T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YEŞİL SENTEZ YÖNTEMİ İLE HAZIRLANMIŞ KAHVE POSASI-GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİNİN (KP@AgNP) KİTOSAN İLE NANOJEL HALİNE GETİRİLMESİ VE SHSY-5Y HÜCRE HATTINDA H_2O_2 İLE OLUŞTURULMUŞ HÜCRESEL DEJENERASYONDA OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Berat AKIN

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. BÜLENT KAYA

BİNGÖL-2026

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, akademik gelişimime kıymetli katkılar sağlayan ve sabrıyla bana her zaman örnek olan saygıdeğer tez danışmanım Doç. Dr. Bülent Kaya'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim ve tez sürecim boyunca değerli fikir, öneri ve desteklerini esirgemeyen tüm kıymetli hocalarıma; bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan KAYA Lab Grubu üyelerine ve laboratuvar çalışmalarım sırasındaki desteklerinden dolayı Öğr. Gör. Muhammed Abdullah KÖDÖR'e teşekkür ederim.

Bu uzun ve meşakkatli süreçte maddi ve manevi desteklerini her an hissettiren başta annem, babam olmak üzere ailemin tüm fertlerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Hayatımın her aşamasında yanımda olan, sevgisi ve desteğiyle bana güç veren, bu tezi kendisine armağan ettiğim erkek kardeşim Abdusselam AKIN'a da ayrıca özel olarak teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim süresince her zaman yanımda olan, en ufak problemimi dahi kendi meselesi gibi sahiplenen kıymetli dostum Murat DEMİRELLİ'ye gönülden teşekkür borçluyum.

Ayrıca, karşılaştığım tüm zorluklara rağmen sabrını, azmini ve inancını kaybetmeden ilerleyen; yorulduğu ve umutsuzluğa kapıldığı anlarda dahi yeniden ayağa kalkmayı başaran, içindeki mücadele gücüyle hedeflerinden vazgeçmeyen kendime de teşekkür etmek isterim.

Son olarak, çalışmamıza sağladığı değerli finansal ve kurumsal katkılarından dolayı Bingöl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (BÜBAP) şükranlarımı sunarım.
Bu çalışmanın bilim dünyasına faydalı ve katkı sağlayıcı bir nitelik taşımasını temenni ederim.

Berat AKIN
Bingöl 2026

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ..... i
İÇİNDEKİLER..... ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ..... v
ŞEKİLLER LİSTESİ..... vii
TABLOLAR LİSTESİ..... viii
ÖZET..... x
ABSTRACT..... xi
1. GİRİŞ..... 1
1.1. Nanoteknoloji ve Nanopartiküller..... 2
1.2. Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Yöntemler..... 3
1.3. Kahve Posası ve Biyolojik Atıkların Değerlendirilmesi..... 4
1.3.1. Kahve Posasının Kimyasal İçeriği..... 4
1.3.2. Atık Biyomalzemelerin Geri Kazanımı..... 5
1.4. Gümüş..... 6
1.5. Gümüş Nanopartiküller (AgNP)..... 6
1.6. Kitosan Bazlı Nanojel Sistemleri..... 7
1.6.1. Kitosanın Yapısı ve Biyouyumluluğu..... 7
1.6.2. Nanojeller..... 8
1.7. Oksidatif Stres ve Nörodejeneratif Hastalıklar..... 9
1.7.1. Oksidatif Stres Mekanizmaları..... 9
1.7.2. Nörodejeneratif Hastalıklarda Oksidan/Antioksidan Denge..... 10
1.7.2.1. Oksidatif Stres ve Alzheimer..... 11
1.7.2.2. Oksidatif Stres ve Parkinson..... 11
1.7.2.3. Oksidatif Stres ve Huntington..... 12
1.8. SH-SY5Y Hücre Hattı ve H_2O_2 ile Oksidatif Stres Modeli..... 13
1.8.1. H_2O_2 ile Hücresel Dejenerasyonun Modellenmesi..... 13
1.9. Çalışmanın Amacı..... 14
2. KAYNAK ÖZETLERİ..... 18

3. MATERYAL VE YÖNTEM..... 23
3.1. Materyal..... 23
3.1.1. Kullanılan Kimyasal ve Reaktifler..... 23
3.1.2. Kullanılan Cihazlar..... 23
3.2. Yöntem..... 24
3.2.1. Kahve Posası (KP) Ekstraktının Hazırlanması..... 24
3.2.2. KP Ekstraktı Fenolik Bileşenlerinin LC-MS/MS Orbitrap Kütle Spektrometresi ile Analizi..... 24
3.2.2.1. Sıvı Kromatografisi-Yüksek Çözünürlük Kütle Spektrometrisi Cihazı..... 25
3.2.2.2. Kromatografi ve Yüksek Çözünürlüklü MS Koşulları..... 25
3.3. KP Kaynaklı Gümüş Nanopartiküllerin (KP@AgNP) Sentezi..... 27
3.4. Nanopartikül Karakterizasyonu..... 27
3.5. KP@AgNP'nin Nanojel Haline Getirilmesi..... 28
3.6. Nanojelin Karakterizasyonu..... 29
3.7. Hücre Kültürü..... 29
3.7.1. SH-SY5Y Canlı Hücre Sayımı..... 30
3.7.2. WST-1 ile Hücre Canlılık Testi..... 30
3.7.3. H_2O_2 ile *In Vitro* Nörodejenerasyon Modelinin Oluşturulması..... 31
3.7.4. *In Vitro* Nörodejenerasyona Karşı KP@AgNP ve CS@KP@Ag Nanojel Doz Aralıklarının Belirlenmesi..... 31
3.7.5. Deney Grupları ve Uygulama Düzeni..... 32
3.8. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS)..... 33
3.9. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS)..... 34
3.10. İstatistiksel Analiz..... 35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... 36
4.1. Ekstraktının Fenolik Bileşenlerinin LC-MS/MS Orbitrap Kütle Spektrometresi ile Analizi..... 36
4.2. KP@AgNP ve CS@KP@Ag 'nin Karakterizasyonu..... 41
4.2.1. FT-IR Analizi..... 41
4.2.2. UV/Vis Analizi..... 43
4.2.3. XRD Analizi..... 44
4.3. FE-SEM EDX Analizi..... 46

4.3.1. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Analizi..... 50
4.3.2. Zeta Potansiyeli Analizi..... 51
4.4. Hücre Canlılık Testi (WST) Sonuçları..... 52
4.4.1. H_2O_2'nin SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi..... 52
4.4.2. Farklı KP@AgNP ve CS@KP@Ag Konsantrasyonlarının LD50 Değerinin Belirlenmesi..... 54
4.5. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) Sonuçları..... 56
4.6. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) Sonuçları..... 59
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER..... 65
KAYNAKLAR..... 69

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

α	: Alfa
β	: Beta
μ	: Mikro
θ	: Theta
°	: Derece
°C	: Santigrat derece
%	: Yüzde
A549	: İnsan Adenokarsinom Hücre Hattı
AgNP	: Gümüş Nanopartikül
ALS	: Amyotrofik Lateral Skleroz
Apo-E	: Apolipoprotein
Aβ	: Amiloid Beta Proteini
Bax	: Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bcl-2	: B Hücreli Lenfoma Proteini 2
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleikasit
Drd-2	: Dopamin Reseptör 2
eV	: Elektronvolt
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
kDa	: Kilo Dalton
Map-2	: Mikrotübül İlişkili Protein 2
MCF-7	: İnsan Adenokarsinom Hücre Hattı
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
mL	: Mililitre
MPO	: Miyeloperoksidaz
MS	: Kütle Spektrometresi

NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
nm	: Nanometre
NP	: Nanopartikül
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
pH	: Hidrojenin gücü
RNA	: Ribonükleikasit
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
XOR	: Ksantin Oksidoredüktaz
XRD	: X-Işını Kırınımı
DLS	: Dynamic Light Scattering (Dinamik Işık Saçılımı)
PDI	: Polidispersite İndeksi
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi–Tandem Kütle Spektrometrisi
TPP	: Sodyum Tripolifosfat
CS	: Kitosan
NG	: Nanojel
KP	: Kahve Posası

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. H_2O_2'nin SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stres oluşturma mekanizmasının şematik gösterimi……..... 10
Şekil 1.2. Çalışmanın Genel İş Akış Şeması..... 16
Şekil 3.1. Elüsyonda takip eden gradiyent koşulları..... 26
Şekil 3.2. KP ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle KP@AgNP üretim sürecinin şematik gösterimi..... 27
Şekil 3.3. Kitosan, TPP ve KP@AgNP kullanılarak iyonik jelasyon yöntemiyle CS@KP@Ag oluşumunun şematik gösterimi..... 28
Şekil 4.1. KP@AgNP ve CS@KP@Ag'nin FT-IR Spektrumları (g: gerilme, b: bükülme)..... 42
Şekil 4.2. KP@AgNP'leri ve CS@KP@Ag nanojeline ait 200 -1100 nm aralığında alınan UV/Vis absorbans grafikleri..... 43
Şekil 4.3. KP@AgNP'leri ve CS@KP@Ag nanojeline ait X-ışını kırınımı (XRD) desenleri..... 45
Şekil 4.4. Sentezlenen KP@AgNP'lerinin (a) KP@AgNP'lerinin FESEM mikrografı ve (b) istatistiksel boyut dağılım histogramı, (c) CS@KP@Ag nanojelin SEM mikrografı ve (d) istatistiksel boyut dağılım histogramı..... 47
Şekil 4.5. Yeşil sentezlenen (a) KP@AgNP ve (b) CS@KP@Ag örneklerine ait FESEM-EDX spektrumları ile belirlenen elementel bileşim sonuçları..... 49
Şekil 4.6. DLS analizi ile elde edilen hidrodinamik parçacık boyutu dağılımları..... 50
Şekil 4.7. KP@AgNP ve CS@KP@Ag numunelerinin zeta potansiyeli dağılımları..... 52
Şekil 4.8. Farklı H_2O_2 konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi ve yaklaşık LD_{50} değerinin belirlenmesi..... 54
Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan KP@AgNP ve CH@KP@Ag örneklerinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkileri ve IC_{50} değerlerinin belirlenmesi..... 55

Şekil 4.10. Farklı KP@AgNP konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde toplam antioksidan seviyesi (TAS) üzerine etkisi..... 57
Şekil 4.11. Farklı CS@KP@Ag nanojel konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde toplam antioksidan seviyesi (TAS) üzerine etkisi..... 58
Şekil 4.12. Farklı KP@AgNP konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde toplam oksidan seviyesi (TOS) üzerine etkisi..... 60
Şekil 4.13. Farklı CS@KP@Ag nanojel konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde toplam oksidan seviyesi (TOS) üzerine etkisi..... 62

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1.	Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Reaktifler….....	23
Tablo 3.2.	Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	23
Tablo 3.3.	SH-SY5Y hücre hattında koruyucu ve tedavi edici etkinin değerlendirilmesi amacıyla oluşturulan deney grupları ile KP@AgNP, CS@KP@Ag ve H_2O_2 uygulama sıraları.....	32
Tablo 4.1.	KP ekstraktında LC-MS/MS Orbitrap analizi sonucunda belirlenen fenolik bileşikler, alıkonma zamanı (RT), ana iyon (m/z), iyonlaşma modu, addukt iyonları, kalibrasyon doğrusalığı (R^2), doğrusal çalışma aralığı ve konsantrasyon değerleri gösterilmektedir.....	38
Tablo 5.1.	TAS Referans Değerleri ve Açıklamaları.....	66
Tablo 5.2.	TOS Referans Değerleri ve Açıklamaları.....	67

YEŞİL SENTEZ YÖNTEMİ İLE HAZIRLANMIŞ KAHVE POSASI-GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİNİN (KP@AgNP) KİTOSAN İLE NANOJEL HALİNE GETİRİLMESİ VE SHSY-5Y HÜCRE HATTINDA H_2O_2 İLE OLUŞTURULMUŞ HÜCRESEL DEJENERASYONDA OKSİDAN VE ANTİOKSİDAN SEVİYELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

ÖZET

Nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde oksidatif stresin önemli bir rol oynaması nedeniyle, biyouyumlu ve çevre dostu nanomalzemelerin geliştirilmesi güncel araştırma alanları arasında yer almaktadır. Bu çalışmada, kahve posası ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yöntemi ile gümüş nanopartikülleri (KP@Ag NPs) sentezlenmiş ve elde edilen nanopartiküller kitosan/tripolifosfat (TPP) esaslı nanojel sistemine yüklenerek CS@KP@Ag nanojel formülasyonu geliştirilmiştir. Sentezlenen nanopartiküller ve nanojel sisteminin fizikokimyasal özellikleri UV-Vis spektrofotometrisi, FT-IR, LC-MS/MS, dinamik ışık saçılımı (DLS), zeta potansiyeli, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) analizleri ile karakterize edilmiştir. Biyolojik etkinlik çalışmaları, H_2O_2 ile oksidatif stres oluşturulan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattında gerçekleştirilmiş; hücre canlılığı WST yöntemi ile değerlendirilirken toplam antioksidan seviye (TAS) ve toplam oksidan seviye (TOS) analizleri ile antioksidan etkinlik araştırılmıştır. Karakterizasyon sonuçları, gümüş nanopartiküllerinin başarıyla sentezlendiğini ve nanojel matrisi içerisine etkin şekilde yüklendiğini göstermiştir. Ayrıca CS@KP@Ag nanojel uygulamasının oksidatif stres koşullarında hücre canlılığını artırdığı, toplam antioksidan seviyesini yükselttiği ve toplam oksidan seviyesini azalttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, kahve posasının katma değerli bir biyomateryale dönüştürülmesiyle geliştirilen CS@KP@Ag nanojel sisteminin başarılı fizikokimyasal özelliklere sahip olduğu, oksidatif strese karşı nöroprotektif potansiyel taşıdığı ve biyomedikal ile farmasötik uygulamalarda kullanılabilecek çevre dostu ve umut vadeden bir nano-taşıyıcı sistem olduğu değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Gümüş nanopartikülleri, kahve posası, kitosan nanojel, oksidatif stres, SH-SY5Y, yeşil sentez.

PREPARATION OF CHITOSAN-BASED NANOJELS CONTAINING GREEN-SYNTHESIZED COFFEE GROUNDS–SILVER NANOPARTICLES (KP@AgNP) AND EVALUATION OF THEIR EFFECTS ON OXIDANT AND ANTIOXIDANT LEVELS IN H_2O_2-INDUCED CELLULAR DEGENERATION IN THE SH-SY5Y CELL LINE

ABSTRACT

Oxidative stress plays a critical role in the development of neurodegenerative diseases, making the development of biocompatible and environmentally friendly nanomaterials an important area of research. In this study, silver nanoparticles (KP@Ag NP) were synthesized using a green synthesis approach with spent coffee ground extract, and the synthesized nanoparticles were incorporated into a chitosan/tripolyphosphate (TPP)-based nanogel system to develop a CS@KP@Ag nanogel formulation. The physicochemical properties of the synthesized nanoparticles and nanogel system were characterized using UV-Vis spectroscopy, Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), dynamic light scattering (DLS), zeta potential analysis, scanning electron microscopy (SEM), and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX). The biological activity of the developed formulation was evaluated in H_2O_2-induced oxidative stress model using the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. Cell viability was determined by the WST assay, while antioxidant activity was assessed by measuring total antioxidant status (TAS) and total oxidant status (TOS). Characterization results confirmed the successful synthesis of silver nanoparticles and their efficient incorporation into the nanogel matrix. Furthermore, treatment with the CS@KP@Ag nanogel significantly increased cell viability under oxidative stress conditions, enhanced total antioxidant status, and reduced total oxidant status. These findings suggest that the developed CS@KP@Ag nanogel effectively alleviates oxidative stress-induced cellular damage and exhibits promising neuroprotective potential. In conclusion, the CS@KP@Ag nanogel, developed by valorizing spent coffee grounds into a value-added biomaterial, possesses favorable physicochemical properties and demonstrates considerable biological activity, indicating its potential as an environmentally friendly and promising nanocarrier system for future biomedical and pharmaceutical applications.

Keywords: Silver nanoparticles, spent coffee grounds, chitosan nanogel, oxidative stress, SH-SY5Y, green synthesis.

1. GİRİŞ

Günümüzde çevresel kirlilik, atık yönetimi ve sürdürülebilir kaynak kullanımı, bilimsel araştırmaların ve teknolojik gelişmelerin odak noktalarından biri hâline gelmiştir. Özellikle endüstriyel ve tarımsal faaliyetler sonucunda ortaya çıkan organik atıkların çevreye verdiği zarar, bu atıkların geri kazanımını ve katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesini zorunlu kılmaktadır (Baş ve Aksoy, 2024). Bu bağlamda yeşil kimya ve sürdürülebilir biyoteknoloji yaklaşımları, çevre dostu üretim süreçlerinin geliştirilmesinde belirleyici bir rol üstlenmektedir (Meyer et al., 2011). Nanoteknoloji ise söz konusu sürdürülebilir yaklaşımlarla kesişerek çevresel ve biyomedikal problemlere yenilikçi çözümler üretmektedir. Metal nanopartiküller, sahip oldukları fizikokimyasal özellikler nedeniyle antibakteriyel, antioksidan ve terapötik uygulamalarda yaygın biçimde kullanılmakta; ancak geleneksel kimyasal sentez yöntemlerinin toksik reaktif gereksinimleri ve yüksek enerji maliyeti bu sistemlerin kullanımını kısıtlamaktadır (Joudeh et al., 2022). Bu kısıtlamaların aşılması amacıyla geliştirilen yeşil sentez yöntemleri, biyolojik ve bitkisel kaynakların redüktör ve stabilizatör olarak kullanımını esas almakta; bu çerçevede kahve posası gibi gıda endüstrisi atıkları hem çevre dostu hem de yüksek biyoaktif içeriğe sahip biyomalzemeler olarak ön plana çıkmaktadır (Mussatto et al., 2011; Saygı et al., 2025). Nanopartiküllerin biyolojik sistemlerde güvenli ve kontrollü şekilde uygulanabilmesi için ise biyouyumlu taşıyıcı sistemlere ihtiyaç duyulmakta; kitosan bazlı nanojeller bu amaçla literatürde sıklıkla tercih edilmektedir (Prabahara, 2004). Nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde oksidatif stresin merkezi bir rol oynadığı bilinmekte olup H_2O_2 ile indüklenen SH-SY5Y hücre modeli, bu mekanizmaların *in vitro* koşullarda incelenmesinde standart bir platform olarak kabul görmektedir (Güçlü et al., 2023). Bununla birlikte, kahve posası kökenli gümüş nanopartiküllerinin kitosan nanojel sistemiyle birleştirilerek nörodejeneratif oksidatif stres modelinde değerlendirildiği çalışmalar literatürde oldukça sınırlı kalmaktadır. Bu boşluktan hareketle yürütülen tez çalışması; sürdürülebilirlik, yeşil sentez ve nöroprotektif nanoteknoloji alanlarını bütünleştiren özgün bir yaklaşım sunmayı hedeflemektedir.

1.1. Nanoteknoloji ve Nanopartiküller

Nanoteknoloji, atomik ve moleküler düzeyde (yaklaşık 1–100 nm) materyallerin kontrol edilerek yeni özellikler kazandırılması ve bu özelliklerin bilimsel ile teknolojik uygulamalarda kullanılmasını amaçlayan disiplinler arası bir bilim alanıdır. Nanoteknoloji kavramının temelleri Richard P. Feynman'ın 1959 yılında yaptığı "There's Plenty of Room at the Bottom" başlıklı konuşmasına dayandırılmakta olup, modern nanoteknolojinin kapsamı daha sonra Roco tarafından ayrıntılı olarak tanımlanmıştır (Feynman, 1960; Roco, 2003). Günümüzde nanoteknoloji; yüksek yüzey alanı/hacim oranı, boyuta bağlı optik, elektriksel, manyetik ve biyolojik özellikleri sayesinde tıp, biyoteknoloji, çevre bilimleri, enerji ve malzeme mühendisliği gibi birçok alanda yenilikçi uygulamaların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Buzea et al., 2007; Khan et al., 2019).

Nanopartiküller, nanoteknolojinin en önemli yapı taşlarından biri olup metal, metal oksit, polimerik veya biyolojik kökenli olabilmektedir. Sahip oldukları küçük boyut ve yüzey özellikleri, nanopartiküllerin hücrelerle ve biyomoleküllerle etkileşimini artırmakta; bu durum özellikle biyomedikal uygulamalarda önemli avantajlar sunmaktadır (Chavali et al., 2019). Nanopartiküller; ilaç taşıma sistemleri, biyosensörler, görüntüleme ajanları, antioksidan ve antimikrobiyal uygulamalar gibi birçok alanda aktif olarak kullanılmaktadır (Kirubakaran et al., 2026).

Nanopartiküllerin biyolojik sistemlerdeki etkileri; partikül boyutu, şekli, yüzey yükü ve yüzey yapısındaki yan gruplara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu nedenle nanopartikül sentezinde kullanılan yöntemler ve stabilizasyon stratejileri, elde edilen yapıların biyouyumluluğu ve etkinliği açısından kritik öneme sahiptir (Florian and Marcus, 2013). Özellikle biyomedikal uygulamalarda, toksik etkilere yol açmayan ve kontrollü etkileşim sağlayan nanopartikül sistemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Son yıllarda, çevresel sürdürülebilirlik ve insan sağlığına yönelik artan hassasiyet nedeniyle nanopartikül üretiminde çevre dostu ve biyouyumlu yöntemlere olan ilgi giderek artmaktadır. Bu bağlamda yeşil sentez yaklaşımları ve doğal kaynakların kullanımı, nanopartikül üretiminde geleneksel kimyasal yöntemlere alternatif olarak öne çıkmaktadır.

Nanoteknolojinin bu sürdürülebilir yönü, çevre ve sağlık alanlarında geliştirilen yeni nesil uygulamaların temelini oluşturmaktadır (Kirubakaran et al., 2026).

1.2. Nanopartikül Üretiminde Kullanılan Yöntemler

Nanopartiküllerin elde edilmesi, kullanılan başlangıç materyali ve izlenen sentez sürecine bağlı olarak farklı yöntemler aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemler, üretim sürecinin maddeye uygulanan fiziksel ya da kimyasal müdahale düzeyine göre çeşitlilik göstermektedir. Sentez stratejileri genel olarak, mevcut bir materyalin boyutunun küçültülmesine dayanan yukarıdan aşağıya (top-down) yaklaşımlar ile temel yapı birimlerinden yeni bir yapı oluşturmayı esas alan aşağıdan yukarıya (bottom-up) yaklaşımlar şeklinde ele alınmaktadır (Namakka et al., 2023).

Yukarıdan aşağıya temelli yöntemlerde, başlangıç materyali çeşitli fiziksel veya mekanik işlemlere maruz bırakılarak nano ölçeğe indirgenmektedir. Bu süreçler sırasında uygulanan yüksek enerji, materyalin yüzey yapısında ve kristal düzeninde değişimlere neden olabilmektedir. Mekanik parçalama, iyon temelli uygulamalar ve lazer destekli işlemler bu gruba dâhil edilebilir. Ancak bu yöntemler; yüksek enerji ihtiyacı, çevresel yük ve parçacık boyutunun hassas şekilde kontrol edilememesi gibi nedenlerle sınırlı kullanım alanına sahiptir (Tripathy et al., 2023).

Temel yapı taşlarından hareketle gerçekleştirilen aşağıdan yukarıya (bottom-up) sentez yaklaşımlarında ise atomik veya moleküler düzeydeki birimler, kontrollü reaksiyonlar sonucunda bir araya getirilerek nanopartiküller oluşturulmaktadır. Bu yöntemlerde reaksiyon ortamı, sıcaklık ve kimyasal bileşim gibi parametreler aracılığıyla partikül boyutu ve morfolojisi daha etkin biçimde yönlendirilebilmektedir. Sol-jel, hidrotermal ve buhar fazı temelli teknikler bu yaklaşım kapsamında değerlendirilmektedir. Daha düşük enerji gereksinimi ve yüksek kontrol imkânı sunmaları nedeniyle bu yöntemler literatürde yaygın olarak tercih edilmektedir (Tripathy et al., 2023).

Günümüzde nanopartikül sentezinde çevre dostu alternatiflere olan ilginin artmasıyla birlikte biyolojik kaynaklı üretim yöntemleri öne çıkmıştır. Bu yaklaşımlarda bitkiler, mikroorganizmalar veya mantarlar gibi doğal kaynaklardan elde edilen bileşenler, metal

iyonlarının indirgenmesinde aktif rol oynamaktadır. Biyolojik moleküller aynı zamanda nanopartiküllerin kararlılığını sağlayarak ek kimyasal stabilizatör ihtiyacını azaltmaktadır (Hussain et al., 2016).

Biyolojik temelli sentez yöntemleri (green synthesis), toksik reaktif kullanımını sınırlandırması, düşük enerji gereksinimi ve sürdürülebilirlik açısından önemli avantajlar sunmaktadır. Bununla birlikte, biyolojik kaynakların içeriğinin çevresel ve mevsimsel faktörlere bağlı olarak değişkenlik göstermesi, sentez sürecinin standartlaştırılmasını zorlaştırabilmektedir. Bu durum özellikle tekrarlanabilirlik ve ürün homojenliği açısından bazı kısıtlamalar doğurmaktadır (Parveen et al., 2016).

Bu sınırlamaların aşılması amacıyla son yıllarda, biyolojik sistemlerden elde edilen tanımlı ve saf bileşiklerin nanopartikül sentezinde kullanımı üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır. Saf bileşenler kullanılarak gerçekleştirilen sentezler, daha kontrollü reaksiyon koşulları ve daha tutarlı nanopartikül özellikleri elde edilmesine olanak tanımaktadır. Bu yaklaşım, çevre dostu üretim anlayışı ile analitik güvenilirliği bir arada sunması bakımından dikkat çekmektedir (Kirubakaran et al., 2026).

1.3. Kahve Posası ve Biyolojik Atıkların Değerlendirilmesi

Kahve, dünya genelinde en yaygın tüketilen içeceklerden biri olup tüketim süreci sonunda büyük miktarlarda kahve posası atığı oluşmaktadır. Genellikle evsel veya endüstriyel atık olarak değerlendirilen kahve posası, uygun şekilde yönetilmediğinde çevresel kirliliğe yol açabilmektedir (La Scalia et al., 2021). Bununla birlikte, içerdiği zengin biyokimyasal bileşenler sayesinde kahve posası, sürdürülebilir ve katma değeri yüksek uygulamalar için önemli bir biyomalzeme potansiyeli taşımaktadır (Zabaniotou et al., 2019).

1.3.1. Kahve Posasının Kimyasal İçeriği

Kahve posası; fenolik bileşikler, flavonoidler, alkaloidler, polisakkaritler, lipitler ve proteinler gibi çeşitli biyolojik olarak aktif bileşenler içermektedir (Franca et al., 2022). Özellikle klorojenik asitler, kafeik asit, ferulik asit ve gallik asit gibi fenolik bileşikler, kahve posasının güçlü antioksidan özellikler göstermesinde önemli rol oynamaktadır. Bu

bileşenler, serbest radikalleri nötralize edebilme yetenekleri sayesinde biyolojik sistemlerde oksidatif stresin azaltılmasına katkı sağlamaktadır (Zengin et al., 2019).

Kahve posasında bulunan polisakkaritler ve indirgen şekerler, metal iyonlarının indirgenmesinde doğal indirgeme ajanları olarak görev alabilmektedir. Aynı zamanda bu biyomoleküller, sentezlenen nanopartiküllerin yüzeyinde kaplayıcı ve stabilize edici etki göstererek partikül agregasyonunu azaltmaktadır. Bu özellikler, kahve posasını yeşil sentez yaklaşımları için uygun ve fonksiyonel bir biyomalzeme hâline getirmektedir (Chien et al., 2019).

1.3.2. Atık Biyomalzemelerin Geri Kazanımı

Atık biyomalzemelerin geri kazanımı, sürdürülebilirlik ve döngüsel ekonomi anlayışının temel bileşenlerinden biridir. Tarımsal ve gıda endüstrisi atıkları, uygun biyoteknolojik ve kimyasal işlemlerle yüksek katma değerli ürünlere dönüştürülebilmektedir. Bu yaklaşım hem çevresel yükün azaltılmasına hem de ekonomik açıdan verimli üretim süreçlerinin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır (Echave et al., 2023).

Kahve posasının nanopartikül sentezinde kullanılması, atık yönetimi açısından çevre dostu bir çözüm sunarken, toksik kimyasalların kullanımını azaltarak yeşil kimya prensipleriyle uyumlu bir üretim süreci oluşturmaktadır. Ayrıca, biyolojik atıkların bu şekilde değerlendirilmesi; yenilenebilir kaynak kullanımını teşvik etmekte ve sürdürülebilir biyoteknolojik uygulamaların yaygınlaşmasına olanak tanımaktadır (Yusufoğlu et al., 2024).

Bu bağlamda kahve posası gibi atık biyomalzemelerin nanoteknolojik uygulamalarda kullanılması, çevresel sürdürülebilirlik ile biyomedikal yenilikleri bir araya getiren stratejik bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır.

1.4. Gümüş

Gümüş (Ag), fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle tarih boyunca insanlık tarafından farklı amaçlarla kullanılmış, biyolojik sistemlerle etkileşimi en iyi bilinen metallerden biridir. Antik uygarlıklardan itibaren gümüş kapların su ve gıdaların muhafazasında tercih edilmesi, bu metalin mikroorganizmalar üzerindeki baskılayıcı etkisinin erken dönemlerde fark edildiğini göstermektedir (Antsiferova et al., 2022). Modern bilimsel çalışmalar, gümüşün biyolojik aktivitesinin temel olarak gümüş iyonlarının (Ag^+) hücresel yapılarla etkileşimine dayandığını ortaya koymuştur; bu iyonlar hücre duvarı ve membran bütünlüğünü bozabilmekte, enzimatik proteinlerle bağlanarak metabolik süreçleri inhibe edebilmekte ve nükleik asit yapılarıyla etkileşime girerek hücre çoğalmasını sınırlandırabilmektedir (de Paiva Pinheiro et al., 2021). Bu özellikler, gümüşün özellikle antibakteriyel, antifungal ve antiviral uygulamalarda etkin bir ajan olarak kullanılmasına olanak sağlamıştır. Günümüzde gümüş; yara örtüleri, yanık tedavi materyalleri, ortopedik ve dental implantlar, kateterler ve diğer tıbbi cihazların yüzey kaplamalarında enfeksiyon riskini azaltmak amacıyla yaygın biçimde değerlendirilmektedir (Betts et al., 2021).

1.5. Gümüş Nanopartiküller (AgNP)

Nanoteknolojideki gelişmelerle birlikte gümüşün biyolojik uygulamaları yeni bir boyut kazanmış; gümüş nanopartiküller (AgNP'ler), yüksek yüzey alanı/hacim oranları sayesinde klasik gümüş formlarına kıyasla daha güçlü ve uzun süreli biyolojik etki gösterebilen yapılar olarak öne çıkmıştır. AgNP'lerin hücre membranıyla doğrudan etkileşime girebilmesi ve kontrollü iyon salınımı sağlayabilmesi, bu nanopartiküllerin ilaç taşıma sistemleri, doku mühendisliği uygulamaları ve biyosensör teknolojilerinde kullanılmasını mümkün kılmıştır (de Paiva Pinheiro et al., 2021).

AgNP'lerin biyolojik etkinliği, partikül boyutu ile doğrudan ilişkilidir. Daha küçük boyutlu AgNP'ler, birim kütlede daha geniş yüzey alanı sunarak Ag^+ salınım hızını artırmakta ve biyolojik hedeflerle daha etkin etkileşime girmektedir. Aynı zamanda yüzey yükü ve kaplama materyali, partikülün hücresel alımını, kararlılığını ve toksisite profilini belirleyen

kritik parametreler arasında yer almaktadır (Joudeh et al., 2022). UV-Vis spektroskopisi ile gözlemlenen yüzey plazmon rezonansı (SPR) piki, AgNP'lerin temel karakterizasyon yöntemi olup partikül boyutu ve dağılımı hakkında önemli bilgi sağlamaktadır. TEM, SEM ve dinamik ışık saçılımı (DLS) teknikleri ise morfolojik ve boyutsal analizde kullanılan tamamlayıcı yöntemlerdir.

Bununla birlikte, gümüş ve gümüş nanopartiküllerinin biyolojik etkilerinin doza, partikül boyutuna ve yüzey özelliklerine bağlı olarak değişkenlik gösterebildiği; yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etkilere yol açabileceği bilinmektedir (Sati et al., 2025). Nöral hücreler üzerinde yapılan çalışmalar, AgNP'lerin konsantrasyona bağlı nörotoksik potansiyel taşıdığını ortaya koymakta; bu nedenle nöroprotektif amaca yönelik uygulamalarda doz optimizasyonu ve biyouyumlu taşıyıcı sistemlerin kullanımı büyük önem kazanmaktadır. Bu doğrultuda kitosan gibi biyopolimerlerle hibrit nanojel sistemleri oluşturulması, AgNP'lerin terapötik etkinliğini korurken hücresel toksisite riskinin minimize edilmesine imkân tanımaktadır (Shehabeldine et al., 2022).

1.6. Kitosan Bazlı Nanojel Sistemleri

Nanoteknoloji ve biyomalzeme alanındaki gelişmeler, biyolojik sistemlerle uyumlu, güvenli ve etkin taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesini mümkün kılmıştır (Drabczyk et al., 2024). Bu bağlamda doğal kökenli polimerler arasında yer alan kitosan, sahip olduğu biyolojik ve fizikokimyasal özellikler nedeniyle nanojel sistemlerinin geliştirilmesinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Kitosan bazlı nanojeller, özellikle biyomedikal uygulamalarda kontrollü salım, artmış hücresel etkileşim ve düşük toksisite gibi önemli avantajlar sunmaktadır (Iacob et al., 2021).

1.6.1. Kitosanın Yapısı ve Biyouyumluluğu

Kitosan, kitinin deasetilasyonu sonucu elde edilen, doğrusal yapıda ve pozitif yüklü bir doğal polisakkarittir. Yapısında bulunan serbest amino grupları, kitosana pH-duyarlı özellik kazandırmakta ve biyolojik sistemlerle güçlü etkileşimler kurmasını sağlamaktadır. Bu fonksiyonel gruplar sayesinde kitosan, çeşitli biyomoleküller ve nanopartiküllerle kolaylıkla kompleks oluşturabilmektedir (Shariatinia et al., 2019). Kitosanın en önemli

özelliklerinden biri biyouyumlu ve biyobozunur bir polimer olmasıdır. Vücut içerisinde toksik yan ürünler oluşturmadan enzimatik yollarla parçalanabilmesi, onu biyomedikal uygulamalar için güvenli bir materyal hâline getirmektedir. Ayrıca kitosanın düşük immünojenik özellik göstermesi, hücre kültürü ve doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilmesinin başlıca nedenleri arasında yer almaktadır (Saputra et al., 2025). Pozitif yüzey yükü sayesinde hücre membranlarıyla elektrostatik etkileşim kurabilen kitosan, hücresel alımın artırılmasına da katkı sağlamaktadır (Aibani et al., 2021). Bu özellikleri doğrultusunda kitosan; ilaç taşıyıcı sistemler, gen transferi, yara iyileşmesi ve doku mühendisliği gibi birçok biyomedikal uygulamada etkin bir şekilde kullanılmaktadır.

1.6.2. Nanojeller

Nanojeller, çapraz bağlı polimer ağlarından oluşan, nanometre ölçeğinde boyutlara sahip ve yüksek su tutma kapasitesi gösteren yapılardır. Bu özellikleri sayesinde hem hidrofilik hem de hidrofobik aktif maddelerin enkapsülasyonuna olanak tanımakta ve biyolojik ortamlarda stabil bir taşıyıcı sistem olarak görev yapmaktadır (Soni et al., 2016). Klasik nanopartikül ve mikropartikül sistemleriyle karşılaştırıldığında nanojeller, daha yumuşak ve esnek yapıları sayesinde biyolojik dokularla daha iyi uyum sağlamakta ve hücresel etkileşim açısından avantaj sunmaktadır (Soni et al., 2016). Nanojel sistemlerinin önemli üstünlüklerinden biri, aktif maddelerin kontrollü ve sürdürülebilir salımına imkân tanımasıdır. Yüksek şişme kapasitesi ve geniş yüzey alanı sayesinde nanojeller, taşıdıkları biyoaktif bileşenlerin biyoyararlanımını artırabilmekte ve salım kinetiğinin düzenlenmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca pH, iyonik güç ve sıcaklık gibi çevresel faktörlere duyarlı olarak tasarlanabilmeleri, hedefe yönelik ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesinde nanojelleri ön plana çıkarmaktadır (Jain et al., 2024).

Kitosan bazlı nanojeller, kitosanın biyouyumlu, biyobozunur ve düşük toksisiteye sahip bir polimer olması nedeniyle biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak tercih edilmektedir. Kitosanın yapısında bulunan protonlanabilir amino grupları, nanojel sistemlerine pH-duyarlı özellik kazandırarak özellikle asidik ortamlarda kontrollü salımı mümkün kılmaktadır. Bunun yanı sıra, kitosan bazlı nanojellerin pozitif yüzey yükü, hücre membranlarıyla elektrostatik etkileşim kurarak hücresel alımın artırılmasına katkı sağlamaktadır (Arpa et al., 2025).

1.7. Oksidatif Stres ve Nörodejeneratif Hastalıklar

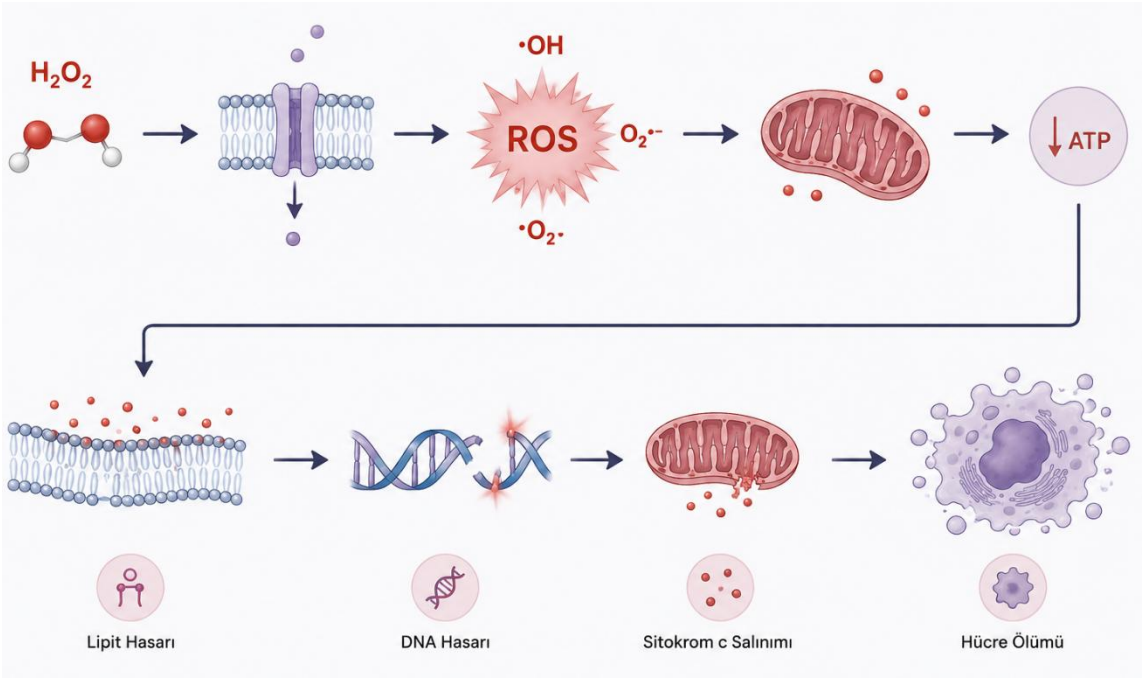
Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS) ile hücresel antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkan ve hücresel hasara yol açan temel bir biyokimyasal süreçtir. ROS; süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi yüksek reaktiviteye sahip molekülleri içerir ve normal fizyolojik koşullarda düşük düzeylerde üretilir. Bu düşük düzeydeki ROS, hücresel sinyal iletimi, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, metabolik homeostazın korunması ve hücresel adaptasyon süreçlerinde kritik bir rol oynar (Juan et al., 2021). Ancak ROS üretimi aşırıya çıktığında, lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı gibi geri dönüşsüz moleküler hasarlar ortaya çıkar. Lipit peroksidasyonu, özellikle hücre membranlarının bütünlüğünü bozarak membran geçirgenliğini ve sinyal iletimini etkiler. Protein oksidasyonu, enzimatik aktivitelerde azalmaya ve hücresel metabolizma bozukluklarına yol açabilir. DNA üzerindeki oksidatif hasar ise mutasyonlara, hücresel fonksiyon kaybına ve programlı hücre ölümüne (apoptoz) zemin hazırlar (Sikder et al., 2025). Sinir hücreleri, yüksek metabolik aktiviteleri ve oksijen tüketimleri nedeniyle ROS'a karşı doğal olarak yüksek maruziyet gösterir. Ayrıca beyin dokusu, yoğun poli-doymamış yağ asitleri içerdiği için lipit peroksidasyonuna karşı oldukça hassastır. Bu hücrelerin sınırlı rejenerasyon kapasiteleri, meydana gelen oksidatif hasarın onarımını güçleştirir ve nöronal işlevlerin bozulmasına neden olabilir (Singh et al., 2019). Oksidatif stresin kronik bir biçimde devam etmesi, sinir hücrelerinde enerji metabolizmasının bozulmasına ve mitokondriyal disfonksiyonun artmasına yol açar (Singh et al., 2019). Yaşlanma ve bazı nörodejeneratif hastalıklar da bu süreci şiddetlendirir. Hücresel antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, oksidatif stres hücre ölümü ve dokusal hasarın başlıca nedenlerinden biri hâline gelir (Dayem et al., 2014).

1.7.1. Oksidatif Stres Mekanizmaları

Oksidatif stres mekanizmaları, süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$) gibi reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimiyle ilişkilidir. Bu reaktif türler, mitokondriyal solunum zinciri, inflamatuvar süreçler ve çevresel stres faktörleri sonucunda oluşabilmektedir (Özcan et al., 2015). Hücrelerde antioksidan savunma sistemi; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimatik

mekanizmalar ile glutatyon, askorbik asit ve tokoferoller gibi enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşmaktadır (Aslankoç vd., 2019).

Bu savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, ROS birikimi lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarı ile sonuçlanmaktadır. Hidrojen peroksit, hücre zarından kolaylıkla difüze olabilmesi ve daha reaktif türlere dönüşebilmesi nedeniyle *in vitro* oksidatif stres modellerinde yaygın olarak kullanılan bir ajandır. H_2O_2 ile indüklenen oksidatif stres, hücresel dejenerasyon mekanizmalarının kontrollü bir şekilde incelenmesine olanak sağlamaktadır (Başaran, 2024).



Şekil 1.1. H_2O_2'nin SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stres oluşturma mekanizmasının şematik gösterimi

1.7.2. Nörodejeneratif Hastalıklarda Oksidan/Antioksidan Denge

Nörodejeneratif hastalıkların patogenezinde oksidan ve antioksidan denge bozukluğu merkezi bir rol oynamaktadır. Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıkları gibi nörodejeneratif bozukluklarda, artmış oksidatif stresin nöronal hasarı hızlandırdığı ve hücre ölüm mekanizmalarını tetiklediği gösterilmiştir. Protein agregasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve nöroinflamasyon gibi süreçler, oksidatif stres ile doğrudan ilişkilidir (Olufunmilayo et al., 2023).

1.7.2.1. Oksidatif Stres ve Alzheimer

Alzheimer hastalığı (AH), yaşa bağlı ilerleyici bir nörodejeneratif bozukluk olup bilişsel işlev kaybı ve hafıza bozulması ile karakterizedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, AH patogenezinde oksidatif stresin merkezi bir rol oynadığını göstermektedir. Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROS) ile hücresel antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkar. Bu dengesizlik, lipitler, proteinler ve DNA üzerinde geri dönüşsüz moleküler hasarlara yol açar (Olufunmilayo et al., 2023). Beyin dokusu, yüksek oksijen tüketimi ve yoğun poli-doymamış yağ asidi içeriği nedeniyle ROS'a karşı özellikle hassastır. Nöronal membranlarda lipit peroksidasyonu, hücre bütünlüğünün bozulmasına ve sinyal iletiminde aksamalara neden olur. Mitokondriyal disfonksiyon, enerji metabolizmasının bozulması ve ROS üretiminin artması, oksidatif stresi daha da şiddetlendirir (Kocacenk vd., 2016). Protein agregasyonu ve nöroinflamasyon gibi patolojik süreçler, oksidatif stres ile doğrudan ilişkilidir ve AH'nın ilerlemesini hızlandırır. Hücresel antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği, nöronal ölüm ve bilişsel işlev kaybının başlıca nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle AH patogenezinde oksidatif stresin mekanizmalarının anlaşılması, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşır. Antioksidan yaklaşımlar ve ROS seviyelerinin düzenlenmesi, Alzheimer hastalığında nöroproteksiyonun sağlanmasında umut vaat etmektedir (Teleanu et al., 2022).

1.7.2.2. Oksidatif Stres ve Parkinson

Parkinson hastalığı, ilerleyici seyirli ve nörodejeneratif özellik gösteren bir hastalık olup temel olarak substantia nigra pars compacta bölgesindeki dopaminerjik nöron kaybı ile karakterizedir. Hastalığın patogenezinde oksidatif stresin merkezi bir rol oynadığına dair güçlü bilimsel kanıtlar bulunmaktadır (Blesa et al., 2015). Beynin yüksek oksijen tüketimi ve sınırlı antioksidan savunma kapasitesi, nöral dokuyu oksidatif hasara karşı hassas hâle getirmektedir. Dopamin metabolizması sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen türleri, Parkinson hastalığında artmış oksidatif yükün önemli kaynaklarından biridir. Substantia nigra bölgesinde görülen demir birikimi, serbest radikal oluşumunu hızlandırarak oksidatif stresi daha da artırmaktadır (Chang et al., 2020). Mitokondriyal solunum zincirindeki bozukluklar, hücresel enerji üretimini azaltırken reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimine

yol açmaktadır. Artan oksidatif stres, lipit peroksidasyonu yoluyla hücre zarının bütünlüğünü bozmaktadır. Aynı zamanda proteinlerin oksidatif modifikasyonu, enzim aktivitelerinde ve hücresel sinyal yollarında ciddi işlev kayıplarına neden olmaktadır. DNA ve mitokondriyal DNA hasarı, nöronların onarım kapasitesini aşarak hücre ölüm süreçlerini tetiklemektedir (Exner et al., 2012). Oksidatif stres, apoptotik ve nekrotik hücre ölüm mekanizmalarının aktivasyonunda önemli bir faktör olarak görev yapmaktadır. Bununla birlikte oksidatif hasar, alfa-sinüklein agregasyonunu artırarak Lewy cisimciklerinin oluşumuna katkı sağlamaktadır (Erekat et al., 2018). Mikroglial hücrelerin aktivasyonu ile gelişen nöroinflamasyon, oksidatif stresle birlikte dopaminerjik nöron kaybını hızlandırmaktadır. Bu süreçler birbirini besleyen patolojik bir döngü oluşturarak hastalığın ilerlemesini kolaylaştırmaktadır. Antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği, nöronların serbest radikal hasarına karşı korunmasını zorlaştırmaktadır. Bu nedenle oksidatif stresin Parkinson hastalığındaki rolünün detaylı olarak incelenmesi, hastalığın moleküler mekanizmalarının anlaşılması ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (He et al., 2020).

1.7.2.3. Oksidatif Stres ve Huntington

Huntington hastalığı, kalıtsal geçiş gösteren, ilerleyici ve ölümcül seyirli bir nörodejeneratif hastalık olup motor, bilişsel ve psikiyatrik bozukluklarla karakterizedir. Hastalık, huntingtin geninde meydana gelen CAG trinükleotid tekrar artışı sonucunda oluşan mutant huntingtin proteininin nöronal işlevleri bozmasıyla ortaya çıkmaktadır (Reiner et al., 2011). Nörodejeneratif hastalıkların büyük bir kısmında olduğu gibi Huntington hastalığının patogenezinde de oksidatif stres önemli bir rol oynamaktadır. Beyin dokusunun yüksek oksijen tüketimi ve sınırlı antioksidan savunma kapasitesi, nöronları oksidatif hasara karşı duyarlı hâle getirmektedir. Huntington hastalığında artmış reaktif oksijen ve azot türleri, hücresel redoks dengesinin bozulmasına neden olmaktadır (D'Egidio et al., 2023). Mutant huntingtin proteini, mitokondriyal fonksiyonları olumsuz etkileyerek enerji metabolizmasında aksamalara yol açmaktadır. Mitokondriyal solunum zincirindeki bozukluklar, ATP üretiminin azalmasına ve serbest radikal oluşumunun artmasına neden olmaktadır. Artan oksidatif stres, lipit peroksidasyonu yoluyla hücre zarının bütünlüğünü bozarak nöronal hasarı derinleştirmektedir. Aynı zamanda proteinlerin oksidatif modifikasyonu, hücresel sinyal iletimini ve enzim aktivitelerini olumsuz

etkilemektedir. DNA ve mitokondriyal DNA'da meydana gelen oksidatif hasar, nöronların onarım kapasitesini aşarak hücre ölüm süreçlerini tetiklemektedir (Joshi et al., 2025). Oksidatif stres, apoptotik ve nekrotik hücre ölüm mekanizmalarının aktivasyonunda önemli bir faktör olarak görev yapmaktadır. Striatum bölgesindeki nöronların oksidatif hasara karşı daha hassas olması, Huntington hastalığına özgü nöronal kaybın temel nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Jiménez-Jiménez et al., 2025). Ayrıca oksidatif stresin nöro inflamasyon süreçleriyle etkileşimi, nöronal dejenerasyonu hızlandıran patolojik bir döngü oluşturmaktadır. Antioksidan savunma sistemlerinin yetersizliği, mutant huntingtin proteininin toksik etkilerini daha da belirgin hâle getirmektedir. Bu nedenle oksidatif stresin Huntington hastalığındaki rolünün ayrıntılı olarak incelenmesi, hastalığın moleküler mekanizmalarının anlaşılması ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır (D'Egidio et al., 2025).

1.8. SH-SY5Y Hücre Hattı ve H_2O_2 ile Oksidatif Stres Modeli

Nörodejeneratif hastalıkların hücresel ve moleküler mekanizmalarının anlaşılabilmesi için güvenilir ve tekrarlanabilir *in vitro* modellere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla kullanılan hücre hatları arasında insan kökenli nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y, sinir sistemi hastalıklarının araştırılmasında en yaygın tercih edilen modellerden biridir. SH-SY5Y hücreleri, nöronal farklılaşma kapasitesi ve oksidatif strese duyarlılığı sayesinde nörodejeneratif süreçlerin incelenmesine olanak sağlamaktadır (Zhang et al., 2025).

1.8.1. H_2O_2 ile Hücresel Dejenerasyonun Modellenmesi

Hidrojen peroksit (H_2O_2), hücre zarından kolaylıkla difüze olabilen ve hücre içerisinde daha reaktif oksijen türlerine dönüşebilen bir oksidan ajandır. Bu özelliği nedeniyle H_2O_2 ile indüklenen oksidatif stres modelleri, hücresel dejenerasyonun *in vitro* koşullarda kontrollü bir şekilde oluşturulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. H_2O_2 uygulaması, hücrelerde lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu, DNA hasarı ve mitokondriyal fonksiyon bozukluklarına yol açarak nörodejeneratif süreçleri taklit etmektedir (Clementi et al., 2019).

SH-SY5Y hücre hattında H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif stres modeli, oksidan/antioksidan dengenin bozulmasını ve buna bağlı hücresel hasarı değerlendirmek açısından oldukça etkilidir. Bu model, antioksidan kapasiteye sahip bileşiklerin ve nanoteknolojik sistemlerin hücre koruyucu etkilerinin araştırılmasına olanak sağlamaktadır. H_2O_2 konsantrasyonu ve maruziyet süresi, hücresel yanıtın şiddetini belirleyen temel parametreler olup deneysel tasarımda dikkatle optimize edilmektedir (Clementi et al., 2019).

1.9. Çalışmanın Amacı

Nanoteknoloji alanında son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, biyolojik kaynaklar kullanılarak sentezlenen metal nanopartiküllerinin biyouyumluluklarının artırılabileceğini ve çevre dostu üretim yaklaşımlarının geliştirilebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, yeşil sentezde kullanılan bitkisel ve biyolojik kaynakların önemli bir bölümü doğrudan doğal bitki materyallerinden elde edilmekte olup, tarımsal ve gıda endüstrisi atıklarının yüksek katma değerli nanomalzemelerin üretiminde değerlendirilmesine yönelik çalışmalar halen sınırlı sayıdadır. Bu kapsamda kahve posası (KP), içerdiği klorojenik asit, kinik asit ve diğer fenolik bileşikler sayesinde metal iyonlarını indirgeme ve sentezlenen nanopartikülleri stabilize edebilme potansiyeline sahip sürdürülebilir bir biyokütle kaynağı olarak dikkat çekmektedir. Aynı zamanda kahve posasının değerlendirilmesi, organik atık miktarının azaltılması ve döngüsel ekonomi yaklaşımının desteklenmesi açısından da önemli bir çevresel avantaj sağlamaktadır.

Gümüş nanopartikülleri (AgNP'ler), yüksek yüzey alanı/hacim oranı, güçlü biyolojik aktivitesi ve antimikrobiyal, antioksidan ile terapötik özellikleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda en yaygın kullanılan metal nanopartiküller arasında yer almaktadır. Bununla birlikte, çıplak AgNP'lerin biyolojik ortamlarda agregasyona uğrayabilmesi, kontrolsüz iyon salınımı göstermesi ve yüksek dozlarda sitotoksisite oluşturabilmesi önemli sınırlılıklar arasında bulunmaktadır. Bu nedenle son yıllarda AgNP'lerin biyouyumlu polimerlerle birleştirilerek daha güvenli ve kontrollü taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda doğal, biyobozunur ve biyouyumlu bir polisakkarit olan kitosan, nanojel sistemlerinin hazırlanmasında yaygın olarak tercih edilmektedir. Kitosan bazlı

nanojeller, yüksek su tutma kapasiteleri, kontrollü salım özellikleri, pozitif yüzey yükleri sayesinde hücrelerle etkin etkileşim kurabilmeleri ve nanopartiküllerin stabilitesini artırmaları nedeniyle biyomedikal uygulamalarda önemli avantajlar sağlamaktadır. AgNP'lerin kitosan nanojel sistemi içerisine yüklenmesiyle hem nanopartiküllerin fizikokimyasal kararlılığının artırılması hem de biyolojik etkinliklerinin kontrollü şekilde ortaya konulması hedeflenmektedir.

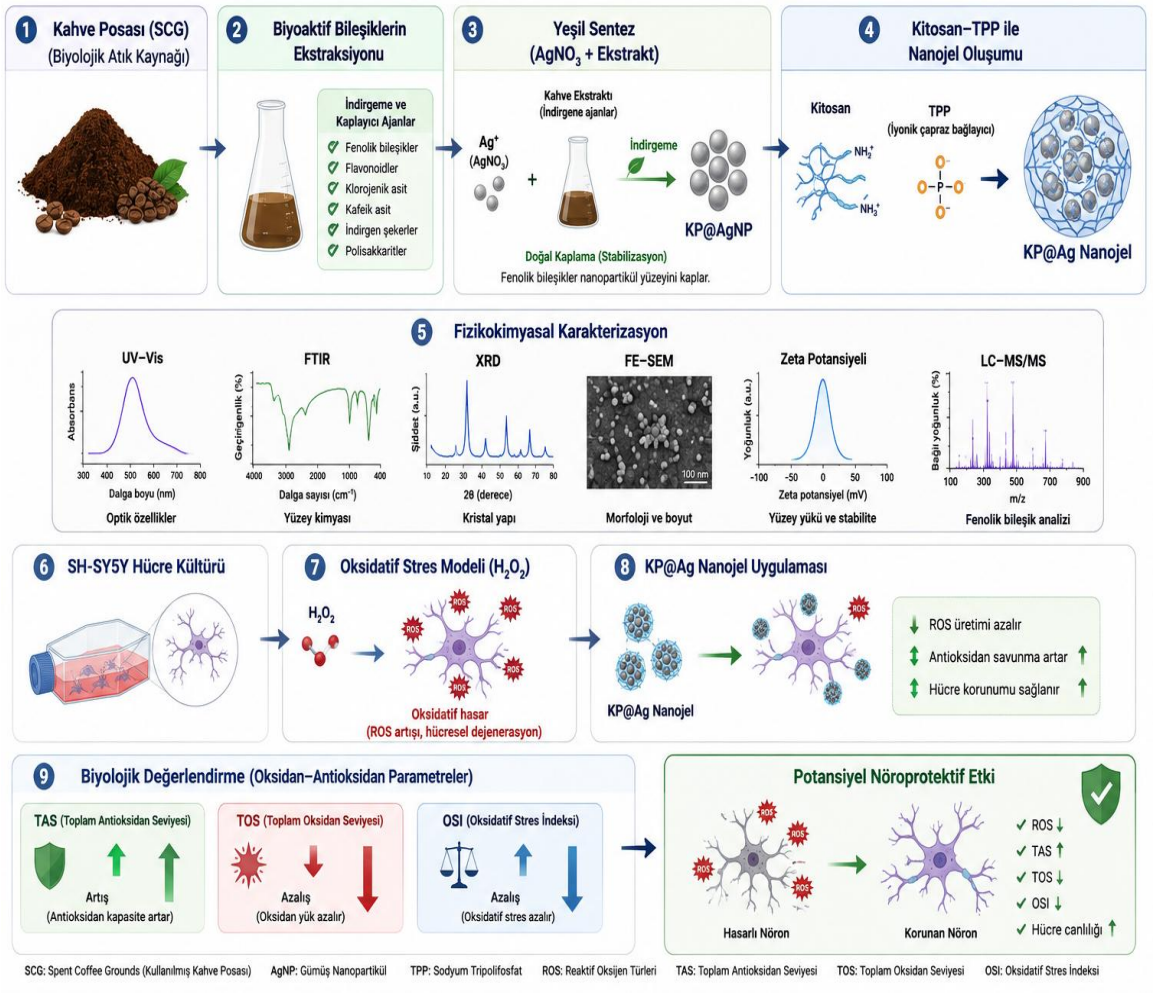
Çalışmada biyolojik değerlendirme modeli olarak SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı tercih edilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, nöronal özellik göstermeleri, oksidatif strese duyarlı olmaları ve nörodejeneratif hastalıkların moleküler mekanizmalarının araştırılmasında yaygın olarak kullanılmaları nedeniyle *in vitro* nöroprotektif çalışmalar için güvenilir deney modellerinden biri olarak kabul edilmektedir. Hücresel oksidatif stres modeli oluşturmak amacıyla hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılmıştır. H_2O_2, hücre zarını kolaylıkla geçebilmesi, hücre içerisinde reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırması ve kontrollü biçimde oksidatif hasar oluşturabilmesi nedeniyle nörodejeneratif hastalık modellerinde en yaygın kullanılan oksidan ajanlardan biridir.

Mevcut literatür incelendiğinde kahve posası kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerine ilişkin çalışmalar bulunmasına rağmen, bu nanopartiküllerin kitosan bazlı nanojel sistemi içerisine yüklenerek H_2O_2 ile oluşturulan SH-SY5Y oksidatif stres modelinde oksidan ve antioksidan parametreler açısından birlikte değerlendirildiği çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Bu durum, geliştirilen sistemin hem sürdürülebilir nanoteknoloji hem de biyomedikal uygulamalar açısından özgün bir yaklaşım sunduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasının temel amacı; kahve posası ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle gümüş nanopartiküllerinin sentezlenmesi, sentezlenen nanopartiküllerin kitosan bazlı nanojel sistemine yüklenerek karakterize edilmesi ve geliştirilen nanojel formülasyonunun H_2O_2 ile oksidatif stres oluşturulmuş SH-SY5Y hücre hattında hücre canlılığı ile toplam oksidan ve toplam antioksidan seviyeleri üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, kahve posası ekstraktında bulunan fenolik bileşiklerin gümüş iyonlarını indirgeme ve kararlı AgNP sentezini gerçekleştirebileceği, sentezlenen nanopartiküllerin kitosan bazlı nanojel sistemi içerisine başarılı şekilde

yüklenebileceği, geliştirilen nanojel formülasyonunun yüksek konsantrasyonlarda AgNP'ler ile larşılaştırmalı oalrak oksidatif stres koşullarında antioksidan savunmayı destekleyerek toplam oksidan seviyesini azaltacağı ve SH-SY5Y hücrelerinde hücre canlılığının korunmasına katkı sağlayacağı öngörülmüştür.

Böylece hem sürdürülebilir bir biyokütle kaynağının yüksek katma değerli bir nanobiyomalzemeye dönüştürülmesi hem de geliştirilen nanojel sisteminin oksidatif strese karşı potansiyel biyolojik etkinliğinin ortaya konulması hedeflenmiştir.



Şekil 1.2. Çalışmanın Genel İş Akış Şeması

Çalışmanın hipotezi şu şekilde kurgulanmıştır: Kahve posasından yeşil sentez yöntemiyle hazırlanan KP@AgNP'nin kitosan nanojel sistemiyle birleştirilmesi, H_2O_2 ile indüklenmiş

oksidatif stres koşullarında SH-SY5Y hücrelerinde oksidan düzeyleri düşürürken antioksidan kapasiteyi artırarak nöroprotektif etki gösterecektir.

Çalışmanın özgün yönü, çevresel bir atık olan kahve posasının hem nanopartikül sentezinde aktif rol alması hem de elde edilen nanoyapının nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili oksidatif stres modelinde değerlendirilmesidir. Bu yönüyle tez; sürdürülebilirlik ve yeşil kimya ilkelerini biyomedikal nanoteknoloji ile birleştirerek literatüre çevre dostu ve biyouyumlu yeni bir yaklaşım sunmakta, aynı zamanda nörodejeneratif hastalıklarda potansiyel antioksidan ve nöroprotektif uygulamalara yönelik bilimsel ve uygulamalı katkı sağlamayı hedeflemektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Dayem ve arkadaşları (2014) tarafından yürütülen çalışmada, gümüş nanopartiküllerin (AgNP) SH-SY5Y hücrelerinde nöronal farklılaşma üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Biyolojik yollarla elde edilen bu nanopartiküllerin hücrelere uygulanması sonucunda, hücre yapısında belirgin değişiklikler meydana geldiği ve özellikle nörit uzamasında dikkate değer bir artış olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin arttığı; ERK ve AKT gibi sinyal iletiminde görevli kinazların daha aktif hale geldiği belirlenmiştir. Ayrıca Map-2, β-tubulin III, sinaptofizin, nörogenin-1, Gap-43 ve Drd-2 gibi nöronal farklılaşma ile ilişkili proteinlerin ekspresyon düzeylerinde de yükselme saptanmıştır. Tüm bu bulgular, AgNP'lerin hücre içi sinyal mekanizmalarını etkileyerek nöronal farklılaşmayı desteklediğini ve bu yönüyle kök hücre temelli uygulamalar açısından dikkate değer bir potansiyele sahip olabileceğini göstermektedir.

Youssif ve arkadaşlarının (2019) gerçekleştirdiği araştırmada, *Lampranthus coccineus* ve *Malephora lutea* bitkilerinin sulu ekstraktları kullanılarak gümüş nanopartiküller sentezlenmiştir. Çalışmada, $AlCl_3$ ile Alzheimer modeli oluşturulmuş sıçanlarda bu nanogümüş yapılarının antioksidan kapasitesi ve nöroprotektif etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, söz konusu nanopartiküllerin kan-beyin bariyerini aşabildiğini ve asetilkolinesteraz düzeylerinde artışa yol açtığını ortaya koymuştur. Ayrıca, nano gümüş içeren sulu ekstraktların oksidatif stresin olumsuz etkilerini azalttığı ve bu yönüyle Alzheimer hastalığının tedavisine yönelik potansiyel bir yaklaşım sunabileceği ifade edilmiştir (Youssif et al.,2019).

Yukarıda özetlenen çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde, gümüş nanopartiküllerinin biyolojik etkilerinin büyük ölçüde sentez yöntemine, yüzey modifikasyonuna, partikül boyutuna ve uygulanan doza bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Özellikle biyolojik veya yeşil sentez yöntemleriyle elde edilen AgNP'lerin klasik kimyasal sentez yöntemlerine kıyasla daha yüksek biyouyumluluk gösterebildiği bildirilirken, SH-SY5Y hücre hattında gerçekleştirilen çalışmaların önemli bir kısmının nanopartiküllerin nörotoksik etkilerini araştırmaya odaklandığı dikkat çekmektedir. Buna karşın yeşil sentezlenmiş AgNP'lerin

oksidatif stres altında olası nöroprotektif etkilerini inceleyen çalışmaların sınırlı sayıda olduğu görülmektedir.

Dahran ve arkadaşları (2025), referans antitümör ilaç olarak florourasil (5-FU) kullanarak gerçekleştirdikleri bir çalışmada, kafeinle konjuge edilmiş gümüş nanopartiküllerin (Caf-AgNP'ler) MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerindeki antikanser etkinliğini değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda, kafeinin AgNP'ler üzerine stratejik konjugasyonunun, meme kanseri hücre hatlarına karşı terapötik etkinliği belirgin şekilde artırdığı ve aynı zamanda normal fare karaciğeri (NBL) hücrelerinde sitotoksisiteyi azalttığı gösterilmiştir. Caf-AgNP'lerin MDA-MB-231 hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS), malondialdehit (MDA), COX-2, IL-1β ve TNF-α düzeylerini anlamlı düzeyde artırdığı; bu artışa glutatyon (GSH) seviyelerinde belirgin bir azalma eşlik ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca, sitozolik sitokrom c, kaspaz-3 ve Bax protein düzeylerindeki artış ile Bcl-2 ekspresyonu ve Bcl-2/Bax oranındaki azalma, Caf-AgNP'lerin bu hücrelerde güçlü pro-apoptotik etki gösterdiğini ortaya koymuştur (Dahran et al., 2025).

Leyva-López ve arkadaşları (2021), *C. viridis* beyin hücrelerinde H_2O_2'nin neden olduğu oksidatif strese karşı kullanılmış kahve telvesinden (spent coffee grounds, SCG) elde edilen polifenolik özütlerin koruyucu etkisini araştırmayı amaçlamıştır. Çalışmada, kahve posasından elde edilen hidrofilik özütlerin kinik, ferulik ve kafeik asitler açısından zengin olduğu belirlenmiş ve bu özütlerin DPPH, ORAC ve FRAP analizleri ile yüksek antioksidan kapasite sergilediği gösterilmiştir. Ayrıca, *C. viridis* beyin hücrelerinin 100 µM H_2O_2 ile 1 saatlik maruziyetinden önce 24 saat boyunca SCG'den elde edilen polifenolik özütlerle (230 ve 460 µg/mL) ön işleme tabi tutulmasının, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzim aktivitelerini anlamlı düzeyde artırdığı ve lipid peroksidasyonunu (MDA seviyeleri ile ölçülen) belirgin şekilde azalttığı rapor edilmiştir. Bu bulgular, SCG özütlerinde bulunan polifenollerin SOD ve CAT aktivitesini uyararak C. viridis beyin hücrelerinde oksidatif strese karşı önemli bir antioksidan koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (Leyva-López et al., 2021).

Angeloni ve ark. (2021) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, kahve posası ekstraktlarının (spent coffee grounds, SCG) nörodejeneratif hastalıklarda görülen oksidatif stres ve nöroinflamasyon üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde

edilen kahve posası ekstraktlarının fenolik bileşenler bakımından zengin olduğu ve başlıca biyoaktif bileşiklerin kafein ile 5-O-kafeoilkinik asit (klorojenik asit) olduğu belirlenmiştir. SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif stres modelinde özellikle metanol ekstraktının hücreleri oksidatif hasara karşı anlamlı düzeyde koruduğu gösterilmiştir. Bu koruyucu etkinin, heme oksijenaz-1 (HO-1), NAD(P)H kinon oksidoredüktaz-1 (NQO1), tiyoredoksin redüktaz ve glutatyon redüktaz gibi endojen antioksidan enzimlerin ekspresyonunu artırmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca ekstraktların nöroinflamasyonu baskılayarak nöronal hasarı azalttığı ve kahve posasının nörodejeneratif hastalıklara yönelik doğal bir biyoaktif kaynak olabileceği sonucuna varılmıştır. (Iriondo-DeHond et al., 2021).

Yang ve ark. (2024) tarafından hazırlanan bu derleme çalışmasında, gümüş nanopartiküllerinin (AgNP) sinir sistemi üzerindeki nörotoksik etkileri moleküler mekanizmalar açısından kapsamlı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada AgNP'lerin kan-beyin bariyerini aşarak nöronlarda reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini artırdığı, mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna yol açtığı ve oksidatif stresi tetiklediği bildirilmiştir. Bunun sonucunda inflamasyon, apoptoz ve otofaji düzensizliği gibi süreçlerin aktive olduğu; özellikle Nrf2, NF-κB, MAPK ve kalsiyum sinyal yolaklarının bu mekanizmalarda önemli rol oynadığı vurgulanmıştır. Ayrıca nanopartiküllerin boyutu, yüzey özellikleri, dozu ve maruziyet süresinin biyolojik etkileri belirleyen temel faktörler olduğu belirtilmiştir. Derlemede, AgNP nörotoksisitesinin daha doğru değerlendirilmesi amacıyla 3B beyin organoidleri ve gelişmiş *in vitro* modeller gibi yeni deneysel yaklaşımların kullanılmasının gelecekteki araştırmalar için önemli olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışma, AgNP'lerin nörodejeneratif süreçlerde hem potansiyel risklerinin hem de güvenli kullanım koşullarının belirlenmesine yönelik önemli bilgiler sunmaktadır (Yang et al., 2024).

Park ve arkadaşları (2025) tarafından hazırlanan bu derleme çalışmasında, gümüş nanopartiküllerinin (AgNP) sinir sistemi üzerindeki nörotoksik etkileri ve bu etkilerin Adverse Outcome Pathway (AOP) yaklaşımı çerçevesinde nasıl geliştiği değerlendirilmiştir. Çalışmada, AgNP'lerin kan-beyin bariyerini geçebildiği, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak oksidatif strese ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca mikroglia aktivasyonu ve nöroinflamasyonun artmasıyla birlikte nöronal hasar, sinaptik fonksiyon kaybı ve hücre

ölümünün gelişebileceği belirtilmiştir. Derlemede, AgNP maruziyetinin özellikle dopaminerjik nöronlar üzerinde olumsuz etkiler oluşturabileceği ve bunun Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olabileceği vurgulanmıştır. Nanopartikül boyutu, yüzey kaplaması, doz ve maruziyet süresinin nörotoksisite üzerinde belirleyici faktörler olduğu ifade edilmiştir. Sonuç olarak çalışma, AgNP'lerin güvenli kullanım sınırlarının belirlenebilmesi için moleküler mekanizmaların daha ayrıntılı araştırılması gerektiğini ortaya koymuştur (Park et al., 2025).

Arancibia-Díaz ve arkadaşları (2026) tarafından yapılan çalışmada, fermente kahve posasından elde edilen fenolik fraksiyonların SH-SY5Y nöronal hücrelerinde nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Çalışmada fermente ekstraksiyon işleminin toplam fenolik madde miktarını önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir. Alzheimer ile ilişkili oksidatif stres modeli oluşturulan hücrelerde kahve posası fraksiyonlarının reaktif oksijen türlerini (ROS) yaklaşık %90 oranında azalttığı, süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini yeniden yükselttiği ve amiloid-β-40 ($A\beta_{40}$) düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir. Elde edilen bulgular, fermente kahve posasının güçlü antioksidan ve nöroprotektif özelliklere sahip olduğunu ve nörodejeneratif hastalıklara yönelik doğal bir biyomateryal olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymuştur (Arancibia-Díaz et al., 2026).

Genel olarak literatür incelendiğinde, yeşil sentez yöntemiyle elde edilen gümüş nanopartiküllerinin biyolojik etkilerinin; sentez yöntemi, partikül boyutu, yüzey özellikleri ve uygulama dozuna bağlı olarak değiştiği, özellikle oksidatif stres ve nörodejeneratif süreçlerde hem nöroprotektif hem de nörotoksik etkiler gösterebildiği bildirilmektedir (Dayem et al., 2014; Yang et al., 2024; Park et al., 2025). Benzer şekilde, kahve posasından elde edilen fenolik bileşiklerin güçlü antioksidan özellikleri sayesinde H_2O_2 ile oluşturulan hücresel oksidatif stres modellerinde reaktif oksijen türlerini azaltarak ve endojen antioksidan savunma sistemlerini aktive ederek nöroprotektif etki gösterdiği ortaya konmuştur (Leyva-López et al., 2021; Iriondo-DeHond et al., 2021; Arancibia-Díaz et al., 2026). Bununla birlikte, mevcut çalışmaların büyük çoğunluğu yeşil sentezlenmiş AgNP'ler ile kahve posası ekstraktlarını ayrı ayrı değerlendirmiş olup, kahve posası kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin kitosan bazlı nanojel sistemi içerisinde stabilize edilerek SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif stres modelindeki nöroprotektif etkinliğini inceleyen kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez

çalışması; sürdürülebilir bir biyokütle kaynağı olan kahve posasının yeşil sentezde değerlendirilmesi, sentezlenen AgNP'lerin kitosan nanojel sistemi ile biyouyumluluğunun artırılması ve geliştirilen formülasyonun hücresel nörodejenerasyon modeli üzerindeki antioksidan etkilerinin araştırılması yönleriyle literatürdeki bu önemli boşluğu doldurmayı amaçlamaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal ve Reaktifler

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Reaktifler

Kimyasal / Reaktif	**Firma**	**Ülke**
Gümüş nitrat ($AgNO_3$)	Merck	Almanya
Kitosan (Düşük molekül ağırlıklı)	Sigma-Aldrich	ABD
Sodyum Tripolifosfat (TPP)	Sigma-Aldrich	ABD
Hidrojen Peroksit (H_2O_2, %30)	Merck	Almanya
DMEM/F12 Besiyeri	Gibco	ABD
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	ABD
Penisilin-Streptomisin	Gibco	ABD
Tripsin-EDTA	Gibco	ABD
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	Gibco	ABD
WST Hücre Canlılık Kiti	Elabscience	Çin
Total Antioksidan Status (TAS) Kiti	Rel Assay Diagnostics	Türkiye
Total Oksidan Status (TOS) Kiti	Rel Assay Diagnostics	Türkiye
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich	ABD
Ultra saf su	Milli-Q (Merck Millipore)	Fransa

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Cihaz	**Model**	**Firma**	**Ülke**
UV-Vis Spektrofotometresi	UV-2600	Shimadzu	Japonya
FT-IR Spektrometresi	Spectrum Two	PerkinElmer	ABD
Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM)	Quanta 250 FEG	Thermo Fisher Scientific, Scios 2 DualBeam)	Finlandiya
Enerji Dağılımlı X-Işını (EDX)	X-MaxN	Oxford Instruments	İngiltere
Dinamik Işık Saçılımı (DLS)	Zetasizer Nano ZS	Malvern Panalytical	İngiltere
Zeta Potansiyel Analiz Cihazı	Zetasizer Nano ZS	Malvern Panalytical	İngiltere
LC-MS/MS Orbitrap	Q Exactive Orbitrap	Thermo Fisher Scientific	ABD
Mikroplaka Okuyucu	Multiskan GO	Thermo Fisher Scientific	Finlandiya
CO_2 İnkübatörü	Heracell VIOS 160i	Thermo Fisher Scientific	ABD
Biyogüvenlik Kabini (Class II)	SafeFAST Elite	Faster	İtalya
Santrifüj	5804 R	Eppendorf	Almanya

Tablo 3.2. (Devam) Çalışmada Kullanılan Cihazlar

pH Metre	SevenCompact S220	Mettler Toledo	İsviçre
Manyetik Karıştırıcı	C-MAG HS 7	IKA	Almanya
Hassas Terazi	Cubis II	Sartorius	Almanya

3.2. Yöntem

3.2.1. Kahve Posası (KP) Ekstraktının Hazırlanması

Bu çalışmada, ilimizde bulunan self-servis kahve işletmelerinden biri olan Cabro Loca (Bingöl)'dan demlenmiş filtre kahve atıkları temin edildi. Elde edilen kahve posasından 50 g alınarak 100 mL distile su (dH_2O) ile yıkandı ve yüzeyinde bulunan çözünür kalıntılar uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi sonrası kahve posası, 40 °C'de 24 saat etüvde kurutuldu.

Kurutma işleminin ardından 50 g kahve posası tartılarak üzerine 100 mL 100 °C distile su ilave edildi ve karışım 4 saat boyunca ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda maserasyona bırakıldı. Süre sonunda elde edilen ekstrakt, filtre kâğıdı yardımıyla süzüldü. Elde edilen kahve posası ekstraktı, içerik analizi ve ileri çalışmalar için −20 °C'de muhafaza edildi.

3.2.2. KP Ekstraktı Fenolik Bileşenlerinin LC-MS/MS Orbitrap Kütle Spektrometresi ile Analizi

Fenolik bileşikler, aromatik halka yapısına bağlı bir veya birden fazla hidroksil (–OH) grubu içeren organik moleküller olup, bitkisel materyallerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu bileşikler, gıdaların renk, tat ve aroma özelliklerinin oluşumunda etkili olmasının yanı sıra, sahip oldukları antioksidan özellikler sayesinde oksidatif strese karşı koruyucu etki göstermektedir. Bitkilerde sekonder metabolitler sınıfında yer alan fenolik bileşikler, çevresel stres koşullarına karşı savunma mekanizmalarında önemli rol oynamaktadır. UV radyasyonu, patojen mikroorganizmalar ve diğer zararlı etmenlere karşı koruyucu etki sağlarken, bitkilere özgü renk oluşumuna katkıda bulunarak polinasyon süreçlerini de desteklemektedir. Ayrıca bu bileşiklerin bitki gelişimi, fotosentez süreçleri ve hücresel düzenleme mekanizmalarında dolaylı etkileri olduğu bilinmektedir.

Kahve posası, fenolik bileşikler bakımından zengin bir biyokütle kaynağı olup, içerdiği biyoaktif bileşenler sayesinde dikkat çekici bir antioksidan kapasiteye sahiptir. Bu nedenle, kahve posası ekstraktının kimyasal içeriğinin detaylı olarak belirlenmesi, biyolojik aktivitesinin anlaşılması açısından önem taşımaktadır. Bu kapsamda, ekstrakt içerisindeki fenolik bileşiklerin tanımlanması ve karakterizasyonu amacıyla LC-MS/MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi) analizi gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. Sıvı Kromatografisi-Yüksek Çözünürlük Kütle Spektrometrisi Cihazı

LC-HRMS orbitrap analizleri, DIONEX UltiMate 3000 RS serisi pompa, otomatik numune alıcısı ve kolon fırını içeren sıvı kromatografisi sistemi ile yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (HRMS) birleşiminden oluşan LC-MS/MS platformu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sistem, ısıtmalı elektrosprey iyonizasyon (HESI) arayüzüne sahip Exactive Plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) yüksek çözünürlüklü kütle analizörü ile bütünleşmiş şekilde çalıştırılmıştır.

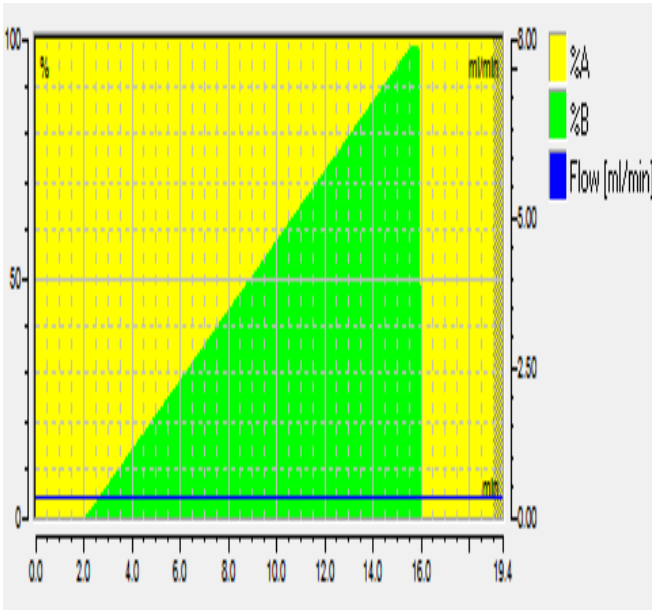
Cihazın kalibrasyonu, otomatik şırınga enjektörü (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak pozitif modda Pierce™ LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution ve negatif modda Pierce™ Negative Ion Calibration Solution çözeltileri ile yapılmıştır. Analiz sürecinde LC ve MS sistemleri eş zamanlı olarak TraceFinder 3.2 (Thermo Scientific) yazılımı ile kontrol edilmiş, elde edilen veriler ise Xcalibur yazılımı (v2.1.0.1140, Thermo Fisher Scientific) aracılığıyla toplanarak kaydedilmiştir.

3.2.2.2. Kromatografi ve Yüksek Çözünürlüklü MS Koşulları

Gerçekleştirilen analizler bir 3C18-EB 100 mm×2 mm UHPLC (COSMOSIL) kolon kullanıldı. Kolon fırın sıcaklığı 30 °C olarak çalıştırıldı. Elüsyon gradiyentinde hareketli A fazında Ultrapure su sistemi (GFL 2004/ Human power 1) ile elde edilen ultra saf su da hazırlanmış %0,5 (v/v) glasiyelasedik asit, hareketli B fazında %99,9 saflıkta LC-MS metanol (Sigma) kullanılmıştır.

Ayırım, numune enjeksiyon hacmi 20,0 µL ve 0,3 mL/dk akış hızında gradiyentelüsyon koşulları Şekil 3.1'de belirtilen durumlara göre gerçekleştirildi. Analiz süresi toplam 20 dakika olarak ayarlandı.

	Retention [min]	Flow [ml/min]	%B
1	0.000	0.300	0.0
2	0.000	0.300	0.0
3	2.000	0.300	0.0
4	15.500	0.300	98.0
5	15.900	0.300	98.0
6	16.000	0.300	0.0
7	19.000	0.300	0.0



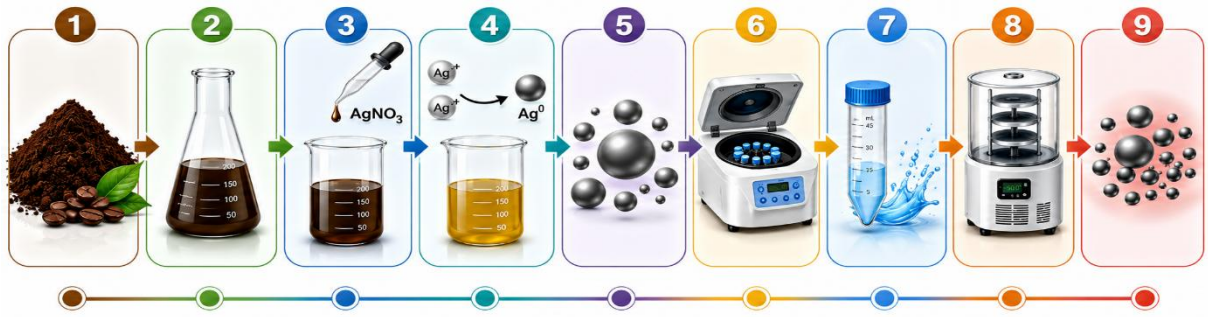
Şekil 3.1. Elüsyonda takip eden gradiyent koşulları

Isıtılmış bir elektrosprey iyonlaşma ara yüzü ile donatılmış Orbitrap HRMS hem pozitif (Full MS/AIF) hem de negatif (Full MS/AIF) modda çalıştırıldı. İyonlaştırma ara yüzü kılıf gaz (sheathgas) akış oranı 35; yardımcı gaz (auxiliarygas) akış oranı 7; sprey voltaj 3,5 kV; kapiler sıcaklığı 350 °C; yardımcı gaz (auxiliarygas) sıcaklığı 350 °C; S-lens RF seviyesi 50 olarak ayarlandı. MS tarama aralığı 60-800 m/z; resolution 17500; ACG target 3. 106; maksimum IT 2 ms; CE (çarpışma enerjisi, collisionenergy)/ step CE 25 V koşullarında gerçekleştirildi.

LC–Orbitrap HRMS analiz metoduna ait fitokimyasal bileşikler için standartların konsantrasyonu 10ppb - 20ppb - 40ppb - 60ppb - 80ppb - 100ppb - 200ppb - 400ppb - 600ppb - 800ppb - 1000ppb hazırlanarak her biri üç tekrarlı şekilde enjeksiyonu yapıldı. Sıvı örnek 10 mL şırınga yardımı ile gözenek büyüklüğü 0,22 mikrometre 25 mm çaplı PTFE şırınga filtreden süzülerek 15 mLfalkon tüpüne alındı. Bu çözeltiden 1,5 mL viale konularak vorteks ile iyice çalkalandı cihaza enjeksiyonu yapıldı.

3.3. KP Kaynaklı Gümüş Nanopartiküllerin (KP@AgNP) Sentezi

Kahve posası kaynaklı gümüş nanopartiküllerin sentezi için 10^{-3} M konsantrasyonda 90 mL $AgNO_3$ çözeltisi hazırlanarak üzerine 10 mL kahve posası ekstraktı yavaşça ilave edildi. Ardından, 20 mL NaOH çözeltisi damla damla eklenerek reaksiyon ortamı bazik hale getirildi. Elde edilen karışım, 40 °C'de 24 saat süreyle ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı.



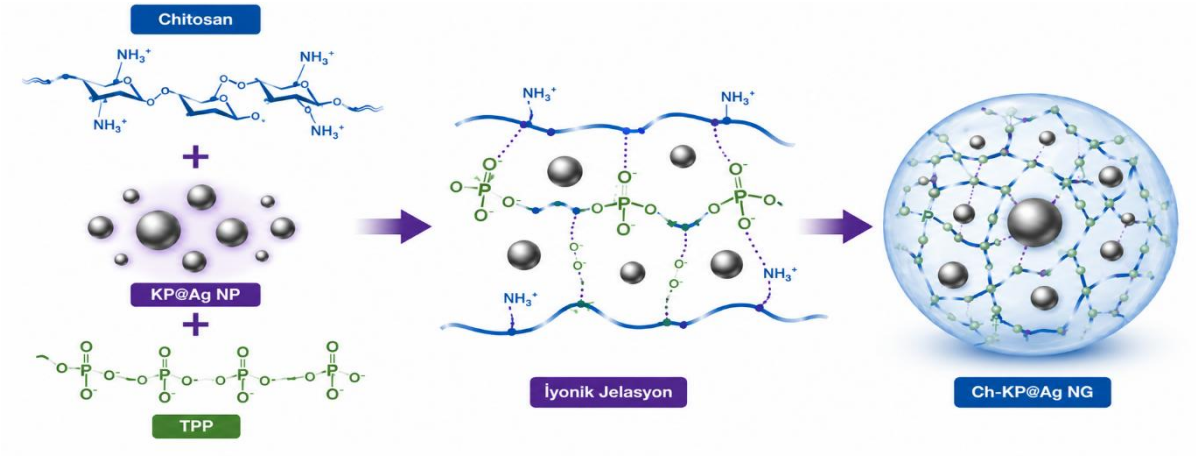
Şekil 3.2. KP ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle KP@AgNP üretim sürecinin şematik gösterimi

3.4. Nanopartikül Karakterizasyonu

Sentezlenen KP Gümüş nanopartikülün (KP@AgNP) Ultraviyole Görünür Işık Spektrofotometresi UV-VIS NIR (SHMADZU UV-3600) ile nanopartikülün biyosentezi doğrulandı., KP@AgNP oluşumu ve bu sentezde kahve ekstraktının rolü Fourier Dönüşüm Kızıl Ötesi Spektrofotometrisi FT-IR (Perkin Elmer Spectrum 100) ile belirlendi. Elde edilen nanopartikülün kristal yapısı X Işını Kırınım Spektrofotometrisi, XRD (RIGAKU ULTIMA IV) kullanılarak belirlendi, nanopartikülün şekil, boyut ve morfolojisi Taramalı Elektron Mikroskobu, FESEM (JEOL JSM 6510) ile belirlendi. Parçacıklar arasındaki itme çekme değeri Tane Büyüklüğü Ölçüm Cihazı, Zeta Sizer (Malvern Panalytical) ile belirlendi.

3.5. KP@AgNP'nin Nanojel Haline Getirilmesi

1 g kitosan %2 (v/v) asetik asit çözeltisi içerisinde (Sigma-Aldrich, ABD) çözündürülerek toplam hacmi 100 mL olacak şekilde %1 (w/v) konsantrasyonda stok kitosan çözeltisi hazırlandı. Aynı şekilde, 75 mg sodyum tripolifosfat (TPP) 100 mL deiyonize su (dH_2O) içerisinde çözündürülerek %0,075 (w/v) konsantrasyonda stok TPP çözeltisi elde edildi . Hazırlanan stok kitosan çözeltisinden seyreltilerek %0,05 (w/v) konsantrasyonda 50 mL kitosan çözeltisi hazırlandı. Elde edilen bu çözeltiye 30 mg kahve posasından elde edilen gümüş nanopartikülleri (KP@AgNP) ilave edilmiş ve nanopartiküllerin kitosan matrisi içerisinde homojen şekilde dağılması sağlandı. Nanojel oluşumu için, hazırlanan kitosan/KP@AgNP çözeltisine 10 mL TPP çözeltisi peristaltik pompa yardımıyla 1 mL/dk akış hızında damlatıldı. Damlatma işlemi tamamlandıktan sonra oluşan nanojel süspansiyonu 750 rpm'de 45 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Ardından süspansiyon, 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Elde edilen CS@KP@Ag nanojel örnekleri karakterizasyon için Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı'na gönderildi.



Şekil 3.3. Kitosan, TPP ve KP@AgNP kullanılarak iyonik jelasyon yöntemiyle CS@KP@Ag oluşumunun şematik gösterimi

3.6. Nanojelin Karakterizasyonu

Sentezlenen nanojelin biyosentezi, Ultraviyole–Görünür–Yakın Kızılötesi (UV–Vis–NIR) spektrofotometresi (Shimadzu UV-3600) kullanılarak değerlendirilmiştir. Nanojelin yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplar, Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektrofotometrisi (FT-IR) yöntemi ile (PerkinElmer Spectrum 100) belirlenmiştir.

Elde edilen nanopartiküllerin kristal yapısı, X-Işını Kırınımı (XRD) analizi kullanılarak (Rigaku Ultima IV) incelenmiştir. Nanopartiküllerin şekil, boyut ve morfolojik özellikleri, Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) (Thermo Fisher Scientific, Scios 2 DualBeam) ile belirlenmiştir. Parçacıklar arasındaki elektrostatik itme ve çekme kuvvetlerini yansıtan zeta potansiyeli ve tane boyutu dağılımı ise Zeta Sizer cihazı (Malvern Panalytical) kullanılarak ölçülmüştür.

3.7. Hücre Kültürü

Bu çalışmada, insan nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y hücreleri kullanılmıştır. SH-SY5Y hücre hattı, ilk kez 1973 yılında nöroblastomalı bir hastadan izole edilen SK-N-SH hücre hattından 1978 yılında klonlanarak elde edilmiştir. Morfolojik olarak nöronal hücre benzeri özellikler göstermesi nedeniyle, özellikle oksidatif stres ve nörodejeneratif hastalık modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Schneider et al.,2011).

Hücre kültürü çalışmaları, Moleküler Biyoloji ve Genetik Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri içerisinde; %10 fetal bovine serum (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin ilavesiyle hazırlanmış kültür ortamında çoğaltılmıştır. Hücreler, 37°C sıcaklıkta, %5 CO_2 ve %95 nem içeren karbondioksit inkübatöründe kültüre edilmiştir.

Kültür süreci boyunca hücreler invert mikroskop altında düzenli olarak gözlemlenmiş; morfolojileri ve çoğalma durumları değerlendirilmiştir. Hücreler %70–80 yoğunluk seviyesine ulaştığında pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Pasajlama öncesinde besiyeri ortamdan uzaklaştırılmış ve hücreler fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile yıkanmıştır. Ardından hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağlamak amacıyla flasklara %0,05 tripsin-

EDTA solüsyonu eklenmiş ve hücreler kısa süreli inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerin yüzeyden ayrılmasının ardından tripsin etkisi, besiyeri eklenerek inhibe edilmiştir.

Hücre süspansiyonu 15 mL'lik santrifüj tüplerine alınarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peleti taze besiyeri içerisinde homojen şekilde süspanse edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonu, deneysel çalışmalarda kullanılmak üzere uygun yoğunluklarda kültür kaplarına ekilmiştir.

3.7.1. SH-SY5Y Canlı Hücre Sayımı

Pasajlama işlemi sonrasında elde edilen hücre süspansiyonundan eşit hacimde örnek alınarak tripan mavisi boyası ile karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımdan 10 µL alınmış üzerine 10 µL Tripan mavisi boyası eklenmiş ve Thoma lamına aktarılarak mikroskob altında canlı hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Canlı hücreler boyasız, ölü hücreler ise mavi renkli olarak değerlendirilmiştir. Hücre yoğunluğu, standart hücre sayım yöntemlerine göre hesaplanmıştır.

3.7.2. WST-1 ile Hücre Canlılık Testi

Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla WST-1 sitotoksisite testi kullanılmıştır. Bu yöntem, canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin tetrazolyum tuzu olan WST-1'i formazan ürününe indirgemesi prensibine dayanmaktadır. Oluşan formazan miktarı, hücre canlılığı ile doğru orantılıdır. SH-SY5Y hücreleri 96 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin tutunabilmesi için 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından hücreler, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış KP@AgNP ve CS@KP@Ag nanojel ile muamele edilerek 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa 10 µL WST-1 reaktifi eklenmiş ve plaklar 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ölçümler, mikroplaka okuyucu cihazında 450 nm dalga boyunda, 600 nm referans dalga boyu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Hücre canlılık yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$(\%)\text{Canlılık} = (\text{Örnek Absorbansı} / \text{Kontrol Absorbansı}) \times 100 \quad (3.1)$$

3.7.3. H_2O_2 ile İn Vitro Nörodejenerasyon Modelinin Oluşturulması

SH-SY5Y nöroblastoma hücrelerinde oksidatif stres modelinin oluşturulması amacıyla hücreler sırasıyla 500, 400, 250, 200, 125, 100, 62,5 ve 50 µM H_2O_2 konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından WST hücre canlılık testi gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda GraphPad Prism programı kullanılarak yaklaşık %50 hücre canlılığına karşılık gelen H_2O_2 konsantrasyonu (IC_{50}) belirlenmiştir. Belirlenen IC_{50} değeri, sonraki deneylerde SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stres modelinin oluşturulması amacıyla uygulanmıştır.

3.7.4. *In Vitro* Nörodejenerasyona Karşı KP@AgNP ve CS@KP@Ag Nanojel Doz Aralıklarının Belirlenmesi

In vitro oksidatif stres modeli altında AgNP ve CS@KP@Ag'nin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, 96 kuyucuklu hücre kültürü plaklarına her bir kuyucukta 1×10^4 hücre/100 µL olacak şekilde ekilmiş ve yüzeye tutunmalarının sağlanması amacıyla 37 °C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin ardından hücre kültürü ortamı uzaklaştırılmış ve deneylerde kullanılacak AgNP ile CS@KP@Ag konsantrasyonları hazırlanmıştır. Bu amaçla 6 mg örnek tartılarak 1 mL tam besiyeri içerisinde çözündürülmüş ve 6 mg/mL stok çözelti hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiden tam besiyeri kullanılarak seri seyreltmeler hazırlanmış ve çalışma konsantrasyonları 0,19; 0,38; 0,75; 1,5; 3 ve 6 mg/mL olarak oluşturulmuştur.

SH-SY5Y hücreleri hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki KP@AgNP ve CS@KP@Ag ile muamele edilmiş ve hücreler 37 °C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda hücre canlılığı WST 1 hücre canlılık testi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda KP@AgNP ve CS@KP@Ag örneklerinin yaklaşık IC_{50} değerleri belirlenmiş ve sonraki hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak uygulama konsantrasyonları seçilmiştir.

3.7.5. Deney Grupları ve Uygulama Düzeni

H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif stres modelinde KP@AgNP ve CS@KP@Ag uygulamalarının hücre canlılığı, toplam antioksidan seviye ve toplam oksidan seviye üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla deney grupları oluşturulmuştur. Hücre kontrolü grubuna herhangi bir nanopartikül, nanojel veya H_2O_2 uygulaması yapılmamış; oksidatif stres kontrol grubuna ise yalnızca belirlenen H_2O_2 konsantrasyonu uygulanmıştır. KP@AgNP ve CS@KP@Ag formülasyonlarının tek başına oluşturabileceği etkilerin belirlenmesi amacıyla H_2O_2 içermeyen uygulama grupları da deney düzenine dâhil edilmiştir.

Koruyucu etkinin değerlendirilmesinde hücrelere önce KP@AgNP veya CS@KP@Ag, ardından H_2O_2 uygulanmıştır. Tedavi edici etkinin değerlendirilmesinde ise hücrelerde öncelikle H_2O_2 ile oksidatif stres oluşturulmuş, daha sonra KP@AgNP veya CS@KP@Ag uygulanmıştır. Deney grupları aynı deney içerisinde üç teknik tekrar hâlinde çalışılmıştır. Deneysel gruplar ve uygulama sıraları Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3. SH-SY5Y hücre hattında koruyucu ve tedavi edici etkinin değerlendirilmesi amacıyla oluşturulan deney grupları ile KP@AgNP, CS@KP@Ag ve H_2O_2 uygulama sıraları. Tüm deney grupları aynı deney içerisinde üç teknik tekrar halinde gerçekleştirilmiştir

Grup	**Uygulama**	**Uygulama sırası**	**Deneysel amaç**
Negatif Kontrol (Hücre Kontrolü)	SH-SY5Y hücreleri + tam besiyeri	Uygulama yapılmadı	Hücrelerin bazal canlılık, TAS ve TOS düzeylerinin belirlenmesi
Pozitif Kontrol	SH-SY5Y hücreleri + Referans antioksidan + H_2O_2	Önce referans antioksidan, ardından H_2O_2	Referans antioksidanın oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin belirlenmesi ve deneysel sistemin doğrulanması
H_2O_2 Kontrolü (Oksidatif Stres Kontrolü)	SH-SY5Y hücreleri + H_2O_2	Yalnızca H_2O_2	Oksidatif stres modelinin oluşturulması ve H_2O_2 kaynaklı hücresel hasarın belirlenmesi
KP@AgNP	SH-SY5Y hücreleri + KP@AgNP	Yalnızca KP@AgNP	KP@AgNP'nin tek başına hücreler üzerindeki etkisinin belirlenmesi
CS@KP@Ag Nanojel	SH-SY5Y hücreleri + CS@KP@Ag	Yalnızca CS@KP@Ag	Nanojel formülasyonunun tek başına hücreler üzerindeki etkisinin belirlenmesi
KP@AgNP + H_2O_2	SH-SY5Y hücreleri + KP@AgNP + H_2O_2	Önce KP@AgNP, ardından H_2O_2	KP@AgNP'nin oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin değerlendirilmesi
CS@KP@Ag + H_2O_2	SH-SY5Y hücreleri + CS@KP@Ag + H_2O_2	Önce CS@KP@Ag, ardından H_2O_2	Nanojel formülasyonunun oksidatif strese karşı koruyucu etkisinin değerlendirilmesi

Tablo 3.3. (Devam) SH-SY5Y hücre hattında koruyucu ve tedavi edici etkinin değerlendirilmesi amacıyla oluşturulan deney grupları ile KP@AgNP, CS@KP@Ag ve H_2O_2 uygulama sıraları. Tüm deney grupları aynı deney içerisinde üç teknik tekrar halinde gerçekleştirilmiştir

H_2O_2 + KP@AgNP	SH-SY5Y hücreleri + H_2O_2 + KP@AgNP	Önce H_2O_2, ardından KP@AgNP	KP@AgNP'nin oksidatif hasar sonrası iyileştirici etkisinin değerlendirilmesi
H_2O_2 + CS@KP@Ag Nanojel	SH-SY5Y hücreleri + H_2O_2 + CS@KP@Ag	Önce H_2O_2, ardından CS@KP@Ag	Nanojel formülasyonunun oksidatif hasar sonrası iyileştirici etkisinin değerlendirilmesi

3.8. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS)

KP@AgNP ve CS@KP@Ag uygulamalarının SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan oksidatif stres modeli üzerindeki toplam antioksidan kapasiteye etkisinin belirlenmesi amacıyla Rel Assay Diagnostics Toplam Antioksidan Seviye (TAS) kiti kullanılmıştır. TAS analizi, farklı uygulama sıralamalarının hücrelerin toplam antioksidan kapasitesi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Deneysel çalışmalarda iki farklı uygulama modeli oluşturulmuştur. İlk grupta SH-SY5Y hücrelerine belirlenen konsantrasyonlarda KP@AgNP veya CS@KP@Ag uygulanmış, ardından 400 µM H_2O_2 ilave edilerek oksidatif stres oluşturulmuştur (İlaç + H_2O_2 grubu). İkinci grupta ise hücrelere öncelikle 400 µM H_2O_2 uygulanarak oksidatif stres oluşturulmuş, daha sonra belirlenen konsantrasyonlarda KP@AgNP veya CS@KP@Ag uygulanmıştır (H_2O_2 + İlaç grubu). Tüm deney grupları 37 °C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin ardından hücre içeriğindeki antioksidan bileşenlerin hücre kültürü ortamına geçmesini sağlamak amacıyla hücrelere iki kez 30 dakika −20 °C ve ardından 30 dakika 37 °C olacak şekilde dondurma-çözündürme işlemi uygulanmıştır. Daha sonra hücre kültürü ortamı toplanarak mikro santrifüj tüplerine aktarılmış ve TAS analizinde numune olarak kullanılmıştır.

Analiz sırasında numuneler, 48 kuyucuklu mikroplakalara her kuyucuğa 10 µL olacak şekilde üç tekrarlı olarak yüklenmiştir. Aynı hacimlerde standart ve dH_2O kuyucukları hazırlanmıştır. Numunelerin üzerine 300 µL Reaktif 1 (R1) eklenmiş ve ilk absorbans değeri (A_1) 660 nm'de ölçülmüştür. Daha sonra her kuyucuğa 22,5 µL Reaktif 2 (R2) ilave

edilmiş, plaklar oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiş ve ikinci absorbans (A_2) değeri yine 660 nm'de kaydedilmiştir. Her örnek için $\Delta Abs = A_2 - A_1$ değeri hesaplanmış ve toplam antioksidan seviye aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{TAS (mmol Trolox Eq./L)} = \frac{\text{Abs}_{dH_2O} - \text{Abs}_{\text{Örnek}}}{\text{Abs}_{dH_2O} - \text{Abs}_{\text{Standart}}} \quad (3.2)$$

3.9. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS)

KP@AgNP ve CS@KP@Ag uygulamalarının SH-SY5Y hücrelerinde oluşturulan oksidatif stres modeli üzerindeki toplam oksidan seviyesine etkisinin belirlenmesi amacıyla Rel Assay Diagnostics Toplam Oksidan Seviye (TOS) Kiti kullanılmıştır. TOS analizi, farklı uygulama sıralamalarının hücrelerin toplam oksidan seviyesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Deneysel çalışmalarda iki farklı uygulama modeli oluşturulmuştur. İlk grupta SH-SY5Y hücrelerine belirlenen konsantrasyonlarda KP@AgNP veya CS@KP@Ag uygulanmış, ardından 400 µM H_2O_2 ilave edilerek oksidatif stres oluşturulmuştur (İlaç + H_2O_2 grubu). İkinci grupta ise hücrelere öncelikle 400 µM H_2O_2 uygulanarak oksidatif stres oluşturulmuş, daha sonra belirlenen konsantrasyonlarda KP@AgNP veya CS@KP@Ag uygulanmıştır (H_2O_2 + İlaç grubu). Tüm deney grupları 37 °C'de %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin ardından hücre içeriğindeki oksidan bileşenlerin hücre kültürü ortamına geçmesini sağlamak amacıyla hücrelere iki kez 30 dakika −20 °C ve ardından 30 dakika 37 °C olacak şekilde dondurma-çözündürme işlemi uygulanmıştır. Daha sonra hücre kültürü ortamı toplanarak mikro santrifüj tüplerine aktarılmış ve TOS analizinde numune olarak kullanılmıştır.

Analiz sırasında numuneler, 48 kuyucuklu mikroplakalara her kuyucuğa 45 µL olacak şekilde üç tekrarlı olarak yüklenmiştir. Pozitif kontrol olarak kit içerisinde bulunan standart çözelti, negatif kontrol olarak ise dH_2O kullanılmıştır. Numunelerin üzerine 300 µL Reaktif 1 (R1) eklenmiş ve ilk absorbans değeri (A_1) 530 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu ile ölçülmüştür. Daha sonra her kuyucuğa 7,5 µL Reaktif 2 (R2) ilave edilmiş, plaklar oda

sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiş ve ikinci absorbans (A_2) değeri tekrar 530 nm'de kaydedilmiştir. Her örnek için $\Delta Abs = A_2 - A_1$ değeri hesaplanmış ve toplam oksidan seviye aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir.

$$\text{TOS } (\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ Eq./L}) = (\text{AbsÖrnek} / \text{AbsStandart}) \times 10 \quad (3.3)$$

3.10. İstatistiksel Analiz

Bu çalışma kapsamında elde edilen tüm deneysel veriler üç bağımsız tekrar (n = 3) halinde gerçekleştirilmiş olup sonuçlar ortalama ± standart sapma (Mean ± SD) olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler GraphPad Prism version 11.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro–Wilk normal dağılım testi ile değerlendirilmiştir. Normal dağılım gösteren verilerde gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi amacıyla tek yönlü varyans analizi (Two-way ANOVA) uygulanmıştır. Çoklu grup karşılaştırmalarında Tukey's multiple comparisons test kullanılmıştır. Veriler ortalama ± standart sapma (Mean ± SD) olarak sunulmuştur. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 11.2.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Grafiklerde istatistiksel anlamlılık düzeyleri şu şekilde gösterilmiştir: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ ve **** $p < 0,0001$.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ekstraktının Fenolik Bileşenlerinin LC-MS/MS Orbitrap Kütle Spektrometresi ile Analizi

Kahve posası (spent coffee grounds, SCG), kavurma ve demleme işlemlerinden sonra dahi önemli miktarda fenolik bileşik içeren zengin bir biyokütle kaynağıdır. Bu fenolik bileşikler yüksek antioksidan kapasiteleri nedeniyle doğal antioksidan kaynağı olarak değerlendirilmekte ve son yıllarda LC-MS/MS, LC-QTOF-MS ve Orbitrap-MS gibi yüksek çözünürlüklü analitik tekniklerle ayrıntılı olarak karakterize edilmektedir (Mussatto et al., 2011; Ballesteros et al., 2014; Campos-Vega et al., 2015). Kahve posasında bulunan fenolik asitler ve flavonoidler, serbest radikallerin uzaklaştırılması, metal iyonlarının şelatlanması ve oksidatif stresin baskılanması gibi biyolojik aktivitelerden sorumlu temel bileşenler arasında yer almaktadır.

Bu çalışmada kahve posası ekstraktının fenolik bileşimi LC-MS/MS Orbitrap kütle spektrometresi kullanılarak analiz edilmiş ve taranan çok sayıdaki fenolik bileşik arasından yalnızca quinic acid, chlorogenic acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde (protocatechuic aldehyde) ve ellagic acid tespit edilmiştir (Tablo 4.1). Analiz sonucunda en yüksek konsantrasyona sahip bileşiğin Kinik asit (quinic acid (122,545 µg/g) olduğu belirlenmiştir. Bunu sırasıyla Ellajik Asit (ellagic acid 101,869 µg/g), Klorojenik asit (chlorogenic acid (83,355) µg/g) ve 3,4-dihydroxybenzaldehyde (35,743 µg/g) izlemiştir. Analiz edilen diğer fenolik bileşikler ise tespit edilememiştir (NF).

Kinik asit (Quinic acid), kahve çekirdeğinin doğal yapısında yüksek miktarda bulunan organik asitlerden biri olup özellikle klorojenik asitlerin hidrolizi sonucunda oluşabilmektedir. Kavurma derecesi, ekstraksiyon yöntemi ve demleme koşulları Kinik asit (quinic acid) miktarını önemli ölçüde etkilemektedir (Farah and Donangelo, 2006). Bu çalışmada Kinik Asit'in (quinic acid) en yüksek konsantrasyonda bulunması, kullanılan kahve posasının fenolik profilinin büyük ölçüde klorojenik asit türevlerinden kaynaklandığını göstermektedir.

Çalışmada üçüncü en yüksek konsantrasyonda belirlenen Klorojenik asit (chlorogenic acid), kahvenin en önemli fenolik antioksidanlarından biridir. Klorojenik asit; güçlü serbest radikal süpürücü aktivitesi, metal şelatlama kapasitesi ve lipid peroksidasyonunu baskılayıcı etkileri nedeniyle kahvenin biyolojik aktivitelerinden sorumlu başlıca bileşik olarak kabul edilmektedir (Clifford, 1999; Farah and Donangelo, 2006). Literatürde kahve posasında en baskın fenolik bileşiklerden biri olarak bildirilen Klorojenik asit'in bu çalışmada da yüksek miktarda bulunması önceki çalışmalarla uyumludur (Mussatto et al., 2011; Campos-Vega et al., 2015).

Analizde düşük konsantrasyonda belirlenen 3,4-dihydroxybenzaldehyde (protocatechuic aldehyde) ise lignin ve fenolik asit metabolizmasının ara ürünlerinden biri olup güçlü antioksidan özellik göstermektedir. Bu bileşiğin oksidatif stresin azaltılması ve hücre içi reaktif oksijen türlerinin baskılanmasına katkı sağlayabileceği bildirilmektedir (Heleno et al., 2015).

Çalışmada tespit edilen bir diğer fenolik bileşik olan ellagic acid, güçlü antioksidan, antienflamatuvar ve antikanser özellikleriyle bilinen doğal bir polifenoldür. Ellajik asid'in hidroksil grupları sayesinde serbest radikalleri etkili şekilde uzaklaştırabildiği ve hücresel oksidatif hasarı azaltabildiği bildirilmektedir (Larrosa et al., 2006). Konsantrasyonunun diğer bileşiklere göre düşük olmasına rağmen biyolojik aktiviteye katkı sağlayabilecek önemli fenolik bileşiklerden biri olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada analiz edilen çok sayıdaki fenolik bileşiğin büyük kısmının tespit edilememesi; kullanılan kahve türü, kavurma derecesi, demleme yöntemi, ekstraksiyon koşulları, çözücü sistemi ve kahve posasının depolama sürecine bağlı olarak fenolik profilin değişebilmesi ile açıklanabilir (Mussatto et al., 2011; Ballesteros et al., 2014). Fenolik bileşiklerin önemli bir kısmı demleme sırasında kahve içeceğine geçtiğinden, kahve posasında yalnızca belirli fenolik bileşiklerin yüksek miktarlarda kalması beklenen bir durumdur.

Genel olarak değerlendirildiğinde, kahve posası ekstraktında özellikle Kinik asit (quinic acid) ve klorojenik asit'in (chlorogenic acid) yüksek konsantrasyonlarda bulunması,

ekstraktın önemli bir antioksidan potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar, daha sonraki aşamada sentezlenen KP@AgNP antioksidan ve nöroprotektif biyolojik aktivitelerinde bu fenolik bileşiklerin indirgeme ve stabilize edici ajan olarak önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Tablo 4.1. KP ekstraktında LC-MS/MS Orbitrap analizi sonucunda belirlenen fenolik bileşikler, alıkonma zamanı (RT), ana iyon (m/z), iyonlaşma modu, addukt iyonları, kalibrasyon doğrusalığı (R^2), doğrusal çalışma aralığı ve konsantrasyon değerleri gösterilmektedir. NF: Analiz koşullarında tespit edilemeyen bileşikleri ifade etmektedir

No	Fenolik İçeriği	RT (min)	Parent Ion (m/z)	Ion Mode	Adduct Ions	R2	Linear Range (ng/mL)	Conc. (µg/g)
1	Benzoic Acid	N/F	121,02950	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9977	10–1000	N/F
2	Salicylic Acid	N/F	137,02442	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9976	10–1000	N/F
3	3-Hydroxybenzoic Acid (3-HBA)	N/F	137,02442	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9981	20–1000	N/F
4	3-Hydroxyphenylacetic Acid (3-HPA)	N/F	107,05053	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9991	10–1000	N/F
5	Syringic Acid	N/F	197,04555	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9983	10–1000	N/F
6	Gallic Acid(3,4,5-Trihydroxybenzoic Acid)	N/F	169,01425	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9974	20–1000	N/F
7	Protocatechuic Acid (3,4-Dihydroxybenzoic Acid)	N/F	109,02992	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9959	10–1000	N/F
8	Protocatechuic Acid Ethyl Ester (Ethyl 3,4-Dihydroxybenzoate)	N/F	181,05063	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9948	10–1000	N/F
9	3,4-Dihydroxybenzaldehyde (Protocatechuic Aldehyde)	6,22	137,02442	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9930	10–1000	35,743
10	2,4-Dihydroxybenzoic Acid (Beta-Resorcylic Acid)	N/F	153,01933	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9989	10–1000	N/F
11	Vanillic Acid	N/F	167,03498	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9986	10–1000	N/F
12	Homovanillic Acid((4-Hydroxy-3-Methoxyphenylacetic Acid)	N/F	181,05063	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9967	20–1000	N/F
13	Vanillin	N/F	151,04007	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9969	20–1000	N/F
14	Gentisic Acid	N/F	153,01933	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9981	10–1000	N/F
15	Trans Cinnamic Acid	N/F	147,04515	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9943	10–1000	N/F
16	Coumaric Acid (Trans-3-Hydroxycinnamic Acid)	N/F	163,04007	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9985	10–1000	N/F
17	Caffeic Acid	N/F	179,03498	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9973	10–1000	N/F
18	Caffeic Acid Phenhyl Ester (CAPE)	N/F	283,09758	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9969	10–1000	N/F
19	Ferulic Acid	N/F	193,05063	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9981	10–1000	N/F
20	Sinapic Acid	N/F	223,06120	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9979	10–1000	N/F
21	Chlorogenic Acid	7,79	353,08781	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9986	10–1000	83,355
22	Quinic acid	0,87	191,05611	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9928	20–1000	122,545
23	3-(4-Hydroxyphenyl) Propionic Acid	N/F	165,05572	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9952	60–1000	N/F
24	2-(4-Hydroxyphenyl)Etanol (Tyrosol)	N/F	137,06102	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9952	100–10000	N/F
25	A-Cyano-4-Hydroxycinnamic Acid	N/F	188,03532	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9992	10–1000	N/F

Tablo 4.1. (Devam) KP ekstraktında LC-MS/MS Orbitrap analizi sonucunda belirlenen fenolik bileşikler, alıkonma zamanı (RT), ana iyon (m/z), iyonlaşma modu, addukt iyonları, kalibrasyon doğrusalığı (R^2), doğrusal çalışma aralığı ve konsantrasyon değerleri gösterilmektedir. NF: Analiz koşullarında tespit edilemeyen bileşikleri ifade etmektedir

26	Catechin (Cianidanol)-P	N/F	289,07176	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9914	40–1000	N/F
27	Epigallocatechin	N/F	305,06668	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9959	40–1000	N/F
28	Epigallocatechin Gallate	N/F	457,07763	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9911	10–1000	N/F
29	Chrysin (5,7-Dihydroxy-2-Phenyl-4H-Chromen-4-One)	N/F	253,05063	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9522	10–1000	N/F
30	Apigenin (5,7-Dihydroxy-2-(4-Hydroxyphenyl)-4H-Chromen-4-One)	N/F	269,04555	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9929	10–1000	N/F
31	Acacetin (5,7-Dihydroxy-2-(4-Methoxyphenyl)-4H-Chromen-4-One)	N/F	283,06120	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9953	10–1000	N/F
32	Rhoifolin (Apigenin 7-O-Neohesperidoside)	N/F	433,11200	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9964	10–1000	N/F
33	Vicenin 2	N/F	593,15119	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9990	10–1000	N/F
34	Apigenin 7-Glucuronide	N/F	445,07763	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9967	10–1000	N/F
35	Apigenin 7-Glucoside	N/F	431,09837	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9976	10–800	N/F
36	Apiin (Apigenin-7-(2-O-Apiosylglucoside)	N/F	563,14063	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9883	10–1000	N/F
37	Vitexin (Apigenin 8-C-Glucoside)	N/F	431,09837	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9990	10–1000	N/F
38	Schaftoside	N/F	563,14063	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9981	10–1000	N/F
39	Ethylgallate	N/F	197,04555	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9991	10–1000	N/F
40	Rutin Hydrate M-OH2	N/F	609,14611	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9972	10–1000	N/F
41	Luteolin	N/F	285,04046	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9984	10–1000	N/F
42	Luteolin-7-O-Glucuronide (Luteolin-7-O-B-D-Glucuronide)	N/F	463,08609	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9859	20–1000	N/F
43	Diosmetin (Luteolin 4′-Methyl Ether)	N/F	299,05611	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9838	40–1000	N/F
44	Orientin	N/F	447,09328	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9989	10–1000	N/F
45	Isoorientin	N/F	447,09328	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9967	10–1000	N/F
46	Luteoloside (Luteolin 7-Glucoside)	N/F	447,09328	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9919	20–1000	N/F
47	Luteolin 7-Rutinoside	N/F	593,15119	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9832	40–1000	N/F
48	Galangin (3,5,7-Trihydroxy-2-Phenyl-4H-Chromen-4-One)	N/F	269,04555	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9965	10–1000	N/F
49	Quercetin	N/F	301,03538	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9932	20–1000	N/F
50	İsoquercitrin (Quercetin 3-Glucoside)	N/F	463,08820	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9850	40–1000	N/F
51	Narcissin (Narcissoside, Isorhamnetin 3-Rutinoside)	N/F	315,05139	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9929	20–1000	N/F
52	Quercetin 3-Rutinoside 7-Glucoside	N/F	447,09296	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9857	10–1000	N/F
53	Isorhamnetin (Quercetin 3′-Methyl Ether)	N/F	315,05103	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9939	10–1000	N/F
54	C Vit	N/F	175,02478	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9969	10–1000	N/F
55	Kaempferol	N/F	285,04046	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9986	10–1000	N/F
56	Afzelin (Kaempferol 3-Rhamnoside)	N/F	431,09837	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9977	10–1000	N/F
57	Kaempferide	N/F	299,05611	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9817	10–1000	N/F
58	Kaempferitrin	N/F	593,13006	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9957	10–1000	N/F

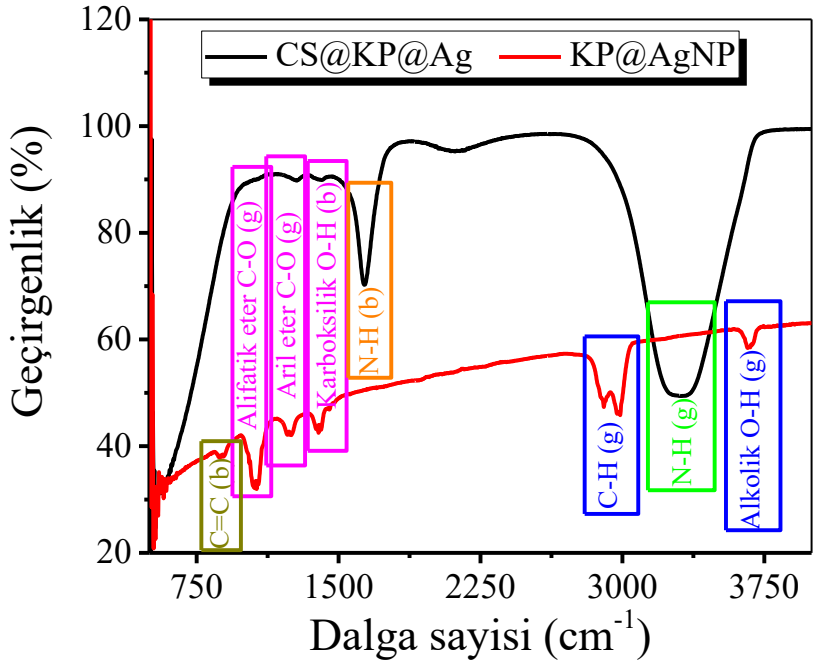
Tablo 4.1. (Devam) KP ekstraktında LC-MS/MS Orbitrap analizi sonucunda belirlenen fenolik bileşikler, alıkonma zamanı (RT), ana iyon (m/z), iyonlaşma modu, addukt iyonları, kalibrasyon doğrusalığı (R^2), doğrusal çalışma aralığı ve konsantrasyon değerleri gösterilmektedir. NF: Analiz koşullarında tespit edilemeyen bileşikleri ifade etmektedir

59	Nicotiflorin (Kaempferol 3-Rutinoside, Kaempferol 3-O-B –Rutinoside)	N/F	593,15119	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9915	40–1000	N/F
60	Astragalin (Kaempferol 3-Glucoside)	N/F	447,09328	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9938	40–1000	N/F
61	Tiliroside	N/F	285,04156	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9987	10–1000	N/F
62	Leucoside (Kaempferol 3-Sambubioside)	N/F	287,05536	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9978	100–1000	N/F
63	Myricetin	N/F	317,03029	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9989	10–1000	N/F
64	Fisetin Hydrate	N/F	285,04046	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9982	10–1000	N/F
65	Naringin	N/F	579,17193	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9977	10–1000	N/F
66	Naringenin	N/F	271,06120	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9910	40–1000	N/F
67	Sakuranetin (Naringenin 7-O-Methyl Ether)	N/F	285,07685	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9887	10–1000	N/F
68	Narirutin (Narirutinsa, Naringenin Rutinoside)	N/F	579,17193	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9971	10–1000	N/F
69	Oleuropein	N/F	435,13031	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9910	10–800	N/F
70	Neohesperidin	N/F	461,07269	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9904	10–1000	N/F
71	Eriodictyol (3,4,5,7-Tetrahydroxyflavanone)	N/F	287,05501	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9729	40–1000	N/F
72	Eriocitrin	N/F	417,11978	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9957	10–1000	N/F
73	Liquiritigenin	N/F	255,06628	ESI (−)	$[M-H]^-$	-0,3182	10–800	N/F
74	Liquiritin (4′,7-Dihydroxyflavanone 4′-Glucoside)	N/F	417,11987	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9956	10–1000	N/F
75	Genistein (5,7-Dihydroxy-3-(4-Hydroxyphenyl)-4H-Chromen-4-One)	N/F	269,04555	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9975	10–1000	N/F
76	Daidzin	N/F	415,10346	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9946	20–1000	N/F
77	Formononetin (Neochanin)	N/F	267,06628	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9755	10–400	N/F
78	Doxorubicin Hydrchloride	N/F	544,18134	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9939	20–1000	N/F
79	Ellagic Acid	10,90	300,99899	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9983	10–1000	101,869
80	Esculin Hydrate	N/F	339,07216	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9991	20–1000	N/F
81	Phloridzin	N/F	435,12967	ESI (−)	$[M-H]^-$	-0,5331	10–800	N/F
82	Rosmarinic Acid	N/F		ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9928	40–1000	N/F
83	Glabridin	N/F	323,12888	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9985	10–1000	N/F
84	Arbutin	N/F	271,08233	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9908	100–1000	N/F
85	Emodin	N/F	269,04555	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9601	10–1000	N/F
86	Etoposide	N/F	447,09070	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9878	10–1000	N/F
87	Pinocembrin	N/F	255,06694	ESI (−)	$[M-H]^-$	0,9628	10–1000	N/F

4.2. KP@AgNP ve CS@KP@Ag ‘nin Karakterizasyonu

4.2.1. FT-IR Analizi

FTIR (Fourier Transform Infrared Spektroskopisi), numunede bulunan fonksiyonel grupların belirlenmesi ve moleküler yapının karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan önemli bir analiz yöntemidir. FTIR spektrumları genel olarak dört ana bölgede incelenmektedir. 2500–4000 cm^{-1} aralığında tekli bağlara ait titreşimler görülmekte olup özellikle 3200–3600 cm^{-1} civarındaki geniş pikler -OH, -NH_2 ve su moleküllerine bağlı hidrojen bağlarını göstermektedir (Nandiyanto et al., 2022). 3000 cm^{-1} üzerindeki pikler aromatik ve doymamış C-H bağlarıyla, 3000 cm^{-1} altındaki pikler ise alifatik C-H bağlarıyla ilişkilendirilmektedir. 1500–2500 cm^{-1} aralığında üçlü ve çift bağlara ait karakteristik pikler yer almakta, özellikle 1650–1850 cm^{-1} bandında karbonil (C=O) grupları belirgin şekilde gözlenmektedir (Nandiyanto et al., 2022). 1600–1650 cm^{-1} civarındaki pikler ise C=C çift bağlarını göstermektedir. 1500 cm^{-1} altındaki bölge ise “parmak izi bölgesi” olarak adlandırılmakta ve moleküle özgü titreşim bantlarını içermektedir. Bu nedenle nanojel ve nanopartikül yapılarının yüzey özellikleri ile fonksiyonel grup değişimlerinin belirlenmesinde önemli bilgiler sağlamaktadır. Nanojel ve nanopartiküle ait FT-IR spektrumu Şekil 4.1’de verilmiştir.



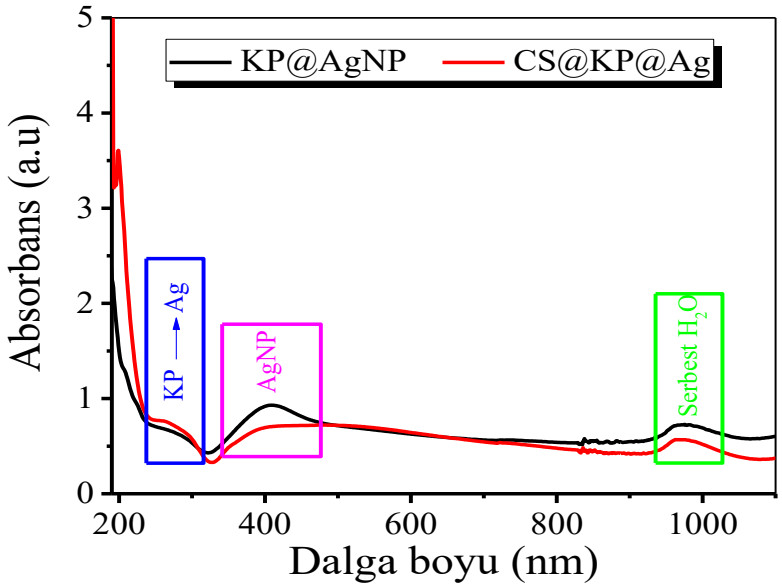
Şekil 4.1. KP@AgNP ve CS@KP@Ag'nin FT-IR Spektrumları (g: gerilme, b: bükülme)

Yapılan FT-IR spektroskopisi analizleri, KP@AgNP ve CS@KP@Ag numunelerinin kimyasal yapılarını ve gümüş nanopartiküllerin yüzey etkileşimlerini başarıyla ortaya koymuştur. Şekil 4.1'de verilen pikler üzerinde bulunan pembe renkli kutucuklar her iki numunede ortak olan pikleri gösterirken diğerleri ise her bir numuneye ait spesifik pikleri işaret etmektedir. KP@AgNP'in FT-IR spektrumu incelendiğinde LC-MS-MS sonuçlarına göre KP içerisinde tespit edilen kinik asit ($C_7H_{12}O_6$), ellajik asit ($C_{14}H_6O_8$), klorojenik asit ($C_{16}H_{18}O_9$) ve 3,4-dihidroksibenzaldehit (protokateşik aldehit, $C_7H_6O_3$) fenolik bileşikleri ile uyumlu olarak 3668 cm-1, 2977-2904 cm-1 ve 887 cm-1'deki pikler sırasıyla alkolik O-H gerilme, C-H gerilme ve C=C bükülme piklerine atfedilebilir (Lamarra et al., 2018). Bu pikler, yapısında bu fenolik bileşikler bulunan KP'nin AgNP üzerine yüklendiğini açık bir şekilde göstermektedir. CS@KP@Ag nanojeline ait FT-IR piki incelendiğinde ise toz formundan farklı olarak 3315 cm-1 ve 1630 cm-1'deki piklerde gözlenen sırasıyla N-H gerilme ve bükülme pikleri kitosanın varlığına işaret etmektedir. (Akmaz vd., 2013) Hem KP@AgNP hem de CS@KP@Ag nonejlinde ortak olarak sırasıyla 1392 ve 1398 cm-1'de gözlenen piklerin karboksilik O-H bükülme piklerine, 1238 ve 1277 cm-1'deki piklerin aril eter C-O gerilme piklerine ve 1057 ve 1072 cm-1'de verilen piklerin ise alifatik eter C-O gerilme piklerine ait olduğu düşünülmektedir (Martínez-Cisterna et al.,2025). Bu üç ortak pikin KP'nin yapısında bulunan fenolik bileşiklerin kimyasal yapısından kaynaklandığı

anlaşılmaktadır. Tüm bu veriler ışığında KP'nin bahsi geçen fenolik bileşikleri içerdiği ve AgNP'lerinin üzerine yüklendiği ve CS@KP@Ag nanojelinin hem kitosanı hem de KP@AgNP'lerini içerdiği kolaylıkla söylenebilir.

4.2.2. UV/Vis Analizi

UV-Vis spektrofotometrisi, metal nanopartiküllerin serbest elektronlarının elektromanyetik ışınımla etkileşmesi sonucu oluşan Yüzey Plazmon Rezonansı (Surface Plasmon Resonance, SPR) etkisini kullanarak partikül oluşumu, boyutu, şekli ve kolloidal kararlılığı hakkında hızlı ön bilgi sağlayan önemli bir karakterizasyon yöntemidir. Partikül boyutunun küçülmesi absorbans pikinin daha kısa dalga boylarına (maviye kayma), partikül büyümesi veya agregasyonu ise daha uzun dalga boylarına (kırmızıya kayma) kaymasına neden olur. Bu değişimler nanopartiküllerin morfolojisi ve çevresindeki dielektrik ortam hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. UV-Vis analizi, sentez başarısının doğrulanmasında etkili olmakla birlikte SEM ve TEM gibi mikroskobik yöntemlerle birlikte değerlendirildiğinde nanopartiküllerin boyutu, dağılımı ve agregasyon durumu daha güvenilir şekilde ortaya konulabilmektedir. (Lee & Jun, 2019; Kang et al., 2019).

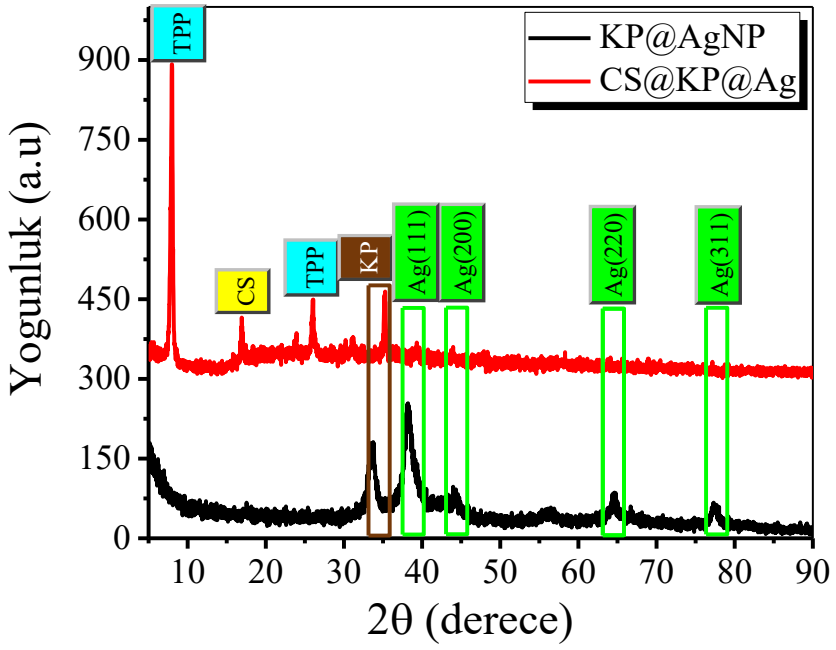


Şekil 4.2. KP@AgNP'leri ve CS@KP@Ag nanojeline ait 200 -1100 nm aralığında alınan UV/Vis absorbans grafikleri

UV-Vis spektrofotometrik analiz sonuçlarında, her iki örneğin neredeyse aynı noktalarda pik verdiği açıkça görülmektedir (Şekil 4.2). Hem KP@AgNP'leri hem de CS@KP@Ag nanojeline ait UV-Vis spektrumlarında 274, 412 ve 971 nm'de olmak üzere üç adet absorbans piki gözlenmiştir. Bu piklerin sırasıyla KP-Ag yük aktarımı, AgNP'leri ve serbest su moleküllerine ait olduğu anlaşılmıştır (Berbeć S et al., 2019; Yıldırım H et al., 2025). Her iki spektrum, KP@AgNP'lerinin başarıyla sentezlendiğini ve CS@KP@Ag nanojelinin ise bu toz nanopartikülleri içerdiğini net bir şekilde göstermektedir.

4.2.3. XRD Analizi

X-ışını kırınımı (XRD), nanomalzemelerin kristal yapısının, faz saflığının ve kristallenme derecesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan güçlü bir karakterizasyon tekniğidir. X-ışınlarının kristal örgü düzlemleri tarafından belirli açılarda kırınıma uğraması prensibine dayanan bu yöntem, malzemelerin yapısal özellikleri hakkında ayrıntılı bilgi sunar. Elde edilen kırınım desenlerinde gözlenen karakteristik pikler, materyalin kristal fazlarını tanımlamaya ve sentezlenen nanopartiküllerin yapısal bütünlüğünü doğrulamaya olanak sağlar. Pik konumları kristal yapıyı ve faz kompozisyonunu yansıtırken, pik şiddeti ve genişliği kristallenme derecesi, kristalit boyutu ve yapısal düzenlilik hakkında bilgi vermektedir. Özellikle metal nanopartiküllerde gözlenen belirgin ve yüksek şiddetli kırınım pikleri, başarılı nanopartikül oluşumunun ve yüksek kristalliliğin önemli göstergeleridir. XRD analizinin SEM, TEM ve diğer karakterizasyon yöntemleriyle birlikte değerlendirilmesi, nanopartiküllerin morfolojik, yapısal ve fizikokimyasal özelliklerinin kapsamlı bir şekilde ortaya konulmasını sağlamaktadır**.**



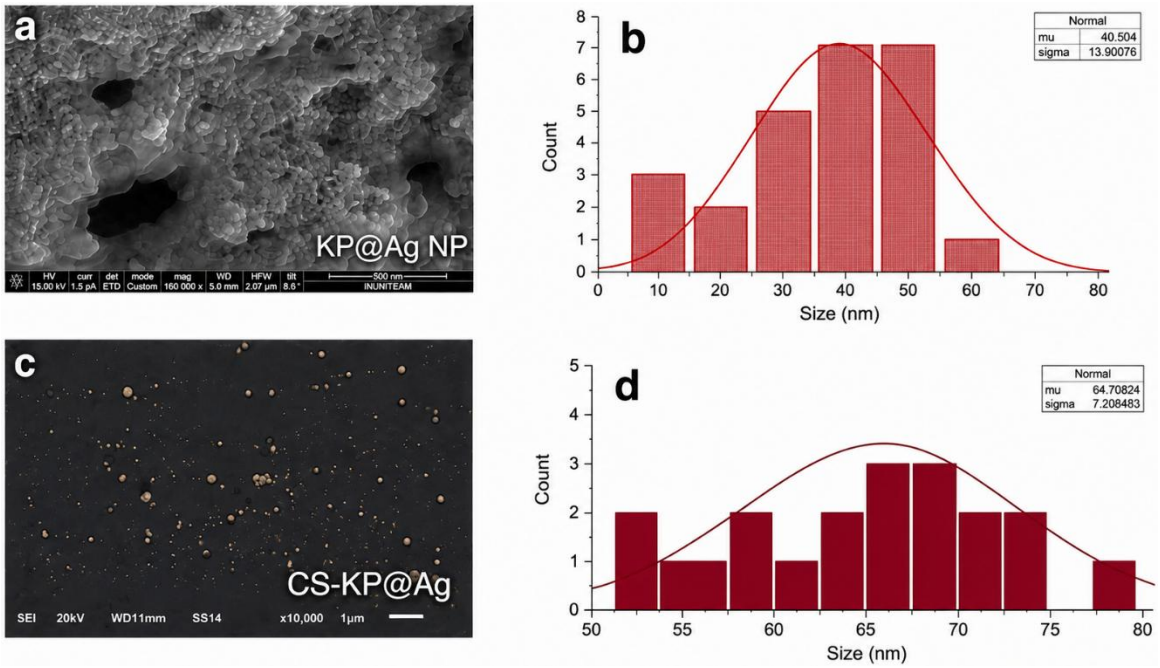
Şekil 4.3. KP@AgNP'leri ve CS@KP@Ag nanojeline ait X-ışını kırınımı (XRD) desenleri

KP@AgNP'lerinin ve CS@KP@Ag nanojelinin kristal yapılarını anlamak için XRD desenleri incelendi ve bu desenler Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Buna göre, KP@AgNP örneğinde 2θ ≈ 38° (111), 44° (200), 64° (220) ve 77° (311)'de dört adet belirgin ve yüksek şiddetli kırınım piki gözlenmiştir (JCPDS No. 04-0783, Şekil 4.3). Bu pikler, gümüş nanopartiküllerinin kristalin yapıda olduğunu ve başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir. Bu piklere ek olarak 2θ ≈ 33°'de gözlenen yeni bir pik KP içerisinde bulunan fenolik bileşiklerin karbon yapısına atfedilebilir. Bu pik küçük bir kayma ile birlikte (2θ ≈ 35°) CS@KP@Ag nanojeline ait XRD deseninde de gözlenmektedir. Ayrıca, nanojel örneğine ait XRD deseninde gözlenen 2θ ≈ 26° ve 8°'deki iki tepenin TPP'ye (ve 2θ ≈ 17°'deki tepenin ise kitosana ait olduğu anlaşılmıştır. (Akmaz vd., 2013; Trivedi et al., 2015) Bu sonuç, bariz bir şekilde KP@AgNP'lerinin varlığını ve CS@KP@Ag nanojelinin bu gümüş nanopartiküllerini içerdiğini işaret etmektedir. Her iki örneğin içinde bulunan AgNP'lerinin Ag(111) kırınım tepe noktası, gümüş nanopartiküllerinin yüzey merkezli kübik kristal yapısına sahip olduğunu gösterir ve bu 2θ değeri, metal parçacıklarının ortalama kristalit boyutunu ve kafes parametrelerini hesaplamak için kullanılır. (Ali vd., 2023) KP@AgNP'lerinin deneysel kafes sabiti değeri a=4,098 olarak bulunmuştur; bu değer, saf gümüş metalinin teorik kafes sabiti değeri olan a=4,086'ya çok yakındır (Ali vd., 2023). Dahası, Ag(111) için Scherer formülü ile KP@AgNP'lerinin ortalama kristalit boyutu 49,19 nm olarak bulunmuştur ve bu değer SEM görüntüsü ile elde

edilen parçacık boyutuna ile de doğrulanmıştır (SEM parçacık boyutu= 40,50 nm, daha sonra bakınız). Sonuç olarak, XRD sonuçları, kitosan bazlı nanojel sisteminin gümüş nanopartikülleri ile başarılı bir şekilde kompozit hale getirildiğini ve yapısal bütünlüğün korunduğunu doğrulamaktadır.

4.3. FE-SEM EDX Analizi

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi, sentezlenen nanopartiküllerin morfolojik yapılarının, yüzey topografilerinin, şekil özelliklerinin ve boyut dağılımlarının doğrudan görselleştirilmesinde kullanılan en güçlü ve yaygın karakterizasyon tekniklerinden biridir. Bu yöntem, odaklanmış bir elektron demetinin numune yüzeyi ile etkileşimi sonucu açığa çıkan sinyallerin taranması esasına dayanmakta olup, nanometre ölçeğinde yüksek çözünürlüklü ve üç boyutlu illüzyona sahip mikrograflar elde edilmesine olanak tanır. SEM analizi sayesinde, nanopartiküllerin küresel, eliptik veya düzensiz geometrilere sahip olup olmadıkları belirlenebilmekte; parçacıkların sistem içerisindeki monodispers (tekdüze) veya polidispers dağılım karakteri doğrudan gözlemlenebilmektedir. Ayrıca, mikrograflar üzerinden yapılan istatistiksel boyut analizleri (histogramlar), kolloidal sistemin ortalama parçacık boyutu ve aglomerasyon (kümelenme) eğilimi hakkında sayısal ve kesin veriler sunmaktadır. Bu doğrultuda elde edilen morfolojik veriler; Zeta potansiyeli, FTIR ve DLS gibi diğer fizikokimyasal karakterizasyon sonuçları ile entegre edilerek, sentez mekanizmasının başarısı ve nanopartiküllerin nihai uygulama alanlarındaki potansiyeli hakkında kapsamlı bir değerlendirme yapılmasına zemin hazırlamaktadır.



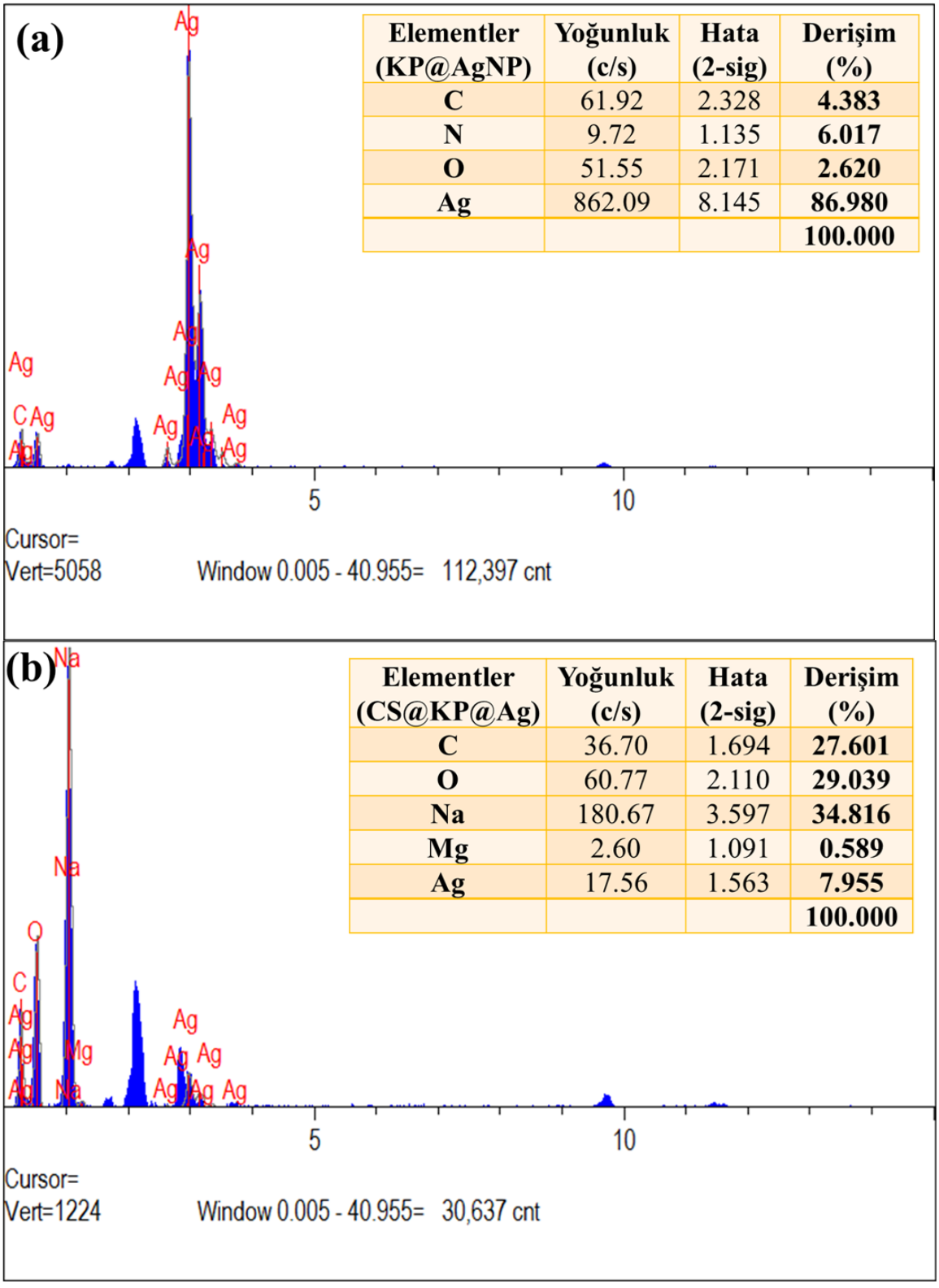
Şekil 4.4. Sentezlenen KP@AgNP'lerinin (a) KP@AgNP'lerinin FESEM mikrografı ve (b) istatistiksel boyut dağılım histogramı, (c) CS@KP@Ag nanojelin SEM mikrografı ve (d) istatistiksel boyut dağılım histogramı

Bu kapsamda, sentezlenen nanopartiküllerin morfolojik özelliklerini ve parçacık boyut dağılımlarını belirlemek amacıyla gerçekleştirilen SEM analizi ve ilgili histogram sonuçları Şekil Şekil 4.4'te sunulmuştur. Elde edilen mikrograflar ve istatistiksel boyut dağılım eğrileri incelendiğinde, KP@AgNP örneğinin 40,50 nm ortalama boyuta sahip olduğu, buna karşın CS@KP@Ag nanojeli incelendiğinde, ortalama parçacık boyutunun 64,70 nm olarak gerçekleştiği tespit edilmiştir.

FESEM görüntüleri ile aynı bölgelerden alınan EDX analizleri, sentezlenen KP@AgNP ve CS@KP@Ag yapılarına ait elementel bileşimin doğrulanması amacıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5). EDX spektrumları incelendiğinde her iki örnekte de karbon (C), oksijen (O) ve gümüş (Ag) elementlerine ait karakteristik piklerin bulunduğu görülmektedir. Bu bulgular, yeşil sentez yöntemiyle elde edilen gümüş nanopartiküllerinin başarıyla oluşturulduğunu ve organik matriks içerisinde bulunduğunu doğrulamaktadır.

Şekil 4.5a'da verilen KP@AgNP için EDX spektrumunda büyük oranda bulunan gümüş elementine ek olarak karbon, azot ve oksijen elementlerinin olduğu gözlenmiştir. KP'de bulunan dört fenolik bileşiğin kimyasal yapısı incelendiğinde azot elementini içermediği

anlaşılmıştır. Bu durumda, Şekil 4.5a'da görülen azot elementinin $AgNO_3$ tuzundan gelen kirlilik olduğu düşünülmektedir. Şekil 4.5b'de görülen CS@KP@Ag nanojelinin EDX spektrumunda ise karbon, oksijen ve gümüş elementlerine ek olarak yüksek oranda sodyum ve eser miktarda magnezyum elementlerine ait pikler dikkat çekmektedir. Burada gözlenen sodyum pikinin CS@KP@Ag nanojelinin sentezinde iyonik jelasyon sırasında çapraz bağlayıcı olarak kullanılan TPP molekülünden, magnezyum pikinin ise kirlilikten kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, kitosan molekülünün yapısında bulunan azot elementinin CS@KP@Ag nanojeline ait EDX spektrumunda çıkmamasının nedeni deneysel hata olarak değerlendirilmektedir. Sonuç olarak, karbon ve oksijen elementleri kitosan ile kahve posası ekstraktında bulunan organik bileşenleri temsil ederken, yaklaşık 3 keV civarında gözlenen karakteristik Ag pikleri gümüş nanopartiküllerinin nanojel matriksi içerisinde başarıyla enkapsüle edildiğini göstermektedir.



Elementler (KP@AgNP)	Yoğunluk (c/s)	Hata (2-sig)	Derişim (%)
C	61.92	2.328	**4.383**
N	9.72	1.135	**6.017**
O	51.55	2.171	**2.620**
Ag	862.09	8.145	**86.980**
			100.000

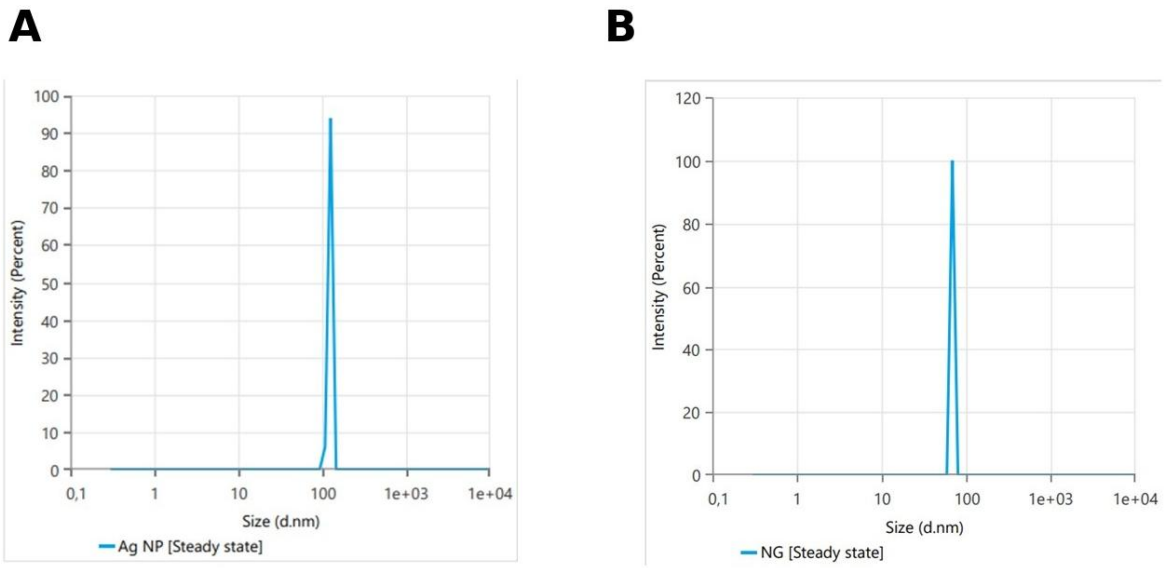
Elementler (CS@KP@Ag)	Yoğunluk (c/s)	Hata (2-sig)	Derişim (%)
C	36.70	1.694	**27.601**
O	60.77	2.110	**29.039**
Na	180.67	3.597	**34.816**
Mg	2.60	1.091	**0.589**
Ag	17.56	1.563	**7.955**
			100.000

Şekil 4.5. Yeşil sentezlenen (a) KP@AgNP ve (b) CS@KP@Ag örneklerine ait FESEM-EDX spektrumları ile belirlenen elementel bileşim sonuçları

Her iki örnek birlikte değerlendirildiğinde, nanojel formülasyonunda kitosan ve TPP matriksinin ilavesiyle karbon, oksijen ve özellikle sodyum oranlarında belirgin artış meydana gelirken, gümüşün ağırlıkça oranında beklenen bir azalma gözlenmiştir. Buna rağmen Ag'ye ait karakteristik piklerin korunmuş olması, nanopartiküllerin nanojel matriksi içerisinde yapısal bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir. FESEM görüntüleri ile birlikte değerlendirilen EDX sonuçları, KP@AgNP'nin başarıyla sentezlendiğini ve CS@KP@Ag formülasyonunun başarılı şekilde oluşturulduğunu doğrulamaktadır. Bu bulgular, XRD ve FT-IR analizlerinden elde edilen sonuçlarla da uyum göstermektedir**.**

4.3.1. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Analizi

Dinamik Işık Saçılımı (DLS) analizi, sentezlenen nanopartiküllerin çözeltideki hidrodinamik parçacık boyutunun ve boyut dağılımının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir karakterizasyon yöntemidir. Bu teknik sayesinde nanopartiküllerin kolloidal ortamda sergilediği davranış, polidispersite indeksi (PDI) ve parçacık dağılım homojenliği değerlendirilebilmektedir. Bu kapsamda sentezlenen KP@AgNP ve CS@KP@Ag örneklerinin hidrodinamik boyut dağılımlarını belirlemek amacıyla DLS analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.6'te sunulmuştur.

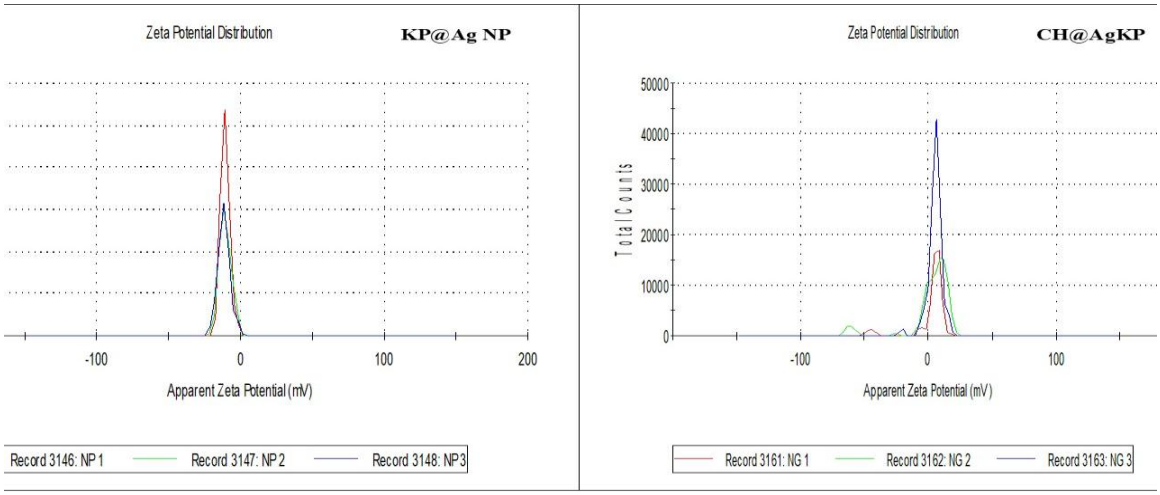


Şekil 4.6. DLS analizi ile elde edilen hidrodinamik parçacık boyutu dağılımları. (A) KP@AgNP ve (B) CS@KP@Ag örneklerine ait yoğunluk esaslı parçacık boyutu dağılım eğrileri

DLS analizi sonucunda, KP@AgNP örneğinin hidrodinamik parçacık boyutu yaklaşık 124,6 nm, CS@KP@Ag örneğinin ise yaklaşık 68,7 nm olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, her iki örneğin de nanometre boyut aralığında olduğunu göstermektedir. DLS ile belirlenen hidrodinamik boyutlar, çözelti ortamında partikül yüzeyini çevreleyen hidratasyon tabakası ve yüzeyde bulunan biyomoleküler yapıların etkisini de içerdiğinden, FE-SEM analizinde elde edilen parçacık boyutlarından farklılık gösterebilmektedir. Bu nedenle DLS ve FE-SEM sonuçları birbirini tamamlayıcı nitelikte değerlendirilmektedir.

4.3.2. Zeta Potansiyeli Analizi

Zeta potansiyeli analizi, nanopartiküllerin yüzey yükünün ve kolloidal sistemlerdeki dağılım kararlılığının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan önemli bir karakterizasyon yöntemidir. Bu teknik, parçacıkların sıvı ortamda elektrik alan etkisi altında gösterdiği hareketin ölçülmesi esasına dayanmakta olup, nanopartiküllerin yüzey özellikleri hakkında bilgi sağlamaktadır. Elde edilen zeta potansiyeli değerleri, partiküller arasındaki elektrostatik itme veya çekme kuvvetlerini yansıtarak sistemin agregasyon eğilimi ve stabilitesi hakkında değerlendirme yapılmasına olanak tanır. Yüksek pozitif veya negatif zeta potansiyeli değerleri, partiküller arasındaki elektrostatik itmenin artmasına bağlı olarak daha kararlı dispersiyonları işaret ederken, düşük mutlak değerler partikül agregasyonu riskinin arttığını göstermektedir. Nanopartikül sistemlerinde zeta potansiyeli analizi, sentez başarısının değerlendirilmesi, yüzey modifikasyonlarının doğrulanması ve kolloidal stabilitenin belirlenmesi açısından önemli bilgiler sunmaktadır. Bu nedenle zeta potansiyeli sonuçları, SEM, TEM, DLS ve diğer karakterizasyon yöntemleri ile değerlendirilerek nanopartiküllerin fizikokimyasal özelliklerinin kapsamlı olarak ortaya konulmasına katkı sağlamaktadır.



Şekil 4.7. KP@AgNP ve CS@KP@Ag numunelerinin zeta potansiyeli dağılımları

Şekil 4.7 ‘de görüldüğü üzere, KP@AgNP numunesi hafif negatif bir yüzey yüküne sahip olup, yaklaşık -10 mV’da dar ve keskin tek bir pik sergilemiştir. Bu profili, numunenin yüzey yükü açısından oldukça homojen bir dağılımda olduğunu ve ardışık üç ölçümün mükemmel bir tekrarlanabilirlik gösterdiğini kanıtlamaktadır.

Buna karşın, yüzey modifikasyonuna tabi tutulan CS@KP@Ag numunesinin zeta potansiyeli pozitif bölgeye kayarak ortalama 3,76 mV’da pik yapmıştır (Şekil 4.7). Yüzey yükünde gözlenen bu belirgin pozitif yönlü değişim, nanopartikül yüzeyinin pozitif yüklü kitosan ile başarılı bir şekilde kaplandığının doğrudan kanıtıdır.

4.4. Hücre Canlılık Testi (WST) Sonuçları

4.4.1. H_2O_2'nin SH-SY5Y Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

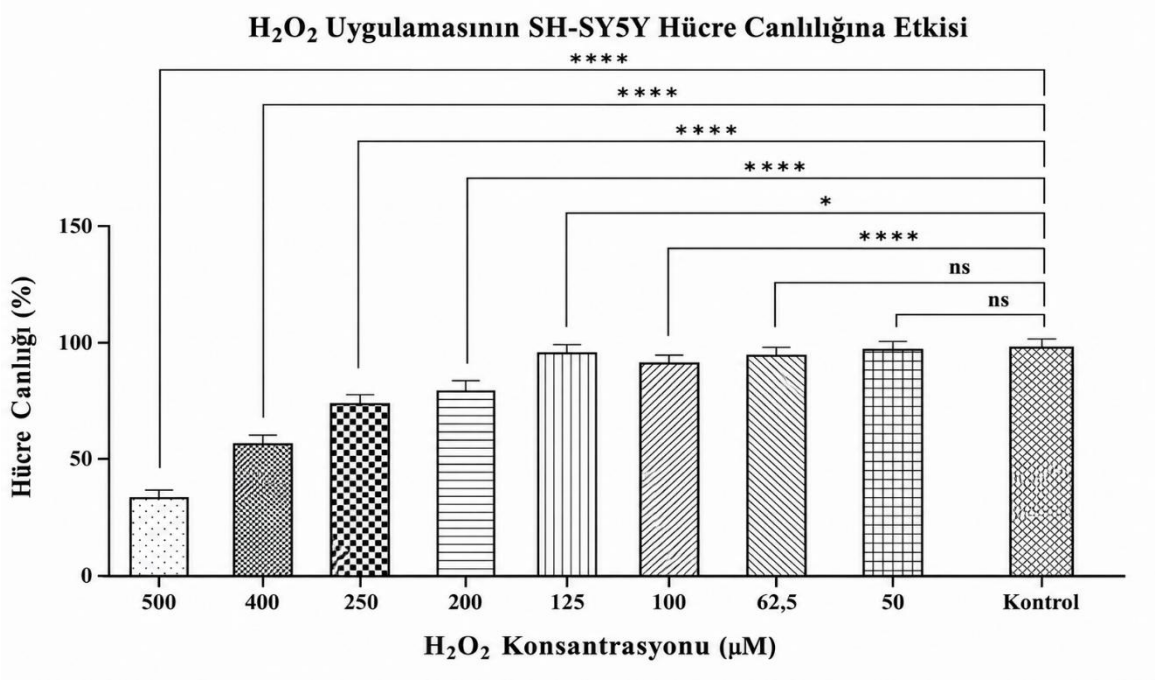
SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stres modelinin oluşturulması amacıyla farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 uygulanmış ve hücre canlılığı WST yöntemi ile değerlendirilmiştir. WST reaktifi uygulandıktan yaklaşık 4 saat sonra absorbans değerleri 450 ve 630 nm'de mikroplaka okuyucusunda ölçülmüştür. Ölçümlerde 630 nm değeri arka plan (blank) olarak kabul edilerek 450 nm absorbansından çıkarılmış ve her kuyucuk için $A_{450}-A_{630}$ değerleri hesaplanmıştır. Hücre canlılığı, Hücre Canlılığı (%) = (AÖ/AK) × 100 formülü kullanılarak belirlenmiştir. Tüm deneyler üç bağımsız tekrar halinde

gerçekleştirilmiş, hata çubukları ortalama ± standart sapma (Mean ± SD) olarak gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, H_2O_2 konsantrasyonunun artmasıyla SH-SY5Y hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azaldığını göstermiştir (Şekil 4.8). H_2O_2 uygulanmayan kontrol grubunda hücre canlılığı %100 olarak kabul edilirken, 50, 62,5, 100, 125, 200, 250, 400 ve 500 µM H_2O_2 uygulanan gruplarda hücre canlılığı sırasıyla %97,92, %96,61, %86,90, %92,47, %76,16, %72,38, %56,73 ve %34,51 olarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel analiz sonucunda, 50 ve 62,5 µM H_2O_2 uygulanan grupların kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermediği (ns, $p>0,05$) belirlenmiştir. Buna karşın 100 µM grubunda anlamlı düzeyde azalma gözlenmiş (*$p<0,05$), 125, 200, 250, 400 ve 500 µM H_2O_2 uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığında ileri düzeyde anlamlı azalma tespit edilmiştir (****$p<0,0001$). Bu bulgular, H_2O_2'nin SH-SY5Y hücrelerinde doz bağımlı sitotoksik etki oluşturduğunu doğrulamaktadır.

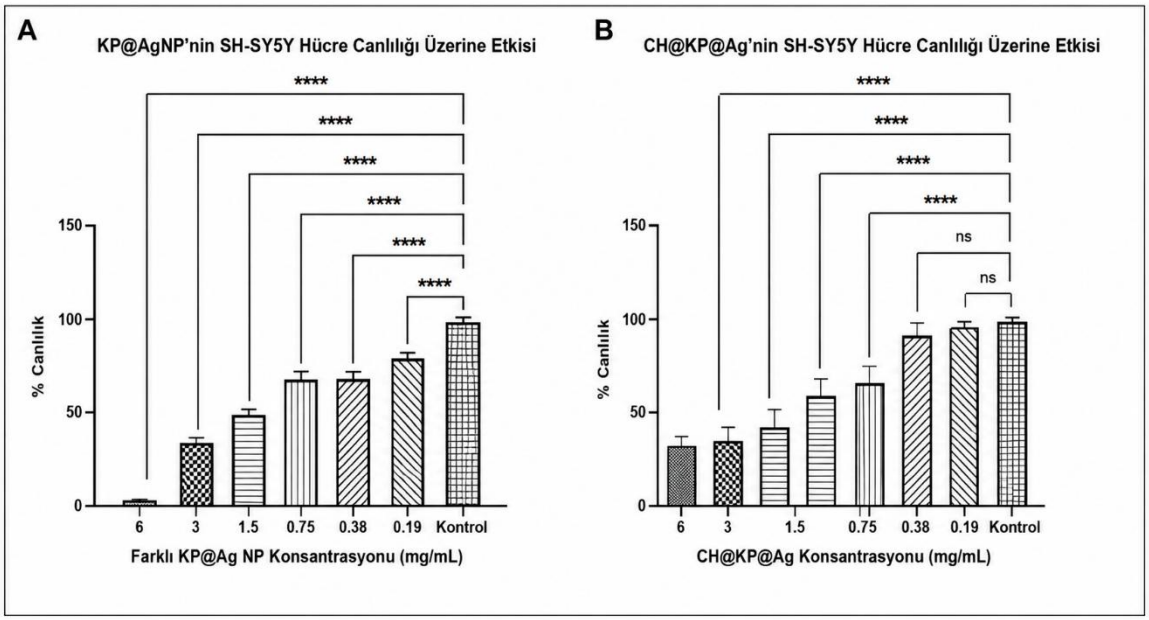
Hücre canlılığının yaklaşık %50 seviyesine düştüğü konsantrasyon dikkate alınarak 400 µM H_2O_2 yaklaşık LD_{50} değeri olarak belirlenmiş ve sonraki oksidatif stres deneylerinde bu konsantrasyon kullanılmıştır.



Şekil 4.8. Farklı H_2O_2 konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücre canlılığı üzerindeki etkisi ve yaklaşık LD_{50} değerinin belirlenmesi. Hücre canlılığı WST yöntemi ile belirlenmiş olup sonuçlar ortalama ± standart sapma (Mean ± SD, n = 3) olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak kontrol grubuna göre gerçekleştirilmiştir. *p < 0,05; ****p < 0,0001; ns: istatistiksel olarak anlamsız

4.4.2. Farklı KP@AgNP ve CS@KP@Ag Konsantrasyonlarının LD50 Değerinin Belirlenmesi

SH-SY53Y insan nöroblastoma hücre hattında KP@AgNP ve CS@KP@Ag örneklerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonlarda hücre canlılığı analizi gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı sonuçları kontrol grubuna göre değerlendirilmiş ve elde edilen veriler Şekil 4.6 'da sunulmuştur**.**



Şekil 4.9. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan KP@AgNP ve CH@KP@Ag örneklerinin SH-SY5Y hücre canlılığı üzerine etkileri ve IC_{50} değerlerinin belirlenmesi. Veriler ortalama ± standart sapma olarak sunulmuştur. İstatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve Dunnett çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubuna göre anlamlılık düzeyleri ns: $p > 0,05$; : $p < 0,01$; *: $p < 0,001$; **: $p < 0,0001$

KP@AgNP uygulamalarında konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığının belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir. En yüksek konsantrasyon olan 6 mg/mL'de hücre canlılığı yaklaşık %5 düzeyine kadar düşerken, konsantrasyonun azalmasıyla birlikte hücre canlılığında kademeli bir artış meydana gelmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda tüm uygulama konsantrasyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde farklılık gösterdiği belirlenmiştir (****, $p < 0,0001$). Doz-cevap eğrisinden hesaplanan IC_{50} değeri 1,63 mg/mL olarak belirlenmiş olup, bu sonuç KP@AgNP'nin SH-SY5Y hücrelerinde konsantrasyona bağlı belirgin bir sitotoksik etki oluşturduğunu göstermektedir.

CHKP@Ag grubunda da konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığında azalma gözlenmiş, ancak aynı konsantrasyonlarda KP@AgNP grubuna kıyasla daha yüksek hücre canlılığı değerleri elde edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunurken ($p < 0,01–0,0001$), 0,38 mg/mL ve 0,19 mg/mL konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (ns, $p > 0,05$). Doz-cevap eğrisinden hesaplanan IC_{50} değeri 1,37 mg/mL olarak belirlenmiştir.

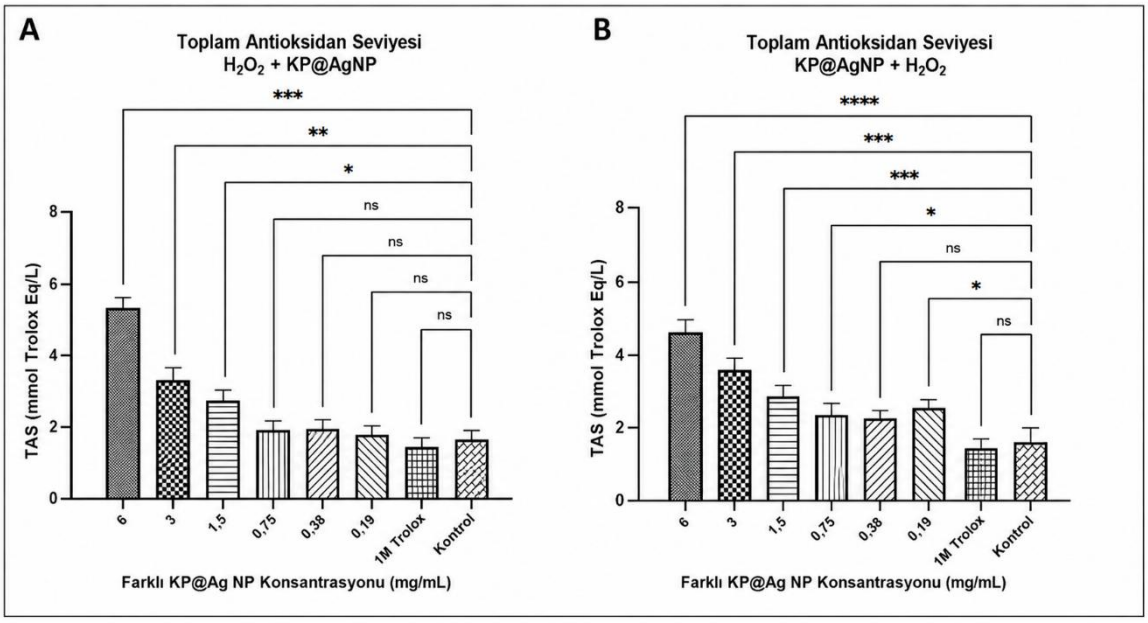
Her iki formülasyonun IC_{50} değerleri birbirine yakın olmakla birlikte (KP@AgNP: 1,63 mg/mL; CH@KP@Ag: 1,37 mg/mL), doz-cevap eğrileri incelendiğinde nanojel formülasyonunun özellikle düşük ve orta konsantrasyonlarda serbest KP@AgNP'ye kıyasla daha yüksek hücre canlılığı sağladığı görülmektedir. Bu durum, kitosan bazlı nanojel matriksinin gümüş nanopartiküllerini stabilize ederek kontrollü salınım sağlaması ve hücrelerle doğrudan temasını sınırlandırması ile açıklanabilir. Literatürde de kitosan bazlı taşıyıcı sistemlerin nanopartiküllerin biyouyumluluğunu artırdığı ve sitotoksik etkilerini azalttığı bildirilmektedir. Bu nedenle, CS@KP@Ag nanojel formülasyonunun yalnızca sitotoksik etki açısından değil, biyomedikal uygulamalarda güvenli kullanım potansiyeli bakımından da avantaj sağlayabileceği düşünülmektedir (Ahsan et al., 2025).

4.5. Toplam Antioksidan Seviyesi (TAS) Sonuçları

SH-SY5Y hücrelerinde toplam antioksidan seviyesinin (TAS) belirlenmesi amacıyla Reel Assay (Gaziantep, Türkiye) tarafından geliştirilen ticari Toplam Antioksidan Seviye (TAS) tayin kiti kullanılmıştır. Deney kapsamında SH-SY5Y hücrelerinde H_2O_2 ile oksidatif stres modeli oluşturulmuş ve sentezlenen KP@AgNP ile CH@KP@Ag nin antioksidan etkileri iki farklı uygulama protokolü kullanılarak değerlendirilmiştir. İlk protokolde hücrelere öncelikle H_2O_2 uygulanarak oksidatif stres oluşturulmuş, ardından KP@AgNP veya CH@KP@Ag uygulanmıştır (H_2O_2 + ilaç grubu). İkinci protokolde ise hücreler öncelikle KP@AgNP veya CH@KP@Ag ile muamele edilmiş, daha sonra H_2O_2 uygulanmıştır (ilaç + H_2O_2 grubu). Bu sayede sentezlenen nanomateryallerin hem tedavi edici hem de koruyucu antioksidan etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Uygulamaların tamamlanmasının ardından hücreler %5 CO_2 içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilmiş, daha sonra hücre içeriğinin ortama salınmasını sağlamak amacıyla iki döngü halinde 30 dakika −20 °C ve ardından 30 dakika 37 °C'de bekletilerek donma-çözünme (freeze–thaw) işlemi uygulanmıştır. Elde edilen hücre süpernatantları TAS analizlerinde kullanılmıştır. Analizler Reel Assay (Gaziantep, Türkiye) firmasının önerdiği protokole uygun olarak gerçekleştirilmiş, standart çözeltiler yardımıyla toplam antioksidan seviyeleri hesaplanmıştır. Ayrıca herhangi bir uygulama yapılmayan hücreler kontrol

grubu olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen TAS sonuçları Şekil 4.8A ve Şekil 4.8B'de sunulmuştur.



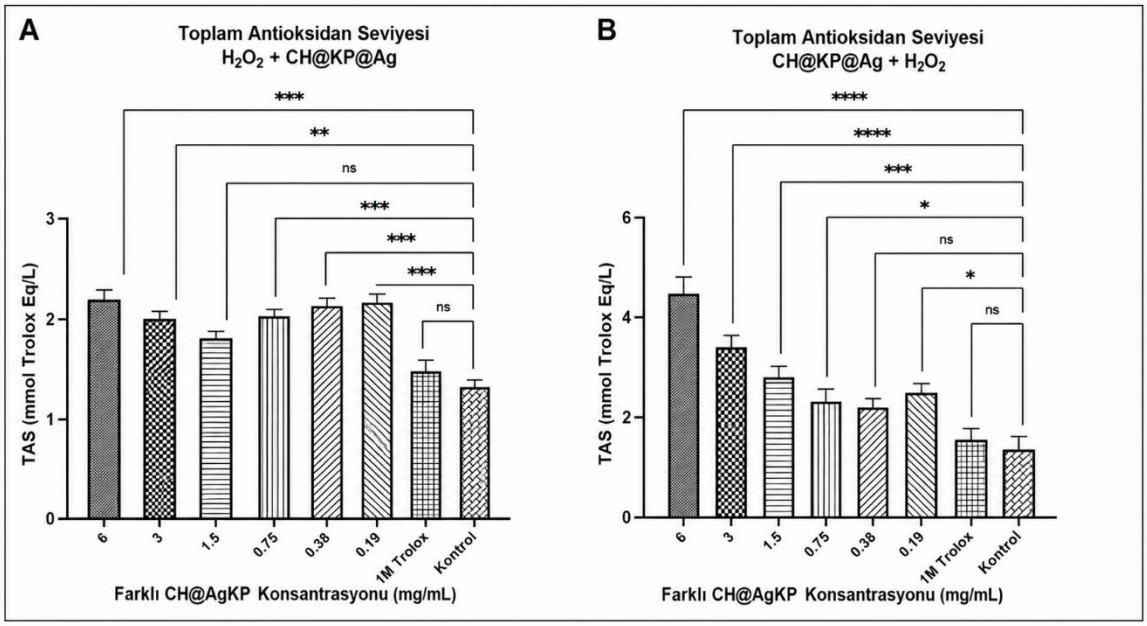
Şekil 4.10. Farklı KP@AgNP konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde toplam antioksidan seviyesi (TAS) üzerine etkisi. (A) Hücrelere 400 µM H_2O_2 uygulamasının ardından farklı konsantrasyonlarda KP@AgNP uygulanması sonucu elde edilen TAS düzeyleri. (B) Hücrelere öncelikle farklı konsantrasyonlarda KP@AgNP uygulanmasını takiben 400 µM H_2O_2 uygulanması sonucu belirlenen TAS düzeyleri. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (Mean ± SD) olarak verilmiştir (n = 3). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve uygun post-hoc testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *p <0,05; **p <0,01; ***p <0,001; ****p <0,0001; ns: istatistiksel olarak anlamlı değil

400 µM H_2O_2 + KP@AgNP uygulanan SH-SY5Y hücrelerinde elde edilen TAS sonuçları Şekil 4.8A'da gösterilmektedir. En yüksek TAS değeri 6 mg/mL KP@AgNP grubunda belirlenirken, konsantrasyonun azalmasına bağlı olarak TAS değerlerinde genel bir düşüş gözlenmiştir. Özellikle 6 mg/mL grubunun kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek TAS değerine sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,0001$). Buna karşılık 0,75, 0,38 ve 0,19 mg/mL grupları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (ns).

KP@AgNP + 400 µM H_2O_2 uygulanan grupta ise (Şekil 4.8B), en yüksek TAS değeri yine 6 mg/mL konsantrasyonunda elde edilmiş, konsantrasyon azaldıkça TAS seviyelerinde kademeli bir azalma gözlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre anlamlı artışlar belirlenirken, düşük konsantrasyonlarda bu etkinin azaldığı görülmüştür.

Her iki uygulama protokolü birlikte değerlendirildiğinde, KP@AgNP'nin SH-SY5Y hücrelerinde toplam antioksidan seviyesini konsantrasyona bağlı olarak artırdığı görülmektedir. Ayrıca nanopartikülün H_2O_2 uygulamasından önce verilmesiyle elde edilen TAS değerlerinin genel olarak daha yüksek olması, KP@AgNP'nin yalnızca tedavi edici değil aynı zamanda koruyucu antioksidan etki de gösterebildiğini düşündürmektedir.

CS@KP@Ag nanojelin SH-SY5Y hücrelerinde toplam antioksidan seviyesi (TAS) üzerine etkisine ait sonuçlar Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.11. Farklı CS@KP@Ag nanojel konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde toplam antioksidan seviyesi (TAS) üzerine etkisi. (A) Hücrelere 400 µM H_2O_2 uygulamasının ardından farklı konsantrasyonlarda CS@KP@Ag nanojel uygulanması sonucu elde edilen TAS düzeyleri. (B) Hücrelere öncelikle farklı konsantrasyonlarda CS@KP@Ag nanojel uygulanmasını takiben 400 µM H_2O_2 uygulanması sonucu belirlenen TAS düzeyleri Sonuçlar ortalama ± standart sapma (Mean ± SD) olarak verilmiştir (n = 3). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve uygun post-hoc çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; ns: istatistiksel olarak anlamlı değildir

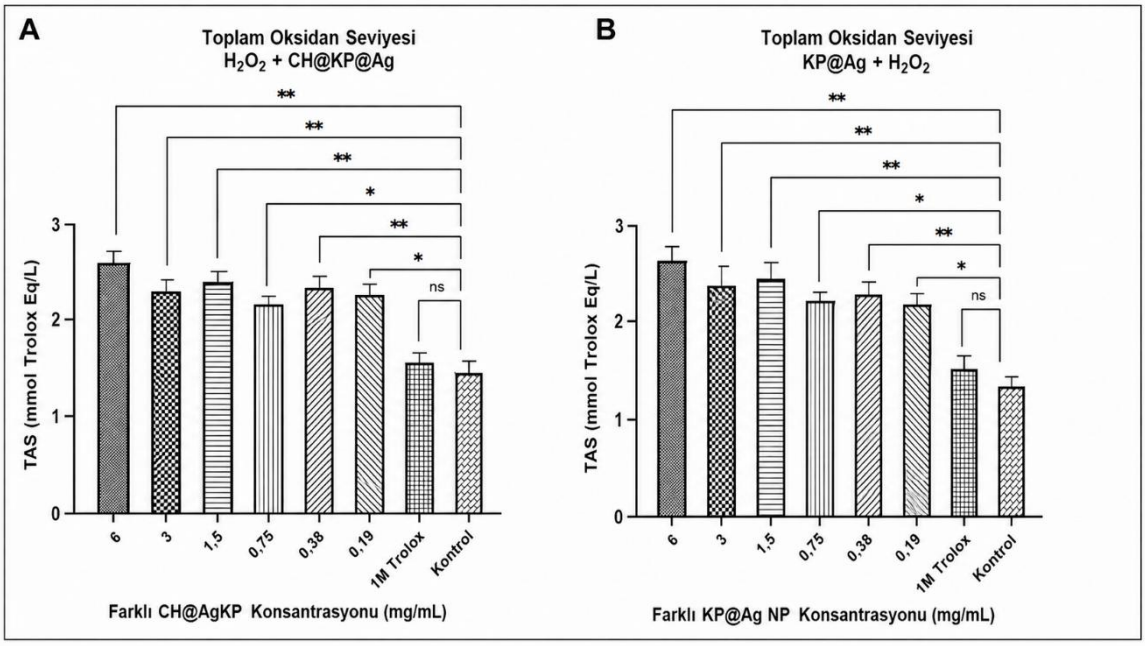
CS@KP@Ag + 400 µM H_2O_2 uygulanan grupta (Şekil 4.9A), en yüksek TAS değeri 6 mg/mL konsantrasyonunda belirlenmiştir. Konsantrasyonun azalmasıyla birlikte TAS değerlerinde kısmi bir azalma gözlenmiş, ancak 3 mg/mL, 1,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,38 mg/mL ve 0,19 mg/mL gruplarında birbirine yakın TAS değerleri elde edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda 6 mg/mL grubunun kontrol grubuna göre anlamlı farklılık

gösterdiği belirlenmiştir ($p<0,01$). Ayrıca 3 mg/mL ve 0,38 mg/mL gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı farklılık saptanırken ($p<0,05$), 0,75 mg/mL grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır (ns). Bu bulgular, nanojel uygulamasının farklı konsantrasyonlarda toplam antioksidan kapasiteyi koruyabildiğini ve yüksek konsantrasyonda bu etkinin daha belirgin olduğunu göstermektedir.

400 µM H_2O_2 + CS@KP@Ag uygulanan grupta ise (Şekil 4.9B), en yüksek TAS değerleri 0,38 mg/mL ve 0,19 mg/mL konsantrasyonlarında elde edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda 6 mg/mL, 3 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,38 mg/mL ve 0,19 mg/mL gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösterdiği belirlenirken (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,01$, $p<0,001$, $p<0,0001$ ve $p<0,001$), 1,5 mg/mL grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır (ns). Düşük konsantrasyonlarda daha yüksek TAS değerlerinin elde edilmesi, nanojel formülasyonunun kontrollü salım özelliği ve biyoyararlanımı artırıcı etkisiyle ilişkili olabilir. Kitosan matriksinin antioksidan bileşenlerin hücreyle etkileşimini düzenlemesi ve gümüş nanopartiküllerinin daha kontrollü şekilde salınmasını sağlaması, düşük konsantrasyonlarda dahi yüksek antioksidan kapasitenin korunmasına katkıda bulunmuş olabilir. Bu durum, nanojel formülasyonunun yalnızca taşıyıcı bir sistem olmadığını, aynı zamanda biyolojik etkinliği optimize eden bir platform olarak görev yapabileceğini düşündürmektedir.

4.6. Toplam Oksidan Seviyesi (TOS) Sonuçları

SH-SY5Y hücrelerinde toplam oksidan seviyesinin (TOS) belirlenmesi amacıyla Reel Assay (Gaziantep, Türkiye) Toplam Oksidan Seviye (TOS) kiti kullanılmıştır. KP@AgNP'nin oksidatif stres üzerindeki etkisi, 400 µM H_2O_2 + KP@AgNP ve KP@AgNP + 400 µM H_2O_2 olmak üzere iki farklı uygulama protokolü ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.10A ve 4.10B'de sunulmuştur.



Şekil 4.12. Farklı KP@AgNP konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde toplam oksidan seviyesi (TOS) üzerine etkisi. (A) Hücrelere 400 µM H_2O_2 uygulamasının ardından farklı konsantrasyonlarda KP@AgNP uygulanması sonucu belirlenen TOS düzeyleri. (B) Hücrelere öncelikle farklı konsantrasyonlarda KP@AgNP uygulanmasını takiben 400 µM H_2O_2 uygulanması sonucu elde edilen TOS düzeyleri. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (Mean ± SD) olarak verilmiştir (n = 3). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve uygun çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; ns: istatistiksel olarak anlamlı değildir

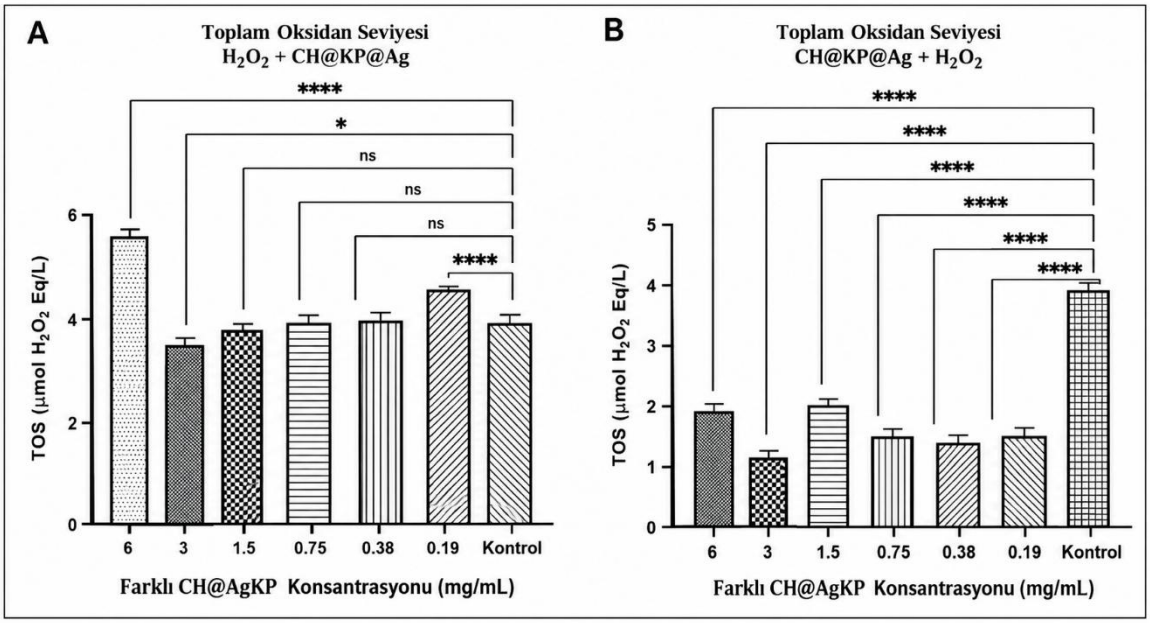
400 µM H_2O_2 + KP@AgNP uygulanan SH-SY5Y hücrelerine ait TOS sonuçları Şekil 4.10A'da gösterilmektedir. En düşük TOS değeri 6 mg/mL KP@AgNP grubunda belirlenmiştir. Konsantrasyonun azalmasına bağlı olarak TOS değerlerinde genel olarak artış gözlenmiş, en yüksek TOS değeri ise kontrol grubunda elde edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda 6 mg/mL grubunun kontrol grubuna göre ileri düzeyde anlamlı farklılık gösterdiği belirlenmiştir (****p<0,0001). Ayrıca 3 mg/mL (**p<0,001) ve 1,5 mg/mL (**p<0,01) gruplarında da anlamlı farklılık saptanırken, 0,75 mg/mL, 0,38 mg/mL ve 0,19 mg/mL gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı farklılık belirlenmemiştir (ns).

KP@AgNP + 400 µM H_2O_2 uygulanan SH-SY5Y hücrelerine ait TOS sonuçları Şekil 4.10B'de verilmiştir. En düşük TOS değeri yine 6 mg/mL grubunda belirlenmiş olup, bunu 3 mg/mL grubu izlemiştir. Konsantrasyonun azalmasıyla birlikte TOS seviyelerinde artış gözlenmiş ve en yüksek TOS değeri kontrol grubunda belirlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda 6 mg/mL, 3 mg/mL ve 1,5 mg/mL gruplarının kontrol grubuna göre ileri düzeyde anlamlı farklılık gösterdiği belirlenmiştir (****p<0,0001). Buna karşın 0,75

mg/mL grubunda anlamlı farklılık gözlenmezken (ns), 0,38 mg/mL ve 0,19 mg/mL gruplarında sırasıyla $p<0,01$ ve $*p<0,001$ düzeyinde anlamlı farklılık saptanmıştır.

Her iki uygulama protokolü birlikte değerlendirildiğinde, KP@AgNP uygulamasının SH-SY5Y hücrelerinde toplam oksidan seviyesini konsantrasyona bağlı olarak azalttığı görülmektedir. Özellikle 6 mg/mL konsantrasyonunda en düşük TOS değerlerinin elde edilmesi, nanopartiküllerin oksidatif yükün azaltılmasında daha etkili olduğunu göstermektedir. Buna karşılık düşük konsantrasyonlarda TOS düzeylerinin artış göstermesi, antioksidan etkinliğin doza bağlı olarak değişebileceğini düşündürmektedir. Elde edilen bu bulgular, TAS analizlerinde gözlenen yüksek antioksidan kapasite ile birlikte değerlendirildiğinde, KP@AgNP'nin SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stresin azaltılmasına katkı sağladığını desteklemektedir.

SH-SY5Y hücrelerinde CS@KP@Ag nanojelin toplam oksidan seviyesi (TOS) üzerine etkisi Reel Assay (Gaziantep, Türkiye) TOS kiti kullanılarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, 400 µM H_2O_2 + CS@KP@Ag ve CS@KP@Ag + 400 µM H_2O_2 uygulama grupları için sırasıyla Şekil 4.11A ve 4.11B'de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Farklı CS@KP@Ag nanojel konsantrasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde toplam oksidan seviyesi (TOS) üzerine etkisi. (A) Hücrelere 400 µM H_2O_2 uygulamasının ardından farklı konsantrasyonlarda CS@KP@Ag nanojel uygulanması sonucu belirlenen TOS düzeyleri. (B) Hücrelere öncelikle farklı konsantrasyonlarda CS@KP@Ag nanojel uygulanmasını takiben 400 µM H_2O_2 uygulanması sonucu elde edilen TOS düzeyleri. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (Mean ± SD) olarak verilmiştir (n = 3). İstatistiksel analiz tek yönlü ANOVA ve uygun post-hoc çoklu karşılaştırma testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; ns: istatistiksel olarak anlamlı değildir

400 µM H_2O_2 + CS@KP@Ag uygulanan grupta (Şekil 4.11A), en düşük TOS değeri 3 mg/mL konsantrasyonunda belirlenirken, bunu sırasıyla 1,5 mg/mL, 0,75 mg/mL ve 0,38 mg/mL grupları izlemiştir. 6 mg/mL ve 0,19 mg/mL gruplarında ise daha yüksek TOS değerleri elde edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda 6 mg/mL ve 3 mg/mL gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösterdiği belirlenirken (****p<0,0001 ve **p<0,01), 1,5 mg/mL, 0,75 mg/mL ve 0,38 mg/mL gruplarında anlamlı farklılık saptanmamıştır (ns). Ayrıca 0,19 mg/mL grubu ile kontrol grubu arasında ileri düzeyde anlamlı farklılık belirlenmiştir (****p<0,0001).

CS@KP@Ag + 400 µM H_2O_2 uygulanan grupta ise (Şekil 4.11B), en yüksek TOS değeri kontrol grubunda gözlenirken, nanojel uygulanan tüm gruplarda daha düşük TOS değerleri elde edilmiştir. Özellikle 3 mg/mL, 0,75 mg/mL, 0,38 mg/mL ve 0,19 mg/mL gruplarında benzer düzeyde düşük TOS değerleri belirlenmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda tüm deney gruplarının kontrol grubuna göre ileri düzeyde anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır (****p<0,0001).

CS@KP@Ag nanojel uygulaması genel olarak SH-SY5Y hücrelerinde toplam oksidan seviyesini kontrol grubuna kıyasla azaltmıştır. Özellikle nanojelin H_2O_2 uygulamasından önce uygulanması durumunda TOS düzeylerinin tüm konsantrasyonlarda düşük seyretmesi, nanojel formülasyonunun oksidatif strese karşı koruyucu bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Buna karşılık H_2O_2 sonrasında uygulanan grupta konsantrasyona bağlı farklılıkların daha belirgin olması, tedavi edici etkinliğin dozdan etkilenebileceğini göstermektedir. Bu bulgular, TAS sonuçları ile değerlendirildiğinde CS@KP@Ag nanojelin SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stresin azaltılmasına katkı sağlayabileceğini desteklemektedir.

TAS ve TOS analizleri birlikte değerlendirildiğinde, KP@AgNP ve CS@KP@Ag nanojel uygulamalarının SH-SY5Y hücrelerinde oksidan–antioksidan dengesini olumlu yönde etkilediği görülmektedir. Genel olarak toplam antioksidan seviyesinin (TAS) arttığı gruplarda toplam oksidan seviyesinin (TOS) azaldığı belirlenmiş olup, bu durum uygulamaların hücresel redoks homeostazının korunmasına katkı sağladığını göstermektedir. Özellikle yüksek konsantrasyondaki KP@AgNP uygulamalarında TAS değerlerinin artmasına paralel olarak TOS düzeylerinin azalması, yeşil sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin reaktif oksijen türlerini baskılayarak antioksidan savunmayı destekleyebildiğini bildiren güncel çalışmalarla uyumludur (Dhir ve ark., 2024).

CS@KP@Ag nanojel gruplarında ise bazı düşük konsantrasyonlarda dahi yüksek antioksidan etkinliğin korunması, kitosan bazlı nanojel sistemlerinin kontrollü salım sağlaması, biyouyumluluğu artırması ve aktif bileşenlerin hücrelerle daha uzun süre etkileşim kurmasına olanak tanımasıyla açıklanabilir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar, kitosan nanopartiküllerinin ve nanojel sistemlerinin SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stresi azaltarak antioksidan yanıtı güçlendirdiğini ve hücresel canlılığı desteklediğini göstermektedir (Canbolat et al., 2024).

Bunun yanında, H_2O_2 uygulamasından önce gerçekleştirilen KP@AgNP ve CS@KP@Ag nanojel uygulamalarında TOS düzeylerinin daha düşük, TAS düzeylerinin ise daha yüksek bulunması, sentezlenen formülasyonların yalnızca oluşmuş oksidatif hasarın azaltılmasında değil, aynı zamanda oksidatif strese karşı koruyucu hücresel yanıtın desteklenmesinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Nanoformülasyonların

kontrollü salım özellikleri ile antioksidan etkinliği birlikte değerlendirildiğinde, kitosan temelli taşıyıcı sistemlerin biyolojik etkinliği artırabildiği ve oksidatif stres kaynaklı hücresel hasarın sınırlandırılmasına katkı sağlayabildiği bildirilmektedir (Almukainzi et al., 2024).

Elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde, KP@AgNP ve CS@KP@Ag nanojel formülasyonlarının SH-SY5Y hücrelerinde oksidan–antioksidan dengesinin korunmasına katkı sağladığı, özellikle uygun konsantrasyonlarda uygulandığında toplam antioksidan kapasiteyi artırırken toplam oksidan seviyesini azaltabildiği görülmektedir. Bununla birlikte farklı konsantrasyonlarda gözlenen değişken yanıtlar, biyolojik etkinliğin uygulama dozu ve uygulama zamanına bağlı olarak değişebileceğini göstermekte olup, optimum uygulama koşullarının belirlenmesine yönelik ileri *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, kahve posası ekstraktı kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle gümüş nanopartiküllerinin (KP@AgNP) elde edilmesi, sentezlenen nanopartiküllerin kitosan-TPP esaslı nanojel sistemine yüklenmesi ve geliştirilen CS@KP@Ag formülasyonunun H_2O_2 ile oksidatif stres oluşturulan SH-SY5Y insan nöroblastoma hücreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda sentezlenen yapıların fizikokimyasal özellikleri çeşitli karakterizasyon yöntemleriyle incelenmiş; ayrıca hücre canlılığı, toplam antioksidan seviye (TAS) ve toplam oksidan seviye (TOS) analizleri ile biyolojik etkinlikleri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, kahve posası temelli yeşil sentez yaklaşımının gümüş nanopartikülü üretiminde başarıyla kullanılabildiğini ve sentezlenen nanopartiküllerin kitosan esaslı nanojel sistemine etkin bir şekilde entegre edilebildiğini göstermiştir.

Karakterizasyon analizlerinden elde edilen bulgular, KP@AgNP'nin yeşil sentez yöntemiyle başarılı bir şekilde üretildiğini ve CS@KP@Ag formülasyonunun istenilen yapısal özellikleri kazandığını ortaya koymuştur. UV-Vis analizlerinde gözlenen karakteristik yüzey plazmon rezonans bandı gümüş nanopartiküllerinin oluşumunu doğrulamış, FT-IR spektrumları ise kahve posası ekstraktında bulunan biyolojik aktif bileşiklerin nanopartikül sentezinde indirgeme ve stabilize edici ajan olarak görev aldığını göstermiştir. XRD analizlerinde elde edilen karakteristik kristalin pikler, gümüş nanopartiküllerinin yüzey merkezli kübik (FCC) kristal yapıya sahip olduğunu doğrularken, nanojel formülasyonunda gözlenen amorf karakter kitosan-TPP ağ yapısının başarılı şekilde oluştuğunu desteklemiştir. FESEM görüntülerinde nanopartiküllerin homojen dağılım göstermesi ve nanojel matriksi içerisinde korunması ile zeta potansiyeli analizlerinde belirlenen yüzey yükü değerleri, geliştirilen sistemin fiziksel olarak kararlı bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, bitki kaynaklı yeşil sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin biyolojik moleküller tarafından stabilize edildiğini ve kitosan esaslı nanojel sistemlerinin nanopartikül stabilitesini artırarak biyomedikal uygulamalar için uygun taşıyıcı sistemler oluşturduğunu bildiren çalışmalarla uyumludur (Arif et al., 2024; Ahsan et al., 2025; Al-Nemrawi et al., 2018).

H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif stres modelinde gerçekleştirilen hücre canlılığı analizleri, SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif hasarın konsantrasyona bağlı olarak arttığını ve oluşturulan modelin başarılı bir şekilde optimize edildiğini göstermiştir. Yapılan doz-cevap analizleri sonucunda belirlenen LD_{50} değerleri, KP@AgNP ve CS@KP@Ag formülasyonlarının biyolojik değerlendirmelerde kullanılabilecek uygun konsantrasyon aralıklarını ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, geliştirilen nanojel sisteminin hücresel uygulamalarda biyouyumlu bir platform oluşturduğunu ve biyolojik etkinliği desteklediğini göstermektedir. Bu sonuçlar, kitosan bazlı nanotaşıyıcı sistemlerin biyouyumluluğu artırabildiğini ve nanopartiküllerin biyolojik performansını iyileştirebildiğini bildiren güncel çalışmalarla paralellik göstermektedir (Gupta et al., 2024; Elizalde-Cárdenas et al., 2024).

Tablo 5.1 TAS Referans Değerleri ve Açıklamaları

Referans Değer	**Açıklama**
>2,00	Çok İyi
1,45 - 2,0	Normal
1,20 - 1,45	Normal Kabul Edilebilir
1,00-1,20	Düşük Antioksidan Seviyesi
<1,00	Çok Düşük Antioksidan Seviyesi

Bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde, KP@AgNP ve özellikle CS@KP@Ag uygulamalarının H_2O_2 ile oluşturulan oksidatif stres modelinde SH-SY5Y hücrelerinde oksidan–antioksidan dengenin korunmasına katkı sağladığı belirlenmiştir. Bulgular bölümünde sunulan Tablo 5.1'de yer alan TAS sonuçları, Rel Assay Diagnostics firmasının önerdiği değerlendirme indeksine göre değerlendirildiğinde deney gruplarının antioksidan kapasitesinin "çok iyi" düzeyde olduğu görülmektedir. Benzer şekilde Tablo 5.2'de verilen TOS sonuçları da "çok iyi" referans aralığında yer almakta olup hücrelerde oksidan yükünün düşük seviyede kaldığını göstermektedir. TAS ve TOS parametrelerinin birbirini destekleyen sonuçlar vermesi, geliştirilen formülasyonların oksidatif stresin baskılanmasında etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Tablo 5.2. TOS Referans Değerleri ve Açıklamaları

Referans Değer	Açıklama
<5,00	Çok İyi
5,00 - 8,00	Normal Değer
8,00 - 12,00	Yüksek Oksidan Seviyesi
>12,0	Çok Yüksek Oksidan Seviyesi

Çalışmanın en dikkat çekici bulgularından biri, KP@AgNP ve CS@KP@Ag gruplarının aynı nominal uygulama konsantrasyonlarında değerlendirilmesine rağmen nanojel formülasyonunun genel olarak daha yüksek biyolojik aktivite göstermesidir. Serbest KP@AgNP gruplarında uygulanan konsantrasyon doğrudan gümüş nanopartiküllerinden oluşurken, CS@KP@Ag gruplarında aynı toplam konsantrasyon nanojel matriksi ile uygulanmaktadır. Bu nedenle nanojel formülasyonunda hücrelerle doğrudan etkileşime giren gerçek gümüş nanopartikül miktarının serbest nanopartikül grubuna kıyasla daha düşük olabileceği değerlendirilmektedir. Buna rağmen nanojel grubunda daha yüksek hücre canlılığı ile daha yüksek TAS ve daha düşük TOS değerlerinin elde edilmesi, biyolojik etkinliğin yalnızca uygulanan nanopartikül miktarına değil, aynı zamanda nanopartikülün hücreye sunuluş şekline ve taşıyıcı sistem özelliklerine de bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, kitosan nanojel matriksinin nanopartiküllerin kolloidal kararlılığını artırması, hücre yüzeyi ile etkileşimini kolaylaştırması ve kahve posası ekstraktından nanopartikül yüzeyine taşınan biyolojik aktif bileşiklerin etkinliğinin korunmasına katkı sağlaması ile ilişkili olabilir. Dolayısıyla geliştirilen CS@KP@Ag formülasyonu, daha düşük miktarda serbest gümüş nanopartikülü ile benzer hatta daha yüksek biyolojik etkinlik oluşturabilme potansiyeli göstermiştir. Bu bulgu, çalışmanın en önemli özgün katkılarından biri olarak değerlendirilebilir.

Bununla birlikte, nanojel içerisindeki gerçek gümüş nanopartikül miktarı ve yükleme verimi bu çalışmada kantitatif olarak belirlenmemiştir. Bu nedenle gelecekte gerçekleştirilecek çalışmalarda ICP-OES veya ICP-MS gibi kantitatif yöntemlerle yükleme veriminin belirlenmesi, nanopartiküllerin hücresel alımının değerlendirilmesi ve gözlenen biyolojik etkinliğin mekanizmasının daha ayrıntılı olarak ortaya konulması yararlı olacaktır. Ayrıca ROS, SOD, CAT, GSH ve Nrf2/Keap1 gibi oksidatif stres yolaklarının moleküler düzeyde incelenmesi, elde edilen biyolojik etkinliğin mekanistik olarak açıklanmasına katkı sağlayacaktır. Nanojel sisteminin kontrollü salım özelliklerinin, uzun

dönem biyouyumluluğunun, kan-beyin bariyerini geçebilme potansiyelinin ve *in vivo* nörodejeneratif hastalık modellerindeki etkinliğinin araştırılması ise geliştirilen formülasyonun klinik uygulamalara aktarılabilirliğinin değerlendirilmesi açısından önemli olacaktır.

Genel olarak değerlendirildiğinde, kahve posası ekstraktı kullanılarak yeşil sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin kitosan-TPP esaslı nanojel sistemi ile birleştirilmesi sonucunda geliştirilen CS@KP@Ag formülasyonu, SH-SY5Y hücrelerinde oksidatif stresin azaltılmasına katkı sağlayan, antioksidan kapasiteyi destekleyen ve serbest nanopartikül uygulamasına kıyasla daha yüksek biyolojik etkinlik gösterebilen biyouyumlu bir nanotaşıyıcı sistem olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, yeşil sentezlenen gümüş nanopartiküllerinin uygun bir taşıyıcı sistem ile biyolojik etkinliğinin artırılabileceğini göstermekte olup, geliştirilen formülasyonun nörodejeneratif hastalıklara yönelik yeni nesil nanobiyoteknolojik yaklaşımlar için umut vadeden bir aday platform olabileceğini ortaya koymaktadır (Pramanik et al., 2024; Gupta et al., 2024; Roy et al., 2019).

KAYNAKLAR

Ahsan, A., Gao, G. F., and Tian, W.-X. (2025). Phytogenic silver nanoparticles derived from *Ricinus communis* and *Aloe barbadensis*: Synthesis, characterization, and evaluation of biomedical potential. *Bioengineering, 12*(11), Article 1273. https://doi.org/10.3390/bioengineering12111273.

Aibani, N., Rai, R., Patel, P., Cuddihy, G., and Wasan, E. K. (2021). Chitosan nanoparticles at the biological interface: implications for drug delivery. *Pharmaceutics*, *13*(10), 1686.

Almukainzi, M., El-Masry, T. A., El Zahaby, E. I., and El-Nagar, M. M. F. (2024). Chitosan/Hesperidin Nanoparticles for Sufficient, Compatible, Antioxidant, and Antitumor Drug Delivery Systems. *Pharmaceuticals*, *17*(8), 999. https://doi.org/10.3390/ph17080999

Akmaz, S., Dilaver Adıgüzel, E., Yasar, M., and Erguven, O. (2013). The effect of Ag content of the Chitosan-Silver nanoparticle composite material on the structure and antibacterial activity. *Advances in Materials Science and Engineering*, *2013*(1), 690918.

Ali, M. H., Azad, M. A. K., Khan, K. A., Rahman, M. O., Chakma, U., and Kumer, A. (2023). Analysis of crystallographic structures and properties of silver nanoparticles synthesized using PKL extract and nanoscale characterization techniques. *ACS Omega*, *8*(31), 28133.

Al-Nemrawi, N. K., Alsharif, S. S. M., and Dave, R. H. (2018). Preparation of chitosan-TPP nanoparticles: the influence of chitosan polymeric properties and formulation variables. *Int. J. Appl. Pharm*, *10*(5), 60-65.

Angeloni, S., Freschi, M., Marrazzo, P., Hrelia, S., Beghelli, D., Juan-García, A., Juan, C., Caprioli, G., Sagratini, G., and Angeloni, C. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory profiles of spent coffee ground extracts for the treatment of neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021*, 6620913. https://doi.org/10.1155/2021/6620913

Antsiferova, A. A., Kashkarov, P. K., & Koval'Chuk, M. V. (2022). Effect of different forms of silver on biological objects. *Nanobiotechnology Reports*, *17*(2), 155-164.

Arancibia-Díaz, A., Trujillo-Fernández, S., Astudillo-Castro, C., Vergara-Castro, M., Soto-Maldonado, C., Córdova, A., Zúñiga-Hansen, M. E., Vega-Letter, A. M., Fuentes, P., and Altamirano, C. (2026). Neuroprotective and antioxidant effects of fermented spent coffee ground fractions against Alzheimer's-related oxysterol 27-hydroxycholesterol in SH-SY5Y neuronal cells. *Food Chemistry, 517*, 149435. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2026.149435.

Arif, M., Raza, H., and Akhter, T. (2024). UV-Vis spectroscopy in the characterization and applications of smart microgels and metal nanoparticle-decorated smart microgels: a critical review. *RSC advances*, *14*(51), 38120-38134.

Arpa, M. D., and Akbuğa, F. J. (2025). Chitosan-Based Nanogels in Modern Drug Delivery: Focus on Protein and Gene Applications. *Gels*, *11*(9), 735.

Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., ve Yılmaz, B. (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü-Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *Medical Journal of Süleyman Demirel University*, *26*(3), 362-369.

Baş, F., ve Aksoy, B.H. (2024). Tarımsal Atıklardan Sürdürülebilir Malzeme Üretimi: Biyo-nano Karbon. Avrasya Tarım Araştırmaları Dergisi, 8(2), 183-191.

Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., and Mussatto, S. I. (2014). Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food and Bioprocess Technology, 7*, 3493–3503.

Başaran, R. (2024). *α-Kimotripsin ile Hazırlanan Gümüş Nanopartikülerin (Ag-CT) H202 ile İndüklenmiş SH-SY5Y Nöroblastoma Hücre Hattında Oksidatif Stres Parametrelerine Etkisinin İncelenmesi* (Master's thesis).

Berbeć, S., Żołądek, S., Kulesza, P. J., and Pałys, B. (2019). Silver nanoparticles stabilized by polyoxotungstates. Influence of the silver–Polyoxotungstate molar ratio on UV/Vis spectra and SERS characteristics. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, *854*, 113537.

Betts, H. D., Whitehead, C., and Harris, H. H. (2021). Silver İn Biology and Medicine: Opportunities For Metallomics Researchers. *Metallomics*, *13*(1).

Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., and Jackson-Lewis, V. R. (2015). Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, *9*, 91.

Buzea, C., Pacheco, I. I., and Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases, 2*(4), MR17–MR71. https://doi.org/10.1116/1.2815690.

Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., Vergara-Castañeda, H. A., and Oomah, B. D. (2015). Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology, 45*(1), 24–36.

Canbolat, F., Demir, N., Yayıntas, O. T., Pehlivan, M., Eldem, A., Ayna, T. K., and Senel, M. (2024). Chitosan nanoparticles loaded with quercetin and valproic acid: a novel

approach for enhancing antioxidant activity against oxidative stress in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Biomedicines*, *12*(2), 287.

Chang, K. H., and Chen, C. M. (2020). The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Antioxidants*, *9*(7), 597.

Chavali, M. S., and Nikolova, M. P. (2019). Metal oxide nanoparticles and their applications in nanotechnology: MS Chavali, MP Nikolova. *SN Applied Sciences*, 1(6), 607.

Chien, H. W., Kuo, C. J., Kao, L. H., Lin, G. Y., and Chen, P. Y. (2019). Polysaccharidic spent coffee grounds for silver nanoparticle immobilization as a green and highly efficient biocide. *International Journal of Biological Macromolecules*, *140*, 168-176.

Clementi, M.E., Lazzarino, G., Sampaolese, B., Brancato, A., and Tringali, G. (2019). DHA protects PC12 cells against oxidative stress and apoptotic signals through the activation of the NFE2L2/HO-1 axis. *International Journal of Molecular Medicine*, 43, 2523-2531. https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4170

Clifford, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates–nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*(3), 362-372.

D'Egidio, F., Qosja, E., Ammannito, F., Topi, S., d'Angelo, M., Cimini, A., and Castelli, V. (2025). Antioxidant and anti-inflammatory defenses in Huntington's disease: roles of NRF2 and PGC-1α, and therapeutic strategies. *Life*, *15*(4), 577.

Dahran, N., Othman, M. S., Mumtaz, F., Aleid, G. M., Ghoniem, M. E., Samak, M. A., and Moneim, A. E. A. (2025). Caffeine-boosted silver nanoparticles target breast cancer cells by triggering oxidative stress, inflammation, and apoptotic pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103802.

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 Paiva Pinheiro, S. K., Rangel Miguel, T. B. A., Chaves, M. D. M., Barros, F. C. D. F., Farias, C. P., de Moura, T. A., and de Castro Miguel, E. (2021). Silver nanoparticles (AgNPs) internalization and passage through the Lactuca sativa (Asteraceae) outer cell wall. *Functional Plant Biology*, 48(11), 1113-1123.

Dhir, R., Chauhan, S., Subham, P., Kumar, S., Sharma, P., Shidiki, A., and Kumar, G. (2024). Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles: unlocking their pharmacological

potential–a comprehensive review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *11*, 1324805.

Drabczyk, A., Kudłacik-Kramarczyk, S., Jamroży, M., and Krzan, M. (2024). Biomaterials in drug delivery: advancements in cancer and diverse therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(6), 3126.

Duman, H., Eker, F., Akdaşçi, E., Witkowska, A. M., Bechelany, M., and Karav, S. (2024). Silver nanoparticles: A comprehensive review of synthesis methods and chemical and physical properties. *Nanomaterials*, *14*(18), 1527.

Echave, J., Fraga-Corral, M., Pereira, A. G., Soria-Lopez, A., Barral, M., Chamorro, F. and Prieto, M. A. (2023). Valorization of food waste biomass and biomaterials from a circular economy approach. *Sustainable Development and Pathways for Food Ecosystems*, 183-226.

Elizalde-Cárdenas, A., Ribas-Aparicio, R. M., Rodríguez-Martínez, A., et al. (2024). Advances in chitosan and chitosan derivatives for biomedical applications in tissue engineering: An updated review. *International Journal of Biological Macromolecules,* 262, 129999. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129999.

Erekat, N. S. (2018). Apoptosis and its Role in Parkinson's Disease. *Exon Publications*, 65-82.

Exner, N., Lutz, A. K., Haass, C., and Winklhofer, K. F. (2012). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: molecular mechanisms and pathophysiological consequences. *The EMBO journal*, *31*(14), 3038-3062.

Farah, A., and Donangelo, C. M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology, 18*(1), 23–36.

Feynman, R. P. (2011). There's plenty of room at the bottom. Resonance: Journal of Science Education, *16*(9), 890–905. https://doi.org/10.1007/s12045-011-0109-x (openurl.ebsco.com

Florian J. H. and Markus N., (2013), The Fascinating World Of Nanoparticle Research, Materials Today, Volume 16, Issues 7–8, 262-271, https://doi.org/10.1016/j.mattod.2013.07.004.

Franca, A. S., and Oliveira, L. S. (2022). Potential Uses of Spent Coffee Grounds in the Food Industry. *Foods*, *11*(14), 2064. https://doi.org/10.3390/foods11142064.

Gupta, P., Sharma, S., Jabin, S., and Jadoun, S. (2024). Chitosan nanocomposite for tissue engineering and regenerative medicine: A review. *International Journal of Biological Macromolecules,* 254, 127660. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127660

Güçlü, E., and Ayan, İ. Ç. (2023). Apigenin-7-glucoside attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress and neuronal death in SH-SY5Y cells via activation of antioxidant enzymes system and inhibition of caspases genes expression. *Genel Tıp Dergisi*, *33*(2), 162-168.

He, J., Zhu, G., Wang, G., and Zhang, F. (2020). Oxidative stress and neuroinflammation potentiate each other to promote progression of dopamine neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2020*(1), 6137521.

Heleno, S. A., Martins, A., Queiroz, M. J. R., and Ferreira, I. C. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chemistry*, *173*, 501-513.

Hussain, I., Singh, N. B., Singh, A., Singh, H., and Singh, S. C. (2016). Green synthesis of nanoparticles and its potential application. *Biotechnology letters*, *38*(4), 545-560.

Iacob, A. T., Lupascu, F. G., Apotrosoaei, M., Vasincu, I. M., Tauser, R. G., Lupascu, D., and Profire, L. (2021). Recent biomedical approaches for chitosan based materials as drug delivery nanocarriers. *Pharmaceutics*, *13*(4), 587.

Jain. V. (2024) Nanogels: A Novel Approach to Drug Delivery Challenges. J Nanomedicine Biotherapeutic Discov. 14:257.

Jiménez-Jiménez, F. J., Alonso-Navarro, H., García-Martín, E., Cárcamo-Fonfría, A., Caballero-Muñoz, M. D. M., and Agúndez, J. A. (2025). Oxidative Stress in Huntington's Disease. *Biomolecules*, *15*(4), 527.

Joshi, D. C., Chavan, M. B., Gurow, K., Gupta, M., Dhaliwal, J. S., and Ming, L. C. (2025). The role of mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: implications for therapeutic targeting. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *183*, 117827.

Joudeh, N., and Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of nanobiotechnology*, *20*(1), 262.

Juan, C. A., Pérez de la Lastra, J. M., Plou, F. J., and Pérez-Lebeña, E. (2021). The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4642.

Kang, H., Buchman, J. T., Rodriguez, R. S., Ring, H. L., He, J., Bantz, K. C., and Haynes, C. L. (2019). Stabilization of silver and gold nanoparticles: Preservation and improvement of plasmonic functionalities. *Chemical Reviews, 119*(1), 664–699. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00341.

Khan, I., Saeed, K., and Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry, 12*(7), 908–931. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011 (sciencedirect.com)

Kocacenk, T. (2016). *Psoriasis Hastalarında Oksidatif Stres ve Enflamatuar Yanıtın Psikiyatrik Komorbidite ve Bilişsel İşlevlerle İlişkisi* (Doctoral dissertation, Bezmialem Vakif University (Turkey).

La Scalia, G., Saeli, M., Miglietta, P. P., and Micale, R. (2021). Coffee biowaste valorization within circular economy: an evaluation method of spent coffee grounds potentials for mortar production. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, *26*(9), 1805-1815.

Lamarra, J., Damonte, L., Rivero, S., and Pinotti, A. (2018). Structural insight into chitosan supports functionalized with nanoparticles. *Advances in Materials Science and Engineering*, *2018*(1), 3965783.

Larrosa, M., González-Sarrías, A., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. A., and Espín, J. C. (2006). Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(5), 1611-1620.

Lee, S. H., and Jun, B.-H. (2019). Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences, 20*(4), 865. https://doi.org/10.3390/ijms20040865.

Leyva-López, N., Peraza-Arias, M., Avalos-Soriano, A., Hernández, C., Lizárraga-Velázquez, C. E., and Heredia, J. B. (2021). Polyphenolic extracts from spent coffee grounds prevent H_2O_2-induced oxidative stress in Centropomus viridis brain cells. *Molecules*, *26*(20), 6195.

Martínez-Cisterna, D., Chen, L., Bardehle, L., Hermosilla, E., Tortella, G., Chacón-Fuentes, M., and Rubilar, O. (2025). Chitosan-coated silver nanocomposites: biosynthesis, mechanical properties, and Ag+ release in liquid and biofilm forms. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(9), 4130.

Meyer, H. P. (2011). Sustainability and biotechnology. *Organic Process Research & Development*, *15*(1), 180-188.

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.

Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., and Teixeira, J. A. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, *83*, 173-179.

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.

Olufunmilayo, E. O., Gerke-Duncan, M. B., and Holsinger, R. D. (2023). Oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative disorders. *Antioxidants*, *12*(2), 517.

Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., ve Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, *6*(3), 331-336.

Park, J. J., and Faustman, E. M. (2025). Silver nanoparticle (AgNP), neurotoxicity, and putative adverse outcome pathway (AOP): A review. *Neurotoxicology*, *108*, 11-27.

Parveen, K., Banse, V., & Ledwani, L. (2016, April). Green synthesis of nanoparticles: Their advantages and disadvantages. In *AIP conference proceedings* (Vol. 1724, No. 1, p. 020048). AIP Publishing LLC.

Prabaharan, M., and Mano, J. F. (2004). Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug delivery*, *12*(1), 41-57.

Pramanik, S., Aggarwal, A., Kadi, A., Alhomrani, M., Alamri, A. S., Alsanie, W. F., Koul, K., Deepak, A., and Bellucci, S. (2024). *Chitosan alchemy: Transforming tissue engineering and wound healing*. *RSC Advances, 14*, 19219–19256. https://doi.org/10.1039/D4RA01594K.

Rabbi, M. B. U., Haque, S., and Bedoura, S. (2024). Advancements in synthesis, immobilization, characterization, and multifaceted applications of silver nanoparticles: A comprehensive review. *Heliyon*, *10*(24).

Reiner, A., Dragatsis, I., and Dietrich, P. (2011). Genetics and neuropathology of Huntington's disease. *International review of neurobiology*, *98*, 325-372.

Roco, M. C. (2003). Nanotechnology: Convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology, 14*(3), 337–346. https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00068-5.

Roy, A., Bulut, O., Some, S., Mandal, A. K., and Yilmaz, M. D. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles: Biomolecule–nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Advances, 9*(5), 2673–2702. https://doi.org/10.1039/C8RA08982E.

Saputra, H. A. (2025). Chitosan and its biomedical applications: A review. *Next Materials*, *9*, 101270.

Sati, A., Mali, S. N., Ranade, T. N., Yadav, S., and Pratap, A. (2025). Silver Nanoparticles (AgNPs) as a Double-Edged Sword: Synthesis, Factors Affecting, Mechanisms of Toxicity and Anticancer Potentials—An Updated Review till March 2025. *Biological Trace Element Research*, 1-52.

Saygı, K. O., Böke, E., Erenler, R., Kacmaz, B., and Ergene, A. (2025). Characterization and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Obtained by Green Synthesis from Cuminum cyminum (Cumin). *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, *13*(6), 1597-1604.

Schneider, L., Giordano, S., Zelickson, B. R., Johnson, M. S., Benavides, G. A., Ouyang, X., and Zhang, J. (2011). Differentiation of SH-SY5Y cells to a neuronal phenotype changes cellular bioenergetics and the response to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, *51*(11), 2007-2017.

Shariatinia, Z. (2019). Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in Colloid and İnterface science*, *263*, 131-194.

Shehabeldine, A. M., Salem, S. S., Ali, O. M., Abd-Elsalam, K. A., Elkady, F. M., and Hashem, A. H. (2022). Multifunctional silver nanoparticles based on chitosan: Antibacterial, antibiofilm, antifungal, antioxidant, and wound-healing activities. *Journal of Fungi*, *8*(6), 612.

Sikder, M. M., Li, X., Akumwami, S., and Labony, S. A. (2025). Reactive Oxygen Species: Role in Pathophysiology, and Mechanism of Endogenous and Dietary Antioxidants during Oxidative Stress. *Chonnam Medical Journal*, *61*(1), 32.

Singh, A., Kukreti, R., Saso, L., and Kukreti, S. (2019). Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*, *24*(8), 1583.

Soni, K. S., Desale, S. S., and Bronich, T. K. (2016). Nanogels: An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation. *Journal of Controlled Release*, *240*, 109-126.

Sur-Erdem, I., Muslu, K., Pınarbası, N., Altunbek, M., Seker-Polat, F., Cingöz, A., and Bagcı-Önder, T. (2020). TRAIL-conjugated silver nanoparticles sensitize glioblastoma cells to TRAIL by regulating CHK1 in the DNA repair pathway. *Neurological Research*, *42*(12), 1061-1069.

Teleanu, D. M., Niculescu, A. G., Lungu, I. I., Radu, C. I., Vladâcenco, O., Roza, E., and Teleanu, R. I. (2022). An overview of oxidative stress, neuroinflammation, and neurodegenerative diseases. *International journal of molecular sciences*, *23*(11), 5938.

Tripathy, S., Rodrigues, J., and Shimpi, N. G. (2023). Top-down and Bottom-up Approaches for Synthesis of Nanoparticles. *Nanobiomaterials Perspect. Med. Appl. Diagn. Treat. Dis*, *145*, 92-130.

Trivedi, M. K., Branton, A., Trivedi, D., Nayak, G., Bairwa, K., and Jana, S. (2015). Physicochemical and spectroscopic characterization of biofield treated triphenyl phosphate. *American Journal of Applied Chemistry*, *3*(5), 168-173.

Venkatesham, M., Ayodhya, D., Madhusudhan, A., Veera Babu, N., and Veerabhadram, G. (2014). A novel green one-step synthesis of silver nanoparticles using chitosan: catalytic activity and antimicrobial studies. *Applied Nanoscience*, *4*(1), 113-119.

Yang, H., Niu, S., Guo, M., and Xue, Y. (2024). Molecular mechanisms of silver nanoparticle-induced neurotoxic injury and new perspectives for its neurotoxicity studies: a critical review. *Environmental Pollution*, *362*, 124934.

Yildirim, H., Enez, B., and Duman, S. (2025). Superior hydrogen production during sodium borohydride methanolysis using monodisperse copper nanoparticles grafted on the peptidoglycan layer of Bacillus atrophaeus bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, *301*, 140378.

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.

Yusufoğlu, B., Kezer, G., Wang, Y., Ziora, Z. M., and Esatbeyoglu, T. (2024). Bio-recycling of spent coffee grounds: Recent advances and potential applications. *Current Opinion in Food Science*, *55*, 101111

Zabaniotou, A., and Kamaterou, P. (2019). Food waste valorization advocating Circular Bioeconomy-A critical review of potentialities and perspectives of spent coffee grounds biorefinery. *Journal of cleaner production*, *211*, 1553-1566.

Zengin, G., Sinan, K. I., Mahomoodally, M. F., Angeloni, S., Mustafa, A. M., Vittori, S., and Caprioli, G. (2020). Chemical composition, antioxidant and enzyme inhibitory properties of different extracts obtained from spent coffee ground and coffee silverskin. *Foods*, *9*(6), 713.

Zhang, X., Cui, J., Sun, J., Wang, F., Fan, B., and Lu, C. (2025). Neuroprotective Effects and Mechanisms of Arecoline Against H_2O_2-Induced Damage in SH-SY5Y Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(21), 10355.