

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CİMİN ÜZÜM YAPRAĞI KULLANILARAK YEŞİL SENTEZ
YÖNTEMİYLE ELDE EDİLEN GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLÜNÜN
GENOTOKSİK ETKİSİNİN KANAT BENEK TESTİ İLE
BELİRLENMESİ

Gürhan BAYĞU

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Deniz ALTUN ÇOLAK

BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN
2020
Her Hakkı Saklıdır.

Bilimsel Etiğe Uygunluk Sayfası

“Cimin Üzüm Yapradı Kullanılarak Yeşil Sentez Yöntemiyle Elde Edilen Gümüş Nanopartiküllerinin Genotoksik Etkisinin Kanat Benek Testi ile Belirlenmesi” isimli “Yüksek Lisans” tezini tarafımda intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim.19/08/2020



Gürhan BAYĞU



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

CİMİN ÜZÜM YAPRAĞI KULLANILARAK YEŞİL SENTEZ YÖNTEMİYLE ELDE EDİLEN GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLÜNÜN GENOTOKSİK ETKİSİNİN KANAT BENEK TESTİ İLE BELİRLENMESİ

Gürhan BAYĞU

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Deniz ALTUN ÇOLAK

Günümüzde nanopartiküllerin bitki özleri ile biyosentezi çok önemli bir araştırma alanı olmuştur. Yeşil sentez, hem üretimde maliyet azalması hem de çevre dostu yaklaşım nedeniyle diğer sentez yöntemlerinden bir adım öndedir. Bu nedenlerle araştırmamızda kullanılan gümüş nanopartikülünün eldesi için doğa dostu yeşil sentez yöntemi seçilmiştir. Bu çalışmada öncelikle gümüş nanopartiküller (AgNP(b)), UV-Vis spektroskopisi, X-ışını kırınımı (XRD), taramalı elektron mikroskopisi (SEM), enerji dağılım X-ışını spektrometresi (EDX) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile karakterize edilmiştir. Sonraki aşamada, kimyasal olarak üretilmiş gümüş nanopartiküller (AgNP(k)) ile Cimin üzüm yaprağı kullanılarak yeşil sentez metodu ile elde edilen gümüş nanopartiküllerin (AgNP(b)) *Drosophila melanogaster*'in transheterozigot larvaları üzerinde olası toksik ve genotoksik etkileri araştırılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla, resesif *flare* (*flr*³) ve *multiple wing hair* (*mwh*) belirleyici genlerini üçüncü kromozomlarında taşıyan 72±4 saatlik larvalar kullanılmıştır. Larvalar, farklı konsantrasyonlarda (1,25; 2,5 ve 5 mg/mL) AgNP içeren besin ortamına alınarak kronik olarak beslenmiştir. AgNP'lerin genotoksik etkileri, uygulama sonunda larvalardan çıkan sineklerin kanat imajinal disk hücrelerindeki genetik değişimler (mitotik rekombinasyon, ayrılmama, delesyon ve nokta mutasyon) sonucunda oluşan mutant trikomlara göre değerlendirilmiştir. Mutant klon değerlendirmeleri, küçük tek tip, büyük tek tip ve ikiz klon sınıflandırmaları esas alınarak yapılmıştır. Somatik mutasyon ve rekombinasyon test yöntemiyle yeşil sentez ile elde edilen AgNP'nin genotoksik etkili olmadığı belirlenmiştir.

2020, 83 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Cimin üzümü, *Drosophila melanogaster*, Genotoksisite, Gümüş nanopartikülü, Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi, Yeşil sentez

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF GENOTOXIC EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES OBTAINED FROM GREEN SYNTHESIS METHOD USING CIMIN GRAPE LEAF BY WING SPOT TEST

Gürhan BAYĞU

Erzincan Binali Yıldırım University
Institute of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Deniz ALTUN ÇOLAK

Nowadays biosynthesis of nanoparticles by plant extracts has been a very important research area. Green synthesis is one step ahead of other synthesis methods due to both cost reduction in production and environmentally friendly approach. For these reasons, the nature-friendly green synthesis method was chosen for the silver nanoparticle used in our research. The synthesized silver nanoparticles were characterized by Uv-Vis spectrophotometry, energy-dispersive X-ray diffractometer (XRD), scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-Ray spectroscopy and Fourier transforms infrared spectroscopy (FTIR). In the next step, we tried to investigate the possible toxic and genotoxic effects of chemically produced silver nanoparticles (AgNP_(k)) and silver nanoparticles (AgNP_(b)) obtained by the green synthesis method on the transheterozygous larvae of *Drosophila melanogaster*. For this purpose, 72 ± 4 hour larvae were used, which carried the recessive *flare* (*flr*³) and *multiple wing hair* (*mwh*) determinant genes in their third chromosomes. The larvae were chronically fed into the nutrient medium containing AgNPs at different concentrations (1,25; 2,5 and 5 mg/mL). The genotoxic effects of AgNPs were evaluated according to the mutant trichomes formed as a result of genetic changes (mitotic recombination, non-separation, deletion, and point mutation) development of the wing imaginal discs. Mutant clone evaluations were made based on small single spots, large single spots, and twin spots classifications. It was determined that AgNP obtained by green synthesis by somatic mutation and recombination test method is not genotoxic.

2020, 83 Pages

Keywords: Cimin grape, *Drosophila melanogaster*, Genotoxicity, Green synthesis, Somatic Mutation and Recombination Test

TEŐEKKÖR

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu alıŐma, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvar'nda gerçekleştirilmiŐ olup FYL-2019-613 numaralı proje kapsamında Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiŐtir.

Yüksek lisans eğitim dönemimde tecrübe ve birikimleri ile her zaman destek olan, yol gösteren değerli Yüksek Lisans eğitim danıŐmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Deniz ALTUN ÇOLAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Bilgi ve birikimlerinden faydalandığım fakültemizin değerli akademisyen ve öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Her zaman ve her yerde desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve yanımda olan canım eŐim Fatma Özlem BAYĐU'ya, bana mutluluk ve enerji kaynağı olan biricik kızlarım Elif Gökçe BAYĐU ve Gülce Buğlem BAYĐU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Gürhan BAYĐU

Ağustos, 2020

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	11
2.1. Materyal11	
2.1.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar	11
2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	11
2.1.3. <i>Vitis vinifera</i> (L.).....	12
2.1.4. <i>Drosophila melanogaster</i> (Meigen).....	13
2.1.4.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in sistematikteki yeri.....	14
2.1.4.2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in gelişim biyolojisi	15
2.2. Yöntem 21	
2.2.1. <i>Vitis vinifera</i> spp., Cimin temini ve yeşil sentez yöntemi ile nanopartikül eldesi	21
2.2.1.1. <i>Vitis vinifera</i> spp., Cimin temini ve ekstraksiyonu	21
2.2.1.2. Yeşil sentez yöntemi ile AgNP eldesi.....	22
2.2.1.3. AgNP konsantrasyonlarının belirlenmesi ve yaşama yüzdesi deneyleri ..	22
2.2.2. AgNP'nin morfolojik karakterizasyonu	23
2.2.2.1. Ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisi (UV-Vis) analizi.....	23
2.2.2.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Enerji dağılım X-ışını spektrometre (EDX) analizi	24
2.2.2.3. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR) analizi.....	26
2.2.2.4. X-Işını kırınımı (XRD) analizi.....	27
2.2.3. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART).....	28
2.2.3.1. Kanat benek testi.....	28
2.2.3.2. Çaprazlama için birey seçimi.....	31

2.2.3.3. Deney gruplarına AgNP'lerin uygulanması.....	32
2.2.3.4. Ergin birey toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması	33
2.2.3.5. Kanat preparatlarının mikroskopta incelenmesi	33
2.2.3.6. Klon indüksiyon frekansının hesaplanması	34
2.2.3.7. Kanat benek testi sonuçlarının istatistiksel analizi	35
2.2.3.8. Mikrofotoğrafi.....	35
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	36
3.1. AgNP _(b) Nanopartikülünün Karakterizasyonu	36
3.1.1. UV-Vis spektroskopisi.....	36
3.1.2. SEM ve EDX analizleri	37
3.1.3. FT-IR analizleri.....	39
3.1.4. XRD analizleri	39
3.2. Yaşama Yüzdesi (Larval Mortalite) Deneilerine Ait Bulgular.....	40
3.3. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi Bulguları	42
3.3.1. Distile su ve EMS'nin genotoksik etkilerinin araştırılması	46
3.3.2. AgNP _(k) ve AgNP _(b) uygulamaları sonucu elde edilen bulgular	49
4. SONUÇ VE TARTIŞMA	54
KAYNAKLAR	66
EKLER	83
Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar.....	84
ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Nanopartikül sentezleme yöntemleri	4
Şekil 1.2. Metalik nanopartiküller.....	5
Şekil 1.3. Gümüş nanopartikülleri (AgNP).....	7
Şekil 2.1. <i>Vitis vinifera</i> L. meyve ve yaprakları.....	13
Şekil 2.2. <i>Drosophila melanogaster</i>	14
Şekil 2.3. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in yaşam döngüsü	16
Şekil 2.4. İmajinal disk hücrelerinin larvadaki konumları.....	17
Şekil 2.5. <i>Drosophila</i> dişi ve erkek türleri	19
Şekil 2.6. Üçüncü kromozom üzerindeki belirleyici genlerin dizilişi.....	20
Şekil 2.7. <i>flr³/TM3, Bd^S</i> türlerdeki homozigot letal etkileri.....	20
Şekil 2.8. Normal ve serrat kanat	21
Şekil 2.9. UV-Vis spektrofotometresi	24
Şekil 2.10. Taramalı elektron mikroskobu ve enerji dağılım X-ışını spektrometresi	26
Şekil 2.11. FT-IR spektrometre.....	27
Şekil 2.12. X-ışını difraktometresi	28
Şekil 2.13. <i>Drosophila melanogaster</i> 'e ait farklı klon türleri.....	30
Şekil 2.14. <i>D. melanogaster</i> 'de SMART uygulanmasının şematik gösterimi	32
Şekil 2.15. Kanat trikomlarının görünüşleri	34
Şekil 3.1. AgNP _(b) 'lerin UV-Vis spektrumu	37
Şekil 3.2. AgNP _(b) 'lerin SEM görüntü ve EDX'leri	38
Şekil 3.3. AgNP _(b) 'lerin FT-IR analizleri	39
Şekil 3.4. AgNP _(b) 'lerin XRD görüntüleri	40
Şekil 3.5. <i>D. melanogaster</i> 'de larval mortalite oranları.....	42
Şekil 3.6. Normal bireydeki kanat kıllarının ışık mikroskobundaki görüntüsü	43
Şekil 3.7. <i>mwh/mwh</i> hattına ait kanat kıllarının ışık mikroskobundaki görüntüsü	43
Şekil 3.8. Küçük tek tip <i>mwh</i> mutant klonların ışık mikroskobundaki görüntüsü.....	44
Şekil 3.9. Büyük tek tip <i>mwh</i> klonların ışık mikroskobundaki görüntüsü	44
Şekil 3.10. Büyük tek tip <i>flr³</i> mutant klonların ışık mikroskobundaki görüntüsü	45
Şekil 3.11. İkiz klonların ışık mikroskobundaki görüntüsü	45
Şekil 3.12. Kontrol grubu (<i>mwh/flr³</i>) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları.....	46

- Şekil 3.13. Kontrol grubu (*mwh/TM3*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplarına ait klon frekansları.....47
- Şekil 3.14. AgNP_(k) ve AgNP_(b) kullanılan uygulama grubu (*mwh/flr³*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplarına ait klon frekansları.....50
- Şekil 3.15. AgNP_(k) ve AgNP_(b) kullanılan uygulama grubu (*mwh/TM3*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplarına ait klon frekansları.....52



TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Çalışmalarda kullanılan cihazlar.....	11
Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar	12
Tablo 3.1. AgNP(k) ve AgNP(b) uygulanan <i>D. melanogaster</i> 'in 72±4 saatlik transheterozigot larvalarında yaşama yüzdesi (larval mortalite) oranları	41
Tablo 3.4. Distile su ve EMS'nin <i>D. melanogaster</i> 'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri	48
Tablo 3.5. AgNP _(k) ve AgNP _(b) 'nin <i>D. melanogaster</i> 'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
(i)	Önemsiz fark
°	Derece
♀	Dişi
♂	Erkek
C	Santigrat
cc	Santimetreküp (= mililitre)
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
Ha	Alternatif hipotez
Ho	Orijinal hipotez
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
X	Çaprazlama
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar

Kısaltmalar

Ag	Gümüş (element)
AgNp	Gümüş nanopartikülü
AgNP _(b)	Biyolojik (yeşil sentezle elde edilmiş) gümüş nanopartikülü
AgNP _(k)	Kimyasal (sentetik) gümüş nanopartikülü
ANOVA	Varyans analizi
<i>Bd^s</i>	Beaded serrat
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDX	Enerji dağılım X-ışını spektrometre
EMS	Etil metansülfonat
<i>flr³</i>	<i>Flare³</i> geni
FT-IR	Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi
ION	Demir oksit nanopartikülü
LD ₅₀	Canlıların %50'sini öldüren letal doz
LDH	Laktat dehidrogenaz
MNP	Manyetik (metal) nanopartikül
<i>mwh</i>	Çoklu kanat kılı geni
NP	Nanopartikül
ROT	Reaktif oksijen türleri
SDB	Standart <i>Drosophila</i> besiyeri
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SMART	Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi
SPSS	Statistical package for social sciences
<i>TM3</i>	Dengeleyici kromozom
UV-Vis	UV- görünür bölge spektroskopisi
XRD	X- ışını kırınımı

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, 1- 100 nm büyüklüğünde nano ölçekli parçacıkların karakterizasyonu, üretimi ve uygulaması için bilimsel bir alandır. Teknolojik olarak maddeye atom ve molekül seviyesinde yeni fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler kazandırmayı hedefleyen, yeni ve hızla gelişen bir teknolojidir (Singh, 2015; Ramsden, 2018). Yunanca cüce anlamına gelen ‘Nano’ kelimesi, bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biridir (Lloyd vd., 2011; Ramsden, 2018). Bir nanometre ise metrenin bir milyarda birine eşit bir uzunluk birimidir. Bir nanometre içine yan yana ancak 2- 3 atom dizilebilmektedir; yaklaşık 100-1000 atom bir araya gelerek nano ölçeklerde bir nesneyi oluşturur (Çıracı, 2005). Geniş yüzey alanları ve küçük boyutları nedeniyle nanopartiküller, dökme malzemelere kıyasla mekanik, elektrik, manyetik ve kimyasal özellikler gibi farklı özelliklere sahiptir (Lloyd vd., 2011; Ramsden, 2018). Nanoteknolojik uygulamalar 20. yüzyılın sonlarında ivme kazanmasına rağmen, nanoteknolojinin kullanımı çok daha erken başlamıştır. MÖ 2600 yıllarında tekstil uygulamalarında ve ortaçağ döneminde kilise camını renklendirmek için kullanılmıştır (Chan, 2008; Dolez, 2015). Ayrıca 12. ve 18. yüzyılları arasında Ortadoğu’ da üretilen Şam çeliğinin yapısında karbon nanotüpleri kullanılmıştır (Reibold vd., 2009). 1857’de Michael Faraday ‘Altın ve Diğer Metallerin Deneysel İlişkileri’ başlıklı makalesinde nanopartiküllerin önemli özelliklerini anlatmıştır (Faraday, 1857). Nanoteknolojiye dikkat çeken ilk bilim adamı Richard Feynman’dır. 1959 yılında Richard Feynman bilim insanlarına yapmış olduğu bir konferansta 24 ciltlik bir ansiklopediyi hatta bütün kütüphaneleri bir toplu iğne başına sığdırmanın mümkün olduğunu ifade etmiştir (Feynman, 1960). Nanoteknoloji kelimesi ilk kez 1974 yılında Profesör Norio Taniguchi tarafından kullanılmış ve ‘ileri düzeyde duyarlılıkla mevcut teknolojilerinin küçültülmesine dayanan bir teknoloji’ olarak tanımlanmıştır (Taniguchi vd., 1974; Ramsden, 2005). Nanoteknoloji, Gerd Binnig ve Heinrich Rohrer tarafından tarama tünelleme mikroskobu keşfiyle 1981 yılında orijinal gelişimini göstermiştir (Binnig vd., 1982; Drexler, 1986).

Son yıllarda nanoboyutlu malzemeler üzerinde yapılan çalışmalar önem teşkil etmekte ve farkındalık yaratmaktadır. Nano boyutlu yapılar, nanopartiküllerin şekil ve boyutlarının karakteristik özelliklerini belirledikleri nanoteknolojinin tüm uygulamaları

için ilgi konusudur. Bu nanoboyutlu yapılar; nanopartiküller, nanokristaller, nanotüpler, nanoteller, nanoçubuklar gibi farklı malzemelerden oluşabilmektedir. En az bir boyutu 1 ila 100 nanometre arasında olan atomik veya moleküler yapılar nanopartiküller (NP'ler) olarak bilinmektedir (Mao vd., 2016).

Nanoboyutlu bu yapıların dikkat çekmesi ve ilgi görmesinin asıl sebebi maddelerin değişik hacimsel boyutlarından ve yapılarından farklı kendilerine has özellikleri ile işlevsellik göstermeleridir (Goldstain vd., 1997; Rao vd., 2004). Nanoparçacıkların benzersiz fiziksel, kimyasal, optik ve mekanik özellikleri nedeniyle kaplama ve boya (Anyago vd., 2008; Kumar vd., 2008), gıda (Espitia vd., 2012; Weir vd., 2012), tekstil (Kathirvelu vd., 2009; Xue vd., 2009), elektronik (Li vd., 2005; Ko vd., 2007), enerji (Frey vd., 2009; Wu vd., 2009), otomotiv ve tarım (Im vd., 2010; Asmatulu vd., 2013), kozmetik (Müller vd., 2002; Pardeike vd., 2009), uzay alanı (Voevodin vd., 2006; Haynes ve Asmatulu, 2013), MRI kontrast maddeleri (Mulder vd., 2006; Na vd., 2009), hücre parçalarının, hücrelerin ve biyolojik moleküllerin ayrılması ve saflaştırılması (Chiang vd., 2005; Lee vd., 2006), doku mühendisliği (Goldberg vd., 2007; Peter vd., 2010), heterojen katalizlerde kullanılması (Yu vd., 2008; Jia ve Schüth, 2011), antimikrobiyal katkı maddeleri (Fondevila vd., 2009; Martinez-Gutierrez vd., 2010), UV koruması (Schlossman ve Shao, 2005; Shi vd., 2012), LCD teknolojisi (Shiraishi vd., 2002; Jamil vd., 2011), ilaç ve genetik (Cho vd., 2008; Sun vd., 2008), patojenlerin biyo tespiti (Sanvicens vd., 2009; Zhang vd., 2010), proteinlerin tespiti (Nam vd., 2003; You, 2007), DNA yapısının araştırılması (Taylor vd., 2000; Wang vd., 2006) gibi farklı alanlarda bir çok uygulaması bulunmaktadır.

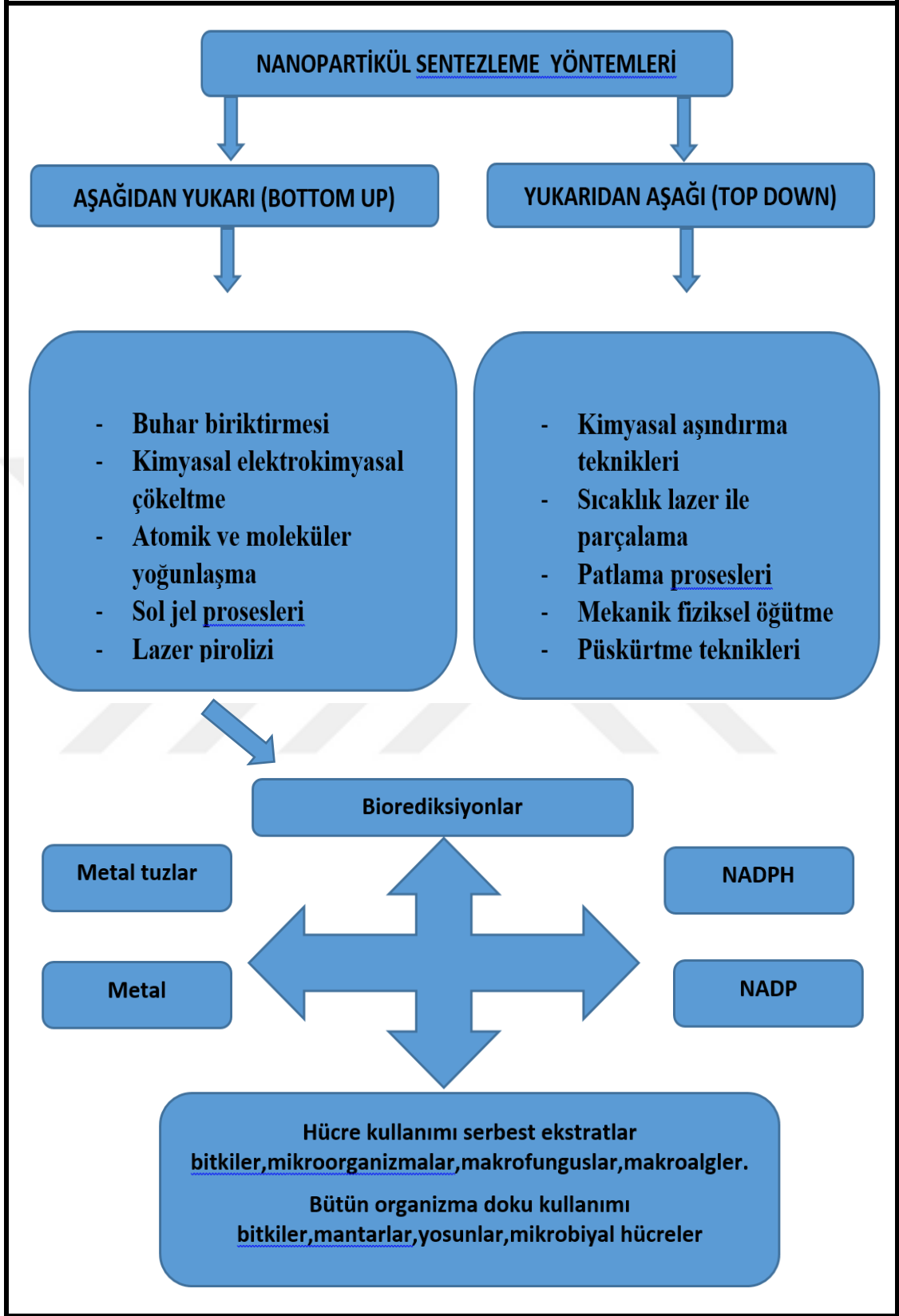
Ayrıca medikal odaklı nanopartiküllerin hastalıkların kolay teşhis edilmesi ve sonrasında akılcı tedavi yöntemleri oluşturulmasında kullanıldığı bilinmektedir. Nanopartiküllerin tıp alanında bu şekilde kullanılabilir olması nanoküreler ile yapılabilecek gen terapileri, kanserin daha erken teşhisi ve tedavisinin yapılabilmesi, odağa yönelik ilaç taşınımı gibi bir çok alanda fayda sağlamaktadır (Mboniyiriyu ve vd., 2015). Nanomalzemeler doğal ve sentetik (mühendislik) nanomalzemeler olarak iki sınıfa ayrılabilir. Doğal nanomalzemeler doğada kendiliğinden bulunur (Jeevanandam, vd., 2018). Sentetik nanomalzemeler ise fiziksel, biyolojik, kimyasal veya hibrit yöntemlerle sentezlenebilir. Manyetik nanopartiküller, metal ve metal oksit

nanopartiküller, kuantum noktaları, yarı iletken nanopartiküller ve diğer nanomalzemeler bu sentez yolları kullanılarak üretilir (Jeevanandam vd., 2018).

Hinduların romatoid artrit hastalıklarının tedavi yönteminde kullandıkları ‘Suvarna bhasma’ isimli ilacın yapısında bulunan altın nanopartiküllerinin sentezindeki gibi 17.yy’den önce nanopartikül sentez metodlarının kullanıldığı bildirilmiştir. Hinduların altın nanopartiküllerini aşağıdan yukarıya yöntemlerinden biri olan biyolojik yöntem ile ürettiği, Micheal Faraday’ın ise 1857 yılında kullandığı ilk kimyasal yöntemi deneyen kişi olduğu bilinmektedir (Reddy, 2006).

Nanopartikül yapıların üretiminde kullanılan yaklaşımlar (Şekil 1.1), aşağıdan yukarı olan ‘bottom up’ yöntemi ile yukarıdan aşağı olan ‘top down’ yöntemi olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Ravichandran, 2010). Yukarıdan aşağı (top down) yaklaşımında, hacimsel olarak kullanılan maddeyi dışarıdan fiziksel, mekanik olarak veya kimyasal müdahale ile enerji aktarımı yapılması sonucunda maddenin nano boyuttaki parçalara kadar bölünmesi esastır. Mekanik veya fiziksel parçalama ve aşındırma ile öğütme top down yaklaşımına örnek gösterilebilir. Bu uygulamalar normal öğütme veya parçalama işlemlerinden daha yüksek derecelerde enerji harcandığından yüksek enerjili parçalama veya yüksek hızlı yelpazeler olarak da ifade edilmektedir (Shibata, 2009).

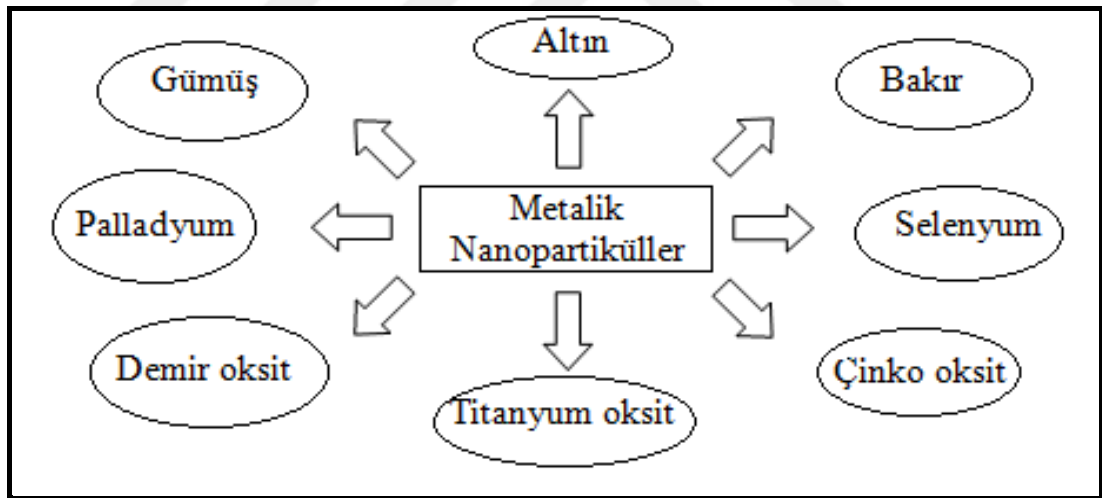
Diğer bir yaklaşım olan aşağıdan yukarı (bottom up) yönteminde, çok küçük boyutlara sahip moleküler ya da atomik yapılarıdaki maddelerin bir takım kimyasal yöntemler kullanılarak hacimsel veya kütleli olarak büyütülüp nanopartikül oluşumu gerçekleştirilmektedir. Nano kristalin metal ve türevlerinin üretiminde kullanılmış olan ilk yöntem gaz yoğunlaştırma tekniği de aşağıdan yukarıya yaklaşımıyla çalışmaktadır. Kimyasal buhar kaplama, kimyasal buhar yoğunlaştırma, sol jel ve sprey piroliz yöntemleri de bu yaklaşımın en çok bilinen diğer üyeleridir. Ayrıca nanopartikül oluşumunda fiziksel mekanik yöntem kullanılarak oluşturulan partiküllere fiziksel yöntemle oluşmuş nanopartikül, kimyasal yollarla elde edilmiş olanlara ise kimyasal yöntemle elde edilmiş nanopartikül şeklinde adlandırılmanın yapıldığı bir sınıflandırmada bulunmaktadır (Wolfgang, 2007; Zaki, 2013).



Şekil 1.1. Nanopartikül sentezleme yöntemleri

Nanopartiküller (NP'ler), karbon nanoparçacıkları, altın ve gümüş gibi soy metal NP'leri, manyetik soy metal nanoparçacıkları ve TiO₂ ve ZnO inorganik yarı iletken nanoparçacıkları şeklinde organik ve inorganik NP'ler olmak üzere iki türe ayrılabilir. İnorganik NP'lere olan talep çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmasından dolayı hızla artmaktadır. Soy metal nanopartiküller altın (Au), gümüş (Ag) ve platin (Pt) uygulamaları nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmiştir (Nair vd., 2007; Nair vd., 2010).

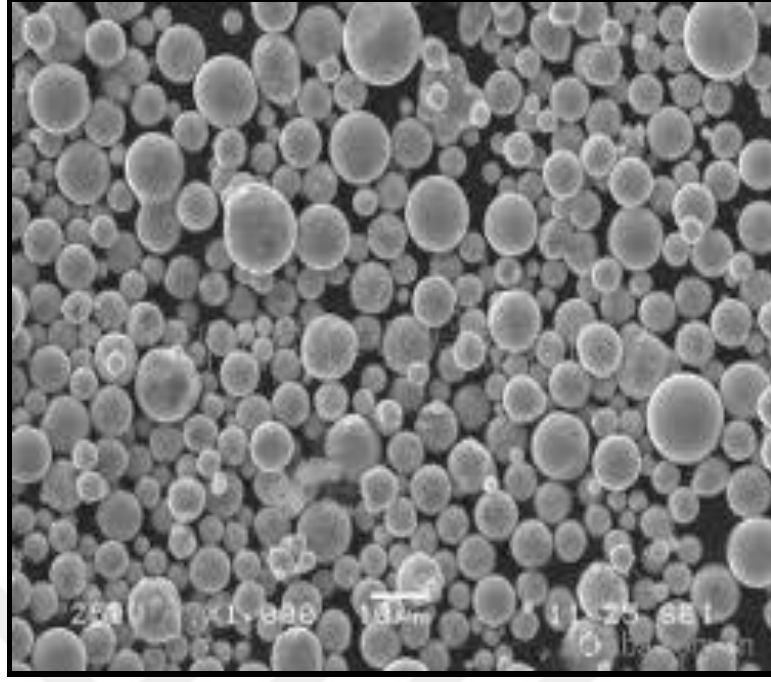
Farklı uygulamalarda kullanılabilen ve fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerle sentezlenen metal nanopartiküllerinin (Şekil 1.2) genotoksik ve sitotoksik etkilerine yönelik endişeler giderek artmakta ve metal nanopartiküller arasında yer alan altın ve gümüş nanopartiküllerinin uygulamaları üzerine araştırmalar yapılmaktadır (Patil ve Kim, 2017). Antimikrobiyal etkili olduğu gösterilmiş olan nano parçacık formundaki gümüşün diğer metallerden daha sık kullanıldığı ve memeli hücrelerinde düşük toksisite gösterdiği de bilinmektedir (Shahverdi vd., 2007).



Şekil 1.2. Metalik nanopartiküller

Günümüzde gümüş nanopartikülleri çeşitli uygulamalar için yaygın olarak kullanılmaktadır (Şekil 1.3). Modern 'nanosilver' terimi gümüş nanomalzemelerini tanımlamak için kullanılmıştır. Project Emerging Nanotechnology (PEN) tarafından hazırlanan 2009 yılı tüketici ürünleri envanterine göre, nanomalzeme tabanlı tüketici ürünlerinin çoğunluğu gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) içermektedir (Wijnhoven vd., 2009). Bu ürünlerin imalatında AgNP'lerin kullanımı esas olarak gümüşün

antibakteriyel doğasından kaynaklanmaktadır (Nowack vd., 2011). Tarihsel olarak, AgNP tabanlı ürünlerin belgelenmiş kullanımı yaklaşık 120 yıl önce başlamıştır. 1889'da M.C. Lea ilk sitrat stabilize gümüş kolloidi sentezlemiştir (Lea, 1889). Bu kolloidal gümüş nanoparçacıkların ortalama çapı 7 ila 9 nm arasındadır (Frens ve Overbeek, 1969). Nanogümüşün antimikrobiyal ajan olarak erken kullanımı, tıp ve tüketici ürünlerinin üretiminde bugünkü rolünü üstlenmiştir. Bugün bile tıp alanındaki AgNP uygulamalarının çoğu, gümüşün antimikrobiyal doğasından kaynaklanmaktadır (Lansdown, 2010). Gümüş nanopartikülleri yanıkların, romatoid artrit ile ilişkili bacak ülserleri ve diyabetik ülserler gibi çeşitli ülserlerin, toksik epidermal nekrolizin, yara iyileşmesinde, cerrahi ağda, kateterlerin ve diğer implante edilebilir tıbbi cihazların tedavisinde ve bakteriyel enfeksiyon ve sepsisi destekleyen balçık içeren biyofilmlerin yapısında kullanılmaktadır. Nanogümüş ayrıca biyomedikal alanlarda, kemik implantları ve diş dolguları, infüzyon portları, kontraseptif cihazlar endovasküler stentler, ürolojik stentler, endotrakeal tüpler, kontakt lens kaplamaları, endoskoplar, elektrotlar, periton diyaliz cihazları, deri altı manşetleri ve cerrahi ve dişçilik aletlerinde yaygın şekilde kullanılmaktadır (Faunce ve Watal, 2010). AgNP'ler ayrıca antitrombosit aktiviteye sahiptir. Fibrinin polimerizasyonunu geciktirme ve pıhtı oluşumunun daha fazla inhibisyonu yakın zamanda bildirilmiştir (Shrivastava vd., 2011). Sriram ve arkadaşları (2010) çalışmalarında, biyolojik olarak sentezlenmiş AgNP'lerin anti-tümör aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir. AgNP'ler ayrıca tekstil kumaşlarında, kesme tahtalarında, güneş koruyucu losyonlarda, kişisel bakım ürünlerinde, cep telefonlarında, elektronik cihazlarda, bilgisayarlarda ve filtreleme ünitelerinin yapısında kullanılmaktadır. AgNP uygulamalarının çoğu antimikrobiyal yapıları ile ilgili olsa da, AgNP'ler optik, katalitik, elektrik ve manyetik özelliklerinden yararlanan çeşitli endüstriyel ve araştırma ortamlarında kullanılmaktadır. AgNP'ler, tek hücreli, yüzeyi güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (SERS) tabanlı biyo görüntüleme (Garnett vd., 2006), elektrokimyasal nano algılama (Guascito vd., 2008), nano PALDI-IMS (Goto-Inoue vd., 2010), kanser hücreleri için karanlık alan multipleks görüntüleme (Hu vd., 2009) ve dokularda 3 boyutlu yansıma görüntüleme için moleküle özgü kontrast maddeleri gibi bilimsel görüntüleme tekniklerine dahil edilmektedir (Javier vd., 2008).



Şekil 1.3. Gümüş nanopartikülleri (AgNP)

AgNP'lerin sentezi için, geleneksel yöntemlerin yanı sıra toksik olmayıp ve çevre dostu bir yöntem olan Yeşil Kimya ya da Yeşil Sentez olarak da bilinen biyolojik bir proses uygulanmaktadır (Anastas ve Warner, 1998). Doğal olarak kaza önleme için daha güvenli kimya, kirliliğin önlenmesi için gerçek zaman analizi, daha güvenli çözücüler ve yardımcı maddeler kullanımı, yenilenebilir maddelerin kullanımı, enerji verimliliği tasarımları, katalizleme, yan ürün türevlerin azaltılması, güvenli kimyasalların tasarımları, daha güvenli bileşik oluşturma, önleme, atom ekonomisi, daha az zararlı kimyasal senteze imkan veren yeşil kimyanın ilkeleri Anastas ve Warner (1998) tarafından belirlenmiştir.

Yeşil nanoteknoloji; yeşil nanoparçacıkların tasarımı ve geliştirilmesi için hem akademik hem de endüstriyel alanlarda sadece temel değil, aynı zamanda hedefe yönelik araştırmaları da teşvik eder. Metal (gümüş, altın, paladyum, demir, bakır, kurşun, titanyum, lityum, çinko, seryum), metal oksit ve manyetik nanoparçacıklar ile kuantum nokta sentezi yeşil sentez yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilebilir (Nadagouda ve Varma, 2008; Sharma vd., 2009; Philip, 2010; Sangeetha vd., 2011; Sundrarajan ve Gowri, 2011; Zain vd., 2014; Elango ve Roopan, 2015; Álvarez vd., 2015; Arumugam vd., 2015; Luo vd., 2015). Sharma ve arkadaşları (2009) tarafından yeşil sentez için 5 farklı yöntem belirtilmiş ve bunlar polioksometalat, tollens,

polisakkarit, ışınlama ve biyolojik yöntem olarak sınıflandırılmıştır. Bu yöntemlerden biri olan biyolojik yöntem, geleneksel kimyanın süreçlerini yeniden değerlendirerek çevreye ve ekonomiye fayda sağlayan bir yöntem olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Horton, 1999; Anastas ve Kirchhoff, 2002; Anastas ve Eghbali, 2010; Rafique vd., 2016). Yeşil sentez işleminde kullanılacak materyalin seçiminde yeşil materyalin güvenli, yalnızca bir adet basit reaksiyon basamağı içeren, atık madde salınımına neden olmayan, çevre dostu, yenilenebilir bir nitelik taşıyan, verim kapasitesi olarak %100'e yakın olan ve reaksiyonun sonunda basit bir şekilde ortamdan ayrışabilen yapıda bir materyal olması gerekmektedir (Raveendran vd., 2003). Tüm bu özellikleri bir arada bulundurmak zor olsa da, büyük çoğunluğunu ihtiva eden bir materyal seçimi, yeşil sentezin başarı oranının artmasında oldukça önemli bir faktör olmaktadır. Son yıllarda, istenen morfoloji ve boyut nanopartiküllerini hazırlamak için doğal indirgeme, kaplama ve stabilize edici maddeler kullanılarak sentez yöntemleri geliştirmek için birçok araştırma yapılmıştır. Bitkiler, mantarlar, mikroorganizmalar ve biyolojik olarak bozunabilir polimerler, nanopartiküllerin yeşil sentezinde bir indirgeme, kaplama ve stabilize edici maddeler kaynağı olarak kullanılır (Kharissova vd., 2013). Biyolojik sentez, kimyasal sentez gibi aşağıdan yukarıya bir işlemdir (Irvani, 2011; Velusamy, vd., 2016). Nanoparçacık sentezinde meyveler, yapraklar, kökler, saplar, perikarp, lateks ve ekstraktlar gibi birçok bitki parçası kullanılabilir (Singh vd., 2016; Saratale vd., 2018). Bitkiler üzerine yapılan araştırmalar, bitkilerin nanopartiküller şeklinde metal depoladıklarını ortaya koymuştur (Harris ve Bali, 2008). Son yıllarda, metal nanoparçacıklar birçok metal tuzları ve bitkileri kullanılarak *in vitro* sentezlenmiştir (Chandran vd., 2006; Jain vd., 2009; Ghaedi vd., 2015). Bitkiler ve bitki özleri kullanılarak metal nanopartiküllerin sentezi aktivasyon, büyüme ve sonlandırma adımı olmak üzere 3 adımda gerçekleşir (Glusker vd., 1999; Si ve Mandal, 2007; Makarov vd., 2014).

Bitkilerin kolay bulunabilir olması, özel koşullara gerek duyulmaması, yeşil sentez yöntemlerinden kaynaklanan atıkların biyoyumlu olması, büyük ölçekli üretim için uygunluğu, düşük maliyetli ve çevre dostu olması bitki özlerinin kullanıldığı yeşil sentez yönteminin avantajları arasında gösterilebilir (Kharissova vd., 2013; Benelli ve Lukehart, 2017). Nanoparçacıkların biyolojik yöntemler kullanılarak sentezlenmesinde genellikle bitki ekstraktlarının hazırlanmasında su tercih edilir. Çok sık olmamakla

birlikte etanol, metanol, aseton, asetat ve petrol eteri gibi sudan farklı çözücüler de kullanılabilir (Kasthuri, 2009a; Kasthuri, 2009b; Bankar vd., 2010; Raghunandan vd., 2011; Zargar vd., 2011).

Bitki özleri kullanılarak yeşil sentez ile gümüş nanoparçacıkların sentezi, araştırmacıların talebini karşılayan çok basit ve uygun maliyetli bir yoldur aynı anda çevresel tehlike olasılığını ortadan kaldırır. Yeşil sentez yönteminde kullanılan bitkilere *Acalypha indica* (hint ısırganı), *Azadirachta indica* (ıhlamur), *Camellia sinensis* (çay), *Aloe vera*, *Jatropha curcas* (hint fıstığı), *Vitis vinifera* spp. (Cimin üzümü) bitkileri örnek olarak verilebilir (Kumar vd., 2013).

Bilimsel olarak yapılan çalışmalarda nanopartikül üretiminde bitkilerin ve bitkisel yollarla elde edilmiş ürünlerin düşük maliyetli ve yenilenebilir doğal kaynaklar olduğu, son dönemlerde bitki ekstratlarının kullanımının kimyasal ve fiziksel metotlara karşı bir alternatif olduğu ve genel olarak sağlık alanında kullanıldığı bildirilmiştir. İran'da yetişen endemik bir bitki türü olan *Salvia limbata* bitki ekstratından çözelti hazırlanarak fitokimyasal yollar ile gümüş nanopartikülü üretildiği, bu üretilen AgNPLerin daha zararlı olan kimyasal madde kullanımını büyük ölçüde azaltacağı ve çevre dostu bir yapısının olduğu belirtilmiştir (Nematollahi, 2015). Bitki özütlerinin biyolojik yöntemlerle sentezinde toz parçacıkları halindeki gümüş nanopartiküllerinin hızla kullanılması, basit olduğu kadar etkili bir yöntem olduğundan dolayı daha fazla çevre dostu olarak bilinmektedir (Verma vd., 2014). Bir çalışmada, *Argyria nervosa* bitki tohum özütleri kullanılarak elde edilen gümüş nanopartiküllerinin eczacılık ve tıp alanlarında etkili bir şekilde kullanıldığı; funguslar, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antitoksik bir etkiye sahip olduğu ve nano boyutlardaki gümüş metallerini azaltan ajanları engelleyebildiği belirlenmiştir (Thombre vd., 2014). Yapılan başka bir araştırmada, mikroorganizmalar ile bitki ekstratları kullanılarak yapılan biyosentezde, canlı hücrelerin ve yapılarının metalik iyonları indirgeyerek zararlı ve toksik olan metallerin toksisite oranlarında azalma bildirilmiştir (Saifuddin, 2009). Nanopartiküllerin çeşitli biyolojik yollarla çevre dostu sentezi gümüş nanopartiküllerini sentezleme yetenekleri için de çeşitli bitkileri keşfetmeye yardımcı olmaktadır.

Bu bağlamda yapmış olduğumuz bu çalışmada, Erzincan ili Üzümlü ilçesinde endemik olarak yetiştirilen siyah üzüm çeşidinin bir alt türü olan *Vitis vinifera* spp., Cimin

yapraklarından yeşil sentez yöntemi kullanılarak elde edilmiş gümüş nanopartiküllerinin *Drosophila melanogaster*'de genotoksik etkisinin belirlenmesi için bir çok yönden avantajı bulunan, hızlı ve uygun bir yöntem olan Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) kullanılmıştır. Kanserojenez, pigmentasyon ve sinir sistemi için gerekli molekülleri kodlayanlar da dahil olmak üzere insan genleri ile yaklaşık %70- 77 oranında homoloji gösteren, meyve sineği olarak da bilinen *Drosophila melanogaster*, insan sağlığı ile ilgili birçok soruyu cevaplamak için mükemmel bir organizmadır. Köklü bir genetik yapı, kısa yaşam döngüsü ve yüksek oranda korunmuş genlere sahiptir. *Drosophila* insanlar için birçok kaynak teşkil etmektedir. Ek olarak, *Drosophila* kullanılarak *in vivo* maruz kalma deneyi yürütmenin ortalama maliyeti diğer hayvan modellerinden çok daha düşüktür. Ayrıca kolay manipülasyonu ve yetiştiriciliği, çok sayıda yavru ve mutasyonları indüklemeye olasılığı sayesinde, toksisite testi de dahil olmak üzere birçok biyolojik süreç için yaygın bir model organizma olarak kullanılır (Rubin, 2000; Rand, 2014). Son dönemlerde maddelerin genotoksik ile mutajenik etkileri araştırılmak üzere ökaryotik ve prokaryotik canlı sistemleri kullanılmaktadır (Garcia ve Dapena, 1974). Bu canlılarda genel hücre metabolizması ve işleyişleri birbirinden büyük farklılıklar içermektedir. Ökaryotik bir canlı türü olan *Drosophila melanogaster*'in genetik bilgi yapısının bilinmesi ve uygun şartlarda deneylerde kullanılabilen bir tür olma özelliklerinden dolayı genotoksik ve sitotoksik araştırmalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Bu nedenlerle insanda keşfedilmeyi bekleyen pek çok gelişimsel olaylara *Drosophila* iyi bir kaynak teşkil etmektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, sentetik gümüş (Ag) elementinden elde edilmiş olan nanopartiküller ile Erzincan ili Üzümlü ilçesinde endemik bir tür olarak yetişen Cimin üzümü olarak bilinen *Vitis vinifera* L. bitkisinin yaprakları kullanılarak yeşil sentez yöntemi ile elde edilen AgNP'lerinin *Drosophila melanogaster*'in 72±4 saatlik transheterozigot larvaları üzerine genotoksik etkisi SMART yöntemi ile belirlenmeye çalışılmıştır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmalarda kullanılan alet ve cihazlar Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Çalışmalarda kullanılan cihazlar

Cihaz adı	Marka-Model
Binoküler mikroskop	Leica DM 500
Buzdolabı	Arçelik 8820 SBS NF
Etüv	Wisecube
Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi	Thermo Scientific, Nicolet 6700
Hassas terazi	Axis AGN 220
Manyetik karıştırıcı	Wisestir MSH-20A
Stereo mikroskop	Leica EZ4
Sterilizasyon cihazı	Thermomac SDO30
Taramalı elektron mikroskobu	FEI-Quanta FEG 450
Ultrasonik banyo	Bandelin Sonorex
Ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisi	Perkin Elmer, Landa 35

2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildikleri firmalar

Kimyasal madde	Firma
Dietil eter	Sigma 60-29-7
<i>Drosophila</i> instant medium	Carolina Biological Supply Company, Formula 4-24
Entellan	Merck 3822 00 00
Etil alkol	Sigma 52-50-0
Etil metansülfonat	Sigma M0880
Gümüş nanopartikülü	Nanografi
Gümüş nitrat	Sigma
Propiyonik asit	Sigma 79-09-4

2.1.3. *Vitis vinifera* (L.)

Çalışmada, Erzincan ili Üzümlü ilçesinde yetiştirilen ve halk arasında Cimin üzümü olarak bilinen *Vitis vinifera* spp., Cimin bitkisinin yaprakları kullanılmıştır. *Vitis vinifera* spp., Cimin Erzincan ili Üzümlü ilçesinde endemik olarak yetiştirilen siyah üzüm çeşidinin bir alt türü olan ve ortalama tane ağırlığı 3- 4 g ağırlığında, mayhoş bir tad barındıran, ortalama 1- 4 arasında çekirdeğe sahip, orta dereceli kabuk kalınlığı bulunan bir üzüm çeşididir. Şekil 2.1’de *Vitis vinifera* bitkisine ait meyve ve yapraklar gösterilmiştir (TPMK, 2001).



Şekil 2.1. *Vitis vinifera* L. meyve ve yaprakları

2.1.4. *Drosophila melanogaster* (Meigen)

Halk arasında meyve sineği ya da sirke sineği olarak da bilinen *Drosophila melanogaster* (Şekil 2.2), bilimsel araştırmalarda bir asırdan fazladır kullanılmaktadır. *Drosophila* Thomas Hunt Morgan tarafından ön plana çıkarılmıştır. Morgan, DNA'nın genetik materyal olduğu bilinmeden kromozomlar üzerinde genlerin bulunduğunu keşfetmiştir (Jennings, 2011). *D. melanogaster*, 3 çift otozomal ve 1 çift gonozomal 4 çift kromozomdan oluşan basit genetik yapısı nedeniyle araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Adams vd. (2000) tarafından *D. melanogaster* genomunun tamamı açıklanmıştır. Tanımlanan 13600 genin %95'nin *D. melanogaster*'e ait dört kromozomdan üçünde kodlandığı tespit edilmiştir (Rand, 2010). *Drosophila*, laboratuvarında yetiştirilmesi ve bakımı kolay olan ucuz maliyetli 8- 14 günlük kısa bir yaşam döngüsüne sahip olup gelişim, sinyal yolağı çalışmalarında sıklıkla tercih edilen model bir organizmadır (Clevers, 2006; Preiffer vd., 2010). Bununla birlikte insan hastalık genlerinin yaklaşık %77'sinin *Drosophila* gen dizileri ile homolog olduğu belirlenmiştir (Reiter vd., 2001). Meyve sinekleri insanlarda hastalıklara neden olan genler ile yaklaşık %77 oranında homolog olması sebebi ile terapötik ilaç keşif potansiyeli olan insan hastalıklarının tespitinde önemli bir model organizma olarak kabul edilmektedir. Çalışmalar gen ekspresyonu ve metabolizmasının düzenlenmesinde

görevli olan *Drosophila* proteinlerinin insan homologları ile yakın ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Pandey ve Nichols, 2012). Tüm bu sayılan özelliklerden dolayı *in vivo* çalışmalarda genellikle *Drosophila melanogaster* tercih edilmektedir.



Şekil 2.2. *Drosophila melanogaster*

2.1.4.1. *Drosophila melanogaster*'in sistematikteki yeri

Drosophila melanogaster'in sistematikteki yeri aşağıdaki gibidir.

Şube (Phylum): Eklem bacaklılar (Arthropoda)

Alt Şube (Subphylum): Mandibulata-Antennata

Sınıf (Classis): Böcekler- Altı bacaklılar (Insecta-Hexapoda)

Alt Sınıf (Subclassis): Kanatlı böcekler (Pterygota)

Üst Takım (Superordo): Uzun kanatlılar (Mecopteroidea-Panorpoidea)

Takım (Ordo): Diptera

Alt Takım (Subordo): Sinekler- Kısa antenliler (Brachycera)

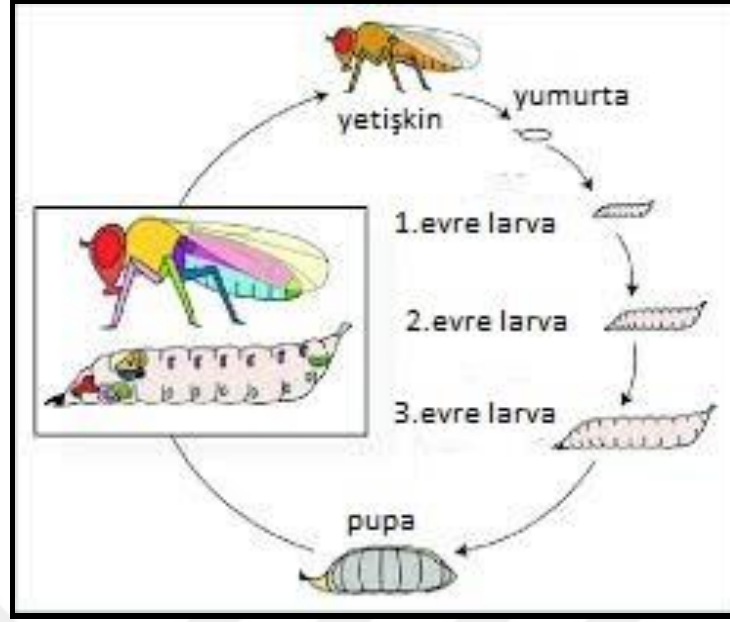
Familya (Familia): Sirke sinekleri- Meyve sinekleri (Drosophilidae)

Cins (Genus): *Drosophila*

Tür (Species): *Drosophila melanogaster*.

2.1.4.2. *Drosophila melanogaster*'in gelişim biyolojisi

Drosophila melanogaster eklembacaklılar şubesine dahil olan, tam başkalaşım gösteren bir çift gonozomal ve üç çift otozomal olmak üzere toplam 8 adet kromozoma sahip ökaryotik bir canlıdır (Rothwell, 1993). *D. melanogaster* türlerinin ideal anlamda embriyonik olarak gelişim gösterebilmeleri ve yumurtalarının ergin hale gelebilmesi için ortam sıcaklığı ortalama 25°C ve nemin %50 olması gerekliliği koşulları sağlanmalıdır. Bu koşullar sağlandığında ortalama 9- 11 günde yumurtadan ergin bireyler oluşmaktadır (Graf vd., 1984). *D. melanogaster*'in gelişim ve yaşam döngüsü, populasyon yoğunluğu, hava koşulları, radyasyon, beslenme, çiftleşme oranları ve ışık gibi faktörlerden etkilenebilmektedir (Hamamcı, 1993). *D. melanogaster*'de gelişim iki safhada gerçekleşmektedir. Bunlardan ilki embriyonik dönem ve ikincisi de postembriyonik dönem olarak bilinmektedir. Yumurtanın döllenerek larvaların yumurtadan çıkmasına kadar geçen süre embriyonik dönem olarak adlandırılır. Yumurtadan çıkan larvaların gelişip büyüyerek yetişkin birey haline gelinceye kadar geçirmiş olduğu evreye ise postembriyonik dönem denilmektedir (Özata, 2006). *D. melanogaster*'in yaşam döngüsünde dişi ve erkek bireylerin çiftleşmesi sonucu yumurtanın döllenmesi uterusunda gerçekleşir. *D. melanogaster* türlerine ait dişi bireyler pupadan çıktıktan sonra yaklaşık olarak 2-3 gün sonra yumurtlamaya başlarlar. Pupadan çıktıklarında vücut yapıları uzun, açık sarı veya beyaz renkte, kanatları kısa görünümlüdür. 2- 3 saat içinde normal görünümlü bir ergin birey olarak gelişimlerini tamamlamaktadırlar (Şekil 2.3). Gelişimini tamamlamış olan bireyler ise ortalama 40-60 gün yaşayabilmektedir (Graf ve Vanschaik, 1992).



şekil 2.3. *Drosophila melanogaster*'in yaşam dđngüsü

Drosophila melanogaster'in uygun koşullardaki başkalaşım evrelerini řu şekilde sıralayabiliriz.

Embriyonik gelişim: 1 gđn (yumurtanın dđllenerek larvaların yumurtadan çıkmasına kadar geçen sđre)

Birinci larval evre - Instar (L1): 1 gđn (yumurtanın parçalanarak ilk deri değiştirme dđnemi)

İkinci larval evre - Instar (L2): 1 gđn (larvanın ikinci kez deri değiştirdiği dđnem)

Üçüncü larval evre - Instar (L3): 2 gđn (larvanın pupa haline dđnüřtüęü dđnem)

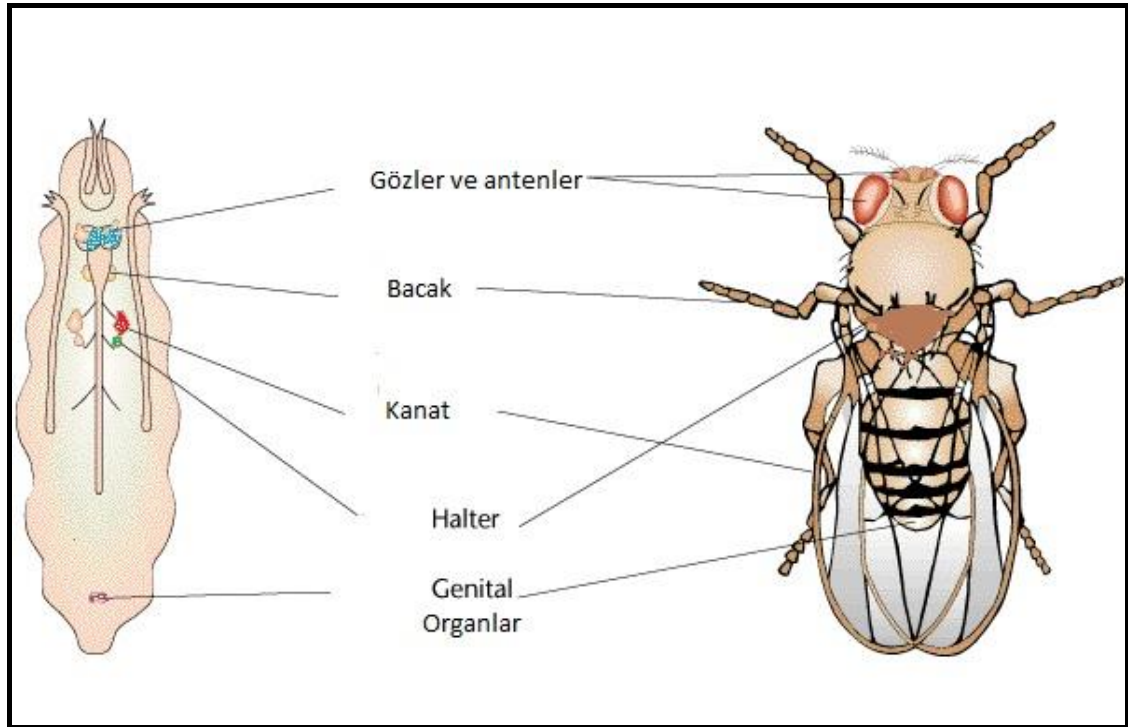
Prepupa evresi: 4 saat

Pupa evresi: 4-5 gđn

Yetişkin evresi: 40-50 gđn

Uterusta dđllenmiř bir yumurta, türüne göre morfolojik olarak farklılık gösterse de genel olarak yuvarlak ya da oval şekillidir. Yumurtanın uzunluğu ortalama 0,5 mm olup, açık sarı veya beyaz renkte ve 0,2 mm çapındadır. Dişiler pupadan çıktıktan yaklaşık 2- 3 gđn sonra dđllenerek yumurtalarını bulunduğu yere ya da besiyeri

ortamına bırakmaya başlarlar. Yumurtalar üzerinde yapısal olarak yumurtayı dış etkilerden koruyan ince tabaka halinde bir zar bulunmaktadır. Bu zar koriyon zarı olarak bilinir. Yumurtanın üst ön kısmında yumurtaya bağlı iplik biçiminde ince uzantılardan oluşan bir çift filamet bulunur. İpliksi uzantılar halindeki bu filamentler yumurtanın bırakıldığı ortamda ya da besiyeri ortamında yumurtanın dışarı ile bağlantısını sağlayıp yumurtanın ortama saplanmasını veya batmasını engelleyerek yumurtanın bulunduğu ortamda gelişim göstermesine yardımcı olmaktadır (Clark ve Rockstein, 1964; Demirsoy, 1982; Graf vd., 1992). Gelişimini 25°C’de ve 22- 24 saatte tamamlayan larvalar yumurtadan çıkmaya başlar. Yumurtanın açılmasından sonra çıkan larvalar, pupa oluşuncaya kadar iki kez başkalaşım geçirerek deri değiştirir. Bu iki deri değiştirme olayının arasında kalan periyoda instar denir (Demirsoy, 1982; Clark ve Rockstein, 1964). *Drosophila melanogaster*’in embriyolojik dönemdeki gelişim aşamasında imajinal disk hücreleri diye adlandırılan hücresel yapılar gözlenir (Şekil 2.4). Bu imajinal disk hücreleri 1., 2. ve 3. larval evrede pupa oluşuncaya kadar sistematik olarak mitoz bölünme geçirerek çoğalır ve bu hücreler ileride türün dış genital organlar, halterler, bacaklar, antenler, ağız parçaları ve gözler gibi farklı organlarını oluşturur (Ashburner, 1989).



Şekil 2.4. İmajinal disk hücrelerinin larvadaki konumları

3. larva evre sonrası prepupa evresinde larvalar besiyeriden ayrılarak kuru yerlere tırmanmaya başlar. Burada dış zar sarı-kahve renkte sabitleşerek pupalaşır. Pupa ergin bir birey haline gelinceye kadar puparyum adı verilen sertleşmiş kütikula tabakasının içerisinde kalır. Başlangıçta yumuşak yapılı ve beyaz renkli olan pupa yaklaşık iki saat sonra açık kahverengi bir hal alır (Falakalı, 1989; Rubin ve Lewis, 2000). Ergin sineğin oluşmasına yakın pupanın rengi iyice koyulaşır ve koyu kahverengi bir renk alır. Pupa halinden, ergin birey durumuna 25°C ve % 40-60 nem ortamında 4-5 gün sürede geçer (Ashburner, 1989; Graf, 1992). Bu gelişim döneminde sineğin kanat kısımları ve göz noktaları belirginleşmiştir (Doğan, 2002).

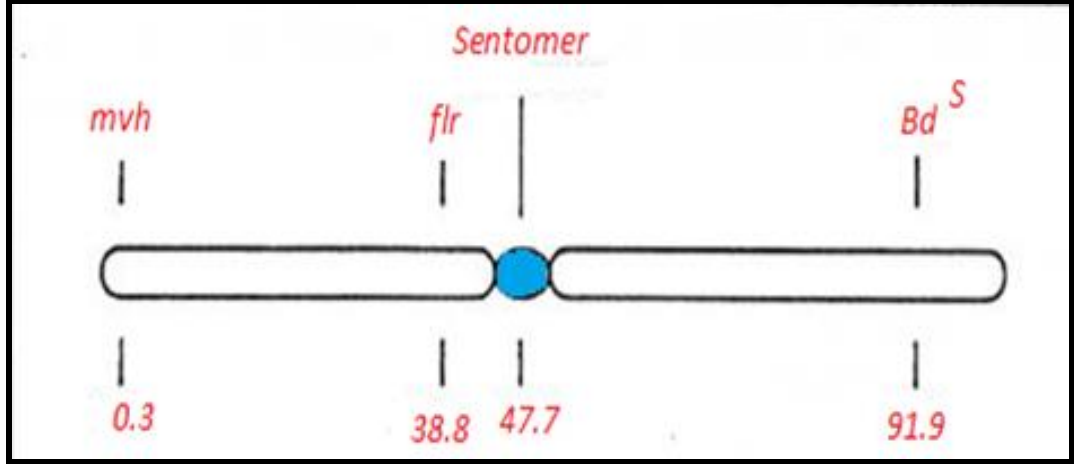
Ergin haline gelmiş *D. melanogaster* 'e ait erkek bireyler olduğu andan itibaren eşeyssel olgunluğa ulaşmış durumdadır. Dişi bireyler ise eşeyssel olgunluğuna 4- 6 saatlik bir sürenin sonunda ulaşırlar. Ergin bireylerde baş, göğüs ve karın bölgeleri olmak üzere 3 ana yapı mevcuttur. *D. melanogaster* dişi ve erkek bireylerinin gelişimsel olarak morfolojik farklılıkları bulunmaktadır (Şekil 2.5). İlk oluşan bireylerin karın (abdomen) bölgesi uzun ve kanat yapıları açılmamıştır. Dişilerde abdomende bulunan segment sayısı 7 iken bu erkek bireylerde 5 adettir. Ayrıca dişi türlerin abdomen uç kısmı uzun ve beyaz renkli iken bu erkek türlerinde ise küt ve siyah renktedir. Dişi bireylerin abdomen kısmı erkek bireylere göre daha geniş bir yapıdadır. Bu durum dişilerin abdomen kısmında yumurta oluşumu ve gelişiminden dolayı daha büyük bir karın bölgesinin oluşmasına sebep olmuştur (Graf ve Vanschaik, 1992). Eşeyssel farklılıklardan bir diğeri ise erkek türlerinde birinci çift bacağıın iç kısmında bulunan, kalın ve siyah renkli kıllardan oluşan 'eşey tarağı' adı verilen yapılardır ve bu durum erkek türleri için karakteristik bir özellik taşımaktadır (Falakalı, 1989; Graf ve Singer, 1992).



Şekil 2.5. *Drosophila* dişi ve erkek türleri

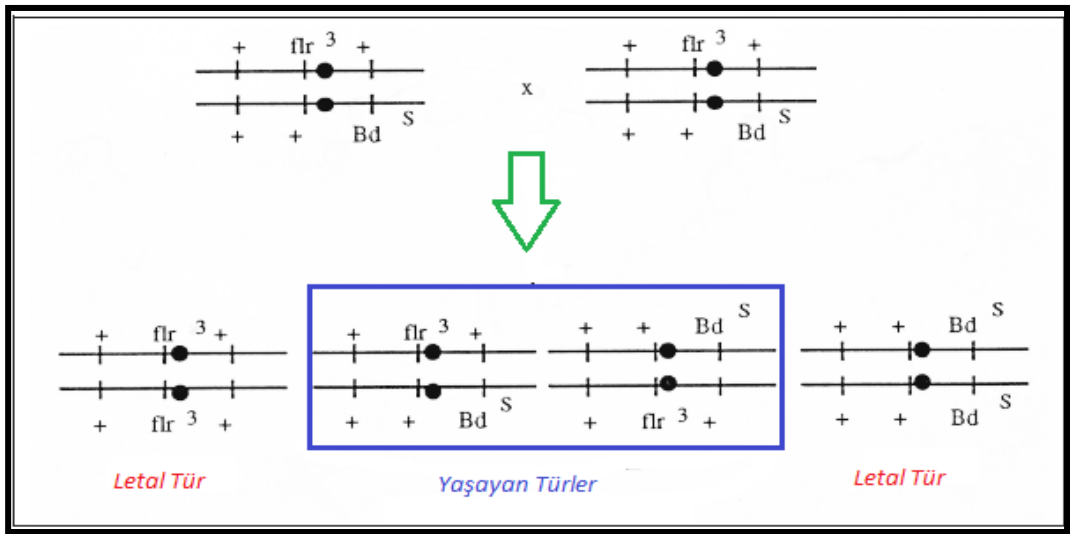
Bu çalışmada kullanılan *Drosophila melanogaster* türleri Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler ve Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarları'nda 25°C ve %60 bağıl neme sahip etüvlerde uygun besiyeri ortamında kültüre alınmak sureti ile bireylere genetik yönden homojen dağılım gösteren normal vücut metabolik aktivitesine sahip olacak bir yaşama ortamı sağlanmıştır.

D. melanogaster' de 3. kromozom üzerindeki somatik mutasyon ve rekombinasyonu belirlemek için kullanılan iki belirleyici gen bulunmaktadır (Şekil 2.6). Bunlar *flare* (*flr³*, 3-38,8) ve *multiple wing hair* (*mwh*, 3-0,3) genleridir. Rekombinasyon ve mutasyonların büyük bir aralıkta kolaylıkla incelenmesine, 3. kromozomun en büyük kromozom olması ve kullanılan genler arasındaki mesafenin de oldukça uzak olması olarak sağlar (Graf vd., 1984).



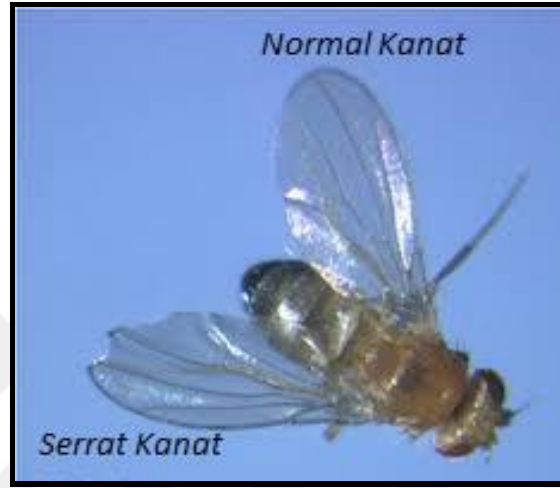
Şekil 2.6. Üçüncü kromozom üzerindeki belirleyici genlerin dizilişi

flr^3/ln (3LR) TM3, ri pp sep 1(3)89Aa bx34e es Bd^S geni kısaca $flr^3/TM3, Bd^S$ olarak gösterilmektedir. flr^3 geni kanat üzerinde bulunan kılların şekil olarak değişime uğratan resesif bir gen dir ve fenotipe değişiklik gösterebilir. Normal fenotipe kanatlarda oluşan kıllar normal, düz ve uzun şekilde iken, mutasyon durumunda kıllar koyu renkli veya nokta balon şeklinde, düzgün olmayan kısa ve kalın şekillerde olabilmektedir (Graf vd., 1984; Rincon ve Graf, 1995). Normal kanat şekillerinin aksine, Bd^S genini taşıyan türlerin kanat kenarları düzgün değildir. Çalışmada kullanılan stokların genetik yapısı Şekil 2.7’de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. $flr^3/TM3, Bd^S$ türlerdeki homozigot letal etkileri

Homozigot letal etki gösteren dominant Bd^S geni, $TM3$ dengeleyici kromozomunun üzerinde yer alır. $TM3$ dengeleyici kromozomuna sahip olan bireyler düzgün olmayan kanat kenarlarının incelenmesiyle diğer türlerden kolayca ayırt edilebilir. Bd^S taşıyan bireylerin kanat kenarlarının şekilleri girintili çıkıntılı bir görünümde olmasıyla ayırt edilir (Graf vd., 1984; Graf vd., 1992). Normal ve serrat kanat yapıları Şekil 2.8'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Normal ve serrat kanat

mwh/mwh geni resesif bir gendir. Çoklu kanat kılı mutasyonunu taşımaktadır. Bu mwh soyu mutant geni olarak yaşatılabilmekte ve bu durum kanat hücrelerinde mutasyona sebep olarak hücrede bir kanat kılı oluşması gerekirken çoklu kanat kılı oluşumuna neden olmaktadır (Rincon ve Graf, 1995).

2.2. Yöntem

2.2.1. *Vitis vinifera* spp., Cimin temini ve yeşil sentez yöntemi ile nanopartikül eldesi

2.2.1.1. *Vitis vinifera* spp., Cimin temini ve ekstraksiyonu

2018 yılının Haziran ayında Erzincan ili Üzümlü ilçesinden bitki yapraklarıyla toplanarak tür teşhisi yaptırılmıştır. Üzüm bitkisine ait yapraklar oda sıcaklığında ve uygun nem koşullarında kurutulmuştur. Kurutulan bu yapraklar saf su ile yıkayıp üzerlerinde bulunan toz parçacıklarından arındırılmıştır. Daha sonra 5'er g olmak üzere tartılarak küçük parçalar halinde kuru yapraklar, içerisinde 100 mL steril distile su

bulunan erlenmayer şişelerine konulmuş, 5- 7 dk arasında kaynatılmak sureti ile bitki yaprak solüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanmış olan solüsyonlar çalışmalarda kullanılmak üzere +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

2.2.1.2. Yeşil sentez yöntemi ile AgNP eldesi

AgNP’lerin sentezi için önceden hazırlanan 1mM 500 mL AgNO₃ sulu çözeltisi ile 125 mL Cimin üzümü bitkisi yaprak özütü 1000 mL’lik bir erlen içerisinde oda sıcaklığında sabit koşullarda reaksiyona bırakılmıştır. Gümüş iyonlarının indirgenmesi ile oluşan koyu renkli solüsyon 10.000 rpm’de 5dk santrifüj edilerek üst sıvı faz uzaklaştırılmış ve kalan katı kısım birkaç kez saf su ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen katı kısım (AgNP) etüvde 65°C’de 48 saat kurumaya bırakılmıştır.

2.2.1.3. AgNP konsantrasyonlarının belirlenmesi ve yaşama yüzdesi deneyleri

AgNP’nin uygun etki aralıklarının belirlenmesinde öncelikli olarak genotoksik etkisinin geniş bir açıdan incelenebilmesi amacıyla önceki çalışmalarda da kullanılmış olan konsantrasyonlardan yararlanılmıştır. *Drosophila melanogaster* 3. evre heterozigot larvalarının LD₅₀ dozunu belirlemek amacı ile farklı konsantrasyonlarda (1,25; 2,5; 5; 7,5 ve 10 mg/mL) uygulamalar yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda LD₅₀ dozu AgNP_(k) için 7,5 mg/mL AgNP_(b) için ise 10 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Buna göre çalışma konsantrasyonları 1,25; 2,5 ve 5 mg/mL olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte yaşama yüzdesi deneyleri de *Drosophila melanogaster*’in 3. evre transheterozigot *mwh* erkek ve *flr*³ dişi bireylerine ait larvaları kullanılarak yapılmıştır. Stok halinde mevcut olan *D. melanogaster* türlerine ait yaklaşık 40 *mwh* erkek ve 40 *flr*³ dişi bireylerinin besiyeri ortamına alınarak 3 gün boyunca 25±1°C ve % 60- 40 bağıl neme sahip etüv içerisinde çiftleşerek gelişmesi sağlanmıştır. 4. gün içerisinde yapılacak olan çalışmalar ve kontrol gruplarında kullanılmak üzere 50’şer larva olacak olacak şekilde yeni besiyeri ortamına ayrılarak alınmıştır. Bu yeni kültür ortamına alınan larvaların besiyerlerine (1,25; 2,5 ve 5 mg/mL) konsantrasyonlarında yeşil sentez yöntemi ile elde edilmiş AgNP ile yine aynı konsantrasyonlarda sentetik olarak elde edilmiş AgNP ilave edilmiştir. Günlük olarak kontrol edilerek yetişkin olan bireyler toplanarak cinsiyetlerine göre ayrılmış ve kaç bireyin oluştuğu hesaplanmıştır.

2.2.2. AgNP'nin morfolojik karakterizasyonu

Metalik nanopartiküllerinin toksisiteleri ve yapısal özellikleri; büyüklükleri, yükü, boyut yapıları ile kimyasal aktiviteleri gibi birçok özellikten etkilenebilmektedir (Umamaheswari vd., 2018). Bu sebeple, nanopartiküllerin karakterizasyonunun iyi belirlenmesi çalışmalarda doğru sonuçların alınabilmesi açısından oldukça önemlidir. Yeşil sentez ile elde edilmiş AgNP'lerin karakterizasyonu için gümüş nanopartiküllerinin sentezinin doğrulanabilmesi, boyut dağılımı profili ve yüzey morfolojisi hakkında fikir sahibi olabilmek ve gerçek parçacık boyutunu belirleyebilmek için çeşitli metodlar uygulanmıştır.

2.2.2.1. Ultraviyole ve görünür bölge spektroskopisi (UV-Vis) analizi

UV-Vis spektroskopisi, ultraviyole ve görünür spektrumların spektral bölgesinde absorpsiyon spektroskopisi olarak anlaşılabilir. Genellikle, görünür ve UV'ye yakın aralıkta ışık kullanır. Ultraviyole ve görünür ışık, dış elektronları daha yüksek enerji seviyelerine yükseltecek kadar enerjiktir ve UV-Vis spektroskopisi genellikle çözelti içindeki moleküllere uygulanır. UV-Vis spektrumları, numune tanımlama için sınırlı kullanımda olan ancak niceliksel ölçümler için çok yararlı olan geniş özelliklere sahiptir. Bir analitin çözelti içindeki konsantrasyonu, özgül dalga boyunda absorbans ölçülerek ve Beer-ambert Yasası uygulanarak belirlenir. UV-Vis aralığı, yaklaşık 400-750 nm'lik insan görme keskinliği aralığını kapsadığından, UV-Vis spektroskopisi, pigmentler, kaplamalar gibi teknolojik olarak önemli çeşitli malzemelerin emilimini, iletimini ve yansıtıcılığını karakterize etmek için yararlıdır. Bu çalışmada, saf suda dispersiyonu hazırlanan 50 mg/mL AgNP'den 5 mL alınarak 1x1 cm'lik kuartz küvete konulmuş ve Perkin Elmer, Lambda 35 UV-Vis Spektrometre (Şekil 2.9) kullanılarak spektrum görüntüsü alınmıştır.



Şekil 2.9. UV-Vis spektrofotometresi

2.2.2.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Enerji dağılım X-ışını spektrometre (EDX) analizi

Taramalı elektron mikroskop (SEM), ışık yerine elektron kullanarak büyük ölçüde büyütülmüş bir görüntü üretir. Bir elektron demeti tarafından mikroskobun üstünde bir elektron demeti üretilir. Elektron ışını, bir vakum içinde tutulan mikroskopta dikey bir yol izler. Işın, ışını numuneye doğru odaklayan elektromanyetik alanlardan ve merceklerden geçer. Işın bir numuneye çarptığında, elektronlar ve X-ışınları numuneden atılır. Dedektörler bu X-ışınlarını, geri saçılmış elektronları ve ikincil elektronları toplar ve bunları televizyon ekranına benzer bir ekrana gönderilen bir sinyale dönüştürür. Bu, yüzeyin son görüntüsünü üretir. SEM vakum koşullarını kullandığı ve bir görüntü oluşturmak için elektron kullandığı için, numuneye özel hazırlıklar yapılmalıdır. Vakumda su buharlaşacağı için tüm su numunelerden uzaklaştırılmalıdır. Tüm metaller iletken ve kullanımdan önce herhangi bir hazırlık gerektirmezken, metal olmayan tüm malzemelerin ince bir iletken malzeme tabakası bir püskürtme kaplayıcı ile kaplanması gerekir (Bowman ve Booth, 1997).

Enerji Dağılım X-Ray ışını Spektroskopisi (EDX), temel eğriyi çıktı olarak sağlayan bir tekniktir. Bu analitik teknik genellikle Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ile birlikte kullanılır. EDX tekniği öncelikle ilgili numunenin elementel bileşimini karakterize etmek için bir elektron ışını ile bombardıman işlemi sırasında numuneden

yayılan X-ışınlarını tespit eder. Bir numune SEM'in elektron ışını tarafından bombardımana tutulduğunda, elektronlar, numunenin yüzeyini oluşturan atomlardan çıkarılır. Ortaya çıkan elektron boşlukları, daha yüksek bir enerji durumundan elektronlar ile doldurulur ve elektronların iki enerji durumu arasındaki enerji farkını dengelemek için bir X-ışını yayılır. Yayılan röntgen enerjisi, yayıldığı elementin önemli bir özelliğidir. EDS X-ışını detektörü, yayılan X-ışınlarının enerjilerine karşı nispi bolluğunu ölçer. Dedektör tipik olarak lityum-rifte edilmiş silikon ve katı halde bir cihazdır. X-ışını detektöre çarptığında, X-ışınının enerjisi ile orantılı bir şarj darbesi oluşturur. Şarj darbesi, yüke duyarlı bir ön yükselteç tarafından bir voltaj darbesine (röntgen enerjisiyle orantılı kalır) dönüştürülür. Sinyal daha sonra darbelerin voltaja göre sıralandığı çok kanallı bir analiz cihazına gönderilir. Her bir olay röntgeni için enerji (voltaj ölçümünden belirlendiği gibi), verilerin görüntülenmesi ve daha fazla değerlendirilmesi için bir bilgisayara gönderilir. X ışını enerjisinin sayımlara karşı spektrumu, örneklenen hacmin temel bileşimini belirlemek için değerlendirilir. EDX, numunede gümüşün varlığının ve yüzdesinin doğrulanmasında fayda sağlamıştır. Biyolojik olarak sentezlenmiş gümüş nanoparçacıklarının yüzey morfolojileri ve özellikleri bu yöntemlerle FEI-Quanta FEG 450 marka cihazında (Şekil 2.10) yüksek derecede vakum altında 20kV'de gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.10. Taramalı elektron mikroskobu ve enerji dağılım X-ışını spektrometresi

2.2.2.3. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR) analizi

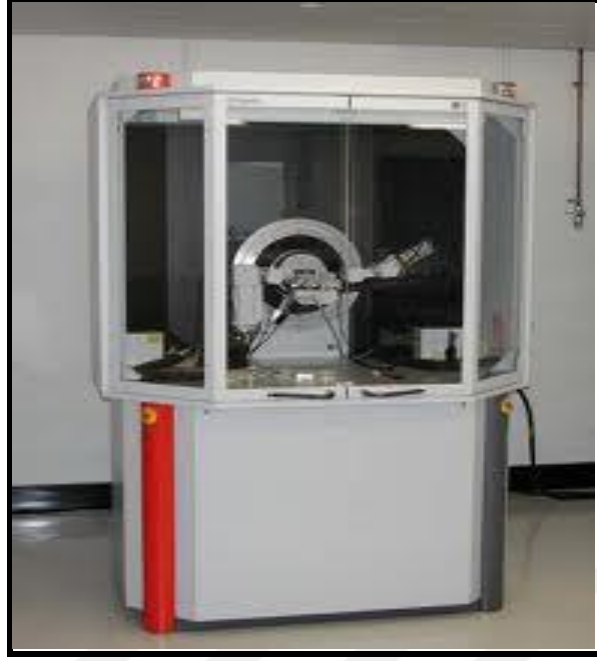
Ekstraktın yüzey özelliklerini ve ayrıca sentezlenmiş nanoparçacıkların tanımlanması için Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi kullanılmaktadır. Deneysel çalışmalarda numune analizinde Thermo Scientific, Nicolet 6700 markalı FT-IR spektrometre (Şekil 2.11) Attenuated Total Reflectance (ATR) tekniği ile kullanılmıştır. Numunenin $400-4000\text{cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında yapısındaki fonksiyonel grupların absorpsiyon değerleri belirlenmiş ve bundan yola çıkılarak yapı aydınlatılmaya çalışılmıştır. Infrared (IR) spektroskopisi yönteminde infrared ışınları moleküllerin titreşim hareketleri tarafından absorplanır. Her maddenin kendine has bir spektrumu vardır. Bu yöntemle bilinmeyen malzemelerin yapısı nitel olarak tanımlanabildiği gibi, kompleks bir karışımdaki bileşenlerin nicel ölçümleri de yapılabilir. IR spektroskopisinde, amaç herhangi bir bileşiğin yapısı hakkında bilgi sahibi olmak veya yapısındaki değişiklikleri incelemektir. Bileşiğin alınan IR spektrumu ile yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri, yapının aromatik veya alifatik olduğuna dair bir bilgi edinebilir.



Şekil 2.11. FT-IR spektrometre

2.2.2.4. X-Işını kırınımı (XRD) analizi

X-ışını kırınımı (XRD) kristal yapıları ve atomik aralıkları incelemek için kullanılan yaygın bir tekniktir. Kristallerin malzeme ve birim hücre boyutları hakkında da bilgi sağlayabilir. X-ışını kırınımı (XRD), monokromatik X-ışınlarının ve bir kristalin numunenin yapıcı girişimine dayanır. Bu X-ışınları bir katot ışın tüpü tarafından üretilir, monokromatik radyasyon üretmek üzere filtrelenir, konsantre olmak üzere toplanır ve numuneye doğru yönlendirilir. Bu kırılmış X-ışınları daha sonra tespit edilir, işlenir ve sayılır. Kırınım piklerinin d-aralıklarına dönüştürülmesi, bir metalin tanımlanmasına izin verir, çünkü her metal bir dizi benzersiz d-aralığına sahiptir. Tipik olarak, bu d-aralıklarının standart referans modelleri ile karşılaştırılmasıyla elde edilir. XRD tekniği, mineraller, inorganik bileşikler gibi bilinmeyen kristalli malzemeleri tanımlamak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bilinmeyen maddelerin tanımlanması jeoloji, çevre bilimi, malzeme bilimi, mühendislik ve biyoloji çalışmalarında önemlidir. AgNP analizinde Panalytical, Empyrean markalı XRD cihazı (Şekil 2.12) kullanılmıştır.



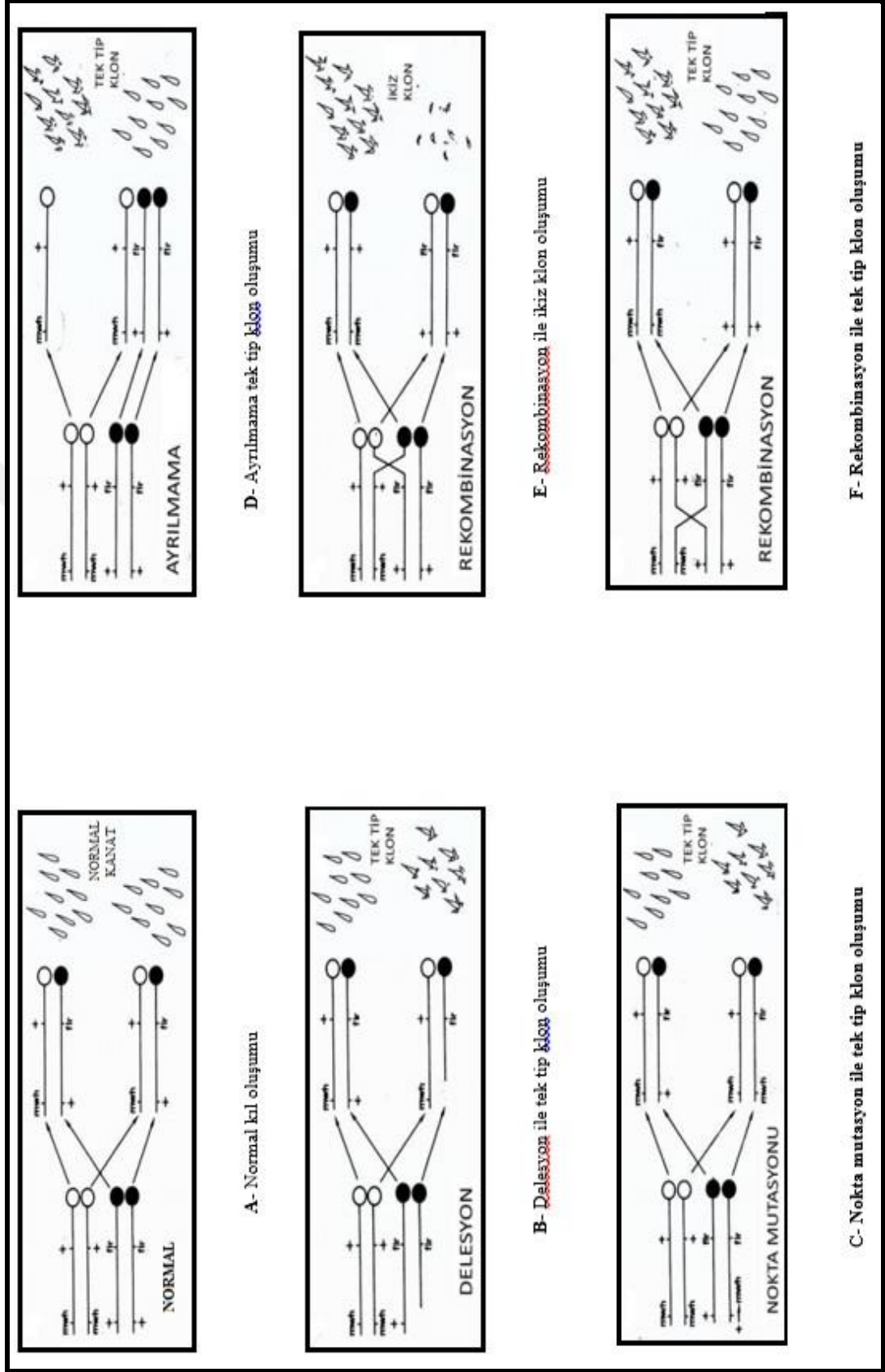
Şekil 2.12. X-ışını difraktometresi

2.2.3. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

2.2.3.1. Kanat benek testi

Kanat benek testi olarak da bilinen somatik mutasyon ve rekombinasyon testi de Graf ve arkadaşlarının 1984 yılındaki çalışmaları esas alınarak *Drosophila melanogaster* türüne ait olan $flr^3/TM3, Bd^S$ dişi virjin bireyler ile mwh/mwh erkek mutant bireyler kullanılmaktadır. Bu bireylerin çaprazlanması ile oluşan 3. instar (72 ± 4 saatlik) transheterozigot larvalarının kanat imajinal disk hücrelerindeki heterozigotluk kaybı fenotipde gözlemlenmektedir (Graf vd., 1984, Kaya, 2000). $flr^3/TM3, Bd^S$ dişi bireyler, yumurta veriminin yüksek olmasından dolayı tercih edilmektedir. SMART tekniğinde, 1. larva evresinde ortalama 50- 100 olan ve artarak 3. larva evresinde 24.400'e ulaşan imajinal diskler test maddelerine maruz bırakılmaktadır (Würgler, 1986; Graf, 1992). Transheterozigot larvalardaki imajinal disk hücrelerinin ileride ergin bireylerin organ ve yapılarını oluşturacağından dolayı test edilen kimyasal maddelerin imajinal disklere etki ederek bireyin gelişiminde ortaya çıkması muhtemel olan nokta mutasyon, delesyon, ayrılmama, kromozom bozuklukları ve rekombinasyonların belirlenmesine imkan vermektedir. SMART, göz benek ve kanat benek testi olmak üzere iki farklı şekilde incelenmektedir (Kaya, 2000).

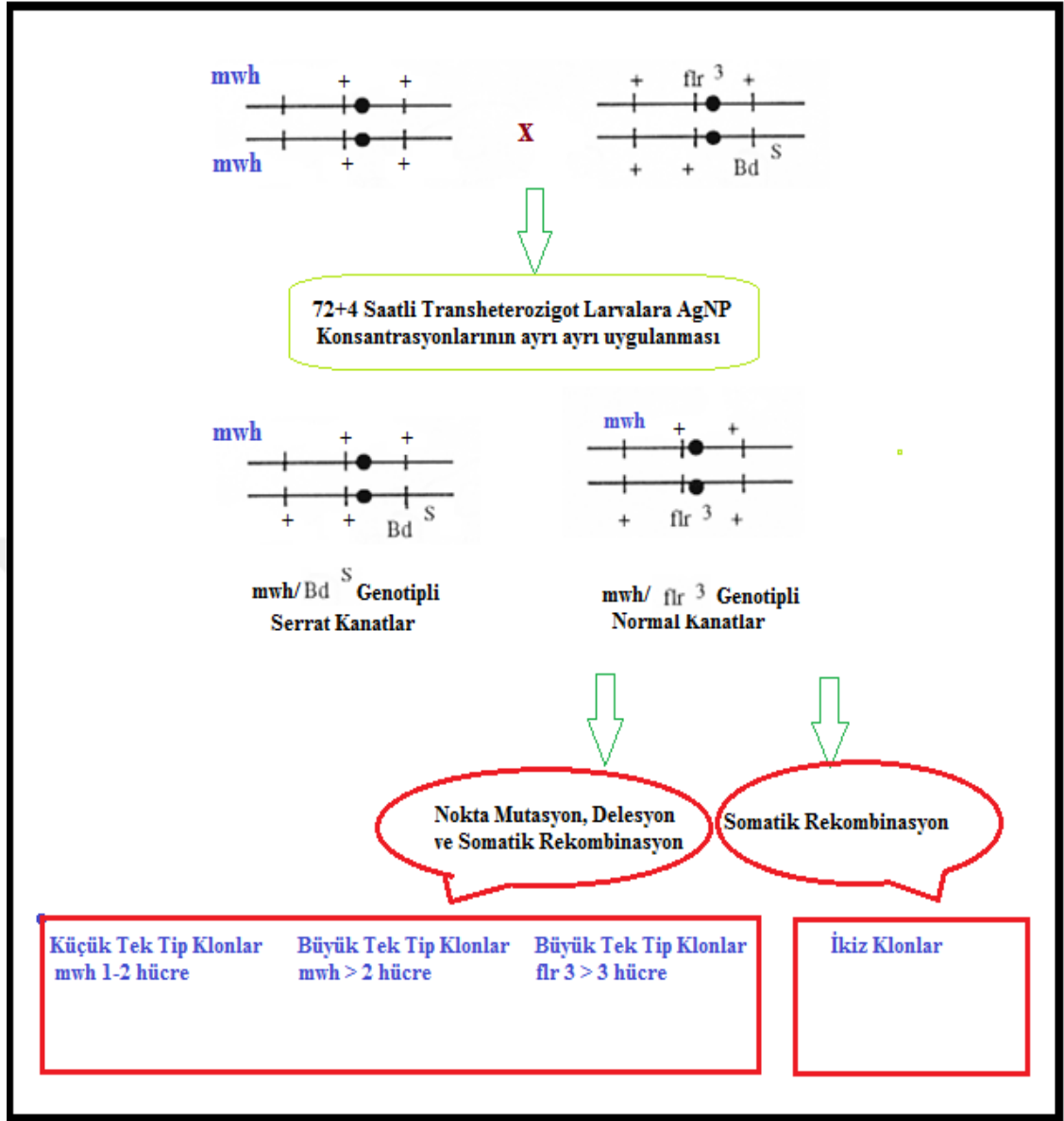
Somatik mutasyon ve rekombinasyon yöntemiyle bir mutasyon ile heterozigotluğun kaybedilip yabancı fenotip yerine mutant fenotip oluştuğu gözlenmektedir (Graf vd., 1984; Graf ve Rincón, 1995). Mutant fenotip, değişiklik gösteren genetik mekanizmalardan dolayı hücre klonlarındaki farklı benek grup ve sayılarına göre belirlenerek farklı şekillerde oluşabilmektedir. Tek tip klon (tekli benekler) flr^3 ya da mwh fenotipindeki hücrelerden meydana gelirken; ikiz klon (ikili benekler) ise flr^3 ve mwh fenotiplerini birlikte bulundurmaktadır. (Şekil 2.13). Tek tip klonda, 1 ya da 2 mwh hücresi bulunması küçük tek tip klon, 3 ya da daha fazla mwh veya flr^3 klonu bulunması ise büyük tek tip klon olarak adlandırılmaktadır (Szabad vd., 1983, Henderson, 2004). Delesyon, ayrılmama, rekombinasyon ve nokta mutasyonları ile mwh ve flr^3 genleri arasında meydana gelen genetik değişiklikler ile tekli mwh klonları oluşurken, flr^3 geni ile 3. kromozomun sentromeri arasında meydana gelen somatik rekombinasyon ile ikiz klonlar oluşmaktadır. TM3 kromozomu, serrat kanatlı ($mwh/TM3$) bireylerde baskılanarak mitotik crossing over olayının meydana gelmesine sebep olmaktadır (Frei ve Würzler, 1996; Sarıkaya, 2005).



Şekil 2.13. *Drosophila melanogaster*'e ait farklı klon türleri

2.2.3.2. Çaprazlama için birey seçimi

SMART uygulamaları için Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarı'nda $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ve %60 bağıl nem ortamındaki etüvlerde yetiştirilen *Drosophila melanogaster*'e ait mutant bireyler kullanılmış ve standart *Drosophila* besiyerinde (SDB) kültüre alınarak yetiştirilmiştir. 3. evre (72 ± 4 saatlik) transheterozigot larvaların elde edilebilmesi amacıyla *D. melanogaster*'in *multiple wing hair (mwh)* erkek bireyleri ile *flare (flr³)* virjin halde dişi bireylerinin bulunduğu besiyeri ortamından 4'er saatlik aralıklarla dişi bireyler virjin halde toplanarak farklı bir besiyeri ortamına alınmıştır. Taze besiyeri ortamına alınmış 40 *flr³* dişi ve 40 *mwh* erkek birey 3 gün süreyle 8 saat aralıklarla aprazlanmaya bırakılmıştır. Yumurta oluşumunun gerçekleşmesi ve transheterozigot larvaların aynı evrede olmaları için oogenezi gerçekleşmiş olan bireylerin 8 saat aralıklarla taze bir besiyeri ortamına alınmak suretiyle yumurta bırakmaları sağlanmıştır. Transheterozigot larvaların elde edilebilmesi için yapılan aprazlama (Graf vd., 1984) Şekil 2.14'de gösterilmiştir.



Şekil 2.14. *D. melanogaster*'de SMART uygulanmasının şematik gösterimi

2.2.3.3. Deney gruplarına AgNP'lerin uygulanması

Yeşil sentez yöntemiyle elde edilen ve sentetik formda ticari olarak satın alınan AgNP_(k)'lerin LD₅₀ dozunu belirlemek amacıyla çeşitli konsantrasyon aralıklarında 24 saatlik uygulamalar yapıldıktan sonra tespit edilen LD₅₀ dozlarına göre iki ayrı deney seti hazırlanarak 3 farklı konsantrasyonda (1,25; 2,50 ve 5 mg/mL) çalışılmıştır. *Drosophila melanogaster*'in *multiple wing hair (mwh)* erkek bireyler ile *flare (flr³)* dişi bireyleri 8 saat süresince çiftleşmeye bırakılmış ve döllenmiş yumurtalardan oluşan 3. evre larvalar distile su ile yıkanarak elekten geçirilip ayrılmıştır. (72±4 saatlik)

transheterozigot larvaların uygulama ortamı olarak kullanılan cam tüpler içerisine yaklaşık 1,5 g kadar hazır *Drosophila* Instant Medium konulmuş ve besinler uygulamadan hemen önce hazırlanan AgNP çözeltilerinin 5 mL'si ile nemlendirilmiştir. Yaklaşık 100 larva olmak kaydıyla her tüp içerisine 1- 2 spatül dolusu larva uygulama ortamına alınmış ve cam tüplerin ağızları tıkaçlarla kapatılmıştır. Uygulama ortamına alınan transheterozigot larvalar $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ve % 60 bağıl nem ortamındaki etüvlere alınarak 72 saat boyunca farklı AgNP dozlarına (1,25; 2,5 ve 5 mg/mL) maruz bırakılmıştır.

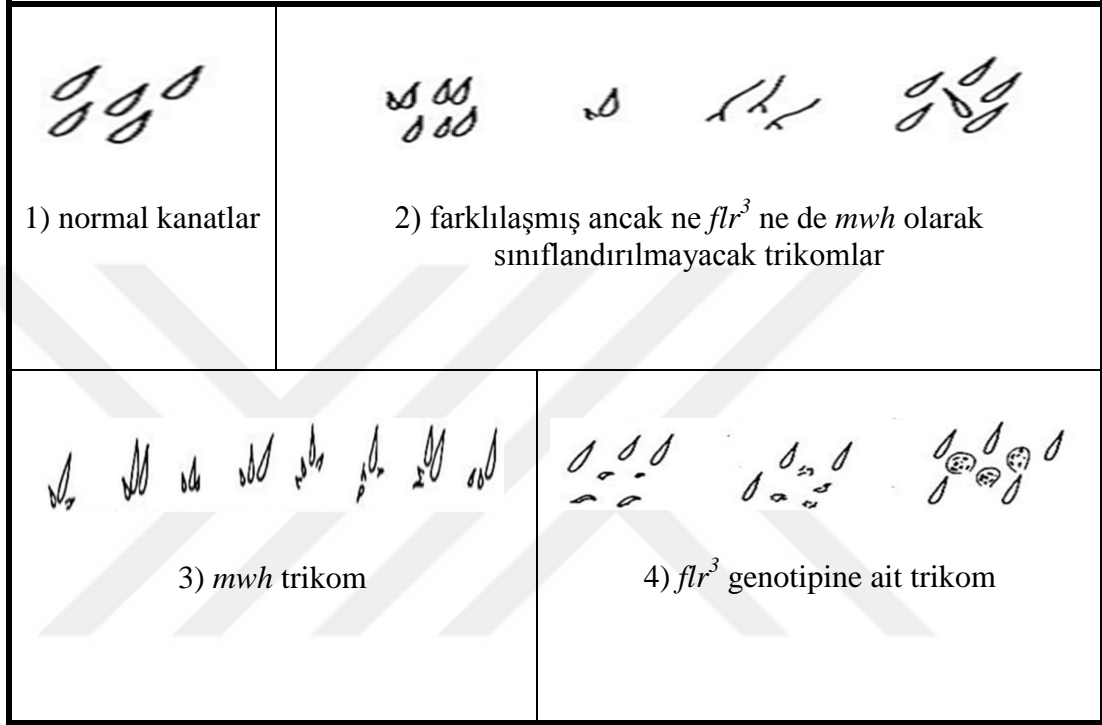
2.2.3.4. Ergin birey toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması

AgNP dozlarına maruz bırakılan larvalar pupa evresini takiben gelişim göstererek ergin birey haline geldiklerinde günlük olarak dietil eter yardımı ile bayıltılarak toplanmış, normal kanatlı (*mwh/flr³*) ve serrat kanatlı (*mwh/TM3,Bd^S*) bireyler şeklinde ayrılarak içerisinde %70'lik etil alkol bulunan tüplere kanat preparatlarının hazırlanması için alınmıştır. Bu tüpler $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Kanat preparatları hazırlamak için 50 mg kloral hidrat, 20 mL gliserol, 30 mg gum arabic ve 50 mL distile su karışımının kaynatılıp soğumaya bırakılmasıyla elde edilen faure solüsyonu kullanılmıştır (Negishi vd., 1988). Temiz bir çukur lam üzerine 1- 2 damla faure solüsyonundan konularak daha önce %70'lik alkol içerisinde bekletilen ergin bireyler ince uçlu pens yardımı ile dikkatlice alınarak Leica marka E24 model stero mikroskobu altında ince uçlu pens kullanılarak hassas bir şekilde kıllara ve kanatlara zarar vermeden kanatların sinek vücuduna bağlı bulunduğu noktasından çekilerek ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ayrılmış olan sinek kanat çiftleri lam üzerine uygun şekilde konularak dizilmiştir. Lamel ile kapatılarak üzerine hafif bir ağırlık konulup tozsuz bir ortamda bekletilip kanatlar incelemek için hazır hale getirilmiştir.

2.2.3.5. Kanat preparatlarının mikroskopta incelenmesi

Hazırlanmış olan kanat preparatları 10X40 büyütmede Leica marka DM 500 model ışık mikroskobunda incelenmiştir. Kanat üzerindeki sektörler, incelemede kolaylık sağlaması açısından A, B, C, C¹, D, D¹ ve E olarak bölümlere ayrılmıştır. Bu sektörlerde yapılan incelemelerde, kanatların hem dorsal hem de ventral yüzündeki hücre

tabakalarında mutant klonların oluşup oluşmadığı dikkate alınmıştır. Kanatlar mikroskopta incelenirken özellikle mikro vida kullanılarak her sektör ayrı taranmış *mwh* ve/veya *flr³* mutant fenotipler sayılarak kaydedilmiştir. Normal ve farklılaşmış fakat ne *flr³* ne de *mwh* olarak sınıflandırılmayacak trikomal (Graf vd.,1984) Şekil 2.15’de gösterilmiştir.



Şekil 2.15. Kanat trikomalının görünüşleri

2.2.3.6. Klon indüksiyon frekansının hesaplanması

Normal standart uygulamada tüm hücrelerde ve her hücre bölünmesinde ortalama indüksiyon frekansı aşağıdaki eşitlik ile matematiksel olarak hesaplanmıştır (Szabad vd., 1983).

$$f = \frac{n}{NC} \times 10^5$$

Eğer sadece *mwh* klonlar göz önüne alınırsa, denklemdaki "f" *mwh* klonlarının indüksiyonunun ortalama frekansını, "n" gözlenmiş olan toplam *mwh* klon sayısını, "N"

analiz edilmiş olan kanat sayısını ve "C" bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısını göstermektedir.

2.2.3.7. Kanat benek testi sonuçlarının istatistiksel analizi

Farklı konsantrasyonlarda AgNP'lerin uygulandığı SMART sonuçlarının değerlendirilmesinde, *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için hazırlanmış bilgisayar programı olan Microsta kullanılmıştır (Frei ve Würgler, 1988).

2.2.3.8. Mikrofotografi

Çalışmalarda, ergin birey kanatlarından hazırlanan preparatlarda gözlenen küçük tek tip, büyük tek tip ve ikiz klonlara ait fotoğraf çekimleri Olympus marka DX63 model ışık mikroskopunda gerçekleştirilmiştir.

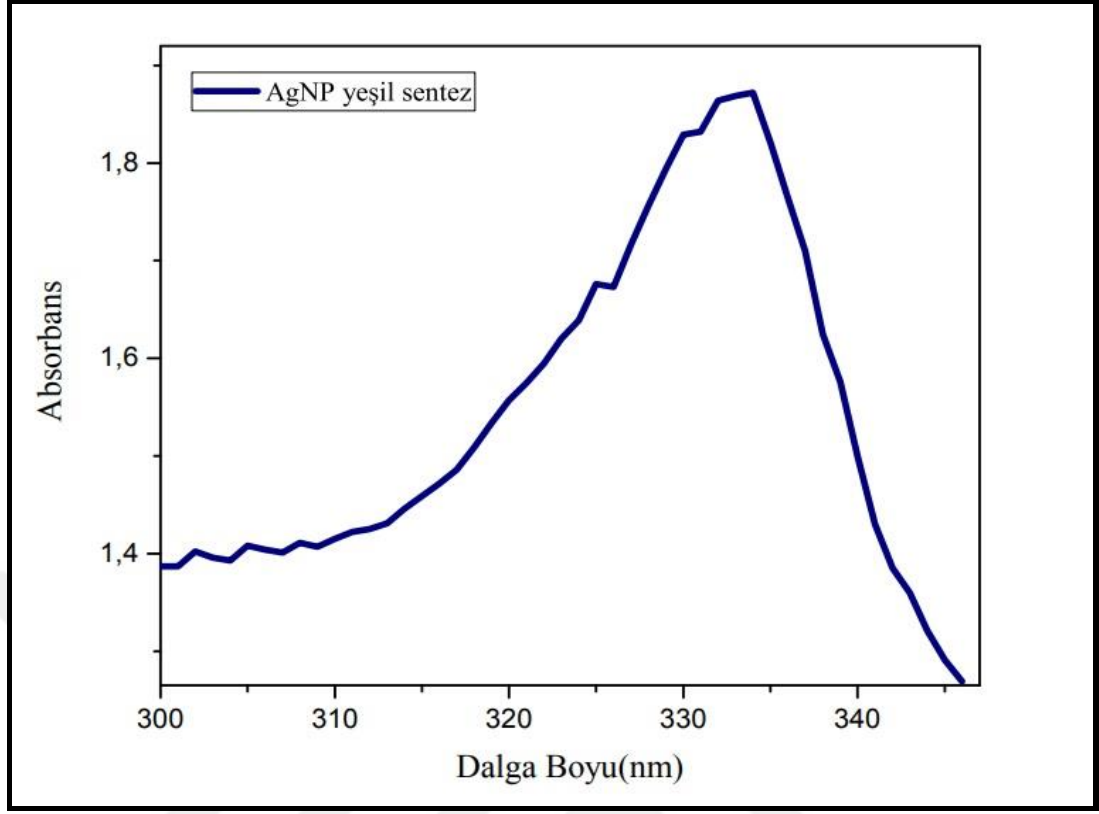
3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışma üç aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle X-ışını kırınımı (XRD), taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve enerji dağılımlı X-ışını (EDAX) analizleri, Fourier transform infrared Spektroskopisi (FT-IR) ve Ultraviyole/görünür ışık absorpsiyon spektrofotometresi (UV-Vis) ile AgNP karakterize edilmiştir. İkinci aşamada ise farklı konsantrasyonlarda (1,25; 2,5; 5,0; 7,5 ve 10 mg/mL) AgNP_(k) (30-50 nm) ve AgNP_(b) içeren besiyerlerinde *Drosophila melanogaster*'in (*mwhxflr*³) 72±4 saatlik transheterozigot larvaların yaşama yüzdesi (larval mortalite) üzerine etkisi araştırılmıştır. Son aşamada ise, LD₅₀ dozununun AgNP_(k) için 7,5 mg/mL ve AgNP_(b) için 10 mg/mL olduğu belirlendikten sonra 1,25; 2,5 ve 5 mg/mL konsantrasyonlarında AgNP_(k) ve AgNP_(b) içeren besiyerlerinde yaşayabilen ergin bireylere ait kanatlar kullanılarak *Drosophila* kanat benek testi ile genotoksik aktivitenin olası sonuçları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

3.1. AgNP_(b) Nanopartikülünün Karakterizasyonu

3.1.1. UV-Vis spektroskopisi

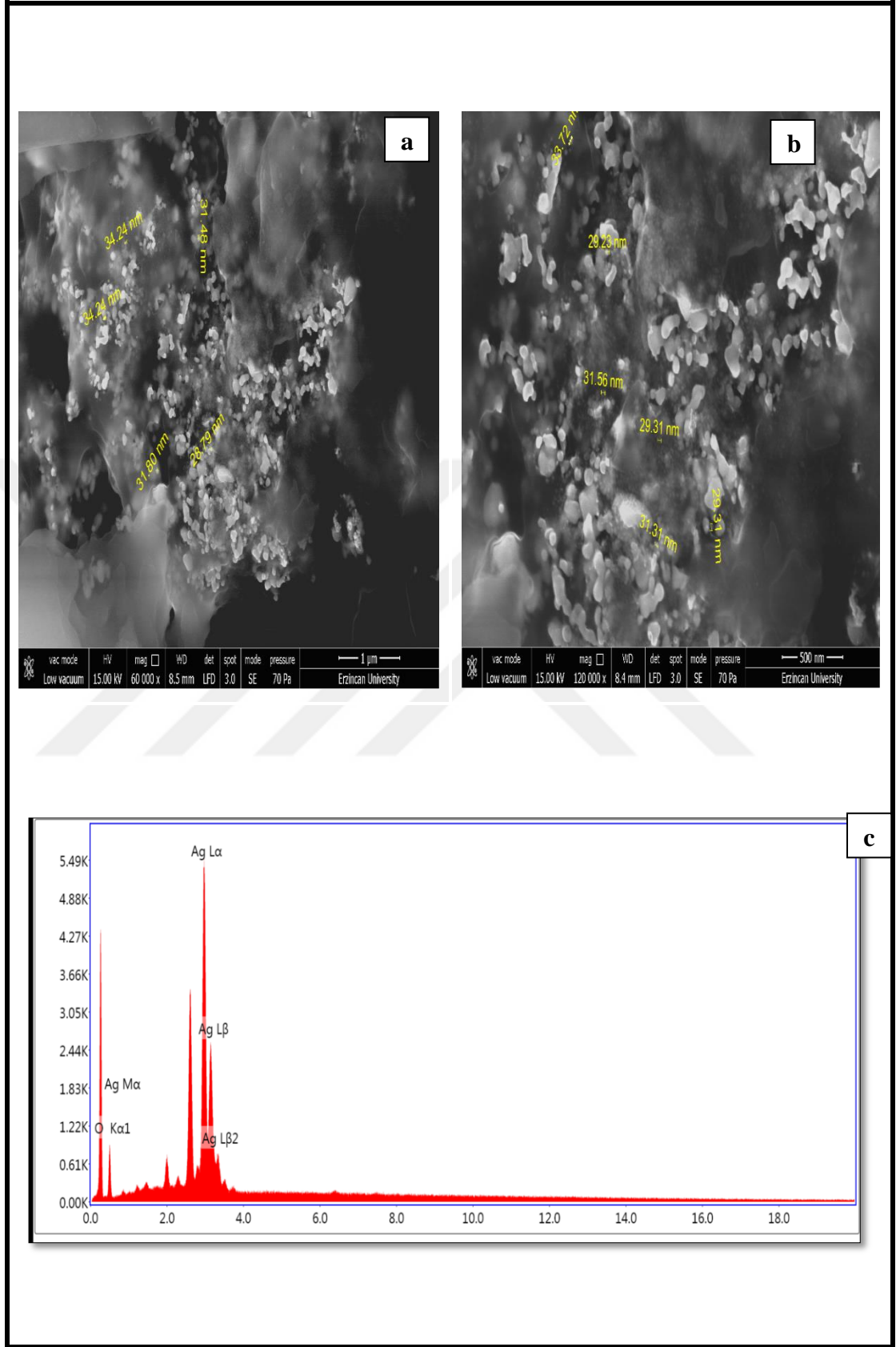
Bitki yaprağı ekstresi kullanılarak sentezlenen AgNP'lerin başarılı sentezi, renk değişimi ve spektroskopik analizi ile doğrulanmıştır. Reaksiyon karışımının renginin sarımsı yeşilden kahverengiye değiştiği gözlenmiştir. Bu durum iyonik formdaki gümüşün (Ag⁺) metalik gümüşe (Ag⁰) dönüştüğünü desteklemektedir. Bu gözlem bazı sekonder metabolitlerin (polifenoller, alkobidler, terpenler ve proteinler gibi) indirgeyici özelliklerinden dolayı bitki elektrotlarının varlığında gümüş iyonlarının azaldığını öngören temel literatürle tutarlıdır (Jain ve Mehata, 2017). AgNP_(b)'lerin optik özelliğinin belirlenmesi amacıyla 300 ve 700 nm aralığında UV- Görünür bölge absorpsiyon spektrumu alınmıştır. Şekil 3.1'de verilen absorpsiyon spektrumu incelendiğinde, AgNP_(b)'lerin 335 nm'de maksimum absorpsiyona sahip olduğu görülmektedir.



Şekil 3.1. AgNP_(b)'lerin UV-Vis spektrumu

3.1.2. SEM ve EDX analizleri

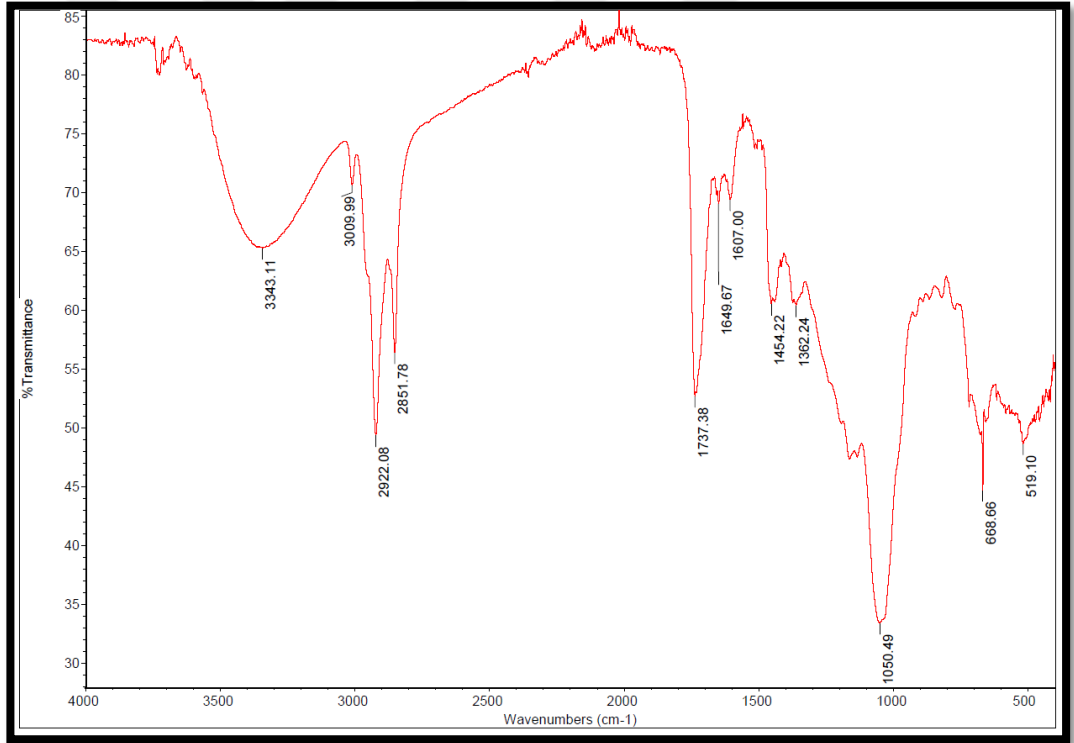
SEM nanoyapıların yüzey morfolojilerini araştırmak için kullanılan önemli bir tekniktir. AgNP_(b) numunesinin SEM görüntüleri Şekil 3.2a ve Şekil 3.2b'de verilmiştir. Ag nanoparçacıkların bitki platformu üzerinde gelişigüzel dağıldığı ve 28- 34 nm aralığında değişen boyutlara sahip olduğu görülmektedir. Normalde küresel yapıya sahip Ag nanoparçacıklarının, çalışmada tam bir küresel yapıya sahip olmayan genişlemiş (uzatılmış) bir yapıda olması sentez esnasında iki veya daha fazla sayıda Ag nanoparçacıklarının üst üste toplanmasından (agregasyonundan) kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum literatürdeki diğer çalışmalarla uyum içerisindedir (Tamuly vd., 2013). Numunenin enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) analizinde %20,4 Ag ve %79,6 O elementleri (% atomik olarak) tespit edilmiştir (Şekil 3.2c). Bu durum Ag nanoparçacıklarının oluştuğunu ispatlarken, stokiyometrideki uyumsuzluk *V. vinifera* bitkisinin yapraklarının yapısında bulunan oksijenden kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.2. AgNP_(b)'lerin SEM görüntü ve EDX'leri

3.1.3. FT-IR analizleri

Numunenin FTIR spektrumu Şekil 3.3'de gösterilmiştir. 3343 cm^{-1} 'deki yayvan pik bitkinin polimerik yapısında bulunana alkolik ve fenolik grupların O-H gerilmelerinden ve amin gruplarının N-H gerilmelerinden kaynaklanmaktadır. 3009 cm^{-1} 'deki pik aromatik C-H gerilmelerine ait iken 2922 ve 2851 cm^{-1} 'deki pikler ise alifatik C-H gerilmelerine aittir. Bitkinin yapısındaki karboksilik grupların C=O gerilmesi şiddetli olarak 1737 cm^{-1} 'de, amid gruplarına ait karbonil gerilmesi (amid I bandı) ise 1649 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. 1607, 1515 ve 1454 cm^{-1} 'deki pikler aromatik halkanın C=C gerilme titreşimlerine, 1362 cm^{-1} 'deki pik ise aminlerin C-N gerilme titreşimlerine atfedilebilir. Ester ve alkol yapılarının C-O gerilmelerinden kaynaklanan pik 1058 cm^{-1} 'de gözlenmiştir.

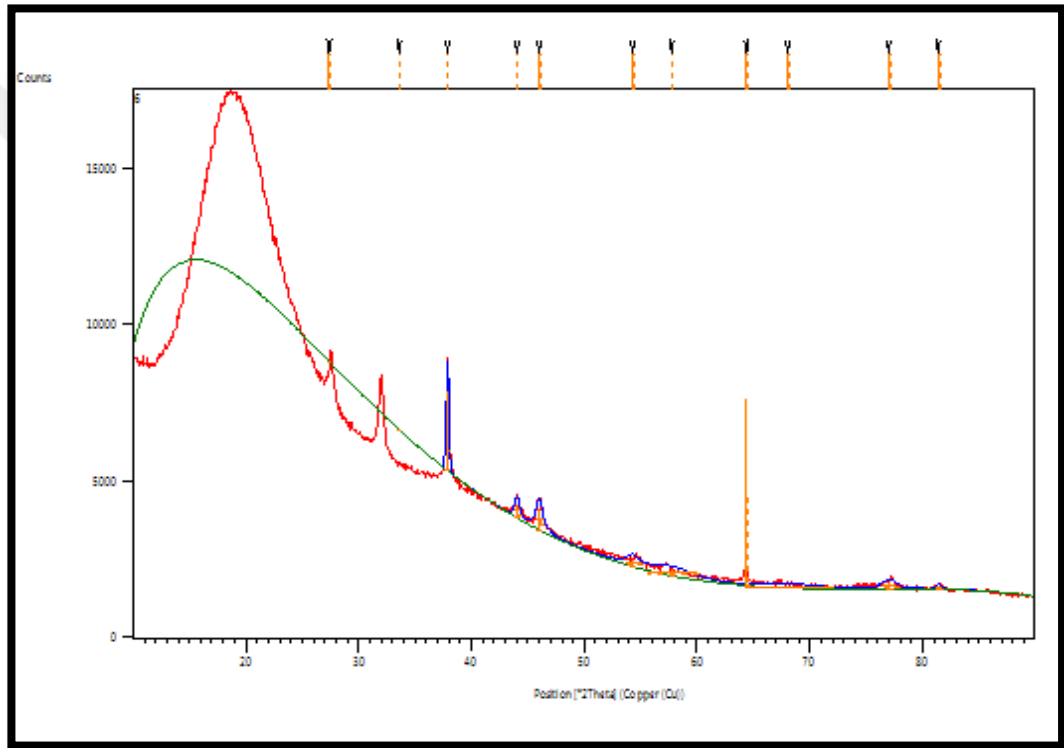


Şekil 3.3. AgNP_(b)'lerin FT-IR analizleri

3.1.4. XRD analizleri

Şekil 3.4'de AgNP_(b) numunesinin toz XRD spektrumu verilmiştir. Numunenin XRD kırınım deseninde hem *V. vinifera* bitkisinin yapraklarına hem de Ag nanoparçacıklarına ait pikler gözlenmiştir. 18.00 (2θ) açısındaki yayvan pik üzüm bitkisinin yapraklarının

polimerik yapısına aittir. Buna ilaveten, Ag nanoparçacıklarından kaynaklanan 27, 30, 34, 56, 37, 86, 46, 10, 64, 32 ve 77,02 (2 θ) açılarında sırasıyla 3,25; 2,67; 2,37; 1,97; 1,44 ve 1,24 Å'lük uzaklığa sahip (210), (113), (111), (200), (220) ve (311) kırınımına karşılık gelen karakteristik pikler gözlenmiştir (JCPDS kart no 04-0783). Elde edilen piklerin pozisyon ve şiddetleri Ag nanoparçacıklarının yüzey merkezli kübik yapıda olduğuna işaret etmektedir (Jasrotia vd., 2020). Bunlara ilaveten 37,86 (2 θ)'daki XRD pikinin yüksek şiddette olması aynı açıda gelen Ag₂O pikiyle çakışmasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.4. AgNP_(b)'lerin XRD görüntüleri

3.2. Yaşama Yüzdesi (Larval Mortalite) Deneilerine Ait Bulgular

Genotoksitesi karşılaştırmalı olarak çalışılacak olan AgNP_(k) ve AgNP_(b)'lerin öncelikle *D. melanogaster* larvaları üzerinde toksik etkileri olup olmadığı yaşama yüzdesi deneyleri ile araştırılmıştır. Bu amaçla, 72±4 saatlik 100'er adet transheterozigot larva farklı konsantrasyonlarda (1,25; 2,5 ve 5,0 mg/mL) AgNP_(k) ve AgNP_(b) içeren uygulama gruplarına ait besiyerlerine konulmuştur. Tablo 3.1 ve Şekil

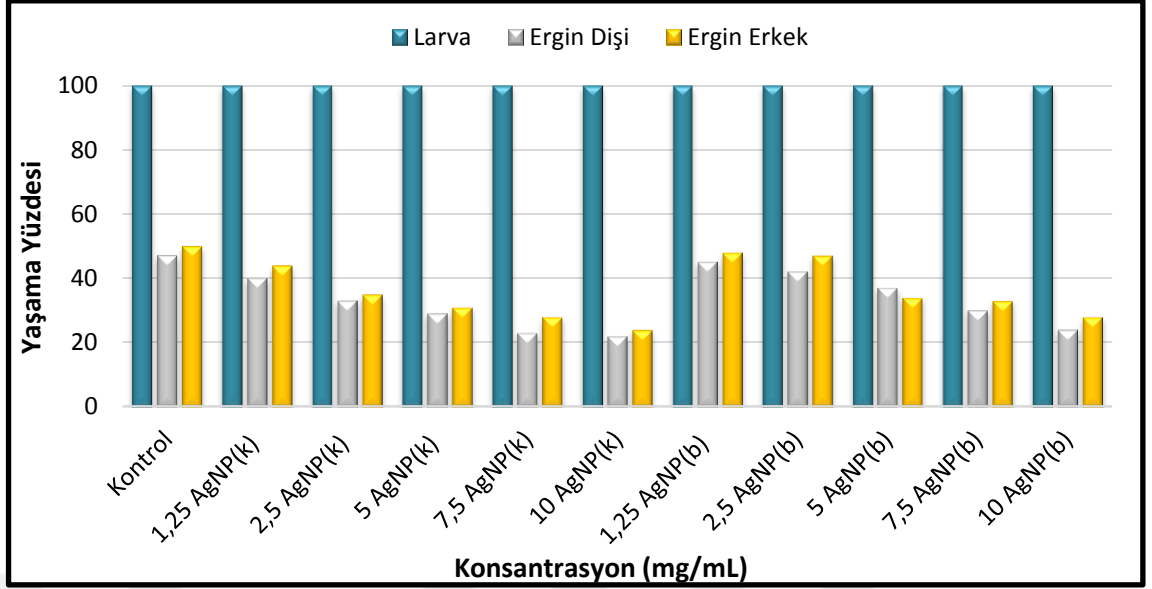
3.5’de tüm gruplarda larvadan ergine gelişebilen bireyler sayılarak hesaplanan hayatta kalış oranları verilmiştir.

Tablo 3.1. AgNP(k) ve AgNP(b) uygulanan *D. melanogaster*’in 72±4 saatlik

Uygulama Grupları	Konsantrasyon (mg/mL)	Larva Sayısı	Hayatta Kalış Oranı (%)		
			Dişi Birey	Erkek Birey	Toplam Birey
Kontrol	0	100	47	50	97
AgNP _(k)	1,25	100	40	44	84
	2,5	100	33	35	68
	5	100	29	31	60
	7,5	100	23	28	51
	10	100	22	24	46
AgNP _(b)	1,25	100	45	48	93
	2,5	100	42	47	89
	5	100	37	34	71
	7,5	100	30	33	63
	10	100	24	28	52

transheterozigot larvalarında yaşama yüzdesi (larval mortalite) oranları

Yaşama yüzdesi deneylerinden elde edilen sonuçlara göre, AgNP_(k) ve AgNP_(b)’nin *D. melanogaster*’e ait larvaların yaşama yüzdesi üzerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak toksik etki gösterdiği ve hayatta kalış oranının kontrole göre azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Bu etkinin AgNP_(k) uygulama gruplarına göre AgNP_(b) uygulama gruplarında çok daha düşük olduğu ve AgNP_(b)’nin en düşük konsantrasyonunda larval mortalite oranının kontrol grubuna yakın olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.1 ve Şekil 3.5).



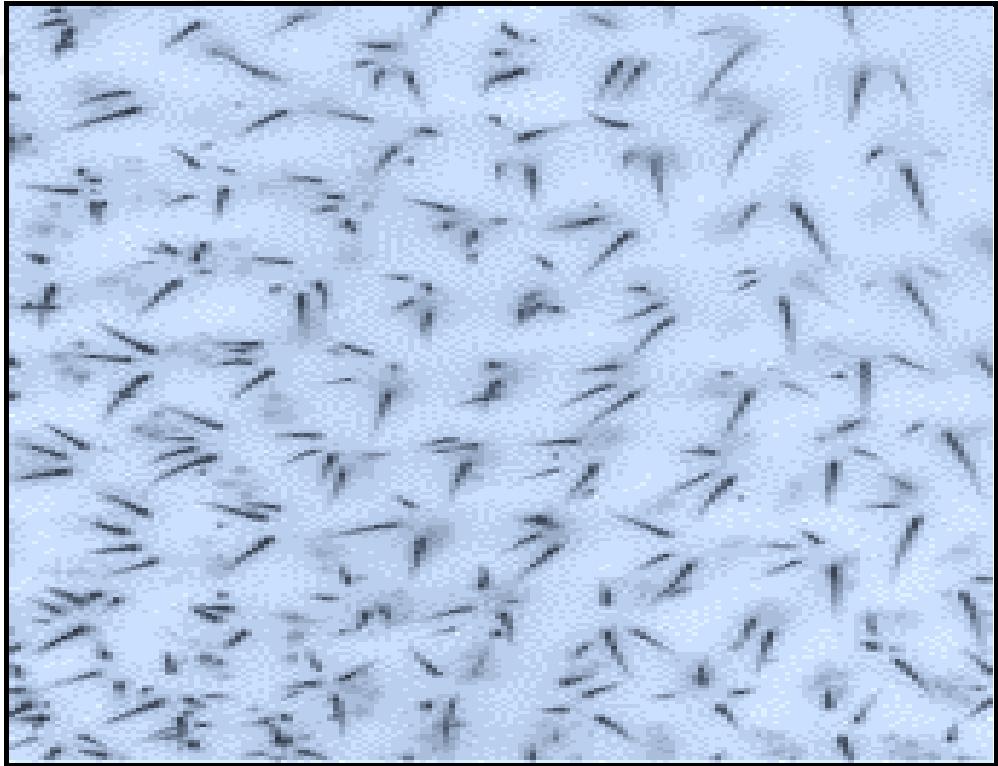
Şekil 3.5. *D. melanogaster*'de larval mortalite oranları

3.3. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi Bulguları

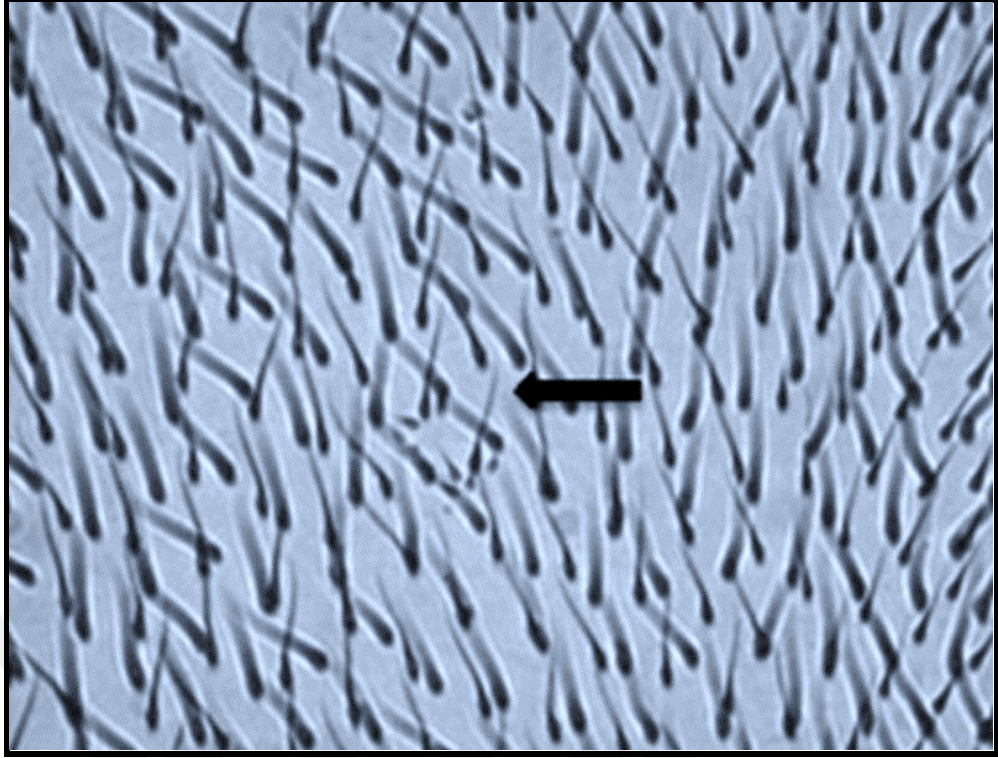
Çalışmamızın ikinci aşamasında, SMART ile AgNP_(k) ve AgNP_(b)'nin genotoksik etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Pozitif kontrol grubu için etil metansülfonat (EMS) tercih edilirken, negatif kontrol grubu olarak distile su kullanılmıştır. Her uygulama grubu için seçilen 80 kanatta, benek sayısını belirlemek üzere, kanatlar ışık mikroskopunda 10x40 büyütmeyle incelenmiştir. İstatistiksel analizlerde kullanılması için incelenen preparatlardaki kanat benekleri tekli benek (*mwh* veya *flr*³ fenotipinde), ikiz benek (*mwh* ve *flr*³ fenotipinde), küçük tekli benek (1-2 klon) ve büyük tekli benek (3≤ klon) olmak üzere fotoğraflanmıştır (Şekil 3.6-Şekil 3.11).



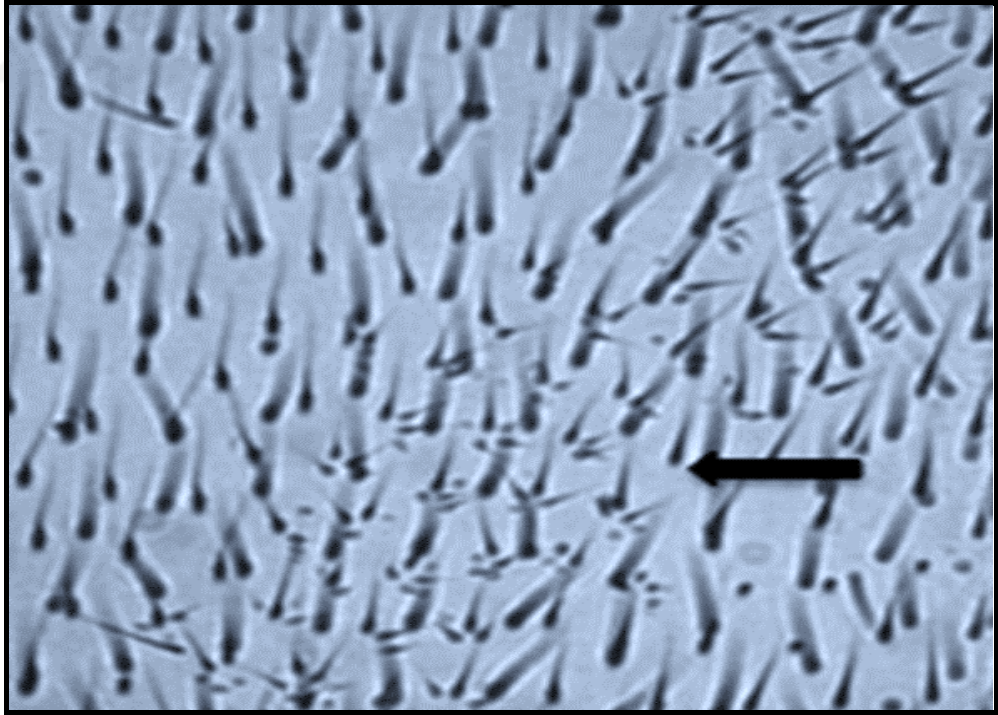
Şekil 3.6. Normal bireydeki kanat kıllarının ışık mikroskopundaki görüntüsü



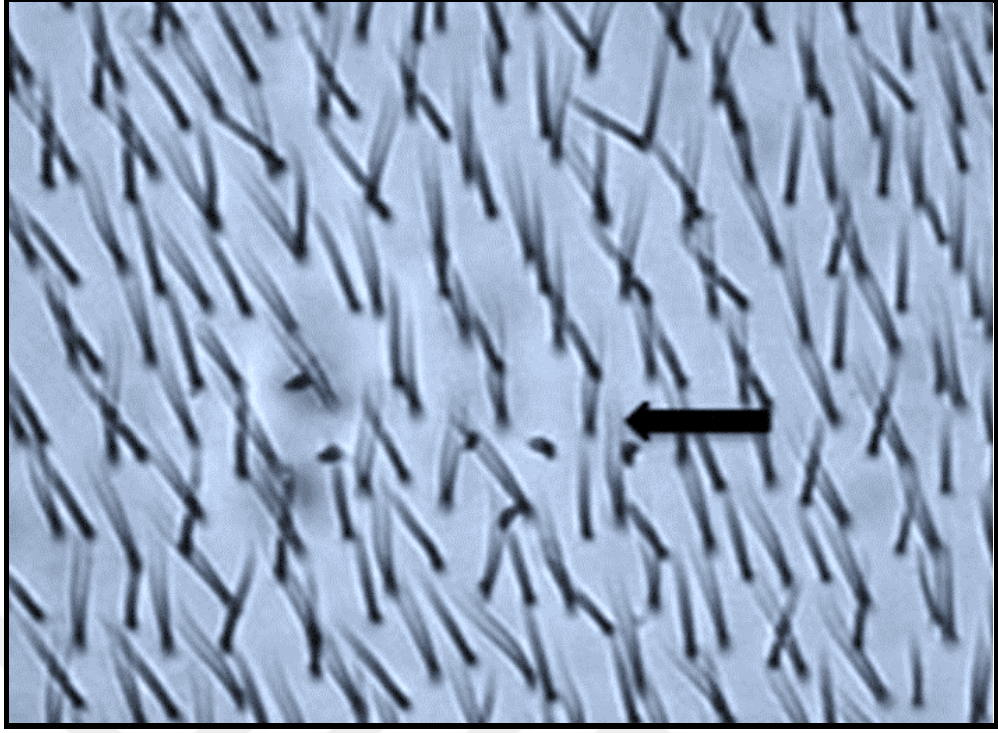
Şekil 3.7. *mwh/mwh* hattına ait kanat kıllarının ışık mikroskopundaki görüntüsü



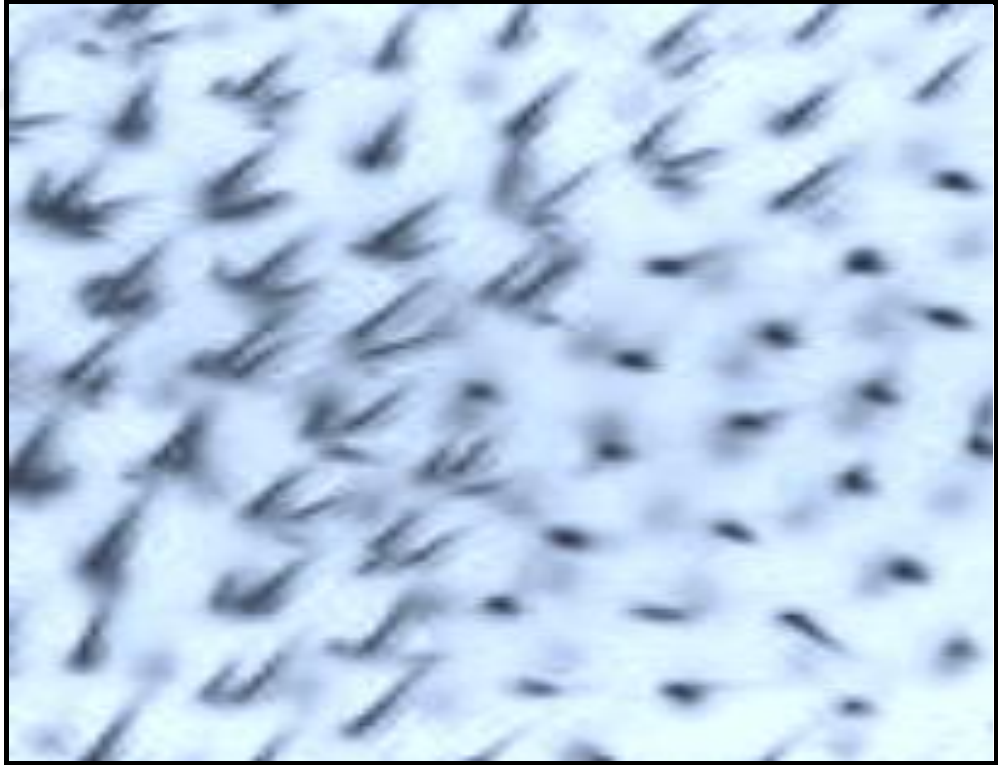
Şekil 3.8. Küçük tek tip *mwh* mutant klonların ışık mikroskopundaki görüntüsü



Şekil 3.9. Büyük tek tip *mwh* klonların ışık mikroskopundaki görüntüsü



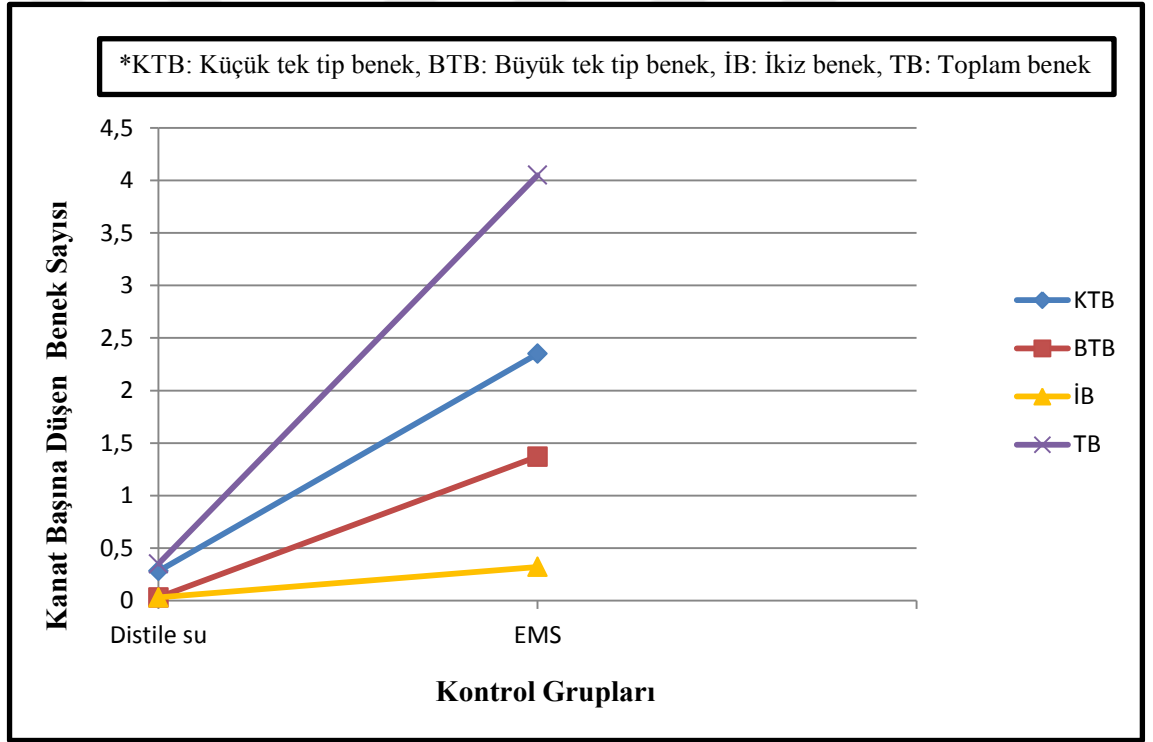
Şekil 3.10. Büyük tek tip flr^3 mutant klonların ışık mikroskopundaki görüntüsü



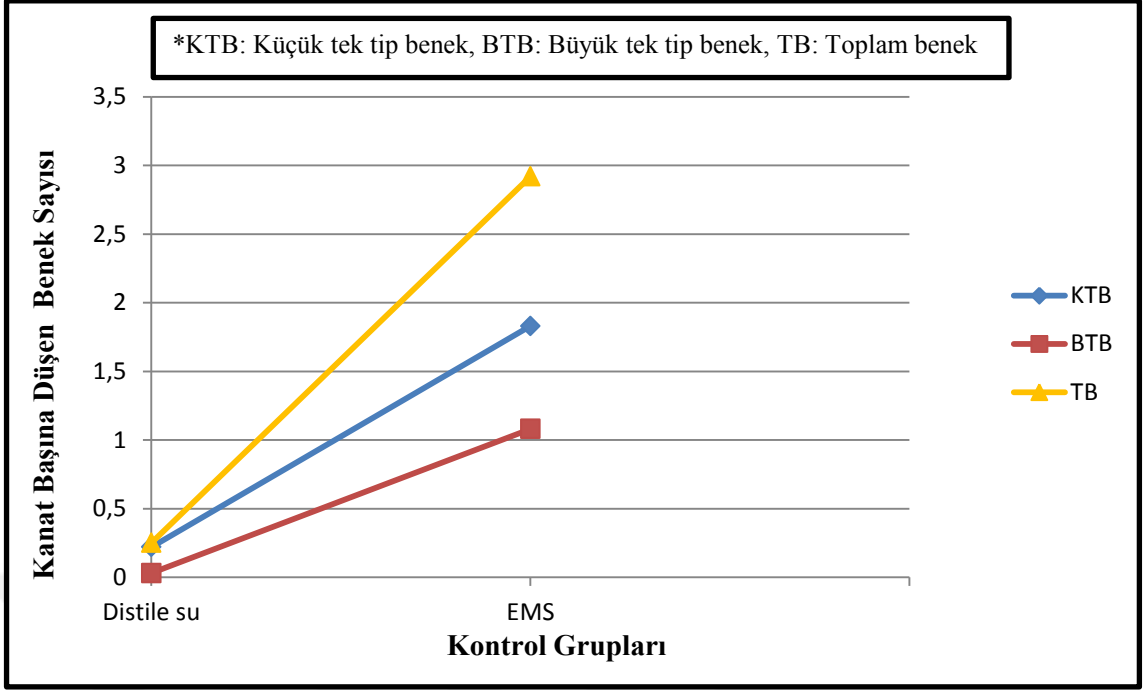
Şekil 3.11. İkiz klonların ışık mikroskopundaki görüntüsü

3.3.1. Distile su ve EMS'nin genotoksik etkilerinin araştırılması

Distile su negatif kontrol, EMS ise pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Literatüre göre, çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılan EMS'nin dozu transheterozigot larvalarda imajinal diskleri etkileyip mutasyon oluşturmak için uygun olup inceleme yapılabilecek yeterli sayıda canlı birey oluşumuna izin veren bir doz olan 1 mM olarak belirlenmiştir. F₁ neslinden elde edilmiş olan normal ve serrat kanatlı bireylerden hazırlanan kanat preparatları mikroskopta analiz edilmiştir. Uygulama gruplarından elde edilen bireylerin kanatlarından hazırlanan preparatlarda gözlediğimiz küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz klon ve toplam klon frekansları Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'de gösterilmiştir.



Şekil 3.12. Kontrol grubu (*mwh/flr³*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplarına ait klon frekansları



Şekil 3.13. Kontrol grubu (*mwh/TM3*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

Tablo 3.2’de hem *mwh/flr³* genotipli normal bireyler hem de *mwh/TM3* genotipli serrat kanatlı bireylerde negatif (distile su) ve pozitif (EMS) kontrol gruplarının olası toksik etkilerini gösteren istatistiksel analiz sonuçları verilmiştir. 1mM EMS uygulanan 72±4 saatlik transheterozigot larvalardan elde edilen kanat preparatları incelendiğinde tüm kanat benek ya da klon tiplerinde distile su negatif kontrol grubuna oranla önemli artışların olduğu gözlenmiştir. 1mM EMS uygulaması sonucunda elde edilen normal fenotipli bireylere ait incelenen 80 adet kanatta, 188 adet küçük tek tip klon, 110 adet büyük tek tip klon, 26 adet ikiz klon olmak üzere toplam klon sayısının 324 adet olduğu gözlenmiştir. EMS uygulamasında klon indüksiyon frekansı ise 9,72 olarak hesaplanmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan distile suyun transheterozigot larvalara uygulanması sonucunda incelenen *mwh/flr³* bireylerine ait 80 adet kanatta ise 23 adet küçük tek tip klon, 3 adet büyük tek tip klon, 2 adet ikiz klon olmak üzere 28 adet toplam klon belirlenmiştir. Distile uygulamasında klon indüksiyon frekansı ise 1,12 olarak hesaplanmıştır. 1 mM EMS uygulanmış grupların preparatları incelendiğinde, tüm kanat benek veya klon değerlerinde negatif kontrol değerlerine göre artış olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.2).

Tablo 3.4. Distile su ve EMS'nin *D. melanogaster*'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri

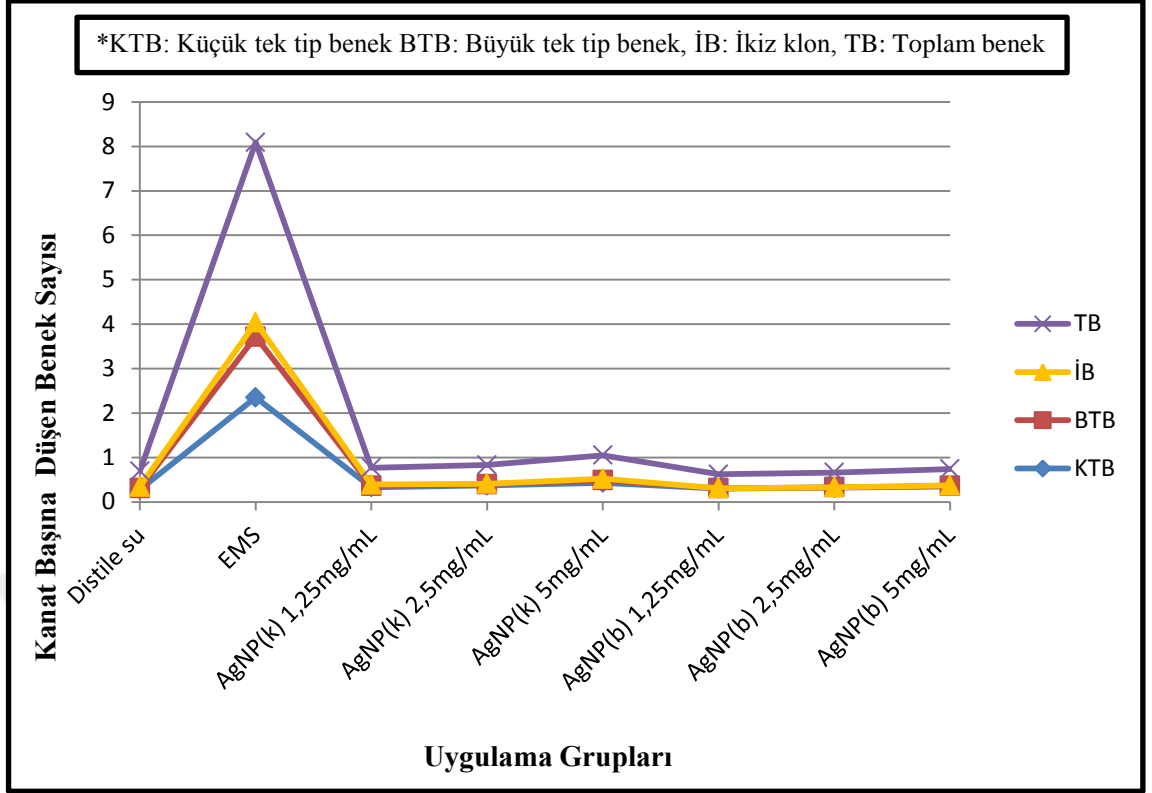
Uygulama Grupları		Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1-2 hücre) ($m = 2$)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) ($m = 5$)			İkiz klon ($m = 5$)			Toplam <i>mwh</i> klon ($m = 2$)			Toplam klon ($m = 2$)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10^5 hücre)
			No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
Normal Kanat (mwh/flr^3)	Distile su	80	23	(0,28)		3	(0,03)		2	(0,03)		22	(0,27)		28	(0,35)		1,12
	EMS (1mM)	80	188	(2,35)	+	110	(1,37)	+	26	(0,32)	+	190	(2,37)	+	324	(4,05)	+	9,72
Serrat Kanat ($mwh/TM3$)	Distile su	80	18	(0,22)		2	(0,03)					20	(0,25)		20	(0,25)		1,02
	EMS (1mM)	80	147	(1,83)	+	87	(1,08)	+		*		234	(2,92)	+	234	(2,92)	+	11,98

No: Klon sayısı, Fr.: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei ve Würzler, 1988), +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü, *: *TM3* dengeleyici kromozomunun varlığında flr^3 mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$

Serrat kanatlı bireylere ait preparatlar incelendiğinde normal kanatlı bireylerde olduğu gibi tüm gruplarda belirlenen artışların istatistiksel açıdan anlamlı (+) olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Serrat kanatlı bireylerde dengeleyici *TM3* kromozomunun varlığı sebebiyle ikiz klona rastlanılmamıştır. EMS maruziyeti sonucu serrat kanat preparatlarında küçük tek tip benek frekansı 1,83, büyük tek tip benek frekansı 1,08 ve toplam *mwh* benek frekansı 2,92 iken distile su uygulaması sonrasında elde edilen frekanslar sırasıyla 0,22; 0,03 ve 0,25 şeklindedir. Klon indüksiyon frekansı (KİF) oranlarına bakıldığında, EMS uygulanan serrat kanatlı bireylerde bu değer 11,98 iken distile su grubunda 0,97 olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.2).

3.3.2. AgNP_(k) ve AgNP_(b) uygulamaları sonucu elde edilen bulgular

D. melanogaster kanatları üzerinde AgNP_(k) ve AgNP_(b)'nin belirlenen konsantrasyonlarda (1,25; 2,5 ve 5mg/mL) herhangi bir genotoksik etkisinin olup olmadığına bakılmış ve sonuçlar negatif kontrol grubu (distile su) sonuçları ile istatistiksel açıdan karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilerden, artan konsantrasyona paralel olarak AgNP_(k) ve AgNP_(b) uygulama gruplarındaki kanat benek sayılarında negatif kontrol grubuna göre artışların olduğu gözlenmiştir (Tablo 3.3, Şekil 3.14 ve Şekil 3.15). Sonuçlar istatistiksel açıdan incelendiğinde, sayısal olarak gözlenen artışlar anlamlı olmayıp negatif (-) ve önemsiz fark (i) olarak değerlendirilmiştir ($p>0,05$).



Şekil 3.14. AgNP_(k) ve AgNP_(b) kullanılan uygulama grubu (*mwh/flr*³) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

AgNP_(k) uygulanan en düşük (1,25 mg/mL) grupta normal kanat fenotipli bireylerde küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam *mwh* ve toplam benek sayılarının frekansları sırasıyla 0,33; 0,03; 0,03; 0,31 ve 0,38 ve klon indüksiyon frekansı 1,28 iken en yüksek (5 mg/mL) grupta bu değerler sırasıyla 0,43; 0,06; 0,03; 0,46 ve 0,53 ve klon indüksiyon frekansı 1,89 şeklindedir (Tablo 3.3 ve Şekil 3.14).

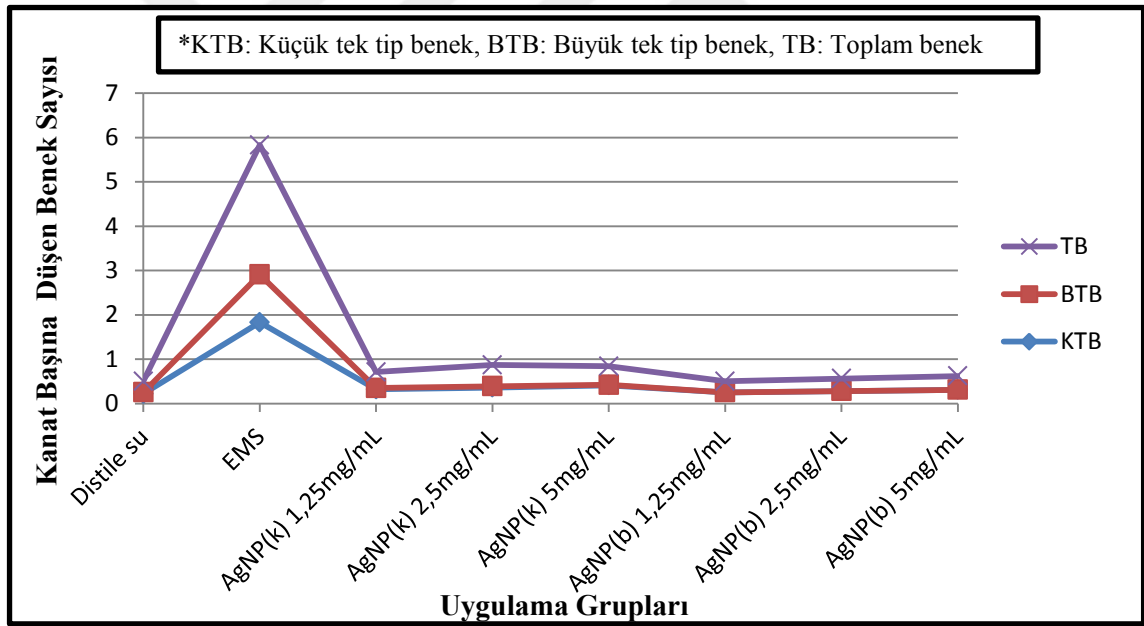
Tablo 3.5. AgNP_(k) ve AgNP_(b)'nin *D. melanogaster*'in normal kanat (mwh/flr^3) ve serrat kanat ($mwh/TM3$) hatları üzerine etkileri

Uygulama Grupları	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1–2 hücre) (m = 2)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) (m = 5)			İkiz klon (m = 5)			Toplam <i>mwh</i> klon (m = 2)			Toplam klon (m = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10 ⁵ hücre)	
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D		
Normal Kanat (mwh/flr^3)	Distile su	80	23	(0,28)		3	(0,03)		2	(0,03)		22	(0,27)		28	(0,35)		1,12
	EMS (1mM)	80	188	(2,35)	+	110	(1,37)	+	26	(0,32)	+	190	(2,37)	+	324	(4,05)	+	9,72
	AgNP _(k) (1,25mg/mL)	80	27	(0,33)	i	2	(0,03)	-	2	(0,03)	i	25	(0,31)	i	31	(0,38)	i	1,28
	AgNP _(k) (2,5mg/mL)	80	30	(0,37)	i	3	(0,03)	i	1	(0,01)	-	31	(0,38)	i	34	(0,42)	i	1,58
	AgNP _(k) (5mg/mL)	80	35	(0,43)	i	5	(0,06)	i	3	(0,03)	i	37	(0,46)	i	43	(0,53)	i	1,89
	AgNP _(b) (1,25mg/mL)	80	24	(0,30)	i	1	(0,01)	-	0	(0,00)	-	24	(0,30)	i	25	(0,31)	-	1,22
	AgNP _(b) (2,5mg/mL)	80	26	(0,32)	i	1	(0,01)	-	0	(0,00)	-	26	(0,32)	i	27	(0,33)	-	1,33
	AgNP _(b) (5mg/mL)	80	28	(0,35)	i	1	(0,01)	-	1	(0,01)	-	29	(0,36)	i	30	(0,37)	i	1,48
Serrat Kanat ($mwh/TM3$)	Distile su	80	18	(0,22)		2	(0,03)					20	(0,25)		20	(0,25)		1,02
	EMS (1mM)	80	147	(1,83)	+	87	(1,08)	+				234	(2,92)	+	234	(2,92)	+	11,98
	AgNP _(k) (1,25mg/mL)	80	26	(0,32)	i	3	(0,03)	i				29	(0,36)	i	29	(0,36)	i	1,48
	AgNP _(k) (2,5mg/mL)	80	29	(0,36)	i	2	(0,03)	i			*	31	(0,38)	i	31	(0,38)	i	1,58
	AgNP _(k) (5mg/mL)	80	33	(0,41)	i	1	(0,01)	-				34	(0,42)	i	34	(0,42)	i	1,74
	AgNP _(b) (1,25mg/mL)	80	20	(0,25)	i	0	(0,00)	-				20	(0,25)	i	20	(0,25)	i	1,02
	AgNP _(b) (2,5mg/mL)	80	23	(0,28)	i	0	(0,00)	-				23	(0,28)	i	23	(0,28)	i	1,17
	AgNP _(b) (5mg/mL)	80	25	(0,31)	i	0	(0,00)	-				25	(0,31)	i	25	(0,31)	i	1,28

No: Klon sayısı, Fr.: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei ve Würzler, 1988), +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü, *: *TM3* dengeleyici kromozomunun varlığında flr^3 mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$

AgNP_(b) uygulanan tüm konsantrasyonlarda normal kanat fenotipli bireylere ait kanatlarda tüm benek tiplerinde bu değerlerin çok daha düşük olduğu gözlenmektedir. Şöyleki; en düşük AgNP_(b) (1,25 mg/mL) grubunda küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam *mwh* ve toplam benek sayılarının frekansları sırasıyla 0,30; 0,01; 0; 0,30 ve 0,31 ve klon indüksiyon frekansı 1,22 iken en yüksek AgNP_(b) (5 mg/mL) grubunda bu değerler sırasıyla 0,35; 0,01; 0,01; 0,36 ve 0,37 ve klon indüksiyon frekansı 1,48 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.3 ve Şekil 3.14).

Serrat kanatlı bireylerden elde edilen preparatlar incelendiğinde, AgNP_(k) uygulanan en düşük (1,25 mg/mL) grupta küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh* ve toplam benek sayılarının frekansları sırasıyla 0,32; 0,03; 0,36 ve 0,36 iken en yüksek (5 mg/mL) grupta bu değerler sırasıyla 0,41; 0,01; 0,42 ve 0,42 şeklindedir. Benzer şekilde klon indüksiyon frekansları da sırasıyla 1,48 ve 1,74'dür (Tablo 3.3 ve Şekil 3.15).



Şekil 3.15. AgNP_(k) ve AgNP_(b) kullanılan uygulama grubu (*mwh/TM3*) larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında gözlenen çeşitli benek tiplerine ait klon frekansları

AgNP_(b)'nin tüm konsantrasyonlarına ait uygulama gruplarından elde edilen serrat kanatlı bireylerde de konsantrasyon artışına paralel olarak tüm klon tiplerinde distile suya göre artışların çok az olduğu tespit edilmiş ve tüm klon tiplerinde bu artış istatistiksel olarak negatif fark (-) ve önemsiz fark olarak belirtilmiştir. En düşük AgNP_(b) (1,25 mg/mL) grubunda küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh* ve toplam

benek sayılarının frekansları sırasıyla 0,25; 0; 0,25; ve 0,25 ve klon indüksiyon frekansı 1,02 iken en yüksek AgNP_(b) (5 mg/mL) grubunda bu değerler sırasıyla 0,31; 0; 0,31 ve 0,31 ve klon indüksiyon frekansı 1,28 olarak bulunmuştur (Tablo 3.3 ve Şekil 3.15).

Sonuçlar negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, AgNP_(k) ve AgNP_(b) uygulanan gruplarda gözlenen değerler anlamlı olmayıp negatif (-) ya da önemsiz fark (i) olarak değerlendirilmiştir. Tüm bu sonuçlardan AgNP'lerin genotoksik etkili olmadığı tespit edilmiştir. Ancak AgNP_(k) ve AgNP_(b)'nin belirlenen konsantrasyonlarda kendi aralarında karşılaştırmalı olarak etkilerine bakıldığında, tüm konsantrasyonlarda AgNP_(k)'nin benek sayılarının ve klon indüksiyon frekanslarının AgNP_(b)'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Nanoteknoloji, biyosensörlerin ve biyomedikal cihazların, alternatif enerji üretiminin ve çevresel parametrelerin geliştirilmesinde sayısız uygulama ile çeşitli mühendislik alanlarının içerisinde kullanılan kimyasal, tıbbi, çevresel ve fiziksel bilimleri birbirine bağlayan disiplinler arası bir bilim olarak hızla gelişmektedir. İnce filmler, nanoküreler, nanorodlar ve çeşitli nanopartiküller (metalik ve metalik olmayan) gibi çeşitli nano yapılar giderek daha fazla yenilikçi uygulamaya katkıda bulunmaktadır (Phung, 1996). Yirminci yüzyıldaki sanayi devrimi, çok sayıda sağlık sorununa yol açan büyük miktarlarda zararlı endüstriyel atıkların birikmesine yol açmıştır (Crabtree, 2003). Gelişiminden bu yana nanoteknoloji birçok alanda, nanoparçacıkların kullanımını sağlayan potansiyel bir yöntem sergilemektedir. Nanopartikül (NP) sentezinde, makro veya dökme malzemeleri nanopartikülat formlarına dönüştürmek için kimyasal öncüler olarak toksik kimyasalları içeren fiziksel veya kimyasal süreçleri içeren geleneksel yöntemler kullanılmaktadır (Catauro, 2004). NP'lerin biyosentezinde, oksidasyon/redüksiyon tepkimelerinin olduğu aşağıdan yukarıya yaklaşım uygulanmaktadır. Fiziksel ve kimyasal prosedürlerin uygulandığı NP'lerin kimyasal sentez gereksinimi pahalıdır (Hu, 2006). Kimyasal sentez, tıbbi uygulamalarda olumsuz bir etkiye yol açabilen toksik maddelerin oluşumuna neden olur (Parashar vd., 2009). Nanopartiküllerin sentezine yönelik biyolojik yolun enerji tasarrufu sağladığı ve nispeten daha az miktarda zararlı atık yarattığı artık günümüzde kanıtlanmıştır (Begum vd., 2009). Yeşil kimya ilkelerinin nanoteknoloji alanına uygulanmasında, nanoteknolojik süreçlerin çevre dostu malzemeler kullanarak yeni ürünler üretme kapasitesine sahip olduğu varsayılmaktadır (Cao, 2004). Bu tür işlemlerde peptitler veya proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar ve lipitler gibi biyolojik makromolekülleride içeren bitki metabolitleri ve bitki özleri kullanılmaktadır (Rajan vd., 2015; Ahmed vd., 2016). Bu araştırmanın amaçlarından biri de, NP sentezinde alternatif bir yolla tehlikeli prosedürlerin kullanımını azaltmaktır.

Yeşil nanoteknoloji, yeşil nanoparçacıkların tasarımı ve geliştirilmesi için hem akademik hem de endüstriyel alanda sadece temel değil, aynı zamanda hedefe yönelik araştırmaları da teşvik etmektedir (Klaus, 1999; Shahverdi, 2007). Yeşil nanopartiküller, akıllı elektronik cihazların, hayat kurtarıcı nano-farmasötiklerin ve yeşil

enerji üretim cihazlarının tasarımında kullanılmaktadır. Yeşil sentez yöntemi ile gümüş nanopartiküllerinin sentezi sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir. Bu durum tehlikeli maddelerin kullanımını ve üretimini azaltmak veya ortadan kaldırmak için geleneksel kimya süreçlerini çevreye ve ekonomiye fayda sağlayacak şekilde ortaya koyan bir yöntemdir. AgNp'lerin sentezi için kimyasal yöntemler toksik ve çevre dostu olmayan reaktifler içermektedir (Rafique vd., 2016). AgNP'lerin üretilmesi için yeni bir yol olarak yeşil sentez yönteminin kullanılması da bu yüzdendir (Horton, 1999; Anastas ve Kirchoff, 2002; Anastas ve Eghbali, 2010).

Gümüş nano-formunun antimikrobiyal potansiyelinin sermayeleştirilmesinin yanı sıra, gümüş nanoparçacıkların uygulanması ve üretimi için kimyasalların kapsamlı kullanımından kaynaklanan çevresel tehlikeye karşı koymak için gümüş nanoparçacıkların yeşil sentez yöntemine odaklanmak gerekmektedir (Subramaniam, 1971). Bitki özleri kullanılarak yeşil gümüş nanoparçacıkların sentezi, araştırmacıların talebini karşılayan ve aynı anda çevresel tehlikelerin olasılığını ortadan kaldıran çok basit ve uygun maliyetli bir yöntemdir. Bitki dokuları, meyveler, sebzeler, mikroorganizmalar vb. özütler kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle AgNP'lerin sentezi rapor edilmiştir (Anastas ve Kirchoff, 2002). Biyolojik olarak sentezlenmiş nanomalzemelerin tasarımı, sentezi ve karakterizasyonu önemli bir ilgi alanı haline gelmiştir (Anastas ve Eghbali, 2010).

Gultekin vd. (2017) yapmış oldukları çalışmada, antioksidan özelliği yüksek olan ve bölgesinde endemik olarak yetiştirilmekte olan Cimin üzümü yaprağından yeşil sentez yöntemi ile elde ettikleri 20- 50 nm bakır nanopartiküllerini UV-VIS, FTIR, XRD ve SEM gibi spektroskopik teknikler kullanarak karakterize etmiştir. Bitki ekstraktı kullanılarak uygun maliyetli ve çevre dostu yeşil sentez yöntemi kullanılarak elde edilen bakır nanoparçacıklarının yeni fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle optik ve biyosensörler gibi birçok alanda kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Nanopartiküllerin çeşitli biyolojik yollarla sentezinde, gümüş nanopartiküllerini (AgNP'ler) sentezleme işlemleri de çeşitli bitkileri keşfetmeye yardımcı olmuştur (Magudapathy, 2001). *Emblica officinalis* (Indian Gooseberry) meyve özütü kullanılarak altın ve gümüş nanoparçacıkların hücre dışı sentezinin, çevre dostu yolla altın ve gümüş nanoparçacıkların üretilmesi için akıllı bir seçenek olabileceği

bildirilmiştir (Ellis, 1976). *Pinus*, *Diospyros kaki*, *Ginkgo*, *Magnolia grandiflora* ve *Platanus* bitki yapraklarının kullanılarak metalik gümüş nanoparçacıkların hücre dışı sentezinin gerçekleştirildiği bir çalışmada, kararlı gümüş nanoparçacıkların oluşumu, $Ag^{(+)}$ dan $Ag^{(0)}$ a indirgeyici ajan olarak sulu $AgNO_3$ çözeltisinin bitki yaprağı özleri ile işlenmesi esasına dayandığı gösterilmiştir. *Magnolia grandiflora* (manolya) yaprak özütünün, sentez oranı ve gümüş nanoparçacıklara dönüşüm açısından en iyi indirgeyici ajan olduğu bildirilmiştir (Magudapathy, 2001).

Partikül boyutunun belirlenmesinde, reaksiyon sıcaklığı, yaprak özütü konsantrasyonu ve $AgNO_3$ konsantrasyonu gibi parametrelerin değişkenliğiyle kontrol edilebilmektedir. Kimyasal yöntemlerden daha hızlı veya karşılaştırılabilir sentez oranları sağlaması ve potansiyel olarak kozmetik, gıda ve tıbbi uygulamalar gibi çeşitli alanlarda daha kullanılabilir olması açısından biyolojik gümüş nanoparçacıkların bu çevre dostu yöntemle eldesinin daha avantajlı olduğu belirlenmiştir.

NP'lerin boyutu, şekli ve yüzey morfolojisi fiziksel, kimyasal, optik ve elektronik özelliklerinin kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır (Gorth, 2011). Ölümcül AgNP dozları organizmadan organizmaya ve organizmaların farklı gelişim dönemlerine göre değişiklik göstermektedir. Gram pozitif (*S. pneumoniae*) ve gram negatif (*P. aeruginosa*) bakteriler için minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) 0,9 ve 0,7 $\mu g/mL$ olarak belirlenmiştir (Gurunathan vd., 2014). *Aedes aegypti* sivrisineğinin larva ve pupa aşaması için saptanan LC_{50} değeri ise sırasıyla 3,496 ve 17,700 ppm olarak belirlenmiştir (Murugan vd., 2016). Nanopartiküllerin fiziksel özellikleri nano boyutlarda yüksek yüzey alanları/hacim oranı ile belirlenmektedir (Sondi, 2004). AgNP aglomerasyon seviyesine bağlı olarak, fiziko-kimyasal nano boyutlarıyla ilgili özellikler kaybolmaktadır ve toksik potansiyelleri büyük ölçüde değişmektedir (Souza vd., 2016). Ayrıca, AgNP'ler sulu çözeltide kolayca iyonize olmakta ve yüksek oranda reaktif hale gelmektedirler. Böylece çevreye salındıklarında suda yaşayan organik maddelerde bulunan çeşitli bileşiklerle reaksiyona girerek boyutlarını ve reaktivitelerini değiştirebilmektedirler (Nason vd., 2012). Bu AgNP'lerin etki mekanizmalarını ve boyutunu daha iyi anlayabilmek için farklı hücre tiplerindeki sitotoksosite ve genotoksosite etkilerinin açığa çıkarılması gerekmektedir (Franchi vd., 2012; Filho vd., 2014). Bu anlamda, hücrelerin farklı yöntemlerle (kimyasal, fiziksel ve biyolojik

yaklaşımlarla) sentezlenen AgNP'leri nasıl içselleştirdikleri hakkındaki araştırmalar sitotoksik ve genotoksik etkisini açığa çıkarmaktadır. Hücreler AgNP'leri fagositoz veya pinositoz ile içselleştirebilmektedir. Pinositoz, ökaryotik hücrelerde en yaygın içselleştirme mekanizmasıdır. Fagositoz ise esas olarak makrofajlar ve monositler gibi bağışıklık hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu bağlamda Kettler vd. (2016), farklı boyutlarda AgNP'lerin hücre içerisine alım kinetiklerini analiz etmişler ve monositik hücrenin THP-1 hattı tercihen daha küçük boyutta olan (20 nm) nanopartikülleri içerdiklerini tespit etmişlerdir. Çoğu araştırmacının dikkatini çeken NP'ler dökme gümüş ve altından üretilebilmektedir (Gade, 2008). Piyasada bulunan yaygın antimikrobiyal ilaçlara dirençli mikroorganizmaların artması nedeniyle dünyadaki araştırmacıların odağı yeni antimikrobiyal ajanların gelişimine kaymıştır. Patojen tespiti için biyosensörler şeklinde bakteri, mantar ve virüslere karşı terapötik bir araç olarak nano malzemeler bu endişe konusu ile başa çıkmak için umut verici bir alternatif sağlamıştır (Mukherjee, 2001). Antiviral tedavide AgNP'lerin uygulanması ile ilgili bir çalışmada Xiang vd. (2013), H3N2 influenza virüsünün hemagglutininin hücresel reseptörlerle ilişkisine müdahale edebileceğini ve daha sonra viral enfeksiyonu inhibe edebileceğini göstermişlerdir.

Gümüş eski çağlardan günümüze antimikrobiyal aktivitesi sayesinde içme suyunu depolamak için kullanılmaktaydı. Gümüşün formülasyonu, madeni paralardaki dökme gümüşten, iyonik gümüş ile mevcut koloidal gümüşe değiştirilmiştir. İyonik veya nanoparçacık formundaki gümüşün, mikroorganizmalar için oldukça toksik olduğu bilinmektedir (Sondi, 2004). Mikroorganizmalara karşı aktivitesi ile bilinen en toksik metal gümüştür. Diğer metaller ise Ag> Hg> Cu> Cd> Cr> Pb> Co> Au> Zn> Fe> Mn> Mo> Sn şeklinde antimikrobiyal aktivite bakımından gümüşü takip etmektedir. Ayrıca nanoparçacık formundaki gümüş, antimikrobiyal aktivitesi açısından gümüş iyonlarından daha etkilidir. Buna ek olarak, memeli hücrelerine de daha düşük toksisite gösterdiği bilinmektedir (Shahverdi, 2007). Antibakteriyel özellikler uzun zamandır bilinmesine rağmen, bulaşıcı hastalıklar için gümüş kullanımını antibiyotiklerin keşfi ile gölgelenmiştir (Bosetti, 2002). Bununla birlikte, antibiyotiğe dirençli patojenik bakterilerin neden olduğu bulaşıcı hastalıkların ortaya çıkması, gümüş ve koloidal formlarına odaklanmayı sağlamıştır. Günümüzde giyim, solunum cihazları, ev su filtreleri, kontraseptifler, antibakteriyel spreyleyler, kozmetik, deterjan, diyet takviyeleri,

cep telefonları, dizüstü bilgisayar klavyeleri ve çocuk oyuncakları, gümüş nanomateriyallerin antimikrobiyal özelliklerinden yararlandığı bilinen ürünler arasındadır.

Nanopartiküllerin biyosentezi, özellikle bitki özlerinden veya organik kaynaklardan elde edilen gümüş nanomalzemeleri, yetenekleri ve çok çeşitli biyoaktif indirgeme metabolitleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Bitkiler, nanoparçacıkların sentezlenmesi için oldukça tercih edilen kaynaklar olarak bilinmektedir. Bakteriler ve algler ile karşılaştırıldığında, bitkiler metal toksisitesine daha yatkındır, böylece gümüş nanoparçacıkların sentezi için yeşil bir alternatif sunmaktadır (Pandey vd., 2013; Rasheed vd., 2017). Patojenik bakteriler tıbbi alanda kullanılan nanopartikülleri enfekte edebileceğinden nanopartiküllerin sentezi için bitki ekstraktının kullanımının mikrobiyal süreçlerden daha fazla avantajı olduğu kanıtlanmıştır (Singh vd., 2018).

Şahin ve Gübbük (2019) yapmış oldukları bir çalışmada, antioksidan özelliği bulunan zerdeçal, zencefil, tarçın ve keçiboynuzu özütleri kullanarak yeşil sentez yöntemi ile sentezledikleri gümüş nanopartiküllerinin karakterizasyon işlemlerini yapmış ve elde edilen AgNP'lerin iyi bir indirgeyici ajan olarak kullanılabilirliğini göstermiştir. Ayrıca bu yöntemin reaksiyonların aktivasyon enerjisini azalttığı ve reaksiyonları katalize ederek uygun elektron transferini sağladığı tespit edilmiştir. Sentezlenmiş olan metal nanopartiküllerin antioksidan ve antibakteriyel özelliklerinden dolayı çevre, medikal ve sağlık alanlarında da kullanımının mümkün olabileceği bildirilmiştir.

Çevre dostu, yeşil nanoteknolojik süreçlerin çevre dostu malzemeler kullanarak yeni ürünler üretme kabiliyetine sahip olduğu bilinmektedir (Cao, 2004). Yeşil nanoteknoloji, yeşil nanoparçacıkların tasarımı ve geliştirilmesi için hem akademik hem de endüstriyel alanlarda sadece temel değil aynı zamanda hedefe yönelik araştırmaları da teşvik eder. Yeşil sentez hem üretimde maliyetin azalması hem de çevre dostu yaklaşımı nedeniyle diğer sentez yöntemlerinden bir adım öndedir (Klaus vd., 1999; Shahverdi vd., 2007).

İsmail vd. (2014) yapmış oldukları çalışmada, üzüm bitkisinin (*Vitis vinifera*) yaprak ve tohumlarını kullanarak yeşil sentez yöntemi ile altın nanopartikülü sentezlemiştir. Sentezlenen ekstraktın yoğunlaştıkça partiküllerin azaldığını, üzüm yaprak ve tohum

özütlerinin yoğun konsantrasyonlarında yapısal olarak küresel şekiller elde edildiğini ancak yaprak özütünün düşük konsantrasyonunda farklı şekiller gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Ayrıca yüksek asit ortamında altın nanoparçacıklarının kararsız oldukları, yapılan XRD analizleri sonucunda çekirdek ekstratından meydana gelen altın nanopartiküllerinin boyut olarak, yaprak ekstratından oluşan altın nanopartiküllerine oranla daha küçük olduklarını tespit etmişlerdir. Çevre dostu yeşil sentez kullanımından dolayı altın nanopartiküllerinin medikal ve tıp alanlarında kullanılabilir olduğu bildirilmiştir. Ayrıca yapılan başka bir çalışmada, üzüm sapı atıkları kullanılarak yeşil sentez yöntemi ile elde edilen gümüş nanopartikülleri çeşitli parametreler dikkate alınarak incelenmiş ve optimize edilerek farklı spektroskopik ve elektron mikroskopi teknikleri ile ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir. Üzüm sapı atıklarından elde edilen bitki ekstraktlarında bulunan toplam polifenoller ve indirgeyici şekerler, nanoparçacık üretiminde indirgeyici ajanlar ve stabilizatörler olarak kullanılmıştır (Bastos-Arrieta, 2018). Roy vd. (2013) yapmış oldukları bir çalışmada üzüm (*Vitis vinifera*) meyve özü kullanarak yeşil sentez yöntemi ile küresel ve kristal yapıya sahip, ortalama boyutları 18-20 nm olan gümüş nanopartikülleri elde etmişlerdir. Bu nanopartiküllerin *B. subtilis* ve *E. coli*'ye karşı etkili antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Eren ve Baran (2017) yapmış oldukları çalışmada, fıstık bitki (*Pistacia vera*) ekstresi kullanarak sentezledikleri 16,7 nm AgNP'lerin antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada, gümüş nanoparçacıklar için indirgeyici ajan olarak işlev görebilen limon ağacı yapraklarının ekstraktı kullanılarak elde edilen gümüş nanoparçacıkları tekstil alanında pamuk ve ipek kumaşlarda son temizleme işleminde antibakteriyel olarak kullanılmıştır (Sanghi vd., 2009). Limon yapraklarından elde edilen gümüş nanopartiküllerinin antimikrobiyal aktivitesi, gümüş ve limon yapraklarının uçucu yağ bileşenlerinin sinerjistik etkisi nedeniyle aktivitede artış göstermiştir. Bu rapor, Ag^+ iyonunun Ag^0 'a kontrollü indirgenmesi yoluyla limon yapraklarının ekstraktı kullanılarak biyotransformasyon ile oldukça kararlı gümüş nanoparçacıkların hücre dışı sentezini göstermiştir. Ayrıca gümüş nanoparçacıklar, kumaş malzemesinin antifungal aktivite değerlendirmesi ile agar difüzyon yöntemi ile *Fusarium oxysporum* ve *Alternaria brassicicola*'ya karşı test edilen kumaşların antifungal tedavisi için kullanıldığı bildirilmiştir (Sharma vd., 2009). AgNP'lerin anti-enflamatuar etkileri araştırılmış ve AgNP'lerin IL-6 ve IL-10 sitokin ekspresyonunu

modüle edebildikleri belirtilmiştir. AgNP'ler, IL-10'un mRNA seviyelerini arttırma ve pro-enflamatuar sitokin IL-6 seviyelerini azaltma işlevi görebildikleri tespit edilmiştir (Wong, 2010).

AgNP'ler ayrıca antikanser terapisinde de incelenmiş ve meme kanseri hücrelerinde sitotoksosite gösterdiği bildirilmiştir (Franco-Molina vd., 2010). Franco-Molina vd. (2010), kolloidal gümüş ile tedavi edilen MCF-7'nin dehidrojenaz aktivitesini önemli ölçüde azalttığını ve NADH/NAD⁺'nin azalmasına neden olduğunu ve mitokondriyal membran potansiyelinin azalması nedeniyle hücrelerin ölümüne neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Asaduzzaman vd. (2016) Bangladesh üzüm bitkisi kullanarak yeşil sentez yöntemi ile sentezledikleri 17 nm gümüş nanopartiküllerinin karides ve Ehrlich ascites karsinom hücreleri (EAC) üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Karidesler üzerinde toksik etkisinin olmasına rağmen EAC'lerde güçlü antibakteriyel ve antikanser aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Acay vd. (2019), üzüm (*Vitis vinifera*) yaprak ekstresinden yeşil sentez yoluyla gümüş nanoparçacıklar (AgNP) üretmişlerdir. Üretilen bu nanoparçacıklar, UV-vis spektrofotometre, SEM, EDX, FTIR, TGA-DTA ve XRD yöntemleri ile karakterize edilmiş 452,47 nm dalga boyuna sahip olduğu belirlenen AgNP'lerin hastane patojenlerine, yani gram-negatif *Escherichia coli* ATCC 25922, gram-pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Candida albicans* mantarına karşı sırasıyla 0,314, 0,078 ve 0,334 µg/mL⁻¹ konsantrasyonlarında etkili olduğu bildirilmiştir.

Gnanajobitha vd. (2013), *V. vinifera*'nın gümüş nanopartiküllerin sentezi için iyi bir kaynak olduğu, meydana gelen ekstraktın kahverengi renk oluşumu ile doğrulandığını bildirilmişlerdir. Gümüş nanopartiküller, küresel şekle sahip ortalama 30 ila 40 nm ortalama boyutlara sahip mevcut yeşil sentez yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Gümüş iyonlarının azaltılması ve gümüş nanopartiküllerinin stabilizasyonunun, meyve proteinleri ve metabolitlerinin katılımı ile gerçekleştiği, reaksiyonun basit ve kullanışlı olduğu ayrıca gümüş nanoparçacıkların *in vitro* fitosentezinin diğer biyolojik sentezlere göre daha fazla avantajlı olduğu vurgulanmıştır.

Çolak ve Atıcı (2016) ZnOTiO₂ nanokompozitinin toksik etkilerine karşı Cimin üzümünün iyileştirici etkisini araştırdıkları bir çalışmada larvalara uygulanan

ZnOTiO₂NP'lerin sağkalım oranını kontrol grubuna göre düşürürken Cimin üzüm çekirdeği ve meyve ekstraktlarının sağkalım oranını arttırdığını gözlemlemiştir.

Nanomalzemelerin çoğu *in vitro* çalışmada gözlenen toksik etkisi sebebiyle NP'lerin tüketici ve biyomedikal ürünlere dahil edilmesi son yıllarda endişe verici de olmuştur. Son zamanlarda, meyve sineği *Drosophila* toksikoloji çalışmaları özellikle nanotoksosite alanı için bir *in vivo* model organizma olarak geliştirilmiştir. Farklı gelişim evreleri ve kısa yaşam döngüsü olan genetik olarak izlenebilir bir organizma olan *Drosophila melanogaster*, nanomalzeme kaynaklı toksisiteyi incelemek için ideal bir organizma görevi görmektedir (Ong vd., 2015).

Demir vd. (2010) *Drosophila*'da gümüş nanoparçacıkların kanat benek testiyle yapılan genotoksik analiz çalışmalarında, gümüş nanoparçacıklarını üçüncü instar larvalarına 0,1- 10 nm arasında değişen konsantrasyonlarda uygulandığında toplam benek frekansında küçük fakat önemli artışların gözlendiğini göstermiştir. Gümüş nanoparçacıkların kanat benek testinde genotoksik aktiviteyi indükleyebildiği gösterilen bu çalışmada aynı zamanda negatif bulguların elde edildiği gümüş nitrat ile kontrast oluşturduğu da belirlenmiştir.

Ong vd. (2016) gümüş nanoparçacıkların *Drosophila* üreme sistemindeki germ hattı kök hücreleri üzerine yaptıkları bir çalışmada, AgNP maruziyetinin memeli modellerinde erkek üreme toksisitesi ile ilişkisi araştırılmıştır. AgNP'lerine maruz kalan meyve sineği *Drosophila*'nın testislerinde germ hattı kök hücre sayısının azaldığı ve oksidatif stresin tetiklendiği tespit edilmiştir. Aynı çalışma ile AgNP maruziyetinin germ hattı kök hücrelerinin erken gelişim farklılaşmasına neden olduğu ve *Drosophila* testislerinde spermatogoninin proliferasyonunu azalttığı bildirilmiştir.

Gorth vd. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada gümüş nanopartikülleri boyut olarak değerlendirilip hem nano ölçekli hem de mikro boyutlu (>100 nm) gümüş parçacıklarının *Drosophila* yumurta gelişimi üzerindeki toksisitesi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. 20- 30 nm AgNP'lerine maruz kalan *Drosophila* yumurtalarının pupalaşma oranları istatistiksel olarak yüksek oranlarda bir azalma göstermezken, 500-1200 nm AgNP'lerine maruz kalan yumurtalarda ise bu oranın azaldığı belirlenmiştir. 10 ppm AgNP maruziyetinde, sadece 20- 30 nm AgNP'lerine maruz kalan pupalar çok

fazla erginleşebilirken, 500-1200 nm ve 100 nm AgNP gruplarında kontrole göre daha düşük oranda erginleşebildikleri bildirilmiştir. Sonuç olarak, nano ölçekli AgNP'lerin (<100 nm) *Drosophila* yumurtaları için mikro boyutlu (>100 nm) gümüş partiküllerine göre daha az toksik olduğu kaydedilmiştir.

Avalos vd. (2015) yapmış oldukları *in vivo* bir çalışmada, *D. melanogaster*'de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile farklı boyutlardaki (4,7 ve 42 nm) AgNP'lerin genotoksitesini değerlendirmişlerdir. Larvalar 25, 30 ve 50 µg/mL dozlarında 4,7 nm AgNP'ler ile 250, 500 ve 1000 µg/mL dozlarında 42 nm AgNP'lerine maruz bırakılmıştır. Uygulanan dozlardaki AgNP'lerin, mutajenik ve rekominogenik etkiyi fenotipte gösteren beneklerin spontan frekansları değiştirmedeğini ancak her iki boyuttaki AgNP'lerin de pigmentasyon kusurlarına ve yetişkin sineklerde lokomotor yeteneğinde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Raj vd. (2017) tarafından *Drosophila*'nın yumurta verimi ve hayatta kalması üzerine gümüş nanoparçacıkların doza bağlı etkisi araştırılmıştır. 3, 10 ve 30 gün boyunca 5, 25, 50 ve 250 mg/mL dozlarda AgNP takviye edilmiş besiyerinde bekletilen virjin dişi sinekler benzer şekilde AgNP'lerle beslenen aynı yaşlı erkek bireylerle çiftleştirilmiştir. 3 gün boyunca farklı dozlarda AgNP takviyeli gıdalarla besledikten sonra, dişiler tarafından 4 saat içinde bırakılan yumurtalar sayılmıştır. 3 gün boyunca farklı dozlarda AgNP'lerle beslenen sineklerin yumurtlama kabiliyetinde kontrole göre herhangi bir fark gözlenmezken, 10 ve 30 gün boyunca farklı dozlarda AgNP'ler ile beslenen sineklerin yumurtlama kapasitesinin kontrole göre doza bağlı olarak azaldığı ve yumurta büyüklüklerinin arttığı bulunmuştur. Bununla birlikte, kontrole göre 5- 50 mg/mL AgNP dozlarının dişi sineklerin yumurtlama kapasitesinde hiçbir değişiklik göstermediği belirlenmiştir. 250 mg/mL'lik dozda AgNP alımının ise sadece bir veya iki yumurta oluşumuna yol açarak yumurta boyutunda ve yumurta bırakma kapasitesinde gözlenen azalmanın uzun süreli AgNP alımlarının istenmeyen bir yan etkiye sebep olduğu tespit edilmiştir.

Park vd. (2011), AgNP'lerin parçacık büyüklüğünün inflamasyon, sitotoksosite, gelişimsel toksisite ve genotoksitesini üzerine *in vitro* etkilerini karşılaştırmalı olarak araştırmışlardır. Farklı boyutlardaki (20, 80 ve 113 nm) AgNP'lerin hücresel metabolik aktivite ve membran hasarı üzerindeki etkilerinin çok belirgin olduğu tespit edilmiştir.

Makrofajlarda bir etki oluşturmazken, L929 fibroblastlarında 20 nm AgNP'lerin daha büyük nanoparçacıklardan daha sitotoksik olduğu gözlenmiştir. AgNP'lerin gümüş iyonlarına kıyasla hücre hasarını indükleme gücünün hücre tipine ve boyuta bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir.

Asare vd. (2012) fare testis hücrelerinde AgNP'lerin sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, 20 nm ve 200 nm AgNP'lerin ve 21 nm titanyum dioksit nanopartiküllerinin (TiO₂NP) üreme hücreleri üzerindeki genotoksitesine vurgu yaparak AgNP'lerin potansiyel riskleri konusunda ciddi endişeleri dile getirmişlerdir. AgNP'lerin TiO₂NP'lere kıyasla daha sitotoksik olduğunu ve ayrıca konsantrasyon ve zamana bağlı olarak apoptoz, nekroz ve proliferasyonun azalmasına sebep olduğunu bildirmişlerdir. Vannini vd. (2014) AgNP maruziyetinin filizlenen buğday fideleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmışlardır. 10 mg/L⁻¹ AgNP'lere maruz kalan fidelerde büyümenin olumsuz yönde etkilendiği ve kök ucu hücrelerinde morfolojik modifikasyonlara neden olduğunu kaydetmişlerdir. Scherer vd. (2019), 100 mg/L⁻¹ konsantrasyonunda 10, 20, 51 ve 73 nm AgNP'lere maruz bırakılan *Allium cepa* tohumlarını çimlenme (GI), kök uzaması (REI), mitotik indeks (MI), nükleer anormallik (NAI) ve mikronükleus indeksi (MNI) açısından değerlendirmiştir. AgNP'lerin köklere nüfuz ettiğini ve meristematik hücrelerde MI, GI, NAI ve MNI'yi etkilediğini göstermiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde AgNP'lerin boyuta bağlı olarak *Allium cepa*'daki sitotoksik ve genotoksik etkilerinin parçacık çapının azalmasıyla arttığını göstermişlerdir.

Wang vd. (2019), polivinilpirolidon ile kaplı 20 nm PVP-AgNP'ler ve 20 nm AgNP'ler ile indüklenen farelerde ve insan hepatoma hücre hattında (HepG2) DNA hasarı ve kromozomal sapmaların yanı sıra kemik iliğinin mikronükleus üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Fare kemik iliği hücreleri üzerindeki mikronükleus testinde, günde bir kez ve 28 gün boyunca oral yolla uygulanan 10, 50 ve 250 mg/kg vücut ağırlığı dozlarında, iki tür AgNP'nin fare kemik iliği hücreleri üzerinde belirgin bir inhibitör etkisinin olmadığı ve kromozom sapması etkisinin 250 mg/kg yüksek dozda ölçülebilir olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada 20-160 µg/mL dozlarında iki tip AgNP'nin de HepG2 hücrelerinde genetik değişikliklere neden olabileceğini bildirmişlerdir. 20 nm AgNP'lerdeki HepG2 hücrelerinin DNA hasar derecesinin 20 nm PVP-AgNP'lerden

daha yüksek olduğunu; 20 nm PVP-AgNP'lerin 20 nm AgNP'lerden daha ciddi kromozomal sapmalara neden olduğu belirtmişlerdir. Sonuç olarak AgNP'lerin HepG2 hücrelerinde genotoksik etkilere ve farelerde kemik iliği üzerinde sınırlı etkilere sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada, HIV-1 ile enfekte olmuş hücrelerde AgNP'nin potansiyel sitoprotektif aktivitesi araştırılmıştır. Üç günlük bir tedaviden sonra, HIV-1 ile enfekte olmuş Hut/CCR5'e karşı AgNP'lerinin aktivitesini izlemek için terminal uridil-nükleotid uç etiketleme testi (TUNEL) kullanılmıştır. AgNP'lerin Hut/CCR5 hücrelerinde replikasyonu inhibe edebileceği ve HIV ile ilişkili apoptoza neden olacağı bildirilmiştir. Büyüklük ve boyut özelliklerine göre AgNP'ler ve HIV-1 virüsü arasında etkileşim gösterilmiştir. AgNP'lerin tercihen HIV-1 virüsünün gp120 glikoprotein düğümlerini hedeflediği ve bağlandığı da belirtilmiştir (Ebrahiminezhad, 2016). *In vitro* çalışmalarda ayrıca, bu etkileşimin virüsün konakçı hücre ile bağlanmamasına neden olduğu gösterilmiştir (Elechiguerra, 2005).

Çalışmamızda yeşil sentez yöntemi ile *Vitis vinifera* spp., Cimin üzüm yaprağından elde edilen gümüş nanaopartikülünün olası genotoksik ve toksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *Drosophila melanogaster* ile yapılan Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) tekniği kullanılmıştır. SMART yöntemi birçok çalışmada rastladığımız, güvenilirliği kanıtlanmış, hızlı, ucuz maliyetli ve *in vivo* çalışmalara olanak sağlayan bir test tekniğidir. *Drosophila melanogaster*'in mutant soylarında kimyasalların sebep olduğu mutasyonların fenotipteki genotoksik etkinliğinin araştırılmasında en iyi yöntemdir. Yapılan literatür taramasında Cimin üzümü (*Vitis vinifera* spp., Cimin) yapraklarından yeşil sentez yöntemi ile elde edilmiş olan gümüş nanopartiküllerinin SMART yöntemi ile *Drosophila melanogaster*'de uygulanması ile ilgili çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca sentetik olarak elde edilmiş olan kimyasal gümüş nanopartiküllerinin AgNP_(k) *D. melanogaster* üzerindeki genotoksik ve toksik etkileri araştırılmış, NP'lerin boyut ve yapı özellikleri, uygulanan konsantrasyon oranlarına göre etkilerinin değişiklik gösterdiği gözlemlenmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmamız üç aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan gümüş nanopartikülünün eldesi için doğa dostu yeşil sentez yöntemi seçilmiştir. Öncelikle elde edilen AgNP_(b), UV-Vis spektroskopisi, X-ışını kırınımı (XRD), taramalı elektron

mikroskopisi (SEM), enerji dağılım X-ışını spektrometresi (EDX) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ile karakterize edilmiştir. 28-34 nm aralığında değişen boyutlara sahip olduğu tespit edilmiştir. Sonraki aşamada, kimyasal olarak elde edilmiş sentetik gümüş nanopartiküller AgNP_(k) ile Cimin üzüm yaprağı kullanılarak yeşil sentez yöntemi ile elde edilen gümüş nanopartiküllerin AgNP_(b) *Drosophila melanogaster*'in transheterozigot larvalarında yaşama yüzdesi (larval mortalite) üzerine etkisi araştırılmıştır. AgNP_(k) ve AgNP_(b)'nin *Drosophila melanogaster*'e ait larvaların yaşama yüzdesi üzerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak toksik etki gösterdiği ve hayatta kalış oranının kontrole göre azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Son aşama da ise LD₅₀ dozunun AgNP_(k) için 7,5 mg/mL ve AgNP_(b) için 10 mg/mL olduğu belirlendikten sonra farklı konsantrasyonlarda (1,25; 2,5 ve 5 mg/mL) AgNP'lerin genotoksik etkileri, uygulama sonunda larvalardan erginleşen sineklerin kanat hücrelerindeki genetik değişimler (mitotik rekombinasyon, ayrılmama, delesyon ve nokta mutasyon) sonucunda oluşan mutant trikomlara göre değerlendirilmiştir. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi yöntemiyle mutant klon değerlendirmeleri, küçük tek tip, büyük tek tip ve ikiz klon sınıflandırmaları esas alınarak yapılmıştır. Çalışma sonunda AgNP_(b)'nin genotoksik etkili olmadığı, tüm konsantrasyonlarda AgNP_(k)'nin klon indüksiyon frekanslarının AgNP_(b)'den daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Gümüş nanopartiküllerinin kullanım alanlarının gün geçtikçe artış göstermesiyle hayatımızda olan rolü büyük önem arz etmektedir. İnsan sağlığı üzerine etkilerinin ne kadar çok önemli olduğu düşünüldüğünde gümüşün etkileri merak ve araştırma konusu olmuştur. Yapmış olduğumuz bu çalışmada literatürde yeterli bir veriye rastlanılmamış ve bölgesinde endemik bir tür olan Cimin üzümü (*Vitis vinifera* spp., Cimin) yaprağı kullanılarak doğa dostu yeşil sentez yöntemi ile gümüş nanopartikülleri sentezlenmiş, *Drosophila melanogaster*'de SMART yöntemi kullanılarak genotoksik ve sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Oluşan gümüş nanopartiküllerinin toksik ve genotoksik etkilerinin olası mekanizmaları değerlendirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Acay, H., Baran, M. F., and Eren, A. (2019). "Investigating antimicrobial activity of silver nanoparticles produced through green synthesis using leaf extract of common grape (*Vitis Vinifera*)", *Applied Ecology And Environmental Research*, 17(2), 4539-4546.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L., Ikram, S., 2016. "A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise", *Journal of Advenced Research* 7, 17–28.
- Alaraby, M., Hernandez, A. and Marcos, R. (2016) "New insights in the toxic/genotoxic effects of CuO nanoparticles in the *in vivo Drosophila* model", *Nanotoxicology*, 10(6), 749-760.
- Álvarez, R. A., Cortez-Valadez, M., Britto-Hurtado, R., Bueno, L. O. N., FloresLopez, N. S., Hernández-Martínez, A. R., and Flores-Acosta, M. (2015). "Raman scattering and optical properties of lithium nanoparticles obtained by green synthesis", *Vibrational Spectroscopy*, 77, 5-9.
- Asare, N., Instanes, C., Sandberg, W. J., Refsnes, M., Schwarze, P., Kruszewski, M., and Brunborg, G. (2012). "Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells", *Toxicology*, 291(1-3), 65–72.
- Asmatulu, R., Nguyen, P., and Asmatulu, E. (2013). "Nanotechnology safety in the automotive industry", *Nanotechnology Safety*, (1st ed.) 57-72.
- Amiri, M., Pardakhti, A., Ahmadi, Z. M., Akbari, A. and Salavati, N. M. (2018) "Magnetic nickel ferrite nanoparticles: Green synthesis by *Urtica* and therapeutic effect of frequency magnetic field on creating cytotoxic response in neural cell lines", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 172, 244-253.
- Amooaghaie R, Saeri MR, Azizi M. (2015). "Synthesis, characterization and biocompatibility of silver nanoparticles synthesized from *Nigella sativa* leaf extract in comparison with chemical silver nanoparticles", *Ecotoxicol Environ Safety*, 120:400–408.
- Anastas, P. T., and Warner, J. C. (1998). "Principles of green chemistry. Green chemistry: Theory and Practice" (1st ed.) 29-56. **Oxford: Oxford University Press.**
- Anastas, P.T., Kirchhoff, M.M., (2002). "Origins, current status, and future challenges of greenchemistry", *Accounts of Chemical Research*, 35,686–694.
- Anastas, P., Eghbali, N., (2010). "Green chemistry: principles and practice", *Chemical Society Reviews* 39, 301–312.

- Andrade, L. R., Brito A. S., Melero, A. M., Zanin, H., Ceragioli H. J., Baranauskas, V., Cunha, K. S. and Irazusta, S. P. (2014). "Absence of mutagenic and recombinogenic activity of multi-walled carbon nanotubes in the *Drosophila wing-spot* test and *Allium cepa* test", *Ecotoxicol and Environmental Safety*, 99, 92-97.
- Anyaogu, K. C., Fedorov, A. V., and Neckers, D. C. (2008). "Synthesis, characterization, and antifouling potential of functionalized copper nanoparticles", *Langmuir*, 24(8), 4340-4346.
- Arumugam, A., Karthikeyan, C., Hameed, A. S. H., Gopinath, K., Gowri, S., and Karthika, V. (2015). "Synthesis of cerium oxide nanoparticles using *Gloriosa superba* L. leaf extract and their structural, optical and antibacterial properties", *Materials Science and Engineering: C*, 49, 408-415.
- Atıcı, T. (2016) "*Drosophila melanogaster*'de ZnOTiO₂ nanokompozitinin *in vivo* toksik potansiyeline karşı oleuropein'in kullanılması", Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzincan, 62-63.
- Asaduzzaman, A. K. M., Chun, B. S., and Kabir, S. R. (2016). "*Vitis vinifera* assisted silver nanoparticles with antibacterial and antiproliferative activity against Ehrlich Ascites Carcinoma cells", *Journal of Nanoparticles*, 2016,1-10.
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila. A laboratory handbook. Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Ávalos, A., Haza, A. I., Drosopoulou, E., Mavragani-Tsipidou, P., and Morales, P. (2015). "*In vivo* genotoxicity assesment of silver nanoparticles of different sizes by the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on *Drosophila*", *Food and Chemical Toxicology*, 85, 114-119.
- Bankar, A., Joshi, B., Kumar, A. R., and Zinjarde, S. (2010). "Banana peel extract mediated novel route for the synthesis of silver nanoparticles", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 368(1-3), 58-63.
- Bastos-Arrieta, J., Florido, A., Pérez-Ràfols, C., Serrano, N., Fiol, N., Poch, J., and Villaescusa, I. (2018). "Green synthesis of Ag nanoparticles using grape stalk waste extract for the modification of screen-printed electrodes", *Nanomaterials*, 8(11), 946.
- Begum, N. A., S. Mondal, S. Basu, R. A. Laskar and D. Mandal, (2009). "Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of *Black tea* leaf extracts", *Colloids and surfaces B:Biointerfaces*, 71, 113-118.
- Benelli, G., and Lukehart, C. M. (2017). "Applications of green-synthesized nanoparticles in pharmacology, parasitology and entomology", *Journal of Cluster Science*, 28(1), 1-2.
- Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., and Weibel, E. (1982). "Surface studies by

- scanning tunneling microscopy”, *Physical Review Letters*, 49(1), 57.
- Bowman, M.J. and A. D. Booth, (1997). “A review of methods for the examination of magnetic domain structure”, *Materials Characterization*, 39(2-5) 139167.
- Cao, G. (2004). “Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications”, *Imperial College Press*, London.
- Chan, C. (2008). “From nanotech to nanoscience”, *Chemical Heritage Magazine*, 26(2), 2.
- Chandran, S. P., Chaudhary, M., Pasricha, R., Ahmad, A., and Sastry, M. (2006). “Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using *Aloe vera* plant extract”, *Biotechnology Progress*, 22(2), 577-583.
- Chiang, C. L., Sung, C. S., Wu, T. F., Chen, C. Y., and Hsu, C. Y. (2005). “Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells”, *Journal of Chromatography B*, 822(1-2), 54-60.
- Cho, K., Wang, X. U., Nie, S., and Shin, D. M. (2008). “Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer”, *Clinical Cancer Research*, 14(5), 1310-1316.
- Clevers, H. (2006). “Wnt/ β -catenin signaling in development and disease”, *Cell*, 127(3), 469-480.
- Çakır, Ş. (2004) “Bazı organik fosforlu insektisitlerin *Drosophila melanogaster*’in yaşama yüzdesi üzerine etkisi”, *Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 24(3), 71-80.
- Çıracı, S., Özbay, E., Gülseren, O., Demir, H. V., Bayındır, M., Oral, A., and Dana, A. (2005). “Türkiye’de nanoteknoloji”, *TÜBİTAK Bilim ve Teknik Dergisi*.
- Demirsoy, A., Kuru, M., Çıplak, B., Şengör, C., Ergezen, S., Bardakçı, F., Kence, M., “Biyoloji eğitiminde evrim sempozyumu” sonuç bildirgesi. Erişim : <http://biyolojiegitim.yyu.edu.tr/ders/ev/sempozyumkitap.pdf> (Erişim tarihi: 12.06.2020)
- Doğan, E.E. (2002). “Bazı astrozon grubu tekstil boyalarının genotoksik etkisinin *Drosophila melanogaster* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile araştırılması”, *Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi*.
- Dolez, P. I. (2015). “Nanomaterials definitions, classifications, and applications”, *In Nanoengineering*, (3-40). Elsevier.
- Dong, X., Ji, X., Wu, H., Zhao, L., Li, J., and Yang, W. (2009). “Shape control of silver nanoparticles by stepwise citrate reduction”, *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(16), 6573-6576.
- Drexler, K. E., (1986). “Engines of creation: the coming era of nanotechnology”,

Doubleday, New York.

- Ebrahiminezhad, A., Bagheri, M., Taghizadeh, S. M., Berenjian, A., and Ghasemi, Y. (2016). "Biomimetic synthesis of silver nanoparticles using microalgal secretory carbohydrates as a novel anticancer and antimicrobial", *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(1), 015018.
- Espitia, P. J. P., Soares, N. D. F. F., dos Reis Coimbra, J. S., de Andrade, N. J., Cruz, R. S., and Medeiros, E. A. A. (2012). "Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications", *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1447-1464.
- Elango, G., and Roopan, S. M. (2015). "Green synthesis, spectroscopic investigation and photocatalytic activity of lead nanoparticles", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 139, 367-373.
- Elechiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H. H., and Yacaman, M. J. (2005). "Interaction of silver nanoparticles with HIV-1", *Journal of Nanobiotechnology*, 3(1), 1-10.
- Falakalı, B. (1989). "Drosophila Genetiği", *Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları*, İzmir, 1-10.
- Faraday, M. (1857). "The Bakerian Lecture. Experimental relations of gold (and other metals) to light", *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 147, 145-181.
- Faunce, T. and Watal, A. (2010). "Nanosilver and global public health: international regulatory issues", *Nanomedicine*, 5, 617-632.
- Feynman R. P. (1960). "There's plenty of room at the bottom", *California Institute of Technology Quarterly*, 2, 2-10.
- Filho, J., Matsubara, E. Y., Franchi, L. P., Martins, I. P., Rivera, L. M. R., Rosolen, J. M., and Grisolia, C. K. (2014). "Evaluation of carbon nanotubes network toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) model", *Environmental Research*, 134, 9-16.
- Franchi, L. P., Santos, R. A., Matsubara, E. Y., Lima, J. C. D., Rosolen, J. M., and Takahashi, C. S. (2012). "Citotoxicidade e genotoxicidade de nanotubos de carbono", *Química Nova*, 35(3), 571-580.
- Franco-Molina, M. A., Mendoza-Gamboa, E., Sierra-Rivera, C. A., Gómez-Flores, R. A., Zapata-Benavides, P., Castillo-Tello, P., and Rodríguez-Padilla, C. (2010). "Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells", *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 29(1), 148.
- Frey, N. A., Peng, S., Cheng, K., and Sun, S. (2009). "Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic

- energy storage”, *Chemical Society Reviews*, 38(9), 2532-2542.
- Frei, H. and Würgler, F.E., (1988). “Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results”, *Mutation Research*, 203(4), 297-308.
- Frens, G. and Overbeek, J. T. (1969). “Carey Leas Colloidal Silver”, *Kolloid Zeitschrift and Zeitschrift fur Polymere*, 233, 922.
- Fondevila, M., Herrero, R., Casallas, M. C., Abecia, L., and Duchá, J. J. (2009). “Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs”, *Animal Feed Science and Technology*, 150(3-4), 259-269.
- Garnett, M. C., and Kallinteri, P. (2006). “Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles”, *Occupational Medicine*, 56(5), 307-311.
- Ghaedi, M., Yousefinejad, M., Safarpour, M., Khafri, H. Z., and Purkait, M. K. (2015). “*Rosmarinus officinalis* leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles and investigation of its antimicrobial properties”, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 31, 167-172.
- Glusker J., Katz A., Bock C., Rigaku J. (1999). “Metal ions in biological systems”, *The Rigaku Journal*, 16(2), 8–16.
- Gnanajobitha, G., Paulkumar, K., Vanaja, M., Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Annadurai, G., and Kannan, C. (2013). “Fruit-mediated synthesis of silver nanoparticles using *Vitis vinifera* and evaluation of their antimicrobial efficacy”, *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 3(1), 67.
- Goldberg, M., Langer, R., and Jia, X. (2007). “Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering”, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(3), 241-268.
- Goldstain, A. (1997). “Handbook of Nanophase Materials”, *Marcel Dekker Inc*, New York.
- Gorth, D. J., Rand, D. M., and Webster, T. J. (2011). “Silver nanoparticle toxicity in *Drosophila*: size does matter”, *International Journal of Nanomedicine*, 6, 343.
- Goto-Inoue, N., Hayasaka, T., Zaima, N., Kashiwagi, Y., Yamamoto, M., Nakamoto, M., and Setou, M. (2010). “The detection of glycosphingolipids in brain tissue sections by imaging mass spectrometry using gold nanoparticles”, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(11), 1940-1943.
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.G. (1984). “Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*”, *Environmental Mutagenesis*, 6, 153-188.

- Graf, U., Singer, D. (1992). "Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*", *Revistan Internacinal de Contamination Ambiental*, 8, 15-27.
- Graf, U., Van Schaik, N., and Würgler, F. E. (2012). "*Drosophila* Genetics: A Practical Course", *Springer Science and Business Media*.
- Graf, U., and van Schaik, N. (1992). "Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*", *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 271(1), 59-67.
- Graf, U., and Würgler, F. E. (1996). "The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27(3), 219-226.
- Guascito, M. R., Filippo, E., Malitesta, C., Manno, D., Serra, A., and Turco, A. (2008). "A new mperometric nanostructured sensor for the analytical determination ofhydrogen peroxide", *Biosensors and Bioelectronics* 24, 1063-1069.
- Gultekin, D. D., Nadaroglu, H., Gungor, A. A., and Kishali, N. H. (2017). "Biosynthesis and characterization of copper oxide nanoparticles using Cimin grape (*Vitis vinifera* cv.) extract", *International Journal of Secondary Metabolite*, 4(3), 77-84.
- Gurunathan, S., Han, J.W., Kwon, D., Kim, J., (2014). "Enhanced antibacterial and antibiofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria", *Nanoscale Research Letters*, 9, 1–17.
- Harris, A. T., and Bali, R. (2008). "On the formation and extent of uptake of silver nanoparticles by live plants", *Journal of Nanoparticle Research*, 10(4), 691-695.
- Haynes, H., and Asmatulu, R. (2013). "Nanotechnology safety in the aerospace industry", *Nanotechnology Safety*, (1st ed.) (85-97). New York: Elsevier.
- Henderson, D.S. (2004) "*Drosophila* Cytogenetic Protocols", *Humana Press*, 389.
- Horton, B., (1999). "Green chemistry puts down roots", *Nature*, 400, 797–799.
- Hu, Z., Zhang, J., Chan, W. L., and Szeto, Y. S. (2006). "Suspension of silver oxide nanoparticles in chitosan solution and its antibacterial activity in cotton fabrics", *MRS Online Proceedings saLibrary Archive*, 920.
- Hu, R., Yong, K. T., Roy, I., Ding, H., He, S., and Prasad, P. N. (2009). "Metallic nanostructures as localized plasmon resonance enhanced scattering probes for multiplex dark field targeted imaging of cancer cells", *Journal of*

Physical Chemistry C: Nanomaterials and interfaces, 113, 2676-2684.

- Im, K., Cho, K., Kim, J., and Kim, S. (2010). "Transparent heaters based on solution processed indium tin oxide nanoparticles", *Thin Solid Films*, 518(14), 3960-3963.
- Iravani, S. (2011). "Green synthesis of metal nanoparticles using plants", *Green Chemistry*, 13(10), 2638-2650.
- Ismail, E. H., Khalil, M. M., Al Seif, F. A., El-Magdoub, F., Bent, A. N., Rahman, A., and Al, U. S. D. (2014). "Biosynthesis of gold nanoparticles using extract of grape (*Vitis vinifera*) leaves and seeds", *Progress in Nanotechnol and Nanomaterials*, 3(1), 1-12.
- Jain, D., Daima, H. K., Kachhwaha, S., and Kothari, S. L. (2009). "Synthesis of plantmediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their anti microbial activities", *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 4(3), 557563.
- Jain, S., and Mehata, M. S. (2017). Medicinal plant leaf extract and pure flavonoid mediated green synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial property. *Scientific Reports*, 7(1), 1-13.
- Jamil, M., Ahmad, F., Rhee, J. T., and Jeon, Y. J. (2011). "Nanoparticle-doped polymerdispersed liquid crystal display", *Current Science*, 101, 1544-1552.
- Jasrotia, T., Chaudhary, S., Kaushik, A., Kumar, R., and Chaudhary, G. R. (2020). "Green chemistry-assisted synthesis of biocompatible Ag, Cu, and Fe₂O₃ nanoparticles", *Materials Today Chemistry*, 15, 100214.
- Javier, D. J., Nitin, N., Roblyer, D. M., and Richards-Kortum, R. (2008). "Metal-based nanorods as molecule-specific contrast agents for reflectance imaging in 3D tissues", *The Journal of Nanophotonics*, 2, 23506.
- Jennings, B. H. (2011) "*Drosophila*-a versatile model in biology and medicine", *Materials Today*, 14, 190-195.
- Jia, C. J., and Schüth, F. (2011). "Colloidal metal nanoparticles as a component of designed catalyst", *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(7), 2457-2487.
- Kathirvelu, S., D'souza, L., and Dhurai, B. (2009). "UV protection finishing of textiles using ZnO nanoparticles", *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 34, 267-273.
- Kasthuri, J., Kathiravan, K., and Rajendiran, N. (2009a). "Phyllanthin-assisted biosynthesis of silver and gold nanoparticles: a novel biological approach", *Journal of Nanoparticle Research*, 11(5), 1075-1085.
- Kasthuri, J., Veerapandian, S., and Rajendiran, N. (2009b). "Biological synthesis of

silver and gold nanoparticles using apiin as reducing agent”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 68(1), 55-60.

Kaushik, R., Supratim, B., and Pataki, C. B. (2013). “Green synthesis of silver nanoparticles by using grape (*Vitis vinifera*) fruit extract: characterization of the particles and study of antibacterial activity”, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4, 1271-1278.

Kaya, B. (2000). “Bazı pestisitlerin *Drosophila melanogaster* hatlarında mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması”, (Doktora Tezi), *Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Antalya, 40-45.

Kaya, B., Yanikoğlu, A., Creus, A. and Marcos, R. (2000). “Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 465(1-2), 77-84.

Kettler, K., Giannakou, C., de Jong, W. H., Hendriks, A. J., and Krystek, P. (2016). “Uptake of silver nanoparticles by monocytic THP-1 cells depends on particle size and presence of serum proteins”, *Journal of Nanoparticle Research*, 18(9), 286.

Kharissova, O. V., Dias, H. R., Kharisov, B. I., Pérez, B. O., and Pérez, V. M. J. (2013). “The greener synthesis of nanoparticles”, *Trends in Biotechnology*, 31(4), 240-248.

Kim, K. T., Truong, L., Wehmas, L., and Tanguay, R. L. (2013). “Silver nanoparticle toxicity in the embryonic zebrafish is governed by particle dispersion and ionic environment”, *Nanotechnology*, 24(11), 115101.

Ko, S. H., Pan, H., Grigoropoulos, C. P., Luscombe, C. K., Fréchet, J. M., and Poulidakos, D. (2007). “All-inkjet-printed flexible electronics fabrication on a polymer substrate by low-temperature high-resolution selective laser sintering of metal nanoparticles”, *Nanotechnology*, 18(34), 345202.

Kumar, A., Vemula, P. K., Ajayan, P. M., and John, G. (2008). “Silver-nanoparticle embedded antimicrobial paints based on vegetable oil”, *Nature Materials*, 7(3), 236.

Kumar, A. M., Chisti, Y., and Banerjee, U. C. (2013). “Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts”, *Biotechnology Advances*, 31(2), 346-356.

Lansdown, A. B. (2010). “A pharmacological and toxicological profile of silver as an antimicrobial agent in medical devices”, *Advances in Pharmacological Sciences*, 2010,1-17.

Lea, M. C. (1889). “Allotropic forms of silver”, *American Journal of Science*, 37, 476.

- Lee, I. S., Lee, N., Park, J., Kim, B. H., Yi, Y. W., Kim, T., and Hyeon, T. (2006). “Ni/NiO core/shell nanoparticles for selective binding and magnetic separation of histidine-tagged proteins”, *Journal of the American Chemical Society*, 128(33), 10658-10659.
- Li, Y., Wu, Y., and Ong, B. S. (2005). “Facile synthesis of silver nanoparticles useful for fabrication of high-conductivity elements for printed electronics”, *Journal of the American Chemical Society*, 127(10), 3266-3266.
- Lloyd, J. R., Byrne, J. M., and Coker, V. S. (2011). “Biotechnological synthesis of functional nanomaterials”, *Current Opinion in Biotechnology*, 22(4), 509-515.
- Luo, C. H., Shanmugam, V., and Yeh, C. S. (2015). “Nanoparticle biosynthesis using unicellular and subcellular supports”, *NPG Asia Materials*, 7(8), e209.
- Mao, B. H., Tsai, J. C., Chen, C. W., Yan, S. J., and Wang, Y. J. (2016). “Mechanisms of silver nanoparticle-induced toxicity and important role of autophagy”, *Nanotoxicology*, 10(8), 1021-1040.
- Makarov, V. V., Love, A. J., Sinitsyna, O. V., Makarova, S. S., Yaminsky, I. V., Taliansky, M. E., and Kalinina, N. O. (2014). “Green nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants”, *Acta Naturae*, 6(1), 20.
- Martinez-Gutierrez, F., Olive, P. L., Banuelos, A., Orrantia, E., Nino, N., Sanchez, E. M., Ruiz F., Bach H., and Av-Gay, Y. (2010). “Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles”, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(5), 681-688.
- Mbonyiryivuze, A., Omollo, I., Ngom, B. D., Mwakikunga, B., Dhlamini, S. M., Park, E., and Maaza, M. (2015). “Natural dye sensitizer for Grätzel cells: Sepia melanin” , *Physics and Material Chemistry*, 3, 1-6.
- Mokhtari, N., Daneshpajouh, S., Seyedbagheri, S., Atashdehghan, R., Abdi, K., Sarkar, S., Minaian, S., Shahverdi, H.R., Shahverdi, A.R. (2009). “Biological synthesis of very small silver nanoparticles by culture supernatant of *Klebsiella pneumoniae*: The effects of visible-light irradiation and the liquid mixing process”, *Materials Research Bulletin*, 44, 1415-1421.
- Mulder, W. J., Strijkers, G. J., van Tilborg, G. A., Griffioen, A. W., and Nicolay, K. (2006). “Lipid-based nanoparticles for contrast-enhanced MRI and molecular imaging. NMR in Biomedicine”: *An International Journal Devoted to the Development and Application of Magnetic Resonance In vivo*, 19(1), 142-164.
- Murugan, K., Sanoopa, C. P., Madhiyazhagan, P., Dinesh, D., Subramaniam, J., Panneerselvam, C., and Munusamy, M. A. (2016). “Rapid biosynthesis of

- silver nanoparticles using *Crotalaria verrucosa* leaves against the dengue vector *Aedes aegypti*: what happens around? An analysis of dragonfly predatory behaviour after exposure at ultra-low doses”, *Natural Product Research*, 30(7), 826-833.
- Müller, R. H., Radtke, M., and Wissing, S. A. (2002). “Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 131-155.
- Na, H. B., Song, I. C., and Hyeon, T. (2009). “Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents”, *Advanced Materials*, 21(21), 2133-2148.
- Nadagouda, M. N., and Varma, R. S. (2008). “Green synthesis of silver and palladium nanoparticles at room temperature using coffee and tea extract”, *Green Chemistry*, 10(8), 859-862.
- Nair, L. S., and Laurencin, C. T. (2007). “Silver nanoparticles: synthesis and therapeutic applications”, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3(4), 301-316.
- Nair, R., Varghese, S. H., Nair, B. G., Maekawa, T., Yoshida, Y., and Kumar, D. S. (2010). “Nanoparticulate material delivery to plants”, *Plant Science*, 179(3), 154-163.
- Nam, J. M., Thaxton, C. S., and Mirkin, C. A. (2003). “Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins”, *Science*, 301(5641), 1884-1886.
- Nason, J. A., McDowell, S. A., and Callahan, T. W. (2012). “Effects of natural organic matter type and concentration on the aggregation of citrate-stabilized gold nanoparticles”, *Journal of Environmental Monitoring*, 14(7), 1885-1892.
- Nematollahi, F. (2015). “Silver nanoparticles green synthesis using aqueous extract of *Salvia limbata* CA Mey”, *International Journal of Biosciences*, 6(2), 30-35.
- Nichols, C.D., Becnel, J. and Pandey, U.B. (2012) “Methods to assay *Drosophila* behavior”, *Journal of Visualized Experiments*, (61), e3795.
- Nowack, B., and Bucheli, T. D. (2007). “Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment”, *Environmental Pollution*, 150(1), 5-22.
- Nowack, B., Krug, H. F., and Height, M. (2011). “120 years of nanosilver history: implications for policy makers”, *Environmental Science and Technology*, 45, 1177-1183.
- Ong, C., Yung, L. Y. L., Cai, Y., Bay, B. H., and Baeg, G. H. (2015). “*Drosophila melanogaster* as a model organism to study nanotoxicity”, *Nanotoxicology*,

9(3), 396-403.

- Ong, C., Lee, Q. Y., Cai, Y., Liu, X., Ding, J., Yung, L. Y. L., and Baeg, G. H. (2016). "Silver nanoparticles disrupt germline stem cell maintenance in the *Drosophila testis*", *Scientific Reports*, 6, 20632.
- Özata, L. (2006). "Bazı tekstil boyalarının *Drosophila melanogaster* üzerine toksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması", (Doktora Tezi), *İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Malatya.
- Pandey, S., Mewada, A., Thakur, M., Shah, R., Oza, G., and Sharon, M. (2013). "Biogenic gold nanoparticles as fotillas to fire berberine hydrochloride using folic acid as molecular road map", *Materials Science and Engineering: C*, 33(7), 3716-3722.
- Patil, M. P., and Kim, G. D. (2017). "Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 79-92.
- Parashar, U. K., Saxena, P. S., and Srivastava, A. (2009). "Bioinspired synthesis of silver nanoparticles", *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures (DJNB)*, 4(1).
- Pardeike, J., Hommos, A., and Müller, R. H. (2009). "Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products", *International Journal of Pharmaceutics*, 366(1-2), 170-184.
- Park, M. V., Neigh, A. M., Vermeulen, J. P., de la Fonteyne, L. J., Verharen, H. W., Briedé, J. J., and de Jong, W. H. (2011). "The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles", *Biomaterials*, 32(36), 9810-9817.
- Patil, M.P., Kim, G.D. (2017). "Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 79-92.
- Peter, M., Binulal, N. S., Soumya, S., Nair, S. V., Furuike, T., Tamura, H., and Jayakumar, R. (2010). "Nanocomposite scaffolds of bioactive glass ceramic nanoparticles disseminated chitosan matrix for tissue engineering applications", *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 284-289.
- Philip, D. (2010). "Green synthesis of gold and silver nanoparticles using *Hibiscus rosa sinensis*", *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 42(5), 1417-1424.
- Rafique, M., Sadaf, I., Rafique, M.S., Tahir, M.B., (2016). "A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications", *Artificial Cells*,

Nanomedicine Biotechnology, 1–20.

- Raghunandan, D., Borgaonkar, P. A., Bendegumble, B., Bedre, M. D., Bhagawanraju, M., Yalagatti, M. S., and Abbaraju, V. (2011). "Microwave-assisted rapid extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using carom seed (*Trachyspermum copticum*) extract and *in vitro* studies", *American Journal of Analytical Chemistry*, 2(04), 475.
- Raj, A., Shah, P., and Agrawal, N. (2017). "Dose-dependent effect of silver nanoparticles (AgNPs) on fertility and survival of *Drosophila*: An *in-vivo* study", *PLoS One*, 12(5), e0178051.
- Rajan, R., Chandran, K., Harper, S. L., Yun, S. I., and Kalaichelvan, P. T. (2015). "Plant extract synthesized silver nanoparticles: an ongoing source of novel biocompatible materials", *Industrial Crops and Products*, 70, 356-373.
- Ramsden, J. J. (2005). "What Is Nanotechnology?" *Department Of Advanced Materials, Cranfield University*, Bedfordshire, UK. Nanotechnology Perceptions 1. 3-17.
- Ramsden, J. (2018). "Applied nanotechnology: the conversion of research results to products", *William Andrew*.
- Rand, M.D., Montgomery, S.L., Prince, L. and Vorobjeikina, D. (2014). "Developmental toxicity assays using the *Drosophila* model", *Current Protocols in Toxicology*, 59(1), 12.
- Rao, Sapra, S., Sarma, D. D., C. N. R., Muller, A., and Cheetham, A. K. (2004). *Chemistry of Nanomaterials*.
- Raveendran, P., Fu, J., and Wallen, S. L. (2003). "Completely green synthesis and stabilization of metal nanoparticles", *Journal of the American Chemical Society*, 125(46), 13940-13941.
- Ravichandran, R. (2010). "Nanotechnology applications in food and food processing: innovative green approaches, opportunities and uncertainties for global market", *International Journal of Green Nanotechnology: Physics and Chemistry*, 1(2), P72-P96.
- Rasheed, T., Bilal, M., Iqbal, H. M., and Li, C. (2017). "Green biosynthesis of silver nanoparticles using leaves extract of *Artemisia vulgaris* and their potential biomedical applications", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 158, 408-415.
- Reddy, P.R. (2006). "Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications", 1791, and references therein Michael Faraday, *Philosophical Transactions of the Royal Society*, London, 1857.
- Reibold, M., Paufler, P., Levin, A. A., Kochmann, W., Pätzke, N., and Meyer, D. C. (2009). "Discovery of nanotubes in ancient Damascus steel", *Physics and*

Engineering of New Materials, 305-310. Berlin: Springer.

- Reiter, L.T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. and Bier, E. (2001). "A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*", *Genome Research*, 11(6), 1114-1125.
- Rincon, J.G., Graf, U. (1995). "*Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor", *Plenum Press*, New York, 169-179.
- Rubin, G.M. and Lewis, E.B. (2000) "A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research", *Science*, 287(5461), 2216-2218.
- Saifuddin, N., Wong, C. W., and Yasumira, A. A. (2009). "Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of bacteria with microwave irradiation", *Journal of Chemistry*, 6(1), 61-70.
- Sangeetha, G., Rajeshwari, S., and Venkatesh, R. (2011). "Green synthesis of zinc oxide nanoparticles by *Aloe barbadensis* miller leaf extract: Structure and optical properties", *Materials Research Bulletin*, 46(12), 2560-2566.
- Sanghi, R., and Verma, P. (2009). "Biomimetic synthesis and characterisation of protein capped silver nanoparticles", *Bioresource Technology*, 100(1), 501-504.
- Sanvicens, N., Pastells, C., Pascual, N., and Marco, M. P. (2009). "Nanoparticle-based biosensors for detection of pathogenic bacteria", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(11), 1243-1252.
- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Shin, H. S., Jacob, J. M., Pugazhendhi, A., Bhaisare, M., and Kumar, G. (2018). "New insights on the green synthesis of metallic nanoparticles using plant and waste biomaterials: current knowledge, their agricultural and environmental applications", *Environmental Science and Pollution Research*, 25(11), 10164-10183.
- Sarikaya, R. (2005). "Sodyum nitrit, sodyum nitrat, potasyum nitrit ve potasyum nitrat'ın genotoksik etkisinin somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile araştırılması", (Doktora Tezi), *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara.
- Sathyavathi, R., Krishna, M. B., Rao, S. V., Saritha, R., and Rao, D. N. (2010). "Biosynthesis of silver nanoparticles using *Coriandrum sativum* leaf extract and their application in nonlinear optics", *Advanced Science Letters*, 3(2), 138-143.
- Scherer, M. D., Sposito, J. C., Falco, W. F., Grisolia, A. B., Andrade, L. H., Lima, S. M., and Oliveira, S. L. (2019). "Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on meristematic cells of *Allium cepa* roots: A close analysis of particle size dependence", *Science of the Total Environment*, 660, 459-467.
- Schlossman, D., and Shao, Y. (2005). "Inorganic ultraviolet filters", *Sunscreens:*

Regulation and Commercial Development (239-80). Florida: Taylor and Francis.

- Sevimli, M., and Sevimli, T. S. (2016). "Embriyonik Kök Hücrelerde Wnt Sinyal Yolağı", *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 30(1), 45-54.
- Shahverdi, A. R., Minaeian, S., Shahverdi, H. R., Jamalifar, H., and Nohi, A. A. (2007). "Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: a novel biological approach", *Process Biochemistry*, 42(5), 919-923.
- Sharma, V. K., Yngard, R. A., and Lin, Y. (2009). "Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities", *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(12), 83-96.
- Shibata, N., Saitoh, T., Tadokoro, Y., and Okawa, Y. (2009). "The cell wall galactomannan antigen from *Malassezia furfur* and *Malassezia pachydermatis* contains β -1, 6-linked linear galactofuranosyl residues and its detection has diagnostic potential", *Microbiology*, 155(10), 3420-3429.
- Si, S., and Mandal, T. K. (2007). "Tryptophan-based peptides to synthesize gold and silver nanoparticles: A mechanistic and kinetic study", *Chemistry—A European Journal*, 13(11), 3160-3168.
- Singh, A. K. (2015). "Engineered nanoparticles: structure, properties and mechanisms of toxicity", (1st ed.) Cambridge: *Academic Press*.
- Singh, P., Kim, Y. J., Wang, C., Mathiyalagan, R., and Yang, D. C. (2016). "*Weissella oryzae* DC6-facilitated green synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial potential", *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(6), 1569-1575.
- Singh, A., Dar, M. Y., Joshi, B., Sharma, B., Shrivastava, S., and Shukla, S. (2018). "Phytofabrication of silver nanoparticles: novel drug to overcome hepatocellular ailments", *Toxicology reports*, 5, 333-342.
- Shi, L., Shan, J., Ju, Y., Aikens, P., and Prud'homme, R. K. (2012). "Nanoparticles as delivery vehicles for sunscreen agents", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 396, 122-129.
- Shiraishi, Y., Toshima, N., Maeda, K., Yoshikawa, H., Xu, J., and Kobayashi, S. (2002). "Frequency modulation response of a liquid-crystal electro-optic device doped with nanoparticles", *Applied Physics Letters*, 81(15), 2845-2847.
- Shrivastava, S., Singh, S. K., Mukhopadhyay, A., Sinha, A. S., Mandal, R. K., and Dash, D. (2011). "Negative regulation of fibrin polymerization and clot formation by nanoparticles of silver", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(1), 241-246.

- Sun, C., Lee, J. S., and Zhang, M. (2008). "Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1252-1265.
- Sundrarajan, M., and Gowri, S. (2011). "Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles by *Nyctanthes arbor-tristis* leaves extract", *Chalcogenide Letters*, 8(8), 447-451.
- Souza, T. A., Franchi, L. P., Rosa, L. R., da Veiga, M. A., and Takahashi, C. S. (2016). "Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines", *Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 795, 70-83.
- Szabad, J., Soos, I., Polgar G. and Hejja, G. (1983) "Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mozaik and the sex linked recessive lethal test", *Mutation Research*, 113, 117-133.
- Tamuly, C., Hazarika, M., Borah, S. C., Das, M. R., and Boruah, M. P. (2013). "In situ biosynthesis of Ag, Au and bimetallic nanoparticles using *Piper pedicellatum* C. DC: green chemistry approach", *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 102, 627-634.
- Taniguchi, N., Arakawa, C., and Kobayashi, T. (1974). "On the basic concept of nanotechnology", *Proceedings of the International Conference on Production Engineering*, 2, 18-23.
- Taylor, J. R., Fang, M. M., and Nie, S. (2000). "Probing specific sequences on single DNA molecules with bioconjugated fluorescent nanoparticles", *Analytical Chemistry*, 72(9), 1979-1986.
- Thombre, R., Parekh, F., and Patil, N. (2014). "Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Argyrea nervosa*", *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5(1), 114-119.
- Türk Patent ve Marka Kurumu TPMK, (2001). Cimin Üzümü Coğrafi İşaret Tescil Belgesi (Tescil No:37), <http://www.turkpatent.gov.tr/TURKPATENT/> (Erişim Tarihi: 08.10.2018).
- Umamaheswari, C., Lakshmanan, A., and Nagarajan, N. S. (2018). "Green synthesis, characterization and catalytic degradation studies of gold nanoparticles against congo red and methyl orange", *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178, 33-39.
- Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., De Mattia, F., Bruni, I., Marsoni, M., and Bracale, M. (2014). "Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings", *Journal of Plant Physiology*, 171(13), 1142-1148.
- Velusamy, P., Kumar, G. V., Jeyanthi, V., Das, J., and Pachaiappan, R. (2016). "Bioinspired green nanoparticles: synthesis, mechanism, and antibacterial

- application”, *Toxicological Research*, 32(2), 95.
- Verma, S., Kumari, B., Shrivastava, J. N. (2014). “Green Synthesis of Silver Nanoparticles sing Single Cell”, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5(2), 458-464.
- Voevodin, N. N., Kurdziel, J. W., and Mantz, R. (2006). “Corrosion protection for aerospace aluminum alloys by Modified Self-assembled Nanophase Particle (MSNAP) sol–gel”, *Surface and Coatings Technology*, 201(3-4), 1080-1084.
- Wang, L., Liu, X., Hu, X., Song, S., and Fan, C. (2006). “Unmodified gold nanoparticles as a colorimetric probe for potassium DNA aptamers”, *Chemical Communications*, 36, 3780-3782.
- Wang, X., Li, T., Su, X., Li, J., Li, W., Gan, J., and Xue, Y. (2019). “Genotoxic effects of silver nanoparticles with/without coating in human liver HepG2 cells and in mice”, *Journal of Applied Toxicology*, 39(6), 908-918.
- Weir, A., Westerhoff, P., Fabricius, L., Hristovski, K., and Von Goetz, N. (2012). “Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products”, *Environmental Science and Technology*, 46(4), 2242-2250.
- Wijnhoven, S. W. P., Peijnenburg, W. J. G. M., Herberts, C. A., Hagens, W. I., Oomen, A. G., Heugens, E. H. W., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., Van De Meent, D., Dekkers, S., De Jong, W. H., Van Zijverden, M., Sips, A. N. J. A. M., Geertsma, R. E. (2009). “Nano-silver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment”, *Nanotoxicology*, 3(2), 109-138.
- Wu, X. L., Jiang, L. Y., Cao, F. F., Guo, Y. G., and Wan, L. J. (2009). “LiFePO₄ nanoparticles embedded in a nanoporous carbon matrix: superior cathode material for electrochemical energy-storage devices”, *Advanced Materials*, 21(25-26), 27102714.
- Würgler, F.E. (1986) “*In vivo* mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*”, *Chemical Mutagens*, 10, 1-72.
- Wolfgang, L. (2007). “Bottom-up methods for making nanotechnology products”. Erişim: <http://www.azonano.com/details.asp?ArticleID=1079>. (Erişim tarihi: 11.11.2014).
- Wong, K. K., and Liu, X. (2010). “Silver nanoparticles—the real ‘silver bullet’ in clinical medicine?”, *Medicinal Chemistry Communications*, 1(2), 125-131.
- Xiang, D., Zheng, Y., Duan, W., Li, X., Yin, J., Shigdar, S., and Xiang, B. (2013). “Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles *in vitro* and *in vivo*”, *International Journal of Nanomedicine*, 8, 4103.

- Xue, C. H., Jia, S. T., Zhang, J., and Tian, L. Q. (2009). "Superhydrophobic surfaces on cotton textiles by complex coating of silica nanoparticles and hydrophobization", *Thin Solid Films*, 517(16), 4593-4598.
- You, C. C., Miranda, O. R., Gider, B., Ghosh, P. S., Kim, I. B., Erdogan, B., Sai A. K., Bunz U. H. F. and Rotello, V. M. (2007). "Detection and identification of proteins using nanoparticle-fluorescent polymer 'chemical nose' sensors", *Nature Nanotechnology*, 2(5), 318.
- Yu, C. H., Tam, K., and Tsang, E. S. (2008). "Chemical methods for preparation of nanoparticles in solution", *Handbook of Metal Physics*, 5, 113-141.
- Zain, N. M., Stapley, A. G. F., and Shama, G. (2014). "Green synthesis of silver and copper nanoparticles using Ascorbic acid and Chitosan for antimicrobial applications", *Carbohydrate Polymers*, 112, 195-202.
- Zaki, A. (2007). "Processing And Synthesis Techniques For The Preparation of Nanomaterials", Erişim : <http://www.azonano.com/details.rrrrrrasp>. (Erişim tarihi : 11.11.2014)
- Zargar, M., Hamid, A. A., Bakar, F. A., Shamsudin, M. N., Shameli, K., Jahanshri, F., and Farahani, F. (2011). "Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles using Vitex negundo L", *Molecules*, 16(8), 6667-6676.
- Zhang, D., Huarng, M. C., and Alocilja, E. C. (2010). "A multiplex nanoparticle-based bio-barcoded DNA sensor for the simultaneous detection of multiple pathogens", *Biosensors and Bioelectronics*, 26(4), 1736-1742.
- Zhao, G., and Stevens, S. E. (1998). "Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion", *Biometals*, 11(1), 27-32.



EKLER

Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar

Altun Çolak, D., **Bayğu, G.**, Atıcı, T. (2020) “Gümüş nanopartiküllerinin meyve sinekleri üzerindeki larval toksisitesinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi.”, **XI. MAS European International Congress On Mathematics-Engineering-Natural & Medical Sciences**, Tokat- TURKEY, 13-15 Mart 2020.



ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Uşak ilinde doğdu. İlk ve orta öğrenimini Manisa ilinin Salihli ilçesinde tamamladı. 2002 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2006 yılında aynı bölümden mezun oldu. Evli ve iki çocuk babası olup halen Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda tezli yüksek lisans öğrenimine devam etmektedir.

