 10000

3.2.3.2. XTT ile Hücre Canlılık Testi

SH-SY5Y hücre hattında oksidatif stres ajanı olarak kullanılacak H₂O₂'in LD₅₀ değeri ve etkin doz değerleri H₂O₂ varlığında gümüş nanopartikülün hücre canlılığı üzerine etkileri belirli konsantrasyonda hücre kültür ortamı ile seyreltilerek ve hücrelerle muamele edilerek 24 saat inkübe edildi. Hücre canlılığı üzerine etkileri XTT testi ile belirlendi. Bunun için her bir kuyucuğa 100 µL besiyeri ile ekilen hücreler %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Kuyucuk tabanına tutunan hücrelerin besiyerleri değiştirildikten sonra ilgili örnek ile muamele edilen hücrelere 50 µL reaksiyon solüsyonu eklendi ve %5 CO₂'li inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakıldı. Kör olarak hücrelerin ekilmediği sadece besiyeri ve reaksiyon solüsyonu içeren kuyucuklar hesaplandı. ELİSA cihazı ile 450 ve 630 nm'lerde ölçüm alındı.

3.2.3.3. H₂O₂ ile *In Vitro* Nörodejenerasyon Modelinin Oluşturulması

Oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyon modelleri oluşturmak için SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri sırasıyla 50 µM, 62,5 µM, 100 µM, 125 µM, 200 µM, 250 µM, 400 µM, 500 µM konsantrasyonlarında H₂O₂ ile 24 saat inkübe edildi. Ardından XTT kiti ile hücre canlılık testi yapıldı. XTT hücre canlılık testi sonucunda hücre ölümünün %50 olduğu konsantrasyon (LD₅₀) değeri ölçüldükten sonra, bir sonraki denemelerde SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde nörodejenerasyon oluşturmak için bu LD₅₀ değeri ile çalışılmaya devam edildi.

3.2.3.4. *In Vitro* Nörodejenerasyona Karşı Ag-CT'lerin Doz Aralıklarının Belirlenmesi

SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri 1x10⁴ yoğunlukta ve 100 µL toplam hacimde hesaplanarak 96 kuyucuklu plakaya ekildi. Hücrelerin kuyulara tutunması için 24 saat 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Ardından kuyucuklardaki besiyeri dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Hücelere uygulanacak nanopartikül şu şekilde hazırlandı:

- 10 mg Ag-CT tartıldı.
- Üzerine 150 µL DMSO eklendi.
- Son olarak 4.85 mL besiyeri eklenerek 2 mg/mL Ag-CT çözeltisi hazırlandı.

Hazırlanan nanopartikül çözeltisi seri seyreltme yöntemiyle kuyucuklara uygulandı. Buna göre SH-SY5Y hücreleri, farklı nanopartikül konsantrasyonları (1 mg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,62 µg/mL, 7,80 µg/mL) ile muamele edildikten sonra 37°C’de %5 CO₂’li etüvde 24 saat inkübe edildi. Besiyeri değiştirilen hücrelere XTT kiti ile canlılık testi uygulandı.

Diğer bir çalışma olan Ag-CT ve H₂O₂ eş zamanlı uygulanmasında 2 farklı yol izlendi. Buna göre 24 saat kuyucuklara tutunması beklenen SH-SY5Y hücre hattından bir gruba önce belirlenen LD₅₀ değerindeki 400 µM H₂O₂ daha sonra farklı Ag-CT dozları uygulandı. Diğer gruba ise önce farklı Ag-CT dozları sonra ve LD₅₀ değerindeki 400 µM H₂O₂ uygulandı ve hücreler 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörde tekrar 24 saat inkübe edildi. Kontrol için ekilen ve herhangi bir uygulama yapılmayan hücrelerin sadece besiyerleri değiştirildi. İnkübe edilen SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde *in vitro* oksidatif stres kaynaklı nörodejenerasyon modeline karşı Ag-CT dozlarının canlılık üzerine gösterdiği etki doz XTT hücre canlılık testi kullanılarak belirlendi.

3.2.4. Antimikrobiyal Aktivite Belirleme

3.2.4.1. Test Mikroorganizmalarının Seçimi

Gram (+), gram (-) mikroorganizmalar (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) ve mayalar (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*) kullanıldı.

3.2.4.2. Agar Disk Difüzyon Yöntemi

Nanopartikül 4 farklı ependorfta 4, 2, 1 ve 0,5 mg dozları 10µl hacimde uygulanacak şekilde %100 dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. Testte kullanılacak mikroorganizmaların (McFarland 0.5 denklemine göre yaklaşık 10⁶ koloni içeren) 50 µL kültür süspansiyonu sırasıyla Mueller Hinton agar üzerine yayıldı. Dozları ayarlanan nanopartikül çözeltileri sonikatörde 5 dk bırakılarak çözünmesi sağlandı. Ardından 1 mm kalınlığında ve 6 mm çapında disklere uygulandı. Negatif kontrol olarak 10 µL DMSO ile doyurulmuş diskler kullanıldı. Referans antimikrobiyal ajan olarak streptomisin

kullanıldı. Petri kapları daha sonra 30 dakika 4°C ve ardından 24 saat 37°C’de inkübe edildi. Antibakteriyel aktivite, disklerin etrafındaki bölgelerin ölçümü ile belirlendi.

3.2.5. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS)

Nanopartikülün içerdiği toplam antioksidan miktarının analizi için Rel Assay Diagnostics TAS kiti kullanılmıştır. Bu çalışma kapsamında bir protein olan kimotripsin ile çalışıldığı için literatürdeki her antioksidan testi Ag-CT’lerde kullanıma uygun değildir. Zira kimi çalışmalar proteinlerin geri dönüşümsüz denatürasyonuna neden olabilecek yüksek sıcaklıklar gerektirmektedir. Ayrıca TAS Kiti numunenin hücre üzerinde antioksidan parametrelere olan etkisini gösterebildiği için bu kit tercih edilmiştir. Kitin çalışma prensibi numunede bulunan antioksidanların radikal koyu mavi-yeşil renkli ABTS'yi renksiz indirgenmiş ABTS formuna dönüştürmesine dayanmaktadır. TAS Kiti uygulaması 96’lık plakaların kuyucuk başı hacmi olan 300 µL öz önüne alınarak 48’lik plakalarda çalışılıp kit protokolünde yer alan miktarlar yarıya indirilerek uygulandı ve ardından 96’lık plakara eklenerek ölçümler alındı. Buna göre numunen R1 ve R2 reaktiflerinden sonraki renk değişimi 660 nm dalgaboyunda alınan absorbans ile ölçülür. Renk değişim miktarı toplam antioksidan kapasite ile doğrudan ilişkilidir. Testin pozitif kontrolü bir E vitamini analogu olan Trolox ile sağlanır. 96’lık plakalara ekilen ve numune uygulamaları yapıldıktan sonra %5 CO₂’li inkübatörde 24 saat inkübasyona alınan hücrelere iki defa 30 dk -20°C ve ardından 30 dk 37°C inkübatöre alınarak ısı şok uygulandı. Bu sayede antioksidan içeriklerinin besiyerine verilmesi suretiyle mini santifrj tüplerine toplanan besiyerleri numune olarak kullanılarak ölçüm alınmıştır. Buna göre toplanan besiyerleri 48’lik plakalara 18 µL numune olacak şekilde 3 tekerrürlü eklenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol ve dH₂O da 96’lık plakalara aynı miktarda konulmuştur. Numunenin üzerine 300 µL Reaktif 1 (R1) solüsyonu eklendikten sonra örnekler 96’lık plakalara alınmış ve Elisa cihazında 660 nm’de ölçüm alınmıştır. Bu veriler ilk ölçüm verileri olarak (A1) kaydedilmiştir. standart ve, 96 kuyucuklu plakalarda belirli kuyucuklara konuldu. Daha sonra kuyucuk başına 22,5 µL Reaktif 2 (R2) solüsyonu eklenmiş, plaka oda sıcaklığında 10 dakika bekledikten sonra tekrar 660 nm’de ölçüm alınmadan önce çalkalanmıştır. İkinci ölçüme ait veriler A2 verileri olarak kaydedilmiştir. Buna göre ΔAbs, A2 - A1 hesaplanarak bulundu. TAS formülü ise; TAS (mmol/L) = [ΔAbs_{H₂O} - ΔAbs_{Örnek}] / [ΔAbs_{H₂O} - ΔAbs_{Örnek}] olarak kullanıldı.

3.2.6. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS)

Ag-CT'lerin SH-SY5Y hücre hattı üzerinde oksidan düzeylerine etkisinin incelenmesi için Rel Assay Diagnostics TOS Kiti kullanılmıştır. TAS Kiti verileri ile paralel olarak yorumlanmak üzere Ag-CT'lerin SH-SY5Y hücre hattı üzerinde oksidan parametrelerine etkisi incelenmiştir. TOS Kiti uygulaması 96'lık plakaların kuyucuk başı hacmi olan 300 µL öz önüne alınarak 48'lik plakalarda çalışılıp kit protokolünde yer alan miktarlar yarıya indirilerek uygulandı ve ardından 96'lık plakara eklenerek ölçümler alındı. Pozitif kontrol olarak farklı konsantrasyonlarda H₂O₂ standartı kullanılmıştır. 96'lık plakalara ekilen ve numune uygulamaları yapıldıktan sonra %5 CO₂'li inkübatörde 24 saat inkübasyona alınan hücrelere iki defa 30 dk -20°C ve ardından 30 dk 37°C inkübatöre alınarak ısıl şok uygulandı. Bu sayede oksidan içeriklerinin besiyerine verilmesi suretiyle mini santifrij tüplerine toplanan besiyerleri numune olarak kullanılarak ölçüm alındı. Buna göre toplanan besiyerleri 48'lik plakalara 45 µL numune olacak şekilde 3 tekerrürlü eklenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol ve dH₂O da 96'lık plakalara aynı miktarda konulmuştur. Üzerine 300 µL Reaktif 1 (R1) solüsyonu eklendi ve 530 nm'de Elisa cihazı ile ölçüm (A1) alındı. Aynı işlemler pozitif kontrol standartı ve dH₂O için de gerçekleştirildi. Daha sonra kuyucuk başına 7,5 µL Reaktif 2 (R2) solüsyonu eklendi, plaka oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 530 nm'de tekrar ölçüm (A2) alındı. ΔAbs, A2 - A1 şeklinde her kuyu için hesaplandı. TOS'un formülasyonu aşağıda mevcuttur.

$$\text{TOS } (\mu\text{mol/L}) = [\Delta\text{Abs}_{\text{Örnek}}] / [\Delta\text{Abs}_{\text{Standart}}] * 10$$

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

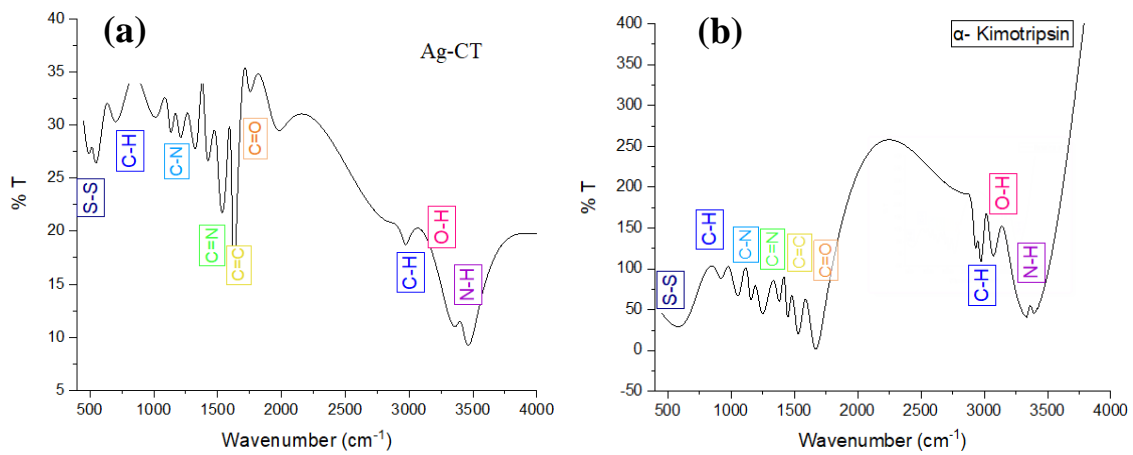
4.1 Gümüş Nanopartikül Karakterizasyonu

4.1.1. FT-IR Analizi

FTIR okumalarında grafik 4 bölüme ayrılarak incelenir. Tekli bağların olduğu birinci bölüm yaklaşık olarak $2500-4000\text{ cm}^{-1}$ 'e denk gelmektedir. Burada $3250-3600\text{ cm}^{-1}$ dolaylarında görülen pikler $\text{H}_2\text{O}/\text{-OH}/\text{NH}_3/\text{-NH}_2$ 'deki hidrojen bağlarına işaret etmektedir (Nandiyanto vd., 2022). Dalgaboyu 3000 cm^{-1} üzerindeki pik değerleri C-H bağlarıyla ilişkilendirilmektedir. Yine 3000 'nin üzerinde olan keskin pikler doymamış aromatik bileşiklere işaret ederken 3000 'in altındaki keskin pikler ise alifatik bileşenlere işaret etmektedir. İkinci bölge $2000-2500\text{ cm}^{-1}$ kapsayıp burada üçlü bağlara ilişkin pikler görülmektedir. Üçüncü alan ikili bağların görüldüğü $1500-2000\text{ cm}^{-1}$ bandıdır. $1650-1850\text{ cm}^{-1}$ bandından karbonil grubuna ait pikler ki bunlardan basit karbnillere ait pikler 1700 ila 1750 cm^{-1} bandında kendini göstermektedir. Amid ve karboksilat pikleri 1700 cm^{-1} altında görülmektedir. $1600-1650$ arasında keskin bir pik olarak C=C çift bağı da üçüncü bölgeye ait piklerdendir (Nandiyanto vd., 2022). Son olarak 1500 cm^{-1} altında görülen piklerden oluşan parmakizi bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgedeki pikler moleküle özgüdür.

Kimotripsin ve Ag-CT yapılarının ikisinin de FT-IR analizi yapıldı ve grafikler Şekil 4.1'de verildi. Buna göre kimotripsinde ve Ag-CT'de 3444 ve 3463 cm^{-1} 'de görülen pikler N-H gerilmelerine atfedilmiştir. Kimotripsinde 3296 cm^{-1} 'de ve Ag-CT de 3200 cm^{-1} de görülen pikler polimerik OH gerilme pikleridir. Her iki örnekte de $2960-2850\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen pikler alkanlara atfedilmektedir. Diğer bir ifadeyle $-\text{CH}_3$ kaynaklı CH gerilmelerini göstermektedir. Karbonil (C=O) gerilmelerine ait sinyaller $1650-1630\text{ cm}^{-1}$ dolaylarında görülmektedir ve bu sinyaller Amid I bandı olarak adlandırılmaktadır (Sizeland vd., 2018). Amid I bandı proteinin ikincil yapıda olduğunu göstermektedir. Ayrıca 1605 ve 1453 cm^{-1} deki pikler birlikte C=C-C aromatik halka gerilmesine ait sinyalleri oluşturmaktadır (Nandiyanto vd., 2022). N-H bükülmelerine ve C-N

gerilmeleriyle ilişkilendirilen Amid II bandının her iki örnekte $1530-1550\text{ cm}^{-1}$ dolaylarında N-H bükülmesinin yanında C-N gerilmesine ilişkin sinyalleri Ag-CT: 1155 cm^{-1} ve kimotripsin: 1161 cm^{-1} dolaylarında görülmektedir (Sizeland vd., 2018). Ayrıca örneklerde farklı yapılardan kaynaklanan ve dolayısıyla çok farklı konumlarda sinyaller veren çeşitli C-H gerilme sinyalleri de mevcuttur. Örneğin aromatik yapılardan gelen C-H gerilmeleri 3070 'lerde, düz zincir gerilmeleri 3000 bandının hemen altında, aromatik düzlem içi 1200 'lerde ve düzlem dışı C-H gerilmeleri 670 'lerde görülmektedir. Bu aromatik yapı sinyalleri kimotripsinin bulundurduğu aromatik halkalı amino asitlere dayanmaktadır. Dördüncü bölgenin özellikle $<1000\text{ cm}^{-1}$ kısmında C-C gerilmelerine dair pikler görülmektedir. Son olarak 500 cm^{-1} civarında disülfid bağıyla ilişkili pikler görülmektedir.

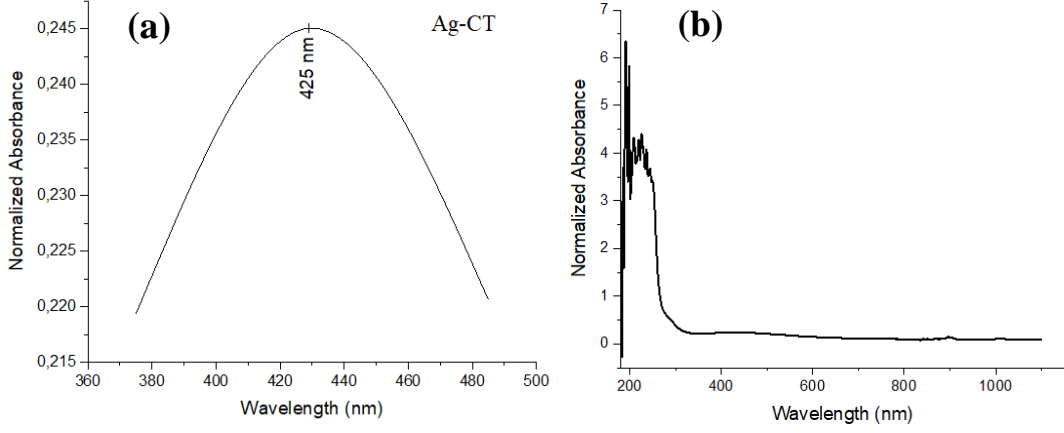


Şekil 4.1. Ag-CT (a) ve α -kimotripsinin (b) $450-4000\text{ cm}^{-1}$ dalgaboyu aralığında FT-IR ölçümlerinin %Transmitans grafikleri

4.1.2.UV/Vis Analizi

UV/Visible testi, TEM, SEM gibi diğer boyut analizi sağlayan testlerle birlikte incelenerek partikül boyutu hakkında fikir sahibi olunmasını sağlamaktadır. Elektronların ışıkla etkileşime girdikten sonra elektronlar yüzey plazmon rezonans emilim bandına parçacık aglomerasyonunun boyut, şekil ve derecesine göre dağılır. Boyut küçüldükçe daha küçük dalgaboylarında pik alındığı deneysel ve teorik olarak keşfedilmiştir (Milorđović vd., 2018). Bu çalışmada Ag-CT'lerden 425 nm 'de alınan pik nanopartikül oluşumunu göstermektedir. Elde edilen veriler OriginPro programında 5p düzeltme

oranıyla düzeltilmiş ve pik bulma aracı kullanılarak işlenmiştir. 380-500 nm arasında ve 425 nm’de maksimum absorbans elde edilmiştir (Şekil 4.2).



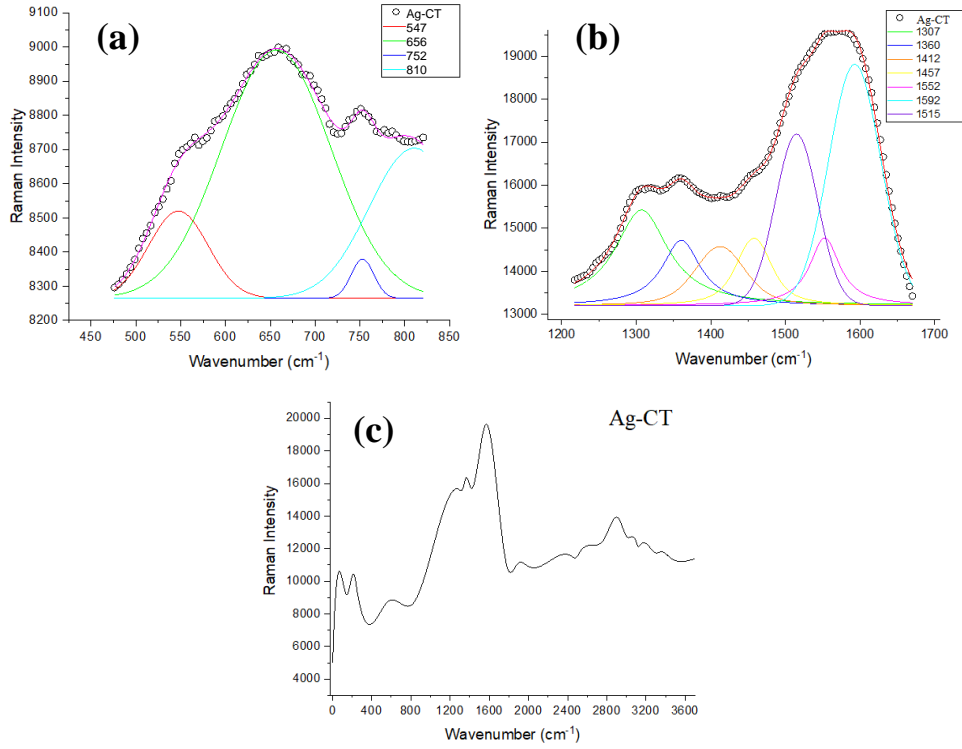
Şekil 4.2. Ag-CT 380-480 nm (a) ve 180-1100 nm (b) aralığında UV/Vis absorbans grafikleri

4.1.3. Micro RAMAN Analizi

Nanopartikülün konformasyonunda kimotripsine kıyasla değişen bağ ve yapıların çakışmasının bir sonucu olarak değerlendirilen gürültülü veriler işlenmiştir. Bu bağlamda OriginPro (2018) programı kullanılarak veriler öncelikle 10p düzeltme faktörü ile gürültü giderimi işlemine tabi tutulmuştur. Ardından üst üste gelen veriler Gaussian-Lorentz bileşenlerinin birleşimi olan bir araç (Voight) ile ayrıştırılmış ve pik analizleri sağlanmıştır. Voight bileşeni keskin ve yayvan piklerin bir arada görüldüğü durumlarda uygulanan bir düzeltme bileşenidir. Buna göre işlenmiş $500-850\text{ cm}^{-1}$ (a), $1200-1600\text{ cm}^{-1}$ (b) ve sadece 10p düzeltme faktörü ile düzenlenmiş $0-3800\text{ cm}^{-1}$ (c) grafikleri Şekil 4.3 başlığı altında verilmiştir.

Alifatik zincirlerin simetrik CC bükülmesi 229 cm^{-1} 'de orta şiddetli bir sinyal ile kendisini göstermektedir. 547 cm^{-1} 'de görülen pik disülfid bağlarına işaret etmektedir. 810 'daki pik tirozin piki, 1307 cm^{-1} 'deki pik ise triptofan piki olduğu değerlendirilmektedir (Nemecek vd., 2013). 1592 'deki pik C=O gerilmeleri ve NH bükülmeleriyle (Sadat & Joye, 2020) ilişkilendirilen kaymış bir Amid I bandı ve 1515 'deki band ise CN gerilmeleri ve NH bükülmeleri ile ilişkilendirilen Amid II bandı olarak değerlendirilmektedir (Nemecek vd., 2013). 1360 cm^{-1} 'de görülen pik ise CN

gerilmeleriyle ilişkili olan Amid III bandı olarak değerlendirilmiştir. 1552 cm^{-1} 'deki pik ise α heliksli yapının varlığına işaret eden bir belirteçtir (Sadat & Joye, 2020). 2787 ve 2927 cm^{-1} 'de alkanlara ait CH gerilmeleri görülmektedir. 3130 ve 3473 cm^{-1} 'daki zayıf sinyaller ise OH gerilme işaretleridir (Vandenabeele, 2013).

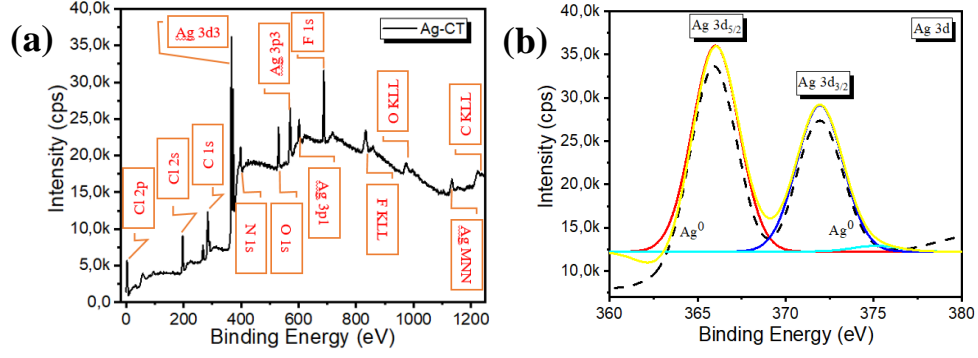


Şekil 4.3. Ag-CT 0.5mWatt 450-850 nm (a), 1200-1700 nm (b) ve 0-4000 nm (c) Micro RAMAN ölçüm grafikleri

4.1.4. XPS Analizi

Ag-CT nanopartikülünün barındırdığı elementlerin ve olası bulaşların izlenebilmesi için X- Işını Fotoelektron Spektroskopisi çalışması yürütüldü. Buna göre nanopartikülde Ag, C, N, O, Cl ve F elementlerine ait pikler Şekil 4.4'te görüldüğü gibi saptandı. Nanopartikülün temel destek elementi olan gümüşe ait Ag MNN, Ag3p3, Ag3p1, pikleri sırasıyla 1134 eV, 571 eV ve 602 eV'da izlenmiştir. Ag3d_{5/2} piki 366eV ve Ag3d_{3/2} piki 372eV'da görülmektedir (Şekil 4.4). Nanopartikül yapısındaki C, N ve O elementleri kimotripsinin yapıya dahil olduğunu göstermektedir. Bunlardan karbona ait C 1s ve C KLL pikleri sırasıyla 284 eV ve 1223 eV'da, oksijene ait O 1s ve O KLL pikleri sırasıyla 530 eV ve 997eV'da ve azota ait N 1s piki 398 eV'da görülmektedir. Klora ait 197 eV'da

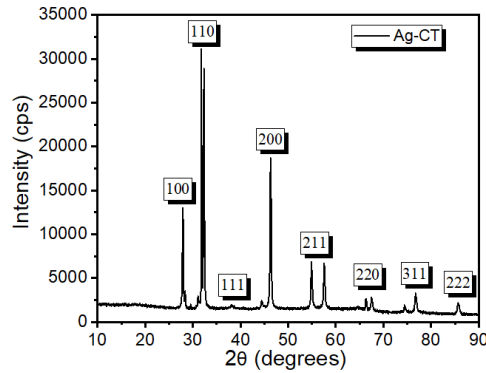
görülen Cl 2s piki ve floara ait F KLL, F 1s pikleri sırasıyla 834 eV ve 688 eV'da görülmektedir. Nanopartikül yapısında görülmesi beklenmeyen Cl ve F piklerinden Cl nanopartikül sentez aşamasında kullanılan PBS tamponundan gelmektedir. F ise bir bulaşı olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 4.4. Ag-CT nanopartikülünün XPS grafikleri

4.1.5. XRD Analizi

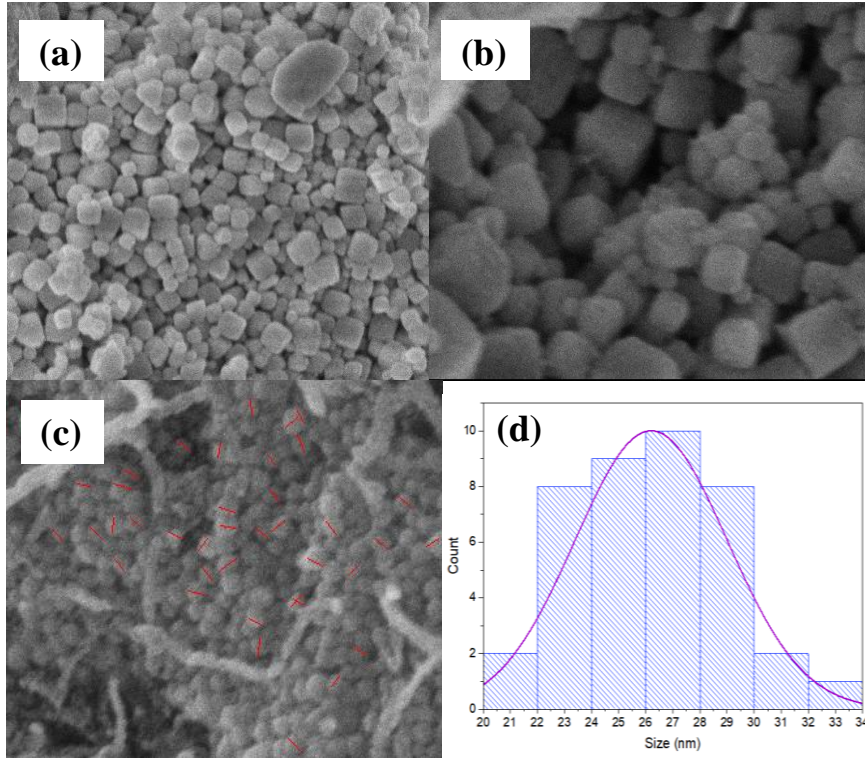
Ag-CT'lerin kristal yapısının incelenmesi için yapılan XRD analizinde Rigaku MiniFlex 300/600 cihazı kullanıldı. Ag-CT kırınım deseni kristalin yapıya işaret eden farklı şiddetlerde 15 adet pik oluşturdu. Bu piklerin 2θ konumları 27.92° , 31.78° , 32.32° , 38.02° , 44.44° , 46.32° , 54.9° , 57.56° , 66.3° , 67.5° , 74.42° , 76.72° ve 85.72° olarak belirlendi. Referans AgNP XRD grafiğine (JCPDS, No. 04-0783) göre Miller indisleri Şekil 4.5'te grafik üzerinde gösterildi. Çeşitli makalelerde sıklıkla görülmekle beraber referans JCPDS kartında bulunmayan pik değerleri de yine grafik üzerinde belirtildi.



Şekil 4.5. Ag-CT XRD grafiği

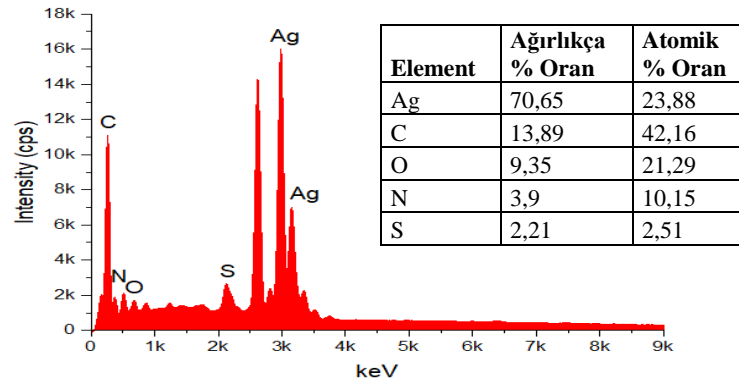
4.1.6. FE-SEM Analizi

Nanopartikülün FE-SEM görüntüsü altın kaplama yapılarak alınmış ve Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Bu görüntüler üzerinden ImageJ programı ile alınan ölçümlere göre oluşturulan histogram grafiği Şekil 4.6'da verilmiştir. SEM görüntüsü üzerinden alınan 40 ölçüme göre nanopartiküller değişken boyutlu olmakla birlikte ortalama boyutları 26-28 nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Ag-CT'lerin FE-SEM görüntüleri (a,b,c) ve nanopartikül boyutu histogram grafiği (d)

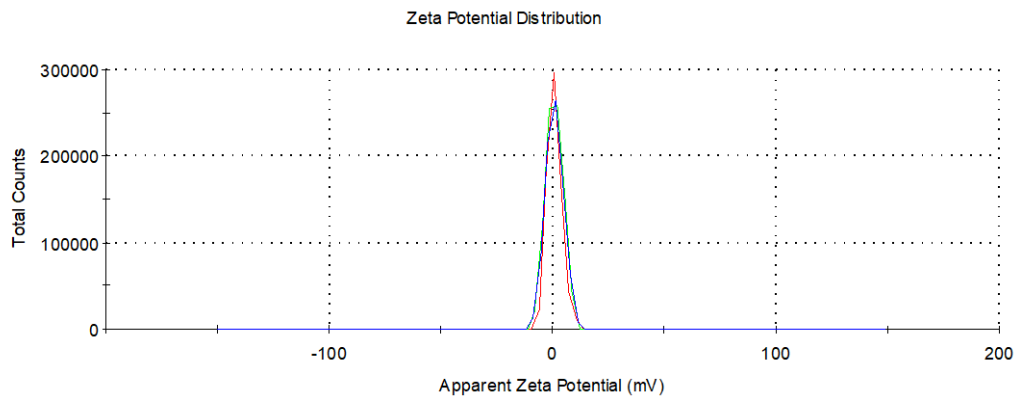
Ag-CT EDX grafiğinde görüldüğü üzere 3 keV da görülen keskin Ag piki Ag^{+1} 'in kimotripsin ile Ag^0 'ye indirgenmesinin bir göstergesidir. Öte yandan kimotripsinin yapıya kattığı C, N, O ve S elementlerine ait pikler de Şekil 4.7'de görülmektedir. EDX verilerine göre nanopartikülün yüzde bileşim oranları da Şekil 4.7'de verilmiştir. Buna göre nanopartikülün ağırlıkça %70,65'i Ag, %13,89'u C, %9,35'i O, %3,9 N ve %2,21'i S olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Ag-CT nanopartiküllerinin EDX grafiği ve elementlerin yüzde grafikleri

4.1.7. Zeta Potansiyeli Analizi

Parçacıkların yükü hakkında bilgi alınması için yapılan Zeta Potansiyeli analizine ait dağılım grafiği Şekil 4.8’de verilmiştir. Buna göre Ag-CT nanopartiküllerinin zeta potansiyeli $0,966 \pm 0,0795$ mV olarak ölçülmüştür.



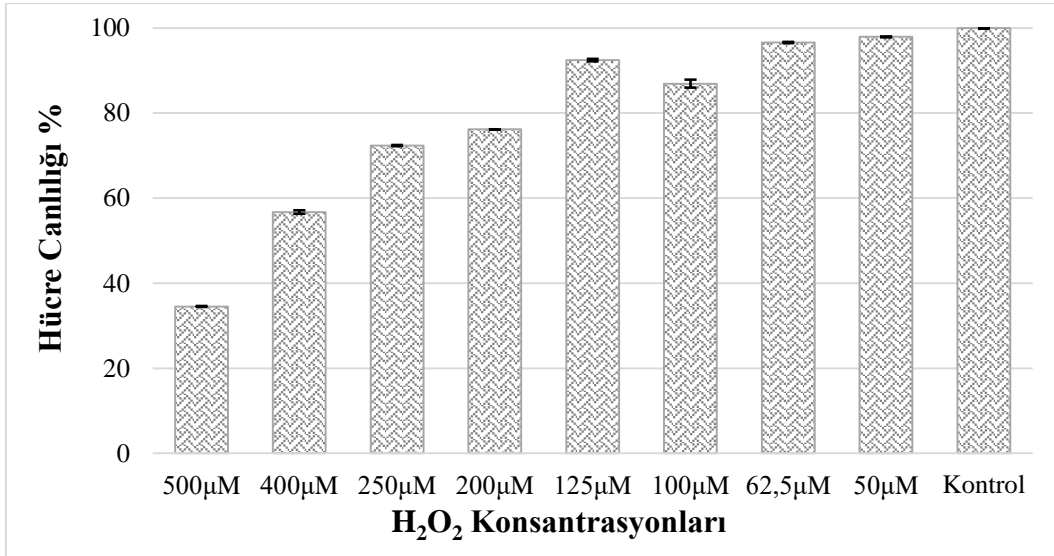
Şekil 4.8. Ag-CT nanopartiküllerinin zeta potansiyeli grafiği

4.2. Hücre Canlılık Testi (XTT) Sonuçları

4.2.1. H₂O₂ ile SH-SY5Y Hattında *In Vitro* Nörodejenerasyon Modelinin Oluşturulması ve LD₅₀ Değerinin Hesaplanması

SH-SY5Y hücre hattına uygulanan H₂O₂'in nörodejeneratif etkisini incelemek için XTT uygulandıktan yaklaşık olarak 4 saat sonra 450 ve 630 nm’de ELİSA cihazında ölçüm

alındı. 630 nm’de alınan ölçümler kör olarak kabul edildi ve 450 nm ölçümlerinden çıkartıldı. Hücre canlılığının hesaplanmasında Hücre Canlılığı % = $A_{\text{ö}}/A_{\text{K}} \cdot 100$ formülü kullanıldı. Hata çubukları özel standart sapma verileri ile oluşturuldu. Bu verilerin hesaplanmasında her biri 3 tekrarlı çalışılan çalışmada her kuyucuk için A_{450} - A_{630} değeri ayrı olarak hesaplandıktan sonra bu veri setleri üzerinden standart sapma hesaplaması yapıldı. Diğer çalışmalarda da veriler bu yöntemle işlenerek oluşturuldu. Yapılan çalışmada H_2O_2 konsantrasyonu azaldıkça kuyucuklarda hücrelerin canlılık yüzdelerinin arttığı gözlemlendi. H_2O_2 uygulaması yapılmayan hücreler pozitif kontrol, sadece besiyeri ise negatif kontrol olarak değerlendirildi. Buna göre uygulanan 50 μM , 62,5 μM , 100 μM , 125 μM , 200 μM , 250 μM , 400 μM ve 500 μM konsantrasyonlarından elde edilen hücre canlılığı yüzdeleri sırasıyla %97,92, %96,61, %86,90, %92,47, %76,16, %72,38, %56,73 ve %34,51 şeklinde hesaplandı (Şekil 4.9). Buna göre hücrelerin yarısının yaşadığı LD_{50} değeri 400 μM olarak belirlendi. Daha sonra yapılan çalışmalarda bu konsantrasyon ile devam edildi.

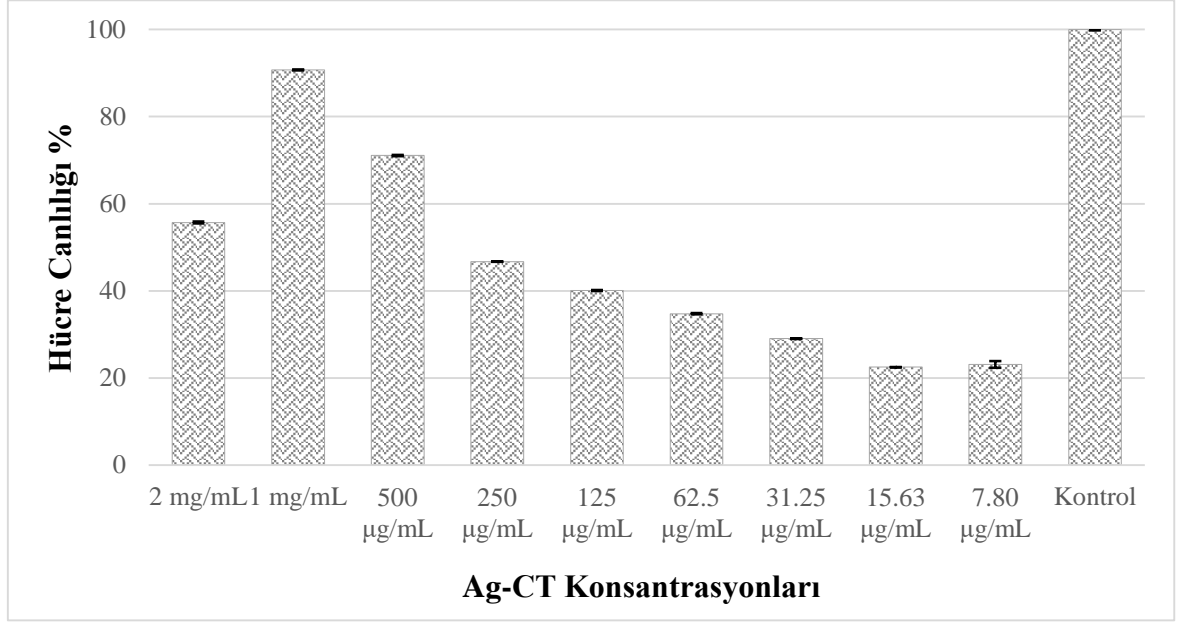


Şekil 4.9. SH-SY5Y hattında H_2O_2 ile LD_{50} değerinin belirlenmesi

4.2.2. SH-SY5Y Hücre Hattında Farklı Ag-CT Dozlarının Nörotoksik Etkilerinin İncelenmesi

SH-SY5Y hücre hattına uygulanan Ag-CT konsantrasyonu azaldıkça kuyucuklarda hücrelerin canlılık yüzdelerinin arttığı gözlemlendi. Buna göre uygulanan 2 mg/mL,

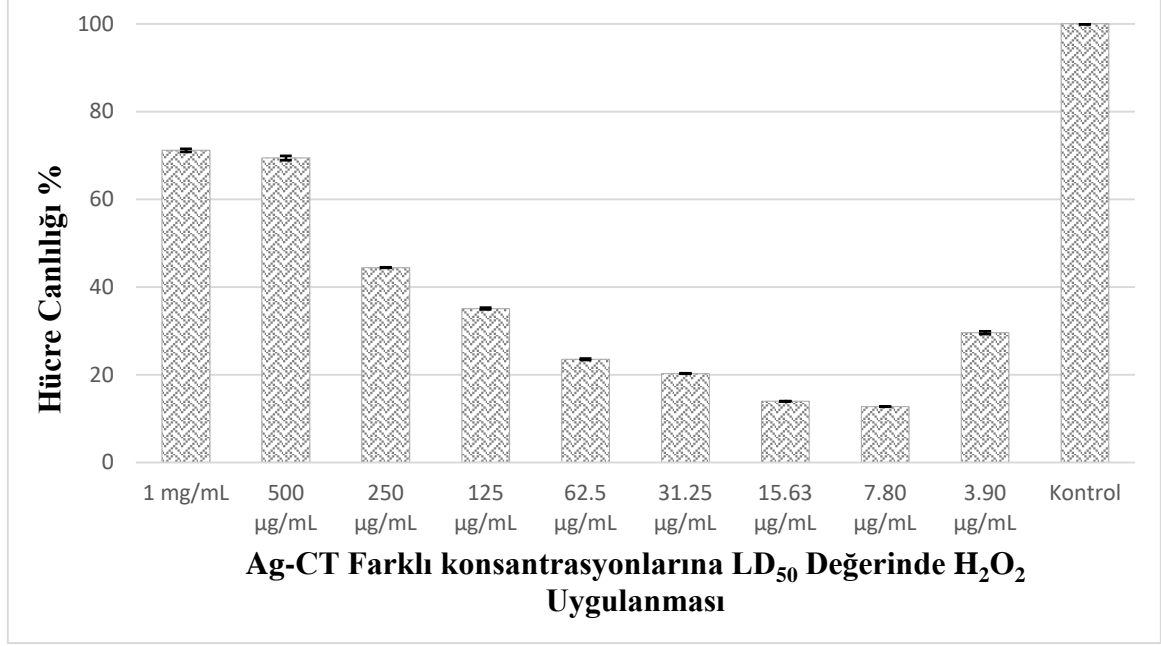
1 mg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,62 µg/mL, 7,80 µg/mL konsantrasyonlarından elde edilen hücre canlılığı yüzdeleri sırasıyla %55,678, %90,725, %71,076, %46,698, %40,068, %34,727, %29,022, %22,499 ve %23,101 şeklinde hesaplandı (Şekil 4.10). Buna göre 1 mg/mL Ag-CT hücreler için ideal doz olarak belirlendi.



Şekil 4.10. SH-SY5Y hattında farklı konsantrasyonlarda Ag-CT uygulanması sonucu XTT absorbanları

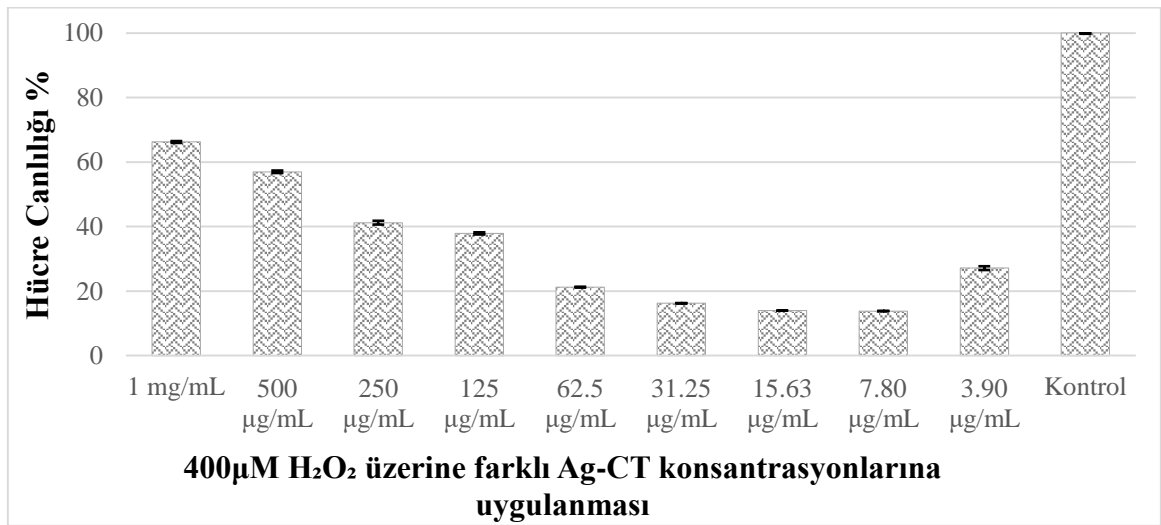
4.2.3 H₂O₂ ile *In Vitro* Nörodejenerasyon Edilen Hücrelere Ag-CT Uygulaması

H₂O₂ ile nörodejenerasyona karşı Ag-CT etkinliğinin incelenmesinde 2 farklı çalışma tasarlandı. Buna göre hücreler önce Ag-CT sonra H₂O₂ ile (Şekil 4.11), önce H₂O₂ sonra Ag-CT ile (Şekil 4.12) muamele edilerek Ag-CT'nin etkisi incelendi. Bu çalışmalarda LD₅₀ değerinin doğru ayarlanabilmesi için 800 µM H₂O₂ kullanılmış ve Ag-CT uygulamaları sonrası son H₂O₂ konsantrasyonunun 400 µM olması sağlanmıştır. Aynı şekilde Ag-CT konsantrasyonları da son kuyucuk hacmi hesaba katılarak sırasıyla 1 mg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,62 µg/mL, 7,80 µg/mL, 3,90 µg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır.



Şekil 4.11. Önce farklı Ag-CT konsantrasyonları sonra LD₅₀ değerinde H₂O₂ uygulanması sonucu XTT absrobans değerleri

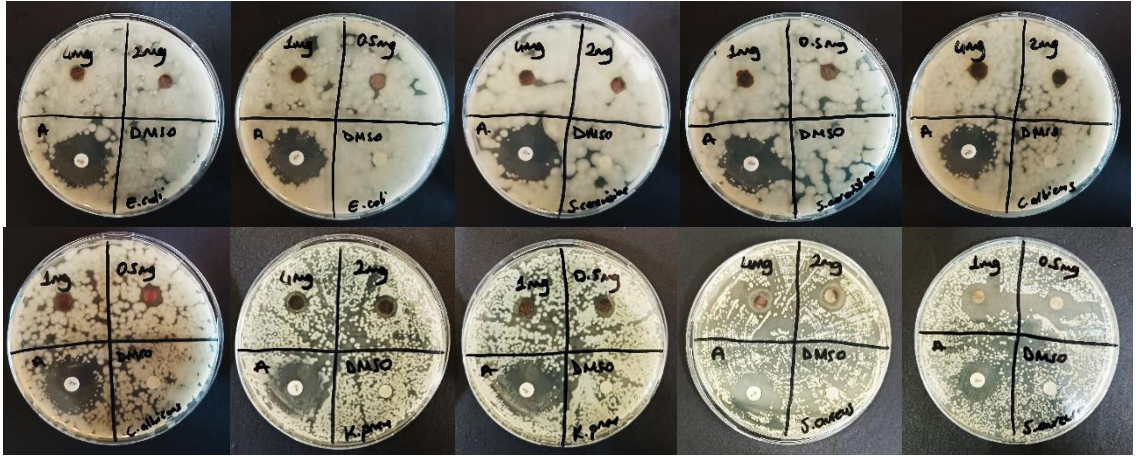
Her iki çalışmada da Ag-CT konsantrasyonu azaldıkça hücrelerin H₂O₂ gösterdiği hassasiyetin arttığı gözlemlendi. Ag-CT'nin önce uygulanması H₂O₂'in önce uygulanmasına göre daha fazla hücre canlılığı ile sonuçlandı. Her iki çalışmada da 1 mg/mL konsantrasyonda en iyi sonuçlar alınırken giderek azalan canlılık değerlerinin ardından 3,90 µg/mL Ag-CT konsantrasyonunda hücre canlılığında artış gözlemlendi.



Şekil 4.12. Önce LD₅₀ değerinde H₂O₂ sonra farklı Ag-CT konsantrasyonları uygulanması sonucu XTT absrobans değerleri

4.3. Antimikrobiyal Aktivite

Nanopartikülün antimikrobiyal aktivitesinin ölçülmesi için Gram (+) ve Gram (-) mikroorganizmalar *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* ile antibakteriyel etki, *Candida albicans* ve *Saccharomyces cerevisiae* ile antifungal etkisi incelendi. Antimikrobiyal çalışmaya ait görseller Şekil 4.13 ve ölçümlerden alınan veriler Tablo 4.1’de verilmiştir. *Klebsiella pneumoniae* bakterisinde 4 mg dozun açtığı alan 10 mm, 2 mg ve 1 mg dozlarının açtığı alan 9 ve 0,5 mg dozunun açtığı alan ise 8 mm olarak ölçüldü. Streptomisin 20 mm açarken negatif kontrol olarak uygulanan DMSO emdirilmiş disklerin dışında alan açılmadı ve disk boyutu olan 6 mm olarak ölçüldü. *Staphylococcus aureus* bakterisinde 4 mg dozun açtığı alan 10 mm, 2 mg dozun açtığı alan 9,5, 1 mg dozlarının açtığı alan 9 ve 0,5 mg dozunun açtığı alan ise 8 mm olarak ölçüldü. Streptomisin 19 mm, DMSO emdirilmiş disklerin açtığı alan 6 mm olarak ölçüldü.



Şekil 4.13. Ag-CT antimikrobiyal uygulamasına ait görseller

Escherichia coli bakterisinde 4, 2, 1 ve 0,5 mg dozlarının tamamının açtığı alan 7 mm ölçüldü. Streptomisin 20 mm, DMSO 6 mm olarak ölçüldü. *Candida albicans* mayasında 4 ve 1 mg dozun açtığı alan 8 mm, 2 mg dozunun açtığı alan 8 mm ve 0,5 mg dozunun açtığı alan ise 9 mm olarak ölçüldü. Streptomisin 20 mm açarken negatif kontrol olarak uygulanan DMSO emdirilmiş disklerin dışında alan açılmadı ve disk boyutu olan 6 mm olarak ölçüldü. *Saccharomyces cerevisiae* mayasında 4, 2, 1 ve 0,5 mg dozlarının tamamının açtığı alan 7 mm, Streptomisin 21 ve DMSO emdirilmiş disklerin alanı ise 6

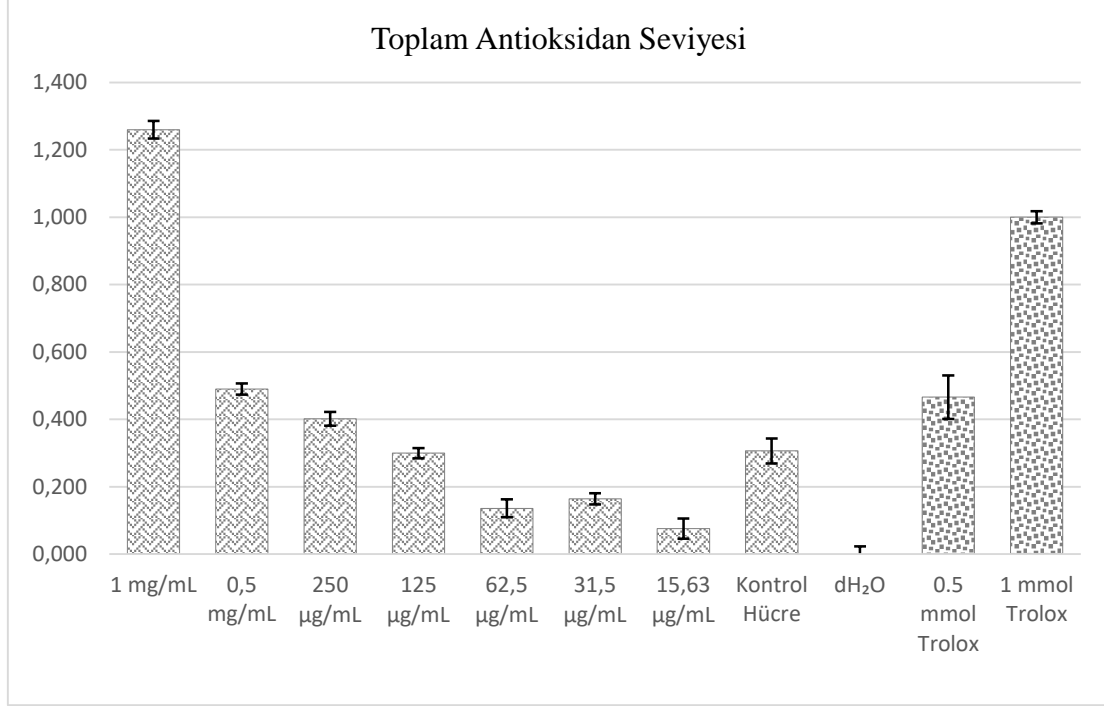
mm olarak ölçüldü. Ag-CT ortalama antimikrobiyal alan açma etkisi hesaplandığında 4 mg için 8,4 mm, 2 mg için 7,9 mm, 1 mg için 8 mm ve 0,5 mg için 7,8 mm oldu.

Tablo 4.1. Antimikrobiyal aktivite alan çapı (mm) ölçüm sonuçları

Mikroorganizma	Antibiyotik	DMSO	0,5 mg	1 mg	2 mg	4 mg
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6539	19	6	8	9	9,5	10
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	19	6	7	7	7	7
<i>Klasiella pnemeunia</i> ATCC 700603	20	6	8	9	9	10
<i>Saccharomyces cerevisiea</i> ATCC 9763	21	6	7	7	7	7
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	20	6	9	8	7	8
Ortalama	19,8	6	7,8	8	7,9	8,4

4.4. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) Sonuçları

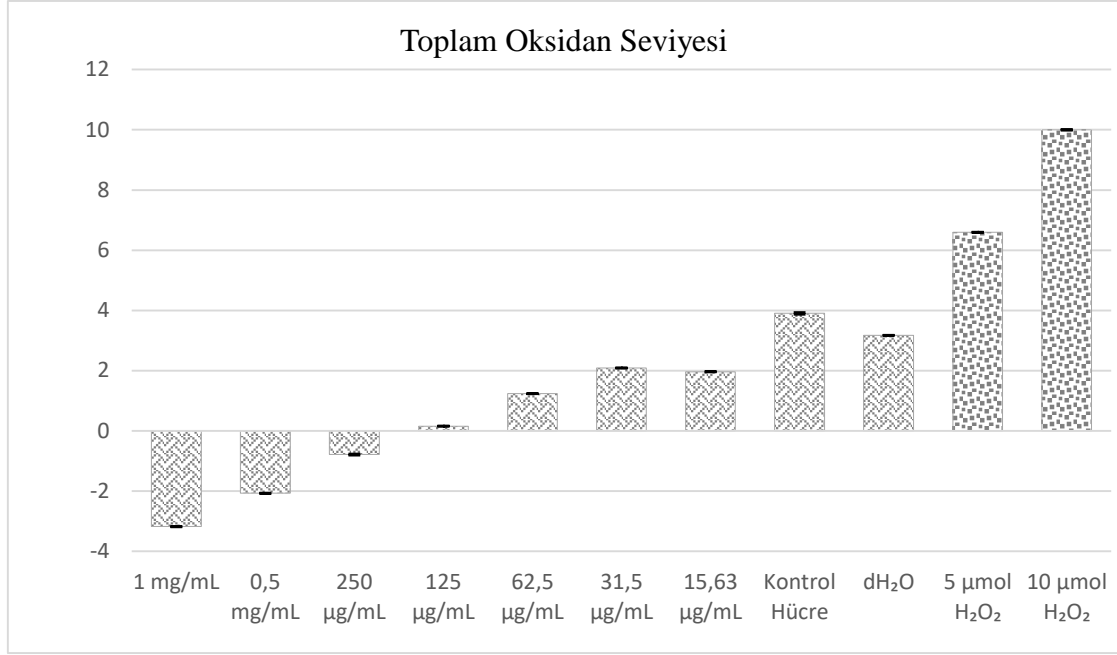
Gümüş nanopartikülün toplam antioksidan kapasitesinin ölçülmesi için TAS kiti kullanıldı. Bunun için farklı konsantrasyonlarda Ag-CT ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerine soğuk şoku uygulandıktan sonra toplanan besiyeri ile çalışıldı. Muamele sonrası 24 saat sonra %5 CO₂'li inkübatöre alınan hücreler daha sonra iki tekrarlı olacak şekilde 30 dk -20°C ve ardından 30 dk 37°C inkübatöre alındı. Böylece hücre içeriğinin dış ortama salınması hedeflendi. Buna göre seyreltilerek uyguanan nanopartiküllerin konsantrasyonu azaldıkça antioksidan miktarının da azaldığı görüldü. Standart olarak 0,5 mmol ve 1 mmol Trolox, negatif kontrol olarak distile su kullanıldı (Şekil 4.14). Ayrıca nanopartikül uygulanmamış hücreler de kontrol grubu olarak çalışıldı.



Şekil 4.14. Farklı Ag-CT konsantrasyonlarının SH-SY5Y toplam antioksidan seviyeleri üzerine etkisi

4.5. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) Sonuçları

Gümüş nanopartikülün toplam oksidan kapasitesinin ölçülmesi için TOS kiti kullanıldı. Bunun için farklı konsantrasyonlarda Ag-CT ile muamele edilen SH-SY5Y hücrelerine soğuk şoku uygulandıktan sonra toplanan besiyeri ile çalışıldı. Muamele sonrası 24 saat sonra %5 CO₂'li inkübatöre alınan hücreler daha sonra iki tekrarlı olacak şekilde 30 dk 20°C ve ardından 30dk 37°C inkübatöre alındı. Böylece hücre içeriğinin dış ortama salınması hedeflendi. Buna göre seyreltilerek uygulanan nanopartiküllerin konsantrasyonu azaldıkça oksidan miktarının arttığı görüldü. Standart olarak 0,5 mmol ve 1 mmol H₂O₂, negatif kontrol olarak distile su kullanıldı (Şekil 4.15). Ayrıca nanopartikül uygulanmamış hücreler de kontrol grubu olarak çalışıldı.



Şekil 4.15. Farklı Ag-CT konsantrasyonlarının SH-SY5Y toplam oksidan seviyeleri üzerine etkisi

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Hücrenin oksidan-antioksidan dengesinin bozulması hücrenin normal metabolizmasını gerçekleştirememesine, işlevlerini yerine getirememesine ve sürekli bu bozulmanın devam ettiği durumlarda patolojik yapıların oluşmasına sebebiyet verebilmektedir. Diğer özelleşmiş hücreler ile kıyaslandığında nöronların oksijen tüketimi daha fazla olmasına karşın antioksidan üretiminde orantılı bir artıştan söz etmek mümkün değildir. Bu da beyin hücrelerini oksidatif hasara karşı daha hassas bir konuma taşımaktadır. Öyle ki oksidatif stres, Parkinson, Huntington, ALS ve Alzheimer gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıkların bir öncülü olarak kabul edilmektedir. Öte yandan antikimotripsinin senil plak oluşumuna katkı sağladığına dair veriler literatürde sunulmaktadır. Bu çalışmada yeşil sentez yoluyla üretilen kimotripsin bağlı gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu FT-IR, RAMAN, Uv/Vis, XPS, XRD, SEM ve Zeta Potansiyeli analizleri ile gerçekleştirildikten sonra SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında canlılık ve antioksidan kapasite üzerine etkileri araştırılmıştır.

Yeşil sentezin kimyasal ve fiziksel sentez yöntemlerine kıyasla toksik olmaması, çevre dostu olması ve ekonomik olması gibi avantajlarının yanında reaksiyon süresi, son ürün kalitesi (homojen olmaması) ve sentezlenen malzemenin toplanmasına dair güçlükleri ise dezavantajlarıdır (Ying vd., 2022). Pisarev vd. (2016) ve Plyushchenko vd. (2019), kimotripsin bağlı gümüş nanopartikül sentezlemek için indirgeyici ajan olarak NaBH_4 kullanmış ve bir nanokompleks oluşturmuşlardır. Sodyum hidroksit ve trisodyum sitrat gibi indirgeyiciler de AgNP sentezinde kullanılmasına karşın bu yöntemler yavaş, pahalı ve nihai ürün toksisitesi yüksektir (Raja vd., 2017). Son yıllarda özellikle çeşitli bitki ekstraktları ve mikroorganizmalar ile AgNP'lerin yeşil sentezi oldukça yaygındır. Ferreira vd (2024) *P. extremaustralis* 2E-UNGS bakterisi ile, Huisa vd (2024) *Euterpe oleracea* ekstraktı ile, Raja vd (2017) *Calliandra haematocephala* yapraklarının ekstraktı ile, Philip (2011) *Mangifera indica* yaprağı ile AgNP sentezlemişlerdir (M. L. Ferreira vd., 2024; Philip, 2011; Raja vd., 2017; Taipe Huisa vd., 2024). Bu çalışmada nanopartikülün sentez aşamasında uygulanan ve toksisitesi yüksek indirgeyici ajanlar süreçten çıkarılarak hücre içi ortama daha iyi uyum sağlanabilmesi için yeşil sentez

metoduyla çalışıldı. Yeşil sentezlenen nanopartikül, karakterizasyon için FT-IR, UV/Vis, Micro RAMAN, XRD, XPS, SEM/EDX ve Zeta Potansiyeli analizlerine tabi tutuldu.

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi analizine tâbi tutulan nanopartikül ve α -kimotripsin farklı şiddette benzer grafikler vermiştir. Numunelerden benzer pikler alınması α -kimotripsin'in yapıya dahil olduğunu göstermektedir. Kimotripsin içerdiği amino asitler ve yan gruplar nedeniyle C=O (karbonil), N-H gerilmesi, S-S (disülfid) bağı, C=C (çift bağı karbon) piki ve farklı noktalarda C-H gerilme pikleri vermektedir. Karbonil piki Amid I bandı olarak da adlandırılmaktadır ve proteinlerin ikincil yapı gösterdiklerine işaret etmektedir (Noinville vd., 2004). Amid II bandı olarak adlandırılan C-N gerilmeleri ve N-H bükülmelerine ait piklerin kimotripsinde çok daha güçlü bir sinyalle görülürken nanopartikülde sinyal yoğunluğunun azalmasına karşın varlığı proteindeki 3 boyutlu konformasyon değişimi ve gümüş-kimotripsin bağlanmasının bir işareti olarak görülmektedir. 500 cm^{-1} civarında disülfid bağıyla ilişkili pikler kimotripsinde muhtemelen diğer bağı sinyallerinin de üst üste binmesiyle çok net görülemezken nanopartikülde bağı yapılarının değişmesiyle ilişkili olarak daha net görüldüğü düşünülmektedir. Ju ve diğerleri (2012) tarafından yapılan bir çalışmada α -kimotripsin Fe_3O_4 -kitosan üzerine immobilize edilmiştir. Çalışmada α -kimotripsin ile karşılaştırmalı olarak incelenen nanopartikül FT-IR grafiklerinde 1646, 1532 ve 1453 cm^{-1} 'de karakteristik α -kimotripsin piki ve nanopartikülde bu piklerin zayıflamalarına karşın hâlâ mevcut olduğu görülmektedir (Ju vd., 2012). Yine disülfid bağlarının da bulgularımız ile paralel olarak kimotripsinde daha yaygın iken nanopartikül yapısı içerisinde daha belirginleştiği görülmektedir. RAMAN analizi sonuçları FT-IR sonuçları ile uyumlu olup Amid I ve Amid II bandları görülmektedir. Ayrıca disülfid bağlarına ait pikler de yine RAMAN grafiklerinde okunmaktadır.

UV/Vis'de gümüş nanopartiküllerin beklenen yüzey plasmon rezonans değeri 420-500 nm aralığındadır (Titus vd., 2019). Milardović vd (2018) NaOH ile indirgeyerek ürettikleri AgNP'ler için 417 nm ve Becaro vd (2015) NaBH_4 ile indirgedikleri AgNP'ler için 400 nm ölçüm almışlardır (Becaro vd., 2015; Milardović vd., 2018). Pisarev vd (2016) sentezledikleri kimotripsin bağı gümüş nanopartiküle ait yüzey plasmon rezonansının 420-430 nm aralığında olduğunu bildirmiştir (Pisarev vd., 2016). Castro (2000) yaptığı çalışmada α -kimotripsinin 280 nm'de pik verdiğini göstermiştir ve Pisarev'in sonuçları

da bununla paraleldir (G. R. Castro, 2000). Buna göre kimotripsin 280 nm'de pik verirken Ag-CT yapısına katılımıyla birlikte belirgin bir kaymadan söz edilmektedir. Bu çalışmada önceki çalışmalar ile paralel olarak Ag-CT yüzey plasmon rezonans değeri 425 nm olarak ölçülmüştür.

Nanopartikülün elemental bileşimini incelemek adına XPS analizi yapıldı. Buna göre yapıya kimotripsin dahil ile görülmesi beklenen C, N ve O elementlerine ait pikler görüldü. Yapıda Ag^0 , $Ag3d_{3/2}$ ve $Ag3d_{5/2}$ pikleri tam konumlarında literatür ile uyumlu olarak saptandı (J. H. A. Ferreira vd., 2024). XPS analizinde görülen Cl elementinin nanopartikül sentez sürecinde çözücü olarak kullanılan PBS tamponundan gelmektedir. Yapıda görülmesi beklenmeyen F elementinin ise bir bulaşı olduğu düşünülmektedir. EDX analizinde ise C, N, O ve S gibi elementlerin görülmesi kimotripsinin yapıya dahil olduğunu gösterirken diğer elemental analizleri de destekler bir veri sundu. Bununla birlikte yapı %70 dolaylarında Ag içermekteydi.

Ag-CT'lerin zeta potansiyeli 0,96 olarak ölçüldü. Düşük zeta potansiyelli nanopartiküller yük dağılımındaki denge nedeniyle düşük agregasyon kapasitesine sahip oldukları şeklinde değerlendirilirler (Salazar-Bryam vd., 2021).

Yapılan SEM analizi sonucu Ag-CT'lerin yüksek kristalleşme derecesine sahip kübik bir formda, değişken boyutlu olmakla birlikte 26-28 nm'de yığılmalı histogramlı olduğu görüldü. Jameel vd (2022) tarafından yapılan bir çalışmada bir mantar olan *Agaricus bisporus* ile sentezlenen AgNP'ler kübik bir yapı oluşturduğu bildirilmiştir (Jameel vd., 2022). Ancak literatürde yeşil sentezlenen AgNP'ler genellikle küresel bildirilmiştir (Vadakkan vd., 2024).

Nanopartikülün kristalin formunu ortaya çıkarmak için yapılan XRD analizinde görülen piklerden 38.02° , 44.44° , 66.3° ve 76.72° (JCPDS, No. 04-0783) sırasıyla (111), (200), (220) ve (311) yüz merkezli kübik forma işaret etmektedir (Patil & Chougale, 2021). Ayrıca 27.92° , 31.78° , 32.32° , 46.32° ve 54.9° , 57.56° , 74.42° konumlarındaki pikler de organik moleküllerle AgNP sentezinde literatürde yaygın olarak bildirilmiştir (İbrahim, 2015; R. Kumar vd., 2012; Rautela vd., 2019).

Ag-CT karakterizasyonunun açıklanmasından sonra hücresel alım ve sitotoksikite üzerine bu bulguların ne anlam ifade ettiğini tartışmak önemlidir. Nanopartiküllerin şekilleri toksisiteyi üzerinde etkili olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada kübik AgNP'lerin <100 µg/mL'de toksik olmadığı, küresel ve prizmatik AgNP'lere oranla aynı düzeylerde toksik etki göstermediğine dair veriler sunulmuştur (Auclair & Gagné, 2022). Ayrıca nanopartiküllerin şekilleri aynı malzemeden sentezlenseler bile hücresel alımları üzerinde etkilidir (Ma vd., 2013). Yapılan çeşitli araştırmalarda hücresel alım için ideal bir boyut saptanamamıştır. HeLa hücrelerine altın nanopartikül uygulanan bir çalışmada hücresel alım için 50 nm optimal boyut olarak saptanırken HEp2-2B hücreleri ile yapılan diğer bir çalışmada PLGA nanopartiküllerinin endositoz alımında 375 ve 600 nm boyutlarının 155 ve 200 nm'den daha fazla alındığı gösterilmiştir (Ma vd., 2013). Öte yandan nanopartikül yükü incelendiğinde yüklü nanopartiküllerin hücre zarından yüksüzlere göre daha kolay geçtiği bilinmektedir. Ancak katyonik, yoğun ve büyük nanopartiküllerin hücre zarında porlar açarak sitotoksik etki gösterebileceği bildirilmiştir (Zhu vd., 2013). Nötr nanopartiküllerin yüklü nanopartiküllere göre hücresel alımlarının daha az olduğu gerçeğinin yanında nanopartikül alımlarında temel sorun olan spesifik olmayan protein bağlanmalarını da en aza indirdiği de unutulmamalıdır (Ma vd., 2013). Bu bağlamda nanopartiküllerin hücresel alımları durum bazlı incelenmesi gereken çok fazla değişkeni olan ve optimal verilerin henüz belirlenemediği bir olgudur.

Çalışma kapsamında farklı H₂O₂ konsantrasyonları (50-500 µM) ile SH-SY5Y hücre hattında *in vitro* nörodejenrasyon modeli oluşturuldu. Buna göre konsantrasyon azaldıkça hücre canlılık oranlarında artış gözlemlendi. Hücrelerin %56,72 oranında yaşadığı 400 µM LD₅₀ değeri olarak belirlendi. 100 µM konsantrasyonunda nispeten daha az görülen hücre canlılığı, ekilen hücre miktarları ile ilişkilendirilmiştir (Gülde vd., 2010). Benzer çalışmalarda H₂O₂ maruziyet süresi ve hücre canlılık yüzdeleri Tablo 5.1'de verilmiştir. Buna göre sonuçlarımız 200 µM konsantrasyonda %76 ile Taki-Nakano vd (2011) sonuçları ile uyumludur (Taki-Nakano vd., 2014). Öte yandan çalışmalardan elde edilen verilerde değişkenlik görülmektedir. Bu durumun H₂O₂ konsantrasyonlarının ayarlanmasında kullanılan çözücü ile ilişkili olabileceği değerlendirilmektedir (Palasz vd., 2008).

Tablo 5.1. SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında *in vitro* H₂O₂ indüklü sitotoksistide çeşitlilik (Othman & Yabe, 2015)

Hücre Hattı	H ₂ O ₂ Molaritesi	Maruziyet süresi	Hücre Canlılığı	Referans
SH-SY5Y	1 mM	16 saat	~15%	Ju vd. (2012)
	1 mM	16 saat	~25%	Ruffels vd. (2004)
	750 µM	16 saat	~80%	Ruffels vd. (2004)
	200 µM	24 saat	~70%	Nakano vd. (2011)
	200 µM	24 saat	~60%	Xiao vd. (2013)
	200 µM	24 saat	~50%	Zhang vd. (2007)
	100 µM	24 saat	~65%	Zhang vd. (2007)
	100 µM	24 saat	~40%	Suematsu vd. (2011)

Sentezlenen Ag-CT'lerin SH-SY5Y hücre hattı üzerinde sitotoksik etkisinin incelenmesi için 2 mg/mL - 7,80 µg/mL aralığında 9 farklı konsantrasyon ile çalışıldı. Buna göre 1 mg/mL Ag-CT ideal dozu olarak belirlendi. Bu dozun üstünde ve altındaki değerlerde hücre canlılığı daha azdı. Bununla beraber Ag-CT dozunun 1 mg/mL konsantrasyonundan itibaren azalmasıyla hücre canlılığının da azaldığı görüldü. Coccini vd. yaptığı çalışmada SH-SY5Y hücre hattına uyguladıkları AgNP'lerin 50 µg/mL konsantrasyona 24 saat maruziyeti ile yaklaşık olarak %10 hücre canlılığı göstermiştir (Coccini vd., 2014). Burada AgNP'ler alınmış olup sentez prosedür hakkında bilgi bulunmamaktadır. AgNP yüksek toksisitesinin sentez yöntemi, nanopartikül şekli ve boyutu gibi etmenler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Wang vd., 2018). Yapılan diğer bir çalışmada ise 100 µg/mL konsantrasyonda SH-SY5Y metabolik aktiviteye bağlı olarak hücre canlılığı %47,27 hesaplanmıştır (Iova vd., 2023). Bu veri çalışmamızda 125 µg/mL konsantrasyonda hesaplanan %40 hücre canlılığı değeri ile uyumlu görünmektedir.

Çalışmanın bir diğer adımı olan LD₅₀ değerinde H₂O₂ ve Ag-CT farklı konsantrasyonlarının beraber uygulanması iki farklı yolla gerçekleştirildi. Önce Ag-CT konsantrasyonları sonra 400 µM H₂O₂ ve önce 400 µM H₂O₂ sonra Ag-CT uygulanmasının ardından alınan hücre canlılık oranları hesaplandı. Her iki çalışmada da Ag-CT konsantrasyonu azaldıkça hücrelerin hidrojen peroksit kaynaklı oksidatif strese gösterdiği hassasiyetin arttığı gözlemlendi. Hücrelere Ag-CT'nin hidrojen peroksitten önce uygulanması eş konsantrasyonlarda nispeten daha fazla hücre canlılığı ile sonuçlandı. Her iki çalışmada da 1 mg/mL konsantrasyonda en iyi sonuçlar alınırken giderek azalan canlılık değerlerinin ardından 3,90 µg/mL Ag-CT konsantrasyonunda

hücre canlılığında artış gözlemlendi. Bu veriler sentezlenen Ag-CT'nin SH-SY5Y hücre hattında nöroprotektif etkisini göstermektedir.

Gümüş nanopartiküller gümüş nitrat tuzuna oranla yüksek antimikrobiyal etkisini büyük yüzey alanı ile bakterilerle daha iyi temas sağlamasına borçludur. Nanopartiküller hücre zarına tutunur ve hücre içine girer. Bakterinin hücre zarında bulunan proteinlerdeki kükürt ile, bakterinin içerisinde ise solunum enzimlerinde bulunan tiyol grupları ile etkileşime girerek etki etmektedir. *E. coli* de ise fosfat emilimini engelleyerek ve çeşitli moleküllerin salınmasına neden olarak antimikrobiyal etkinlik göstermektedir (Rai vd., 2009). AgNP'lerin *K. pneumoniae* üzerinde antibakteriyel etkisi daha önce yapılan çalışmalarla örtüşmektedir (Huq & Akter, 2021). *Melissa officinalis* ekstraktı ile sentezlenen gümüş nanopartikülün *E. coli* ve *S. aureus* üzerinde antibakteriyel etkisinin incelendiği bir çalışmada artan AgNP konsantrasyonu ile inhibisyon alan çapında artış görülmektedir (de Jesús Ruíz-Baltazar vd., 2017). Oysa çalışmamızda artan Ag-CT'nin antimikrobiyal etkisi görülmekle birlikte Ag-CT miktarının artışı ile alan çapında tutarlı bir artış gösteremediği gözlemlenmektedir. Bu durumda 0,5 mg üstündeki konsantrasyonlarda nanopartikülün açtığı alan çapının sabit kalması gümüşün etrafının proteinler ile çevrili olması ile ilişkilendirilmektedir. AgNP'lerin *C. albicans* ve *S. cerevisiae* üzerinde antifungal etkisi de literatürde daha önceden bildirilmiş olup çalışmamızda da antifungal etkiye rastlanmakla birlikte yukarıda belirtildiği gibi nanopartikülün tam çözünememesinden kaynaklı sabit bir çap göze çarpmaktadır (Ribeiro vd., 2023).

Gümüş nanopartiküllerin toplam antioksidan seviyelerinin incelenmesi için SH-SY5Y hücre hattına farklı dozlarda Ag-CT uygulaması yapıp 24 saat sonunda kit ile çalışılmış ve elde edilen verilere göre grafikler oluşturulmuştur. Rel Assay Diagnostics kiti ile yapılan sonuçların değerlendirilmesi için firmanın sağladığı standart Tablo 5.2'de verilmiştir. Buna göre kontrol grubu hücreler 0,3 civarında oldukça düşük antioksidan etkinlik gösterirken 1 mg/mL konsantrasyonda Ag-CT ile muamele edilen hücreler 1,26 dolaylarında antioksidan etkinlik göstermiştir. Bu durum SH-SY5Y hücrelerinin çok düşük antioksidan seviyelerinin Ag-CT uygulaması ile normal kabul edilebilir seviyelere çıktığını göstermektedir. Ag-CT, SH-SY5Y hücre hattında antioksidan seviyelerinin

yükselmesine katkıda bulunmuştur. Ag-CT konsantrasyonlarında azalmaya paralel olarak antioksidan seviyelerinde de azalma görülmektedir.

Tablo 5.2. TAS Referans Değerleri ve Açıklamaları

Referans Değer	Açıklama
>2,00	Çok iyi
1,45 - 2,00	Normal
1,20 - 1,45	Normal Kabul Edilebilir
1,00 - 1,20	Düşük Antioksidan Seviyesi
<1,00	Çok Düşük Antioksidan Seviyesi

Gümüş nanopartiküllerin toplam oksidan seviyelerinin incelenmesi için SH-SY5Y hücre hattına farklı dozlarda Ag-CT uygulaması yapıp 24 saat sonunda kit ile çalışılmış ve elde edilen verilere göre grafikler oluşturulmuştur. Rel Assay Diagnostics kiti ile yapılan sonuçların değerlendirilmesi için firmanın sağladığı standart Tablo 5.3’de verilmiştir. Kimotripsinin bir antioksidan gibi çalıştığına dair veri literatürde yer almaktadır (Latha vd., 1998). Gümüş nitrat ve AgNP ile yapılan bir çalışmada ise gümüş nitrat uygulamasının çok daha yüksek antioksidan seviyeleri ile sonuçlandığını göstermektedir (Bakr vd., 2022). Kimotripsin bağlı gümüş nanopartikül Ag-CT ile yapılan çalışmamızda kontrol grubu hücreler 3,90 civarında sonuç verirken 1 mg/mL, 0,5 mg/mL ve 250 µg/mL konsantrasyonlarında sıfırın altında değerler vermiştir. Bu durum hücrelerdeki Ag-CT uygulaması sonrası azalan oksidan seviyelerine işaret etmektedir. Nanopartikül konsantrasyonu azaldıkça sıfıra yaklaşan ve daha sonra da giderek artan değerler Ag-CT konsantrasyonunun azalmasıyla hücredeki oksidan gideriminin azaldığına işaret etmektedir. TAS ve TOS sonuçları beraber değerlendirildiğinde birbirini destekleyici veriler sağlamaktadır.

Tablo 5.3. TOS Referans Değerleri ve Açıklamaları

Referans Değer	Açıklama
<5,00	Çok iyi
5,00 - 8,00	Normal Değer
8,00 - 12,00	Yüksek Oksidan Seviyesi
>12,00	Çok Yüksek Oksidan Seviyesi

Özetle bu çalışmada kimotripsin bağılı gümüş nanopartiküllerin beklendiği üzere antibakteriyel ve antifungal özellikler göstermekle birlikte farklı konsantrasyonlarda ve farklı çözündürme yöntemleriyle çalışılmasının nanopartikülün antimikrobiyal etkinliği üzerine daha anlamlı sonuçlar vereceği düşünülmektedir. Öte yandan nöroblastoma hücre hattı üzerinde oksidatif strese karşı etkinliği incelenmiştir. Buna göre Ag-CT'nin muhtemel iyi bir nöroprotektif ajan olduğu düşünülmektedir. Ancak bu konuda daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Al-kawmani, A. A., Mashai, K., Abul, M., Ali, M. A., Ali, W., Hailan, Q., and Al-hemaid, F. M. A. (2020). Apoptosis-inducing potential of biosynthesized silver nanoparticles in breast cancer cells. *Journal of King Saud University - Science*, 32(4), 2480–2488. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.04.002>.

Alon, N., Miroshnikov, Y., Perkas, N., Nissan, I., and Gedanken, A. (2014). *Substrates coated with silver nanoparticles as a neuronal regenerative material*. *Substrates coated with silver nanoparticles as a neuronal regenerative material*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S45639>.

Alshemary, A. Z., Pazarcevirin, A. E., Tezcaner, A., and Evis, Z. (2016). Mesoporous strontium doped nano sized sulphate hydroxyapatite as a novel biomaterial for bone tissue applications. *RSC Advances*, 6(72), 68058–68071. <https://doi.org/10.1039/C6RA16809D>.

Atwood, C. S., Robinson, S. R., and Smith, M. A. (2002). Amyloid- β : redox-metal chelator and antioxidant. *Journal of Alzheimer's Disease*, 4(3), 203–214. <https://doi.org/10.3233/JAD-2002-4310>.

Auclair, J., and Gagné, F. (2022). Shape-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles on Freshwater Cnidarians. *Nanomaterials*, 12(18). <https://doi.org/10.3390/nano12183107>.

Bakr, Z., Said, S. M., Mohammad, W. A., Aboulnasr, G. N., and Elshimy, N. A. (2022). Silver-Nanoparticle- and Silver-Nitrate-Induced Antioxidant Disbalance, Molecular Damage, and Histochemical Change on the Land Slug (*Lehmannia nyctelia*) Using Multibiomarkers. *Frontiers in Physiology*, 13, 945776. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.945776>.

Bayr, H. (2005). Reactive oxygen species. *Critical Care Medicine*, 33(Suppl), S498–S501. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000186787.64500.12>.

Becaro, A. A., Jonsson, C. M., Puti, F. C., Siqueira, M. C., Mattoso, L. H. C., Correa, D. S., and Ferreira, M. D. (2015). Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 3, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2014.11.002>.

Bender, M. L., Kezdy, F. J., and Wedler, F. C. (1967). alpha-Chymotrypsin: Enzyme concentration and kinetics. *Journal of Chemical Education*, 44(2), 84. <https://doi.org/10.1021/ed044p84>.

Bishop, G. M., and Robinson, S. R. (2003). Human A β 1–42 reduces iron-induced toxicity in rat cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Research*, 73(3), 316–323. <https://doi.org/10.1002/jnr.10661>.

Castro, G. R. (2000). Properties of soluble α -chymotrypsin in neat glycerol and water. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(1–2), 143–150. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00197-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00197-6).

Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C., and Collin, F. (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology*, 14(October 2017), 450–464. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.10.014>.

Coccini, T., Manzo, L., Bellotti, V., and Simone, U. De. (2014). *Assessment of Cellular Responses after Short- and Long-Term Exposure to Silver Nanoparticles in Human Neuroblastoma (SH-SY5Y) and Astrocytoma (D384) Cells*. 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/259765>.

Collin, F. (2019). Chemical Basis of Reactive Oxygen Species Reactivity and Involvement in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10), 2407. <https://doi.org/10.3390/ijms20102407>.

Conte, V., Uryu, K., Fujimoto, S., Yao, Y., Rokach, J., Longhi, L., ... and Praticò, D. (2004). Vitamin E reduces amyloidosis and improves cognitive function in Tg2576 mice following repetitive concussive brain injury. *Journal of Neurochemistry*, 90(3), 758–764. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02560.x>.

Coyas, A. (1963). Alpha-Chymotrypsin in Otology. *The Journal of Laryngology and Otology*, 77(12), 1001–1005. <https://doi.org/10.1017/S002221510006165X>.

Dalfó, E., Portero-Otín, M., Ayala, V., Martínez, A., Pamplona, R., and Ferrer, I. (2005). Evidence of Oxidative Stress in the Neocortex in Incidental Lewy Body Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 64(9), 816–830. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000179050.54522.5a>.

Dayem, A. A., Hossain, M., Lee, S., Kim, K., Saha, S., Yang, ... and Cho, S.-G. (2017). The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 120. <https://doi.org/10.3390/ijms18010120>.

Dayem, A. A., Kim, B., Gurunathan, S., Choi, H. Y., Yang, G., Saha, S. K., ... and Cho, S. (2014). Biologically synthesized silver nanoparticles induce neuronal differentiation of SH-SY5Y cells via modulation of reactive oxygen species, phosphatases, and kinase signaling pathways. *Biotechnology Journal*, 9(7), 934–943. <https://doi.org/10.1002/biot.201300555>.

De Castro, O., Comparone, M., Di Maio, A., Del Guacchio, E., Menale, B., Troisi, J., ... and Guida, M. (2017). What is in your cup of tea? DNA verity test to characterize black and green commercial teas. *PLoS ONE*, 12(5), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178262>.

de Jesús Ruíz-Baltazar, Á., Reyes-López, S. Y., Larrañaga, D., Estévez, M., and Pérez, R. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using a *Melissa officinalis* leaf extract

with antibacterial properties. *Results in Physics*, 7, 2639–2643. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2017.07.044>.

Ferreira, J. H. A., Medeiros, A. M. A. B., Peres, R. M., and Canevari, T. C. (2024). Ultra-Sensitive Determination of Fenitrothion Pesticide in Orange Juice by Gold-Printed Electrode Modified with AgNP/Carbon Dot/MWCNT Nanoarchitecture Employing Electrochemical Impedance Spectroscopy. *Food Analytical Methods*, 17(6), 825–833. <https://doi.org/10.1007/s12161-024-02614-9>.

Ferreira, M. L., Lazzarini Behrmann, I. C., Daniel, M. A., Sosa, G. L., Owusu, E., Parkin, I. P., ... and Vullo, D. L. (2024). Green synthesis and antibacterial-antibiofilm properties of biogenic silver nanoparticles. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 22(January), 100991. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2024.100991>.

Gandhi, S., and Abramov, A. Y. (2012). Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/428010>.

Gella, A., and Durany, N. (2009). Oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell Adhesion & Migration*, 3(1), 88–93. <https://doi.org/10.4161/cam.3.1.7402>.

Gülden, M., Jess, A., Kammann, J., Maser, E., and Seibert, H. (2010). Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(8), 1298–1305. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.015>.

Halliwell, B. (2001). Role of Free Radicals in the Neurodegenerative Diseases. *Drugs & Aging*, 18(9), 685–716. <https://doi.org/10.2165/00002512-200118090-00004>.

Hanus, M. J., and Harris, A. T. (2013). Nanotechnology innovations for the construction industry. *Progress in Materials Science*, 58(7), 1056–1102. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2013.04.001>.

Hosokawa, M., Nogi, K., Naito, M., and Yokoyama, T. (2008). Nanoparticle Technology Handbook. *İçinde Nanoparticle Technology Handbook*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53122-3.X5001-6>.

Houldsworth, A. (2023). Role of oxidative stress in neurodegenerative disorders: a review of reactive oxygen species and prevention by antioxidants. *Brain Communications*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcad356>.

Huq, M. A., and Akter, S. (2021). Biosynthesis, Characterization and Antibacterial Application of Novel Silver Nanoparticles against Drug Resistant Pathogenic *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella Enteritidis*. *Molecules*, 26(19), 5996. <https://doi.org/10.3390/molecules26195996>.

Ibrahim, H. M. M. (2015). Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using banana peel extract and their antimicrobial activity against representative

microorganisms. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(3), 265–275. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.01.007>.

Indiarto, R., Indriana, L. P. A., Andoyo, R., Subroto, E., and Nurhadi, B. (2022). Bottom-up nanoparticle synthesis: a review of techniques, polyphenol-based core materials, and their properties. *European Food Research and Technology*, 248(1), 1–24. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03867-y>.

Iova, O.-M., Marin, G.-E., Lazar, I., Stanescu, I., Dogaru, G., Nicula, C. A., and Bulboacă, A. E. (2023). Nitric Oxide/Nitric Oxide Synthase System in the Pathogenesis of Neurodegenerative Disorders—An Overview. *Antioxidants*, 12(3), 753. <https://doi.org/10.3390/antiox12030753>.

Jameel, M. S., Aziz, A. A., Dheyab, M. A., Khaniabadi, P. M., Kareem, A. A., Alrosan, M., ... and Mehrdel, B. (2022). Mycosynthesis of ultrasonically-assisted uniform cubic silver nanoparticles by isolated phenols from *Agaricus bisporus* and its antibacterial activity. *Surfaces and Interfaces*, 29(January), 101774. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2022.101774>.

Jia, Q., Deng, Y., and Qing, H. (2014). Potential Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Targeting or Beyond β -Amyloid: Insights from Clinical Trials. *BioMed Research International*, 2014, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2014/837157>.

Ju, H.-Y., Kuo, C.-H., Too, J.-R., Huang, H.-Y., Twu, Y.-K., Chang, C.-M. J., ... and Shieh, C.-J. (2012). Optimal covalent immobilization of α -chymotrypsin on Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 78, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.01.015>.

Kaya, B., and Yıldırım, A. (2021). Determination of the antioxidant, antimicrobial and anticancer properties of the honey phenolic extract of five different regions of Bingöl province. *Journal of Food Science and Technology*, 58(6), 2420–2430. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04783-x>.

Khaled, A. M., Othman, M. S., Obeidat, S. T., Aleid, G. M., Aboelnaga, S. M., Fehaid, A., ... and Morsi, D. S. (2024). Green-Synthesized Silver and Selenium Nanoparticles Using Berberine: A Comparative Assessment of In Vitro Anticancer Potential on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line (HepG2). *Cells*, 13(3), 287. <https://doi.org/10.3390/cells13030287>.

Kim, G. H., Kim, J. E., Rhie, S. J., and Yoon, S. (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Experimental Neurobiology*, 24(4), 325–340. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>.

Kontush, A. (2001). Amyloid- β : an antioxidant that becomes a pro-oxidant and critically contributes to Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(9), 1120–1131. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00688-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00688-8).

Kumar, A., and Ratan, R. R. (2016). Oxidative Stress and Huntington's Disease: The Good, The Bad, and The Ugly. *Journal of Huntington's Disease*, 5(3), 217–237. <https://doi.org/10.3233/JHD-160205>.

Kumar, R., Roopan, S. M., Prabhakarn, A., Khanna, V. G., and Chakroborty, S. (2012). Agricultural waste *Annona squamosa* peel extract: Biosynthesis of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 90, 173–176. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2012.01.029>.

Kumari, S., Raturi, S., Kulshrestha, S., Chauhan, K., Dhingra, S., András, K., ... and Singh, T. (2023). A comprehensive review on various techniques used for synthesizing nanoparticles. *Journal of Materials Research and Technology*, 27, 1739–1763. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2023.09.291>.

Latha, B., Ramakrishnan, M., Jayaraman, V., and Babu, M. (1998). The efficacy of Trypsin: Chymotrypsin preparation in the reduction of oxidative damage during burn injury. *Burns*, 24(6), 532–538. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(98\)00066-7](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(98)00066-7).

Legerská, B., Chmelová, D., and Ondrejovič, M. (2020). TLC-Bioautography as a fast and cheap screening method for the detection of α -chymotrypsin inhibitors in crude plant extracts. *Journal of Biotechnology*, 313(February), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.02.016>.

Li, L., Cui, J., Liu, Z., Zhou, X., Li, Z., Yu, Y., Jia, Y., ... and Wu, Y. (2018). Silver nanoparticles induce SH-SY5Y cell apoptosis via endoplasmic reticulum- and mitochondrial pathways that lengthen endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites and alter inositol-3-phosphate receptor function. *Toxicology Letters*, 285, 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.01.004>.

Li, P., Kuo, T., Chang, J., Yeh, J., and Chan, W. (2010). *Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles*. 197, 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.05.003>.

Lockman, P. R., Koziara, J. M., Mumper, R. J., and Allen, D. D. (2004). Nanoparticle Surface Charges Alter Blood–Brain Barrier Integrity and Permeability. *Journal of Drug Targeting*, 12(9–10), 635–641. <https://doi.org/10.1080/10611860400015936>.

Ma, N., Ma, C., Li, C., Wang, T., Tang, Y., Wang, H., ... and He, N. (2013). *Influence of Nanoparticle Shape , Size , and Surface Functionalization on Cellular Uptake*. 13(10), 6485–6498. <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.7525>.

Malik, S., Muhammad, K., and Waheed, Y. (2023). Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. *Molecules*, 28(2), 661. <https://doi.org/10.3390/molecules28020661>.

Mattson, M. P., Chan, S. L., and Duan, W. (2002). Modification of Brain Aging and Neurodegenerative Disorders by Genes, Diet, and Behavior. *Physiological Reviews*, 82(3), 637–672. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2002>.

- Miethling-Graff, R., Rumpker, R., Richter, M., Verano-Braga, T., Kjeldsen, F., Brewer, J., ... and Erdmann, H. (2014). Exposure to silver nanoparticles induces size- and dose-dependent oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicology in Vitro*, 28(7), 1280–1289. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.06.005>.
- Milardović, S., Ivanišević, I., Rogina, A., and Kassal, P. (2018). Synthesis and Electrochemical Characterization of AgNP Ink Suitable for Inkjet Printing. *International Journal of Electrochemical Science*, 13(11), 11136–11149. <https://doi.org/10.20964/2018.11.87>.
- Miura, N., and Shinohara, Y. (2009). Biochemical and Biophysical Research Communications Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 390(3), 733–737. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.10.039>.
- Modena, M. M., Rühle, B., Burg, T. P., and Wuttke, S. (2019). Nanoparticle Characterization: What to Measure? *Advanced Materials*, 31(32), 1–26. <https://doi.org/10.1002/adma.201901556>.
- Mukherjee, J., Malhotra, D., Gautam, S., and Gupta, M. N. (2013). Green synthesis of nanocomposites consisting of silver and protease alpha chymotrypsin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1054–1061. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.01.004>.
- Nandiyanto, A. B. D., Ragadhita, R., and Fiandini, M. (2022). Interpretation of Fourier Transform Infrared Spectra (FTIR): A Practical Approach in the Polymer/Plastic Thermal Decomposition. *Indonesian Journal of Science and Technology*, 8(1), 113–126. <https://doi.org/10.17509/ijost.v8i1.53297>.
- Nasrollahzadeh, M., Issaabadi, Z., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., and Atarod, M. (2019). Types of Nanostructures. İçinde *Interface Science and Technology* (1. baskı, C. 28, ss. 29–80). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00002-X>.
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Sajjadi, M., and Issaabadi, Z. (2019). An Introduction to Nanotechnology. İçinde *Interface Science and Technology* (1. baskı, C. 28, ss. 1–27). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813586-0.00001-8>.
- Nemecek, D., Stepanek, J., and Thomas, G. J. (2013). Raman Spectroscopy of Proteins and Nucleoproteins. *Current Protocols in Protein Science*, 71(1), 1–52. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1708s71>.
- Noinville, S., Revault, M., Quiquampoix, H., and Baron, M. . (2004). Structural effects of drying and rehydration for enzymes in soils: a kinetics-FTIR analysis of α -chymotrypsin adsorbed on montmorillonite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 273(2), 414–425. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.01.067>.
- Nunomura, A., Castellani, R. J., Zhu, X., Moreira, P. I., Perry, G., and Smith, M. A. (2006). Involvement of Oxidative Stress in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(7), 631–641. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000228136.58062.bf>.

Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., ... and Smith, M. A. (2001). Oxidative Damage Is the Earliest Event in Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60(8), 759–767. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.8.759>.

Othman, S. Ben, and Yabe, T. (2015). Use of Hydrogen Peroxide and Peroxyl Radicals To Induce Oxidative Stress in Neuronal Cells. *Reviews in Agricultural Science*, 3(0), 40–45. <https://doi.org/10.7831/ras.3.40>.

Özden, B. (2019). *Recombinant Production And Characterization Of Serine Protease Enzyme From Virgibacillus Sp. Agtr Strain*. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi.

Pacioni, N. L., Borsarelli, C. D., Rey, V., and Veglia, A. V. (2015). Synthetic Routes for the Preparation of Silver Nanoparticles. İçinde *Engineering Materials* (ss. 13–46). https://doi.org/10.1007/978-3-319-11262-6_2.

Palasz, A. T., Breña, P. B., De la Fuente, J., and Gutiérrez-Adán, A. (2008). The effect of different zwitterionic buffers and PBS used for out-of-incubator procedures during standard in vitro embryo production on development, morphology and gene expression of bovine embryos. *Theriogenology*, 70(9), 1461–1470. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.092>.

Patil, R. B., and Chougale, A. D. (2021). Analytical methods for the identification and characterization of silver nanoparticles: A brief review. *Materials Today: Proceedings*, 47, 5520–5532. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.384>.

Patlolla, A. K., Hackett, D., and Tchounwou, P. B. (2015). Silver nanoparticle-induced oxidative stress-dependent toxicity in Sprague-Dawley rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 399(1–2), 257–268. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2252-7>.

Philip, D. (2011). Mangifera Indica leaf-assisted biosynthesis of well-dispersed silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(1), 327–331. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2010.10.015>.

Pisarev, O. A., Titova, A. V., Borovikova, L. N., Kipper, A. I., Voroshilova, T. M., and Panarin, E. F. (2016). Immobilization of chymotrypsin on silver nanoparticles. *Russian Chemical Bulletin*, 65(3), 790–793. <https://doi.org/10.1007/s11172-016-1375-2>.

Plyushchenko, A. V., Borovikova, L. N., and Pisarev, O. A. (2019). Effect of the Method of Nanocomplex Synthesis on the Proteolytic Activity of Chymotrypsin Immobilized on Silver Nanoparticles. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 55(5), 514–517. <https://doi.org/10.1134/S0003683819050090>.

Popescu, M., Velea, A., and Lorinczi, A. (2010). Biogenic production of nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5(4), 1035–1040.

Rai, M., Yadav, A., and Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>.

Raja, S., Ramesh, V., and Thivaharan, V. (2017). Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Calliandra haematocephala* leaf extract, their antibacterial activity and hydrogen peroxide sensing capability. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.06.023>.

Rautela, A., Rani, J., and Debnath (Das), M. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles from *Tectona grandis* seeds extract: characterization and mechanism of antimicrobial action on different microorganisms. *Journal of Analytical Science and Technology*, 10(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s40543-018-0163-z>.

Reeve, A. K., Krishnan, K. J., Elson, J. L., Morris, C. M., Bender, A., Lightowlers, R. N., and Turnbull, D. M. (2008). Nature of Mitochondrial DNA Deletions in Substantia Nigra Neurons. *The American Journal of Human Genetics*, 82(1), 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.018>.

Ribeiro, L. G., Roque, G. S. C., Conrado, R., and De Souza, A. O. (2023). Antifungal Activity of Mycogenic Silver Nanoparticles on Clinical Yeasts and Phytopathogens. *Antibiotics*, 12(1), 91. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010091>.

Sadat, A., and Joye, I. J. (2020). Peak Fitting Applied to Fourier Transform Infrared and Raman Spectroscopic Analysis of Proteins. *Applied Sciences*, 10(17), 5918. <https://doi.org/10.3390/app10175918>.

Sahni, J. K., Doggui, S., Ali, J., Baboota, S., Dao, L., and Ramassamy, C. (2011). Neurotherapeutic applications of nanoparticles in Alzheimer's disease. *Journal of Controlled Release*, 152(2), 208–231. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.033>.

Salazar-Bryam, A. M., Yoshimura, I., Santos, L. P., Moura, C. C., Santos, C. C., Silva, V. L., ... and Contiero, J. (2021). Silver nanoparticles stabilized by rhamnolipids: Effect of pH. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 205(April), 111883. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111883>.

Sanrattana, W., Maas, C., and de Maat, S. (2019). SERPINS—From Trap to Treatment. *Frontiers in Medicine*, 6(FEB), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00025>.

Senousy, S. R., Ahmed, A. F., Abdelhafeez, D. A., Khalifa, M. M. A., Abourehab, M. A., and El-Daly, M. (2022). Alpha-Chymotrypsin Protects Against Acute Lung, Kidney, and Liver Injuries and Increases Survival in CLP-Induced Sepsis in Rats Through Inhibition of TLR4/NF- κ B Pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, Volume 16(September), 3023–3039. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S370460>.

Shard, A. G., Schofield, R. C., and Minelli, C. (2020). Ultraviolet – visible spectrophotometry. *Çinde Characterization of Nanoparticles* (C. 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00012-2>.

Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., and Kukreti, S. (2019). Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 24(8), 1583. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>.

Sizeland, K. H., Hofman, K. A., Hallett, I. C., Martin, D. E., Potgieter, J., Kirby, N. M., Hawley, A., ... and Cumming, M. H. (2018). Nanostructure of electrospun collagen: Do electrospun collagen fibers form native structures? *Materialia*, 3, 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2018.10.001>.

Smith, M. A., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Raina, A. K., and Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1502(1), 139–144. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(00\)00040-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(00)00040-5).

Sung, S., Yao, Y., Uryu, K., Yang, H., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., and Praticò, D. (2004). Early Vitamin E supplementation in young but not aged mice reduces A β levels and amyloid deposition in a transgenic model of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 18(2), 323–325. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0961fje>.

Taibe Huisa, A. J., Estrella Josende, M., Gelesky, M. A., Fernandes Ramos, D., López, G., Bernardi, F., and Monserrat, J. M. (2024). Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) green synthesis of silver nanoparticles: antimicrobial efficacy and ecotoxicological assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(8), 12005–12018. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-31949-3>.

Taki-Nakano, N., Ohzeki, H., Kotera, J., and Ohta, H. (2014). Cytoprotective effects of 12-oxo phytodienoic acid, a plant-derived oxylipin jasmonate, on oxidative stress-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(12), 3413–3422. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.09.003>.

Tamagno, E., Guglielmotto, M., Vaschiaveo, V., and Tabaton, M. (2021). Oxidative Stress and Beta Amyloid in Alzheimer's Disease. Which Comes First: The Chicken or the Egg? *Antioxidants*, 10(9), 1479. <https://doi.org/10.3390/antiox10091479>.

Thakkar, A. B., Subramanian, R. B., Thakkar, V. R., Bhatt, S. V., Chaki, S., Vaidya, Y. H., ... and Thakor, P. (2024). Apoptosis induction capability of silver nanoparticles capped with *Acorus calamus* L. and *Dalbergia sissoo* Roxb. Ex DC. against lung carcinoma cells. *Heliyon*, 10(2), e24400. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24400>.

Titus, D., James Jebaseelan Samuel, E., and Roopan, S. M. (2019). Nanoparticle characterization techniques. İçinde *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles* (ss. 303–319). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00012-5>.

Vadakkan, K., Rumjit, N. P., Ngangbam, A. K., Vijayanand, S., and Nedumpillil, N. K. (2024). Novel advancements in the sustainable green synthesis approach of silver nanoparticles (AgNPs) for antibacterial therapeutic applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 499(July 2023), 215528. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215528>.

Vandenabeele, P. (2013). *Practical Raman Spectroscopy – An Introduction*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119961284>.

Wang, B., Zhang, J., Chen, C., Xu, G., Qin, X., Hong, Y., ... and Zou, Z. (2018). The size of zinc oxide nanoparticles controls its toxicity through impairing autophagic flux in A549 lung epithelial cells. *Toxicology Letters*, 285(November 2017), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.025>.

Wuttke, S., Lismont, M., Escudero, A., Rungtaweivoranit, B., and Parak, W. J. (2017). Positioning metal-organic framework nanoparticles within the context of drug delivery – A comparison with mesoporous silica nanoparticles and dendrimers. *Biomaterials*, 123, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.01.025>.

Yang, B., Chen, Y., and Shi, J. (2019). Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. *Chemical Reviews*, 119(8), 4881–4985. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00626>.

Ying, S., Guan, Z., Ofoegbu, P. C., Clubb, P., Rico, C., He, F., and Hong, J. (2022). Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. *Environmental Technology & Innovation*, 26, 102336. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102336>.

Youssif, K. A., Haggag, E. G., Elshamy, A. M., Rabeh, M. A., Gabr, N. M., Seleem, A., ... and Abdelmohsen, U. R. (2019). Anti-Alzheimer potential, metabolomic profiling and molecular docking of green synthesized silver nanoparticles of *Lampranthus coccineus* and *Malephora lutea* aqueous extracts. *PLOS ONE*, 14(11), e0223781. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223781>.

Zhang, S., and Janciauskiene, S. (2002a). Multi-functional capability of proteins: α 1-antichymotrypsin and the correlation with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 4(2), 115–122. <https://doi.org/10.3233/JAD-2002-4206>.

Zhang, S., and Janciauskiene, S. (2002b). Multi-functional capability of proteins: α 1-antichymotrypsin and the correlation with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 4(2), 115–122. <https://doi.org/10.3233/JAD-2002-4206>.

Zhao, Y., Cai, J., Liu, Z., Li, Y., Zheng, C., Zheng, Y., ... and Liu, Y. (2019). Nanocomposites Inhibit the Formation, Mitigate the Neurotoxicity, and Facilitate the Removal of β -Amyloid Aggregates in Alzheimer's Disease Mice. *Nano Letters*, 19(2), 674–683. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b03644>.

Zhu, M., Nie, G., Meng, H., Xia, T., Nel, A., and Zhao, Y. (2013). Physicochemical Properties Determine Nanomaterial Cellular Uptake, Transport, and Fate. *Accounts of Chemical Research*, 46(3), 622–631. <https://doi.org/10.1021/ar300031y>.

Zou, K., Gong, J.-S., Yanagisawa, K., and Michikawa, M. (2002). A Novel Function of Monomeric Amyloid β -Protein Serving as an Antioxidant Molecule against Metal-Induced Oxidative Damage. *The Journal of Neuroscience*, 22(12), 4833–4841. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-12-04833.2002>.

EKLER

Tablo 1. Kullanılan Cihazlar ve Mikroorganizmalar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri

Kimyasallar ve Sarf Malzemeleri		Cihazlar		Mikroorganizmalar
DMEM	NaOH	Mikrobiyolojik Emniyet Kabini (Bilser)	Manyetik Karıştırıcı (Ika RT 10)	SH-SY5Y
α -kimotripsin (Merck)	HCl			
Etil Alkol (Tekkim)	KH ₂ PO ₄	Hücre Kültürü Emniyet Kabini	Santifrjü	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (-)
Nutrient Broth (Merck)	Na ₂ HPO ₄			
Mueller Hilton Agar (Merck)	KCl	Otomatik Pipetler (Brand)	Otoklav (Hirayama)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538P (+)
Boş Disk (Bioanalyse)	NaCl			
Streptomycin (Bioanalyse)	AgNO ₃	Buzdolabı (4°C, Arçelik)	Derin dondurucu (-80 °C, Hettich/ Nuair)	
DMSO	H ₂ O ₂			
Tripsin	96'lık ve 48'lik plaka	Manyetik Karıştırıcı (Ika C-MAG HS7)	ELISA	<i>Klasiella pnemeunia</i> ATCC 700603 (-)
Flask	FBS			
Filtre Kâğıdı	Tripan Blue	Vortex	Hassas terazi (Denver)	
Thoma lamı	Petri (Isolab)	Saf su cihazı (GFL 2004)	pH-metre (Hanna Instrument)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763
Serolojik Pipetler	Drigalski			
Pipet uçları	Mikrosantifrjü tüpü	Etüv (Memmert 100-800)	UV – 1800 Spektrofotometre (Shimadzu)	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
TOS Kiti	Santifrjü tüpü			
TAS Kiti	XTT Kiti	Mikroskop		