T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERİN SÜPEROKSİT ANYON RADİKAL SÜPÜRME ETKİNLİĞİ ÖLÇÜMÜ İÇİN ALTIN NANOPARÇACIK ESASLI YÖNTEMGELİŞTİRİLMESİ

Eğsap YILDIRIM

DANIŞMAN
Doç. Dr.Burcu BEKDEŞER

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Haziran, 2022

TEZ KABUL VE ONAYI

Eğsap YILDIRIM tarafından, **Doç. Dr.Burcu BEKDEŞER.** Danışmanlığında hazırlanan **" Antioksidan Bileşiklerin Süperoksit Anyon Radikal Süpürme Etkinliği Ölçümü İçin Altın Nanoparçacık Esaslı Yöntem Geliştirilmesi "**başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **0../0../2022** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği**ile başarılı bulunarak **Yüksek Lisans Tezi**olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	**Sonuç**
DANIŞMAN	Prof. Dr.Xxxx XXXX ..... Üniversitesi ..... Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr.Xxxx XXXX ..... Üniversitesi ..... Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr.Xxxx XXXX ..... Üniversitesi ..... Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr.Xxxx XXXX ..... Üniversitesi ..... Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr.Xxxx XXXX ..... Üniversitesi ..... Anabilim Dalı		☐ Kabul ☐ Ret

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve bilimsel etik kuralları içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve her türlü hukuki sorumluluğu aldığımı kabul ederim.

Eğsap YILDIRIM

(İmza)

Annem/Babam/Ablalarım/ Bababannem/Hocam’a ithaf ediyorum…

BÜTÇE DESTEKLERİ

ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERİN SÜPEROKSİT ANYON RADİKAL SÜPÜRME ETKİNLİĞİ ÖLÇÜMÜ İÇİN ALTIN NANOPARÇACIK ESASLI YÖNTEMGELİŞTİRİLMESİ

Bu tez çalışması için herhangi bir kurumdan bütçe desteği alınmamıştır.

TEŞEKKÜR

Akademik ve bilimsel yönleriyle örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum Sayın Prof. Dr. Reşat APAK'a yüksek lisans eğitim hayatım sırasında ve tez çalışmalarım esnasında gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından ötürü en derin ve içten şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca değerli bilgi ve tecrübelerini sabır ve hoşgörü ile benimle paylaşan, beni akademik alanda yönlendiren, tecrübelerini bana aktararak ufkumu açan, değerli danışman hocam Doç. Dr. Burcu BEKDEŞER'e destek ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmalarım esnasında desteklerini esirgemeyen her türlü bilgi birikimlerini benimle paylaşmaya hazır olan kıymetli hocalarım Doç. Dr. Saliha Esin ÇELİK ve Doç. Dr. Mustafa BENER'e teşekkürlerimi sunarım.

Bursiyer olarak görev aldığım 119Z864 numaralı ve "Lipid Hidroperoksitler, Peroksit- Esaslı Patlayıcılar ve Organofosfor Pestisitlerden Doğrudan ve Dolaylı Yöntemlerle Türetilen Peroksitlerin Tayini için Optik, Elektrokimyasal ve Nano-Kolorimetrik Sensörler Geliştirilmesi" başlıklı 1001 projesi kapsamında yüksek lisans öğrenimim boyunca maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olan kıymetli dostlarım Pervin Işık BİLGİLİ ve Münevver GÖRÜŞÜK'eçok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olup her koşulda bana destek veren, varlıklarıyla bana güç veren ve bugünlere gelmemde en büyük rolü olan sevgili aileme, ayrıca babaanneme teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmalarım boyunca beni sürekli motive eden ve cesaretlendiren arkadaşlarımın hepsine teşekkür ederim.

Haziran 2022 **Eğsap YILDIRIM**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI ii
BEYAN iii
BÜTÇE DESTEKLERİ v
TEŞEKKÜR vi
İÇİNDEKİLER vii
TABLO LİSTESİ xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ xii
ÖZET xiii
ABSTRACT xv
1. GİRİŞ 1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE 3
2.1. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ *3*
2.2. SÜPEROKSİT ANYON RADİKALİ 5
2.2.1. Süperoksit Anyon Radikali Oluşumu 5
2.3. NANOTEKNOLOJİ 8
2.3.1. Nanoyapılı Malzemeler 9
2.3.2. Nanoyapıların Sınıflandırılması 10
2.3.3. Metal Nanoparçacıklar 11
2.3.4. Altın Nanoparçacıklar ve Sentez Yöntemleri 13
2.3.4.2. Kimyasal sentez 13
2.3.4.3. Tohum aracılı büyüme 14
2.3.4.4. Biyolojik Sentez (Yeşil Sentez) 15
2.3.5. Altın Nanoparçacık Karakterizasyonu 16
2.4. SÜPEROKSİT ANYON RADİKAL SÜPÜRME VE DEDEKSİYON YÖNTEMLERİİLE İLGİLİ LİTERATÜR ÇALIŞMALARI 17
3. MALZEME VE YÖNTEM 21
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR 21
3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER 21

3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI 22
3.3.1. AuNP (Altın Nanoparçacık) Sentezi 22
3.3.2. Bitki Çayı İnfüzyonlarının Hazırlanması: 23
3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER 23
3.4.1. Geliştirilen AuNP-SOSA Yöntemi 23
3.4.2. NBT Yöntemi 25
4.BULGULAR 26
4.1. GELİŞTİRİLEN AuNP-SOSA YÖNTEM İÇİN OPTİMUM KOŞULLARIN BELİRLENMESİ 26
4.1.1. Optimum AuNP Hacminin Belirlenmesi 26
4.1.2. Optimum DTT Hacminin Belirlenmesi 27
4.1.3. Optimum Fosfat Tamponu Hacminin Belirlenmesi 28
4.1.4. Reaksiyon Karışımındaki Çözeltilerin AuNP ile Etkileşimleri 29
4.1.5. Altın Nanoparçacıkların Karakterizasyonu İçin SEM Görüntüleri 30
4.2. GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERE UYGULANMASI 31
4.3. NBT YÖNTEMİNİN ANTİOKSİDANLAR ÜZERİNE UYGULANMASI 39
4.4.BİTKİ ÇAYLARININ SÜPEROKSİT ANYON RADİKAL SÜPÜRME AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ 42
4.4.1. AuNP-SOSA Yönteminin Bitki İnfüzyonlarına Uygulanması 42
4.4.2. NBT Yönteminin Bitki İnfüzyonlarına Uygulanması 44
5. TARTIŞMA 45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 50
KAYNAKLAR 52
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 60
ETİK KURUL İZİN YAZISI 61
KURUM İZNİ YAZILARI 62
ÖZGEÇMİŞ 63

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Reaktif oksijen türlerinin oluşum kaynakları. 3

Şekil 2.2: ROS oluşum reaksiyonları (Carocho ve diğ., 2013). 4

Şekil 2.3: Semikinon-tip radikallerin oksidasyonu. 7

Şekil 2.4: KO_2 varlığında süperoksit anyon radikal oluşumu. 8

Şekil 2.5: Nanometre boyutunu anlatan örnekler. 9

Şekil 2.6: Nanoyapıların sentezi için yaklaşımlar (Rawat, 2015)……..... 10

Şekil 2.7: Nanopartikül boyutlarının şematik gösterimi (Poh, 2018). 11

Şekil 2.8 Elektromanyetik alan etkisi doğrultusunda altın nanoparçacıktaki serbest elektronların salınım hareketleri. (Peiris ve diğ., 2016).: 12

Şekil 2.9: AuNP sentez mekanizması (Zhao ve diğ., 2013). …….. 14

Şekil 2.10: Tohum aracılı nanopartikül sentezi. ……..... 15

Şekil 2.11: AuNP'lerin bitki ekstraktı vasıtasıyla sentezi (Ovasi ve diğ., 2017). …….. 16

Şekil 2.12: XTT tetrazolyum tuzu ve XTT formazanın yapısı (Agbe ve diğ.,2019). ……..... 18

Şekil 2.13: NBT'nin süperoksit anyon radikaliyle indirgenmesi (Nimse ve Pal, 2015). ……..... 19

Şekil 4.1 : Farklı Au-NP hacimlerine bağlı değişen absorbans değerleri. ……... 26

Şekil 4.2: Farklı DTT hacimlerine bağlı değişen absorbans değerleri. ……. 27

Şekil 4.3: Farklı fosfat tamponu hacimlerine bağlı değişen absorbans değerleri. ……. 28

Şekil 4.4: Reaksiyon karışımındaki çözeltilerin AuNP ile etkileşimleri.……..... 29

Şekil 4.5: AuNP'nin (a) DTT varlığında ve (b) DTT – SO varlığında elde edilen SEM görüntüleri. ……... 30

Şekil 4.6: AuNP plazmon rezonans spektrumu. ……... 31

Şekil 4.7: AuNP-SOSA yöntemine göre süperoksit anyon radikali varlığında ve yokluğunda elde edilen görünür alan spektrumları (a) süperoksit anyon radikali yokluğundaki referans, (b) 15 µM EA, (c) 10µM EA, (d) 7.5 µM EA, (e) 5 µM EA, (f) 2.5 µM EA (g) süperoksit anyon radikali varlığında referans.....32

Şekil 4.8: AuNP-SOSA yöntemine göre süperoksit anyon radikali varlığında ve yokluğunda elde edilen görünür alan spektrumları. (a) süperoksit anyon radikali yokluğundaki referans, (b) 10 µM QR (c) 8.75 µM QR, (d) 7.5 µM QR, (e) 5 µM QR, (f) 2.5 µM QR (g) süperoksit anyon radikali varlığında referans……...34

Şekil 4.9: AuNP-SOSA yöntemine göre süperoksit anyon radikali varlığında ve yokluğunda görünür alan spektrumları (a) süperoksit anyon radikali yokluğundaki referans, (b) 1.25 µM CAT, (c) 1 µM CAT, (d) 0.75 µM CAT, (e) 0.5 µM CAT, (f) süperoksit anyon radikali varlığında referans.……...……...……35

Şekil 4.10: AuNP-SOSA yöntemine göre ksantin-ksantin oksidaz ile üretilen süperoksit anyon radikali varlığında ve yokluğunda görünür alan spektrumları (a)süperoksit anyon radikali yokluğundaki referans, (b) 37.5 µM QR, (c) 32.5µM QR, (d) 27.25µM QR, (e) 22.5µM QR, (f) 17.5 µM QR, (g) süperoksit anyon radikali varlığında referans……...37

Şekil 4.11: 1:15 oranında seyreltilmiş yeşil çay infüzyonunun AuNP-SOSA yöntemine göre süperoksit anyon radikali varlığında ve yokluğunda görünür alan spektrumları (a) süperoksit anyon radikali yokluğundaki referans , (b) 0.35 mLyeşil çay, (c) 0.30 mLyeşil çay, (d) 0.25 mLyeşil çay, (e) 0.2 mL yeşil çay,(f) 0.15 mL yeşil çay (g) 0.1mL, (h) süperoksit anyon radikali varlığındaki referans…….....42

Şekil 5.1: AuNP yönteminin şematik gösterimi. …….47

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 4.1: $C_{(EA)^-}$ %inhibisyon değerleri ve doğru denklemi. …….....33

Tablo 4.2: AuNP-SOSA yöntemi ile $C_{(QR)^-}$ %inhibisyon değerleri ve doğru denklemi……..34

Tablo 4.3: $C_{(CAT)^-}$ %inhibisyon değerleri ve doğru denklemi. …….....35

Tablo 4.4: AuNP-SOSA yöntemine göre süpürücü antioksidan bileşiklerinin IC_{50}değerleri. ….....36

Tablo 4.5: X-XO sistemine göre $C_{(QR)^-}$ %inhibisyon değerleri ve doğru denklemi. …….....38

Tablo 4.6. NBT yöntemine göre $C_{(QR)^-}$ %inhibisyon değerleri ve doğru denklemi. ……. .39

Tablo 4.7: NBT yönteminegöresüpürücüantioksidanbileşiklerininIC$_{50}$değerleri. ……..40

Tablo 4.8: AuNP-SOSA ve NBT yöntemlerine göre elde edilen süpürücü bileşiklerin IC_{50} değerleri……41

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

A : Absorbans
c : Konsantrasyon
IC_{50} : Radikalin %50'sinin inhibe edilidiği konsantrasyon
SD : Standart Sapma
V : Hacim

Kısaltmalar **Açıklama**

AuNP-SOSA :Altın nanoparçacık esaslı süperoksit anyon radikal süpürme aktivite tayini
AuNP : Altın nanoparçacık
CAT : Kateşin hidrat
CL : Kemilüminesans
DTT : 1,4-Ditiyotreitol
EGCG :Epigallo kateşin gallat
EA : Elajik asit
FA :Ferulik asit
FT : Fosfat tamponu
GA : Gallik asit
NADH : Nikotinamid dinükleotid
NBT : Nitro blue tetrazolium
PMN : Polimorfonükleer lökosit
PMS : Fenazin metasülfat
ROS : Reaktif oksijen türleri
QR : Kuersetin
X : Ksantin
XO : Ksantin oksidaz
SO : Süperoksit anyon radikali
NP :Nanoparçacık
Cyt-c **:** Sitokrom

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERİN SÜPEROKSİT ANYON RADİKAL SÜPÜRME ETKİNLİĞİ ÖLÇÜMÜ İÇİN ALTIN NANOPARÇACIK ESASLI YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

Eğsap YILDIRIM

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Danışman: Doç. Dr.Burcu BEKDEŞER

Reaktif oksijen türleri oksijenden türetilen serbest radikallerdir. Bunlara örnek olarak hidrojen peroksit, peroksinitrit, hidroksi radikali, süperoksit anyon radikali gibi bileşikler örnek verilebilir. Süperoksit anyon radikali, oksijen molekülünün bir elektron alması ile indirgenerek oluşur. Ayrıca indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonun da süperoksit anyon radikali meydana gelebilir. Hücrenin genellikle mitokondrisinde süperoksit anyon radikalleri oluşmaktadır. Mitokondride gerçekleşen enerji dönüşüm reaksiyonları sırasında meydana gelen az miktarda elektron kaçakları oksijen molekülünün süperoksit radikaline dönüşümüne neden olur. Reaktif oksijen türlerinin sentezini ve oluşturabilecekleri hasarı önlemek için vücudumuzda görev alan savunma sistemlerine "antioksidan savunma sistemleri" veya "antioksidanlar" denilmektedir. Bu tez çalışmasının amacı antioksidanların süperoksit anyon radikal süpürme aktivitesi tayini için altın nanoparçacıkların optik özelliklerindeki değişimden yararlanılarak kolorimetrikbir yöntem geliştirmektir. Nanopartiküller boyutları çok küçük yapılardır. Nanopartikül atomlarının neredeyse yarısı kadarı yüzeyde olduğu için reaktivitesi yüksektir. Bu parçacıklar yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmalarından dolayı, kütle ve ısı iletim özellikleri bulk malzemelerinkinden daha iyidir. Bu sebeple, özellikle metal nanoparçacıklar katalizör, sensör, manyetik ve optoelektronik gibi alanlarda birçok mühendislik uygulamalarına sahiptirler. Tez kapsamında sitrat stabilize AuNP

(altınnanoparçacık) sentezi yapılmıştır. Süpeoksit anyon radikal sentezi ise bikarbonat (HCO_3^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), Co (II) iyonlarının reaksiyonu ile üretilmiştir. Ortamda süperoksit anyon radikali varlığında AuNP'ın spektroskopik özelliklerindeki değişiklikler incelenmiştir. Sentezlenen AuNP'ların SEM (taramalı elektron mikroskopisi) görüntüleri ile boyutu yaklaşık 9-10 nm olarak ölçülmüştür. Tez kapsamında antioksidan bileşiklerin süperoksit anyon radikal süpürme etkinliği ölçümü için geliştirilen AuNP-SOSA (Altın Nanoparçacık Esaslı Süperoksit Anyon Radikal Süpürme Aktivite Tayini) yöntemi kullanılarak kuersetin, ferulik asit, epigallo kateşin gallat, gallik asit, elajik asit ve kateşin gibi çeşitli antioksidan bileşiklerin süperoksit anyon radikal süpürme aktiviteleri belirlenmiştir. Çalışılan antioksidan bileşikler arasında en yüksek süperoksit anyon radikal süpürme aktivitesi epigallo kateşin gallat (0.53µM) için bulunmuştur. Ayrıca, geliştirilen yöntem yeşil çay, ada çayı, ıhlamur ve rezene gibi bitkisel çay infüzyonlarına başarılı şekilde uygulanmıştır. Referans yöntem olarak literatürde sıklıkla kullanılan NBT yöntemi kullanılmıştır. NBT reaktifi ve süperoksit anyon radikali arasında gerçekleşen reaksiyon sonucunda suda çözünmeyen mavi formazan bir madde açığa çıkar ve bu madde 560 nm'de maksimum absorpsiyon vermektedir. Geliştirilen bu yöntem kolorimetrik sensör olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olup, kolorimetrik yöntemlerin, zahmetli ön işlemlere ve pahalı enstrümasyona gerek duymama ve tespit sinyalinin çıplak gözle görülebilmesi gibi avantajlarını da içinde barındırmaktadır.
Haziran 2022 , 80sayfa.

Anahtar kelimeler: altın nanoparçacık, süpeoksit anyon radikali, antioksidan bileşikler

ABSTRACT

M.Sc. THESIS

DEVELOPMENT OF GOLD NANOPARTICLE BASED-ASSAY FOR MEASURING SUPEROXIDE ANION RADICAL SCAVENGING ACTIVITY

Eğsap YILDIRIM

IstanbulUniversity-Cerrahpasa

Institute of GraduateStudies

Department of Chemistry

AnalyticalChemistry

Supervisor:Assoc. Prof. Dr.Burcu BEKDEŞER

Reactive oxygen species are free radicals derived from oxygen. Examples of these are compounds such as hydrogen peroxide, peroxynitrite, hydroxy radical, superoxide anion radical. The superoxide anion radical is formed by the reduction of the oxygen molecule by gaining an electron. Superoxide anion radical can also occur in the autooxidation of reduced transition metals. Superoxide anion radicals are formed in the mitochondria of the cell. A small amount of electron leaks that occur during the energy conversion reactions that take place in the mitochondria cause the oxygen molecule to transform into superoxide radical. The defense systems in our body to prevent the synthesis of reactive oxygen species and the damage they may cause are called "antioxidant defense systems" or "antioxidants". The aim of this thesis is to develop a colorimetric method for the determination of the superoxide anion radical scavenging activity of antioxidants by utilizing the change in optical properties of gold nanoparticles. Nanoparticles are very small structures. Since almost half of the nanoparticle atoms are on the surface, its reactivity is high. Because these particles have a high surface-to-volume ratio, their mass and heat transfer properties are better than those of bulk materials. For

this reason, especially metal nanoparticles have many engineering applications in areas such as catalysts, sensors, magnetics and optoelectronics. Within the scope of the thesis, citrate stabilized AuNP (gold nanoparticle) synthesis was performed. The superoxide anion radical synthesis was produced by the reaction of bicarbonate (HCO_3^-), hydrogen peroxide (H_2O_2), Co (II) ions. The changes in the spectroscopic properties of AuNP in the presence of superoxide anion radical in the medium were investigated. The size of the synthesized AuNPs was measured as approximately 9-10 nm by SEM (scanning electron microscopy) images. Within the scope of the thesis, various antioxidant compounds such as quercetin, ferulic acid, epigallo catechin gallate, gallic acid, ellagic acid and catechin were determined by using AuNP-SOSA (Gold Nanoparticle Based Superoxide Anion Radical Scavenging Activity Determination) method, which was developed for the measurement of superoxide anion radical scavenging efficiency of antioxidant compounds. Superoxide anion radical scavenging activities were determined. Among the antioxidant compounds studied, the highest superoxide anion radical scavenging activity was found for epigallo catechin gallate (0.53μM). In addition, the developed method has been successfully applied to herbal tea infusions such as green tea, sage, linden and fennel.

NBT method, which is frequently used in the literature, was used as the reference method. As a result of the reaction between the NBT reagent and the superoxide anion radical, a water-insoluble blue formazan substance is released and this substance gives maximum absorption at 560 nm. This developed method has the potential to be used as a colorimetric sensor, and it has the advantages of colorimetric methods such as not requiring laborious pre-processing and expensive instrumentation, and the detection signal can be seen with the naked eye.

June 2022, 80 pages.

Keywords: gold nanoparticle, superoxide anion radical, antioxidant compounds

1. GİRİŞ

Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet-}$), reaktif bir oksijen türüdür ve moleküler oksijene bir elektron aktarımı ile açığa çıkan, aerobik metabolizmanın bir yan ürüdür. Peroksinitrit ($ONOO^-$), hidroksil radikali (OH^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunda öncüdür (Taubert ve diğ., 2003). Canlı sistemlerde sinyal iletiminin önemli bir düzenleyicisi olarak işlev görür. Bununla birlikte, fazla $O_2^{\bullet-}$ hücreler içinde metabolik dengesizliklere ve oksidatif hasara neden olabilir. Bu yüzden süperoksit anyon radikalinin verimli bir şekilde hücrelerden süpürülmesi hücre içi redoks dengesinin ve homeostazın korunması için kritik öneme sahiptir (Xu ve diğ., 2021). Enflamasyon, iskemi-reperfüzyon yaralanmaları, ateoroskleroz (damar sertliği), alzheimer veya parkinson gibi çoğu hastalıkların sebebi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşum mekanizmalarının hasarı ve süpürülmesindeki dengesizlikler ile ilgilidir (Fiers ve diğ., 1999). Ayrıcasüperoksit anyon radikali, endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) olan nitrik oksidi ($NO^{\cdot}$) sitotoksik olan peroksinitrite ($ONOO^-$), dönüştürür (Gryglewski ve diğ., 1986). Dolayısıyla ROS oluşumunu ve açığa çıkardıkları hasarı önleyebilmek için antioksidan savunma sistemleri kullanılmaktadır. Antioksidanlar; kolaylıkla oksidasyona uğrayan maddelerin oksidasyonunu engelleyen ya da büyük ölçüde geciktiren maddelerdir (Okan ve diğ., 2013).

Süpeoksit anyon radikalleri çeşitli yollarla üretilebilirler. Enzimatik bir yol olan X-XO sisteminde ksantinoksidaz oksijen molekülü varlığında ksantinin yükseltgenmesini katalizler. Ksantin yükseltgenme reaksiyonu 2 aşamalı bir reaksiyon olup ilk aşamasında süperoksit anyon radikali oluşur (Pei ve Li 2000). Bir diğer yöntem ise fenazinmetasülfat-nikotinamiddinükleotid (PMS-NADH) sistemi; enzimatik olmayan yol ile süperoksit anyon radikal üretme yöntemidir.PMS'nin O_2ile reaksiyona girerek süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$) oluşturduğu tespit edilmiştir (Nishikimi ve diğ., 1972). Bir başka yol olarak iseKO_2 gibi alkali metal süperoksitlerin yükseltgenmesi sonucu süperoksit anyon radikal sentezlenmesidir (Sawyer ve Valentine, 1981). Tez kapsamında ise bikarbonat (HCO_3^-) ve hidrojenperoksit (H_2O_2)

varlığında, Co (II) iyonlarının Fenton benzeri bir reaksiyonu tetiklemesiyle, süperoksit anyon radikali oluşturma sistemi kullanılmıştır (Zhang ve diğ., 2015).

Son yıllarda en önemli teknolojilerden biri haline gelen nanoteknoloji, elektronik malzeme bilimi, uzay mühendisliği, biyoteknoloji gibi önemli alanlarda öne çıkmaktadır. Nanopartiküller, yüksek yüzey alanıyla beraber optik, elektronik, manyetik ve floresan özelliklerinden dolayı birçok uygulama yöntemine sahip üstün yapılardır. Özellikle özel yüzey alanları ve küçük boyutlarından dolayı metal nanoparçacıklar birçok farklı araştırma alanında çokça tercih edilmektedir. Metal nanoparçacıklar kimyasal, fiziksel, biyolojik ve tohum aracılı büyüme gibi metodlarla sentezlenebilirler. Bunlardan en önemlisi ise altın nanoparçacık (AuNP) olarak karşımıza çıkmaktadır. AuNP kararlı olması, toksik olmaması ve yüzeyine biyolojik moleküllerin kolay bağlanması gibi avantajları nedeniyle çok kullanılan metalik nanoparçacıklardır (Dolez, 2015).

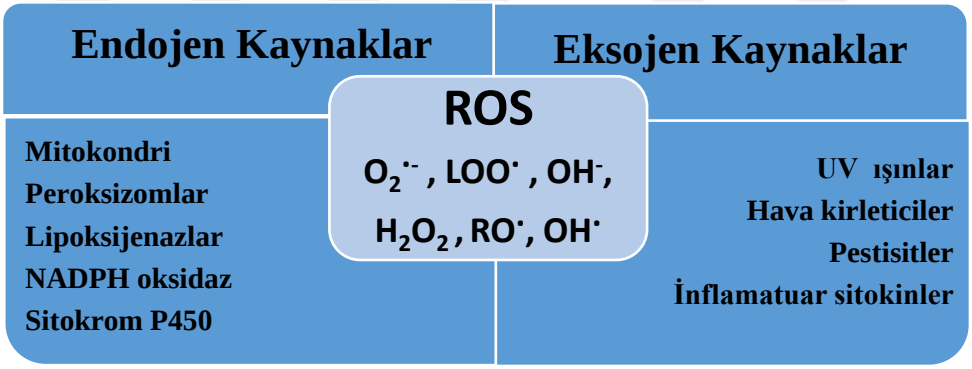
Tez kapsamında AuNP çözeltisi Turkevic ve diğ., (1951) yöntemine göre hazırlanıp, süperoksit anyon radikalleri ise Zhang ve diğ, (2015)'nin geliştirdikleri yönteme göre bikarbonat (HCO_3^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında, Co (II)iyonlarının Fenton benzeri bir reaksiyonu tetiklemesiyle sentezlendi ve altın nanoparçacık esaslı süperoksit anyon radikal süpürme aktivite tayini yöntemi geliştirildi. AuNP'ların antiagregasyonu esas alınıp ditiyotreitolün (DTT) çapraz bağlanma yeteneğinden yararlanıldı. DTT; güçlü kovalent Au-S bağları oluşturup, Au-NP'ıagregasyona uğratmaktadır ve bu durum 675 nm dalga boyunda ölçülen maksimum absorbans ile kanıtlandı. Sonrasında ortama süpeoksit radikali ilavesiyle DTT okside olmaya başladığı için AuNP'lar serbest hale geçip antiagregasyon olayı gerçekleşti. Bu durum ise 675 nm 'deki absorbansın minimuma geçmesi ile açıklanmaktadır. Antioksidanların süperoksit anyon radikali süpürme özelliğinden yararlanarak ortama artan miktarlarda çeşitli antioksidan ilaveleri yapıldığı zaman ise artan antioksidan konsantrasyonu ile süperoksit anyon radikallerinin süpürüldüğü ve bu durumda süperoksit anyon radikallerinin DTT'yi oksitleyemediği için yeniden agregasyon olayının gerçekleştiği ölçülen absorbans değerleri ile kanıtlandı. Ayrıca AuNP'ın fosfat tamponlu ortamı ile süperoksit anyon radikali varlığında elde edilen görüntüleri ayrı ayrı SEM analiz metodu ile tespit edildi. Sonuç olarak kontrollü boyutlara sahip AuNP üretimi ile başlayan ardından süperoksit anyon radikali sentezi ve antioksidan ilaveleri ile devam eden yenilikçi, basit, hızlı bir yöntem geliştirildi.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ

Serbest radikaller, bir adet ya da birden daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip moleküller ya da moleküler yapılar olarak tanımlanabilir. Reaktif oksijen türleri iseoksijenden türetilen serbest radikallerdir. Reaktif oksijen türleri canlı sistemlerde fazlaca üretilibelirler. Ayrıca radikalik olmayan türleri de mevcuttur. Singlet oksijen, hipoklöröz asit, hidrojen peroksit bunlara örnek olarak gösterilebilir. Reaktif oksijen ve azot türleri tüm canlı hücrelerde mitokondri tarafından veya canlı hücrenin dışında, özellikle de fagositler tarafından üretilip canlı hücrelerdeki reaksiyonlarda görev alırlar.

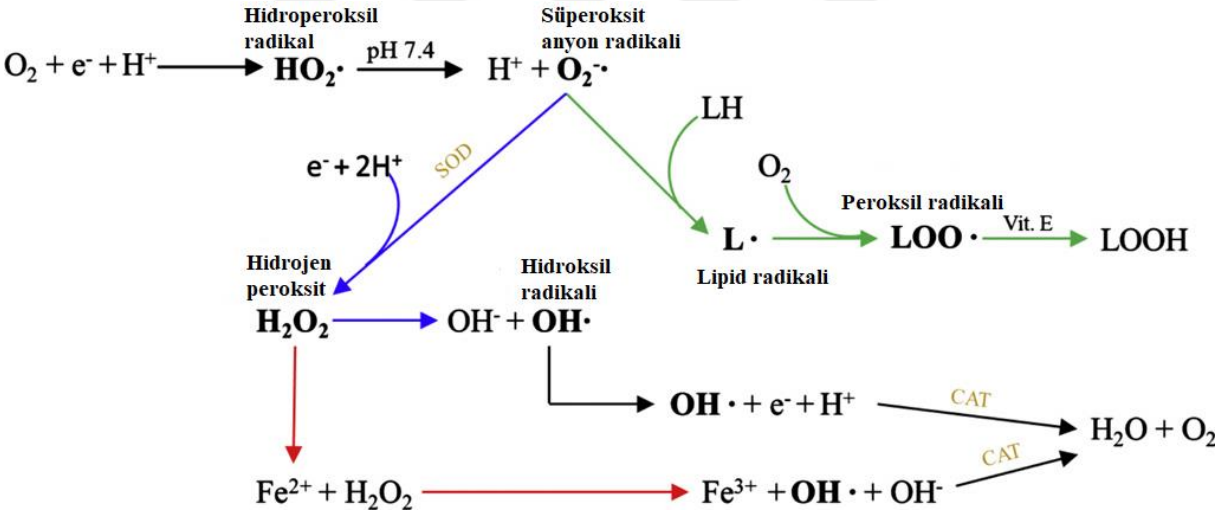
Reaktif oksijen türleri oluşum kaynakları bakımından endojen ve eksojen olarak ikiye ayrılırlar. Endojen kaynaklar; peroksizomlar, mitokondri, sitokrom P450 metabolizması, nötrofiller ve makrofajlardır. Eksojen kaynaklar; hava kirleticileri, pestisidler, metaller, nanoparçacıklar ve UV ışınlar olarak belirlenebilir.



Şekil 2.1: Reaktif oksijen türlerinin oluşum kaynakları.

Reaktif oksijen türlerinin hücre zarını, DNA, RNA gibi genetik yapıları ve çeşitli enzimatik olayları etkileyip hücrelerde hasarlara sebep olurlar. Bu reaktif oksijen türleri canlı organizmalarda sitoplazmik, mitokondriyel ve ekstrasellüler hallerde bulunabilen glutatyonperoksidaz (GPx), süperoksitdismutaz (SOD), ve katalaz gibi antioksidan enzim sistemleri ile seruloplazmin, transferrin, indirgenmiş glutatyon (GSH), askorbik asit (C vitamini) ve alfa-tokoferol gibi çeşitli antioksidanlar vasıtasıyla yıkılırlar. Serbest radikallerin hücrelerde hasar oluşturduğuna dair çokça çalışma bulunmaktadır (Eken, 2012).

Mitokondri tarafından ROS üretimi ilk olarak Jensen (1961), tarafından yapılan çalışmalar sonucu ile kanıtlanmıştır. NADH veya süksinatı oksitleyen submitokondriyal partiküller tarafından tüketilen oksijenin bir kısmının H_2O_2'e dönüştürüldüğü gözlemlemlenmiştir. Serbest radikaller mitokondride çokça üretildikleri için GSH ve süperoksitdismutaz, glutatyonperoksidaz gibi enzimler çok fazla bulunmaktadır (Valko ve diğ., 2006).



Şekil 2.2: ROS oluşum reaksiyonları (Carocho ve diğ., 2013)

2.2. SÜPEROKSİT ANYON RADİKALİ

Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot -}$) neredeyse çoğu canlı hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alması ve redüksiyona uğraması sonucunda meydana gelir. Bazik karakterlidir ve konjuge asidi hidroperoksildir ($HO_2^{\cdot}$).

$$H^+ + O_2^{\cdot -} \rightarrow HO_2^{\cdot} \quad (2.1)$$

Süperoksit anyon radikali ile perhidroksi radikali reaksiyona girdiklerinde bir dismutasyon reaksiyonu gerçekleşir ve perhidroksi radikali indirgenip hidrojen peroksite anyon radikali ise yükseltgenir ve oksijen molekülüne dönüşür.

$$HO_2^{\cdot} + O_2^{\cdot -} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2 \quad (2.2)$$

Süperoksit anyon radikali aynı zamanda indirgeyici ve yükseltgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin ferrisitokrom c veya nitrobluetetrazolium ile reaksiyonunda indirgeyici olarak görev alır, elektron kaybedip ve oksijen molekülüne yükseltgenir (Kovacic ve diğ., 2005).

$$\text{Sit c } (Fe_3^+) + O_2^{\cdot -} \rightarrow O_2 + \text{Sit c } (Fe_2^+) \quad (2.3)$$

Aynı zamanda indirgenen geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucunda da süperoksit anyon radikalleri meydana gelmektedir (Valko ve diğ., 2007).

$$Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\cdot -} \quad (2.4)$$

$$Cu^+ + O_2 \rightarrow Cu^{2+} + O_2^{\cdot -} \quad (2.5)$$

2.2.1. Süperoksit Anyon Radikali Oluşumu

Süperoksit radikalinin mitokondri tarafından üretilmesi ilk olarak Loschen ve diğ., (1974) tarafından yapılmıştır.

Ksantin-ksantinoksidaz (X-XO) sistemi; enzimatik yolla süperoksit oluşturmak için kullanılan bir yöntemdir. Ksantin bir purin baz çeşididir ve kimyasal formülü 3,7-dihidropurin-2,6-dion

olarak bilinir (Erden, 2010). Ksantin oksidaz ise iki alt birimden meydana gelen karmaşık bir enzim yapısına sahiptir. Her bir alt birim iki demir sülfür merkezi, bir molibden merkezi ve flavinadenindinükleotit (FAD) içerir (Kırgöz ve diğ., 2004).

Ksantin oksidaz enzimi ortamda oksijen molekülü varken ksantinin oksidasyon reaksiyonunu meydana getirir. Reaksiyon sırasında ksantin molibden merkezde reaksiyona girerken, oksijen molekülü ise flavon grupları ile reaksiyona girer (Pei ve Li, 2000). Ksantin yükseltgenme reaksiyonu 2 kademeden meydana gelir, ilk aşamada süperoksit anyon radikali ve ikinci aşamada ise yavaş bir şekilde hidrojen peroksit oluşur.

$$\text{Ksantin} + H_2O_2 + O_2 \xrightarrow{\text{Ksantin Oksidaz}} \text{Ürik asit} + O_2^{\cdot -} + H^+ \quad (2.6)$$

$$\text{Ksantin} + O_2 + H_2O \longrightarrow \text{Ürik asit} + H_2O_2 \quad (2.7)$$

Robak ve Gryglewski (1988) yaptıkları çalışmada ksantin-ksantinoksidaz sistemiyle süperoksit anyon radikali ürettikten sonra ortamda bulunan nitrobluetetrazolium (NBT)'un spektrofotometrik ölçümünün azalması ile süperoksit anyon radikali oluşumunu kanıtlamışlardır.

Diğer bir sistem bikarbonat (HCO_3^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında, Co (II)iyonlarının Fenton benzeri bir reaksiyonu tetikleyerek, süperoksit anyon radikali oluşturma sistemidir. Bikarbonat varlığında Co (II)iyonları büyük miktarda süperoksit anyon radikali ($O_2^{\bullet -}$) üretmek için H_2O_2'nin ayrışma reaksiyonunu katalizler (Zhang ve diğ., 2015).

$$Co^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Co^{3+} + OH^- + {}^{\bullet}OH \quad (2.8)$$

$${}^{\bullet}OH + H_2O_2 \longrightarrow HO_2^{\bullet} + H_2O \quad (2.9)$$

$$Co^{3+} + H_2O_2 \longrightarrow Co^{2+} + HO_2^{\bullet} + H^+ \quad (2.10)$$

$$HO_2^{\bullet} \longrightarrow O_2^{\bullet -} + H^+ \quad (2.11)$$

$$O_2^{\bullet -} + {}^{\bullet}OH \longrightarrow O_2 + OH^- \quad (2.12)$$

Fenazin metasülfat-nikotinamid dinükleotid (PMS-NADH) sistemi; enzimatik olmayan yolla süperoksit anyon radikal üretme yöntemidir. Nishikimi ve diğ. (1972) tarafından yapılan çalışmada süperoksit anyon radikalinin enzimatik olmayan PMS-NADH sistemi ile üretilebileceği kanıtlanmıştır. Bu çalışmaya göre indirgenmiş PMS'nin O_2 ile reaksiyona girerek yeniden yükseltgenip süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot -}$) oluşturduğu tespit edilmiştir. NBT ve NADH bulunan karışıma PMS ilavesi yapıldığında indirgenme olayının gerçekleştiği gözlemlenmiş ve PMS'nin elektron taşıyıcı görevi olduğu belirlenmiştir.

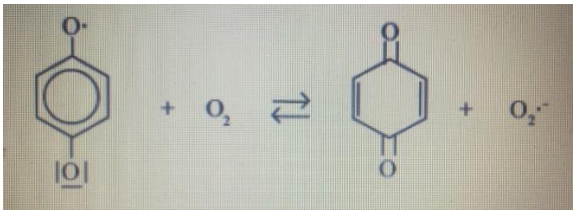
$$PMS + NADH + H^+ \rightarrow NAD^+ + PMSH_2 \qquad (2.13)$$

$$PMSH_2 + 2\,O_2 \rightarrow O_2^{\cdot -} + PMS + 2H^+ \qquad (2.14)$$

Birçok metal iyonları moleküler oksijenle reaksiyona girerek yükseltgenip oksijen molekülünü indirgeyip $O_2^{\cdot -}$ radikali oluşturmaktadır (Sellers ve Simic, 1976). Bu metal iyonlarının bazıları; Co^{2+}, Zn^+, Ag^+, Cd^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{2+}-EDTA ve Cu^+ iyonlarıdır.

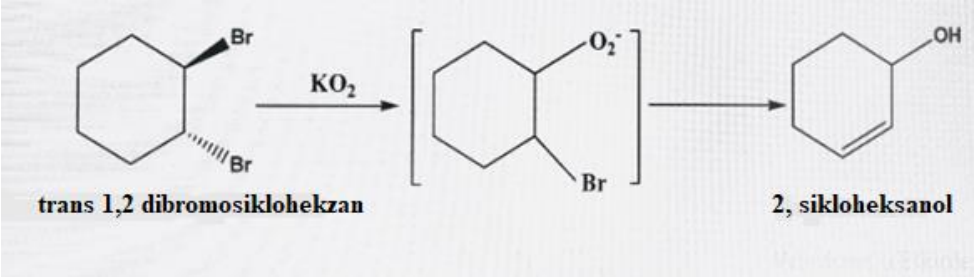
$$M^{+n} + O_2 \rightarrow M^{+(n+1)} + O_2^{\cdot -} \qquad (2.15)$$

Oksijen molekülü, bazı radikallerle iki ayrı şekilde reaksiyona girip süperoksit anyon radikalini oluşturmaktadır: (1) Direkt olarak bir elektron transferi ya da (2) Peroksil radikali oluşumu sırasında ara ürün olarak süperoksit anyon radikali açığa çıkar. Oluşan peroksil radikalleri ikincil bir reaksiyona uğrarlar. Canlı hücrelerde semikinon tipi radikallerin yükseltgenmesi durumu en önemli süperoksit anyon radikali kaynaklarındandır (Şekil 2.3). Gerçekleşen bu reaksiyon mitokondrideki elektron transfer zincirinde rol oynar. (Ilan ve diğ., 1976).



Şekil 2.3: Semikinon-tip radikallerin oksidasyonu.

KO_2 gibi alkali metal süperoksitler, süperoksit anyon raidakli üretmek için kullanılırlar. Özellikle KO_2 organik çözücülerde çözünürlük gösterebildiği için diğer tuzlara göre daha fazla tercih edilir (Sawyer ve Valentine, 1981).



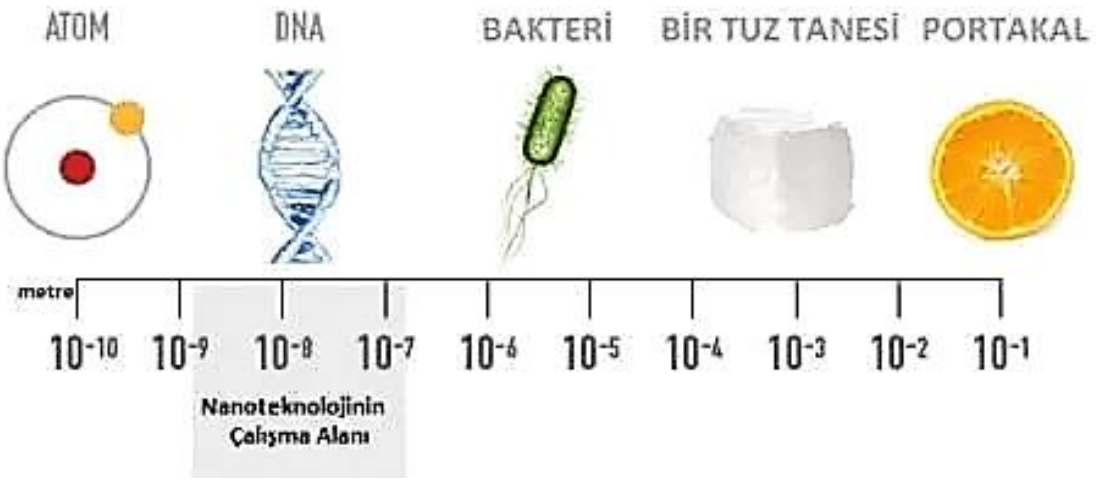
Şekil 2.4: KO_2 varlığında süperoksit anyon radikal oluşumu.

2.3. NANOTEKNOLOJİ

Nano kelimesi Antik Yunan döneminde "cüce" anlamına gelmekteydi. Şimdilerde ise genellikle boyutu 100 nm'den ufak parçacıkları ifade etmekte kullanılır (Zoroddu ve diğ., 2014).

Nanobilim, disiplinlerarası bir bilimdir; son zamanlarda teknolojideki kullanımının artmasıyla birlikte nanoteknoloji, hayatımızda önemli bir yer kaplamaya başlamıştır ve birçok alanda karşımıza çıkmaktadır. Enerji, kozmetik, endüstri, askeriye, sağlık, optik, elektronik, kimyasal, biyolojik, gıda ve daha birçok alanda çalışma ve araştırma konusu olup beraberinde birçok yenilikçi fikirler getirmeye devam etmektedir.

Nanoölçek, herhangi bir ölçünün milyarda biridir (10^{-9}) ve Uluslararası Birimler Sistemi (SI: Systeme International d'Unites) birimlerinden metrenin öneki olarak kullanıldığı zaman 1 metrenin milyarda birini (1nm = $10–^{9}$m) ifade etmektedir (Ealias ve Saravanakumar, 2017). Amerikan Test ve Malzeme Kurumu (ASTM: American Society for Testingand Materials) standardına göre "bir veya daha fazla boyutta 1-100 nanometre arasında değişen uzunluklara sahip parçacık" "nanoparçacık (NP)" olarak adlandırılmaktadır (Mansoori ve Soelaiman, 2005). "Nanometre" kelimesi ilk olarak 1925 yılında Nobel Kimya Ödülü'nü kazanan Richard Zsigmondy tarafından öneriye sunulmuştur. Zsigmondy, nanometre terimini parçacık boyutunu ifade etmek için kullanmış ve altın (Au) kolloid yapıları gibi bir yapıya sahip olan parçacıkların boyutunu mikroskop yardımıyla ölçen ilk kişidir (Hulla ve diğ., 2015).



Şekil 2.5: Nanometre boyutunu anlatan örnekler.

2.3.1. Nanoyapılı Malzemeler

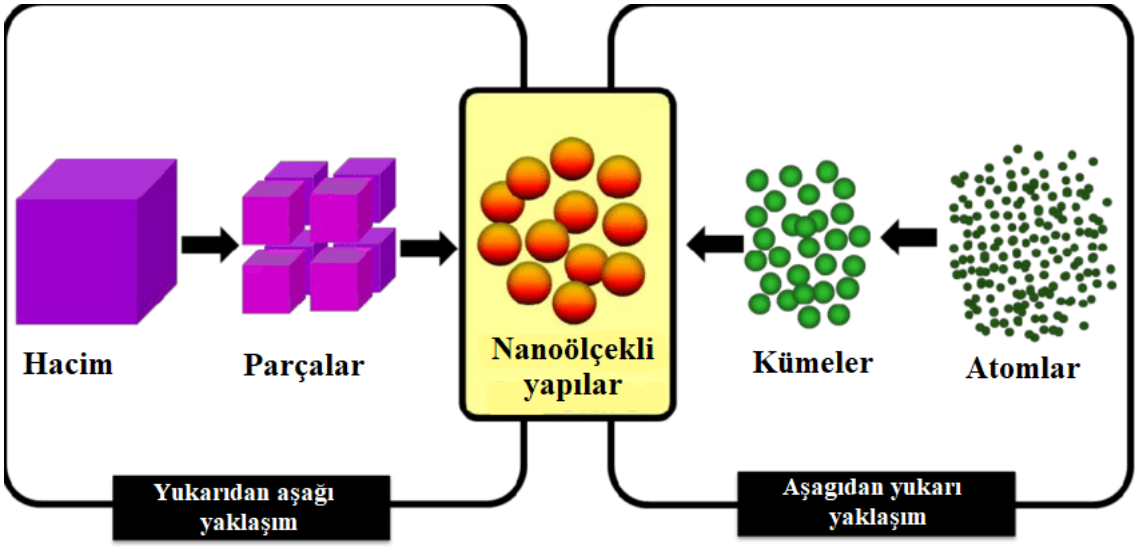
Nanoyapılı (nanokristalli veya nanofazlı) malzemeler, Gleiter'ın (1981,1989) yaptığı çalışmalardan sonra malzeme bilimi içerisinde daha fazla tanınmaya başlanmıştır.

Nanomalzemeler maddelerin 1-100 nanometre boyutunda düzenlemesidir ve bu çok küçük ölçekte yapılan çalışmalar malzemelerin mükemmel özelliklere sahip olmasına neden olur. Nanoyapıların elde edilmesinde iki ana yöntem kullanılmakta olup, bunlar yüzeye molekül kümelerinin katılması ya da bu molekül kümelerinin şekillendirilmesini içeren yukarıdan-aşağı (top-down) ve nanoyapıları meydana getirmek amacıyla molekül ya da atomların bir araya geldiği aşağıdan-yukarı (bottom-up) yöntemleridir (Miller ve diğ., 2005).

Yukarıdan Aşağı Yaklaşımı: Bütün bir parçadan başlayarak sadece mekanik veya kimyasal ya da her iki işlemin aynı anda uygulanarak, enerji açığa çıkması sonucunda maddenin nanoboyuta ulaşmasıdır. Yukarıdan aşağıya yönteminde öğütme, inceltme, toz haline getirme işlemleri yapılarak parçacık NP ölçeğine getirilir. Yukarıdan aşağıya yaklaşımıyla yapılan işlemlerde çok fazla enerji gereklidir. Bu yaklaşımdaki sentezlemelerin en önde gelenleri termik, yüksek enerji, litografik ve mekanik olarak sıralanabilir (Mahesh, 2014).

Aşağıdan Yukarı Yaklaşımı: Atomların veya moleküllerin kimyasal reaksiyonlarla üst üste konularak NP elde edilmesidir. Atomik ya da moleküler boyutlara sahip olan yapıları kimyasal reaksiyonlar aracılığıyla büyüterek partikül meydana getirmek şeklinde bilinmektedir. Bu yaklaşımda kimyasal veya biyolojik yöntemler kullanılır. Bu yaklaşımdaki sentezlemeler ise

kimyasal buhar biriktirme, sol-jel, alev sentezi, asal gaz yoğunlaştırma, atom tabaka çökelmesi, elektro-patlama, lazer ablasyonu ve ultrasonik sprey proliz yöntemi olarak sayılabilir (Baykara, 2016).

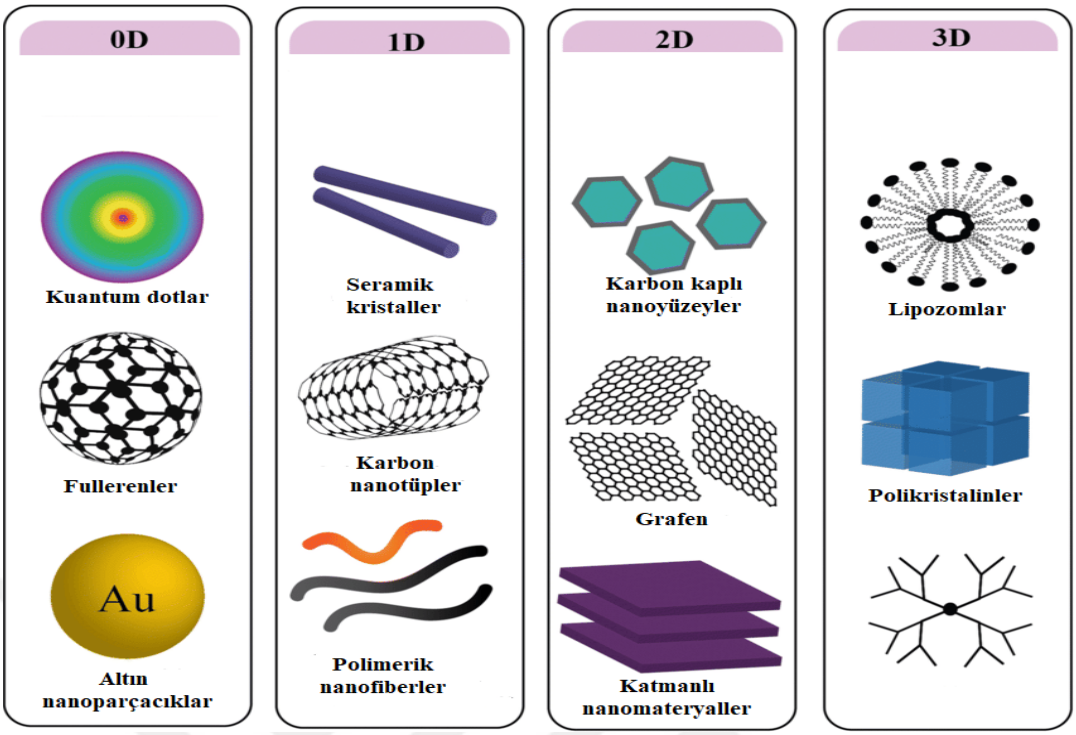


Şekil 2.6: Nanoyapıların sentezi için yaklaşımlar (Rawat, 2015).

2.3.2. Nanoyapıların Sınıflandırılması

İlk olarak nanomalzemeler, doğal veya antropojenik kökenli olma durumlarına göre ikiye ayrılabilirler (Dolez, 2015). Bu son kategori, bilinçli olup olmadığına bağlı olarak rastlantısal veya mühendislik ürünü nanomalzemelere bölünebilir. İnorganik nanomalzeme kaynakları arasında, yanardağların patlaması, deniz dalgalarının kırılması, orman yangınları, kum fırtınaları ve topraklar vardır (Oberdörster, 2015).

İkinci olarak ise nanomalzemeler boyutlarına göre sınıflandırılabilir. Nanoyapılar boyutlarına göre şu şekilde sınıflandırılabilirler; 0D (nanoparçacıklar ve kuantum noktalar), 1D (nanotüpler, fiberler ve rodlar), 2D (ince filmler, yüzeysel quantum kuyuları) ve 3D (nanokompozitler, kütlesel nanokristal filmler) (Çağlayan, 2014).



Şekil 2.7: Nanopartikül boyutlarının şematik gösterimi (Poh, 2018).

2.3.3. Metal Nanoparçacıklar

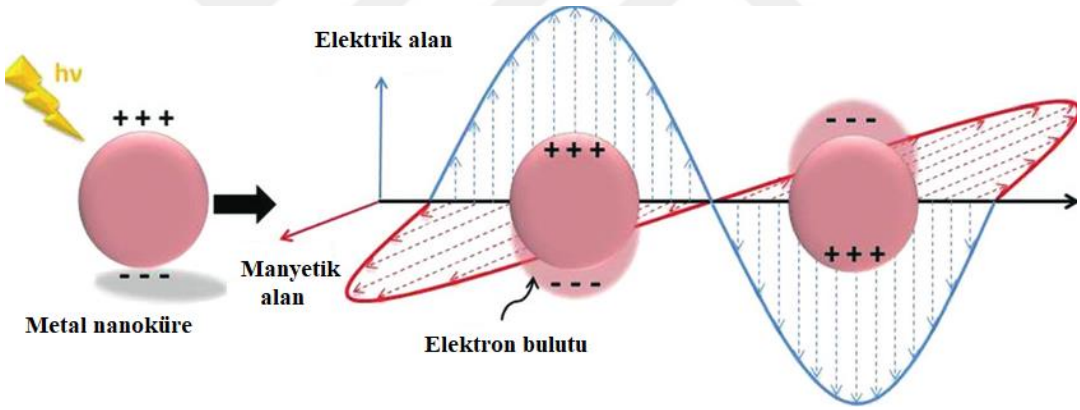
Metal nanoparçacıklar, 0 boyutlu, çap boyutu 1-100 nm arasında, her bir nanoparçacığın içerisinde 10^6 atomdan daha düşük miktarda metal atomu bulunan nanoparçacıklar olarak ifade edilmektedir. Metal nanoparçacıklar; elektronik, optik sentez kolaylığı ve manyetik özellikleriyle diğer nanomateryallere göre daha fazla ilgi çekmektedirler (Feldheim ve Foss, 2002).

Metal nanoparçacıkların sentezi için çoğunlukla metal tuzlarının, kimyasal olarak indirgenmesinden yararlanılır. Bu durum nanoparçacığa sensör özelliği, farklı çözücülerdeki çözünürlük özelliği kazandırabilir. Metal nanomateryaller kendilerine özel optik ve elektriksel özelliklerinden dolayı analitik amaçlar doğrultusunda çok fazla uygulama alanlarına sahiptirler (Brust ve diğ., 1994). Metal nanoparçacıklar analitik ortamda ve spektroskopide uygulama alanlarına sahiptirler. Metal nanoparçacıkların spektroskopik uygulamaları yüzeyde ve çözelti ortamında yapılabilir. Yüzey çalışmaları doğrultusunda en çok tercih edilen teknik Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS) tekniğidir. Ayrıca Yüzeyde Zenginleştirilmiş Floresans (Surface Enhanced Fluorescence, SEF) ve Yüzeyde Zenginleştirilmiş IR Absorbans (Surface Enhanced Infrared Absorbance, SEIRA)

tekniklerine de çokça başvurulur. Çözelti ile yapılan çalışmalarda ise UV-GB spektroskopisi, Raman spektroskopisi, floresans spektroskopisi, IR spektroskopisi tercih edilir (Çağlayan, 2014).

2.3.3.1 Metal Nanoparçacıkların Yüzey Plazmon Rezonansı (SPR)

Yüzey plazmon rezonansı (SPR), nanoparçacığa gelen ışık ile uyarılan elektronların, kollektif şekilde salınımıdır. Rezonans olayı, nanoparçacık üzerine gelen ışıma dalgaboyunun kendisinden daha büyük olduğu durumlarda oluşur. Yüzey plazmon salınım hareketleriyle beraber rezonansta bulunan ışık metaldeki serbest halde bulunan elektronların salınımına sebep olmaktadır. Yüzeyde meydana geldiği için bu olaya yüzey plazmon rezonans (SPR) denilmektedir (Eustis ve El-Sayed, 2006). Şekil 2.8'de ışıkla altın nanoparçacığın elektronları arasında oluşan etkileşim gösterilmiştir. Yüzey plazmon rezonans olayında, parçacık gelen ışığın dalga boyundan daha ufak olmalıdır. Metal nanoparçacıkta bir elektrik dipol olayı yani bir kutuplaşma gözlenir. Böylece bir tarafta net negatif yük birikirken karşı tarafta net pozitif yük meydana gelir (Xia ve Halas 2005).



Şekil 2.8: Elektromanyetik alan etkisi doğrultusunda altın nanoparçacıktaki serbest elektronların salınım hareketleri (Peiris ve diğ., 2016).

Mie, (1908) yaptığı çalışmada metal nanoparçacıkların ışık ile ilişkisini kollodial altın parçacıkların renkleriyle açıklamıştır. Mie, bu çalışmasındaki ölçüm sonuçlarına göre altının boyutunun değişmesi ile renginin de farklılaştığını bulmuştur ve bu durum daha sonra yüzey plazmon rezonans (SPR) şeklinde isimlendirilimiştir (Wriedt, 2012).

2.3.4. Altın Nanoparçacıklar ve Sentez Yöntemleri

Altın, soymetaldir ve yapısı gereği reaksiyona girmez. Bu yüzdendir ki antika altın eserler yıllarca parlaklığını kaybetmeden günümüze kadar gelebilmişlerdir. Ayrıca nano ölçekli altınlar, moleküler ve yığın hallerindekilere göre optik özelliklere, yüzeydeki kaplama özelliği çeşitliliğine ve yüksek biyouyumlu özelliğe sahip oldukları için kimyacılar, fizikçiler ve son zamanlarda biyomedikal uygulayıcılar arasında çok popüler bir çalışma nesnesi haline gelmiştir (Daniel, 2004; Niazov, 2004). AuNP'ler, boyutları 1-150 nm arasında değişen monodispersnanopartiküllerdir (Boisselier ve Astruc, 2009).

2.3.4.1. Fiziksel Sentez

Fiziksel yöntemler çoğunlukla iyonize ya da iyonize olmamış radyasyonla muamele edildiğinde maddede oluşan ve metalik partiküllerin çekirdeklenmesine sebep olan redüksiyon reaksiyonlarını harekete geçiren enerji transferi esasına dayanır. Fiziksel sentez yöntemi; fotokimyasal işlemler, iyonlaştırıcı radyasyon, γ-ışınlama yöntemi, mikrodalga radyasyonu gibi yöntemlerdir (Elahi ve diğ., 2018).

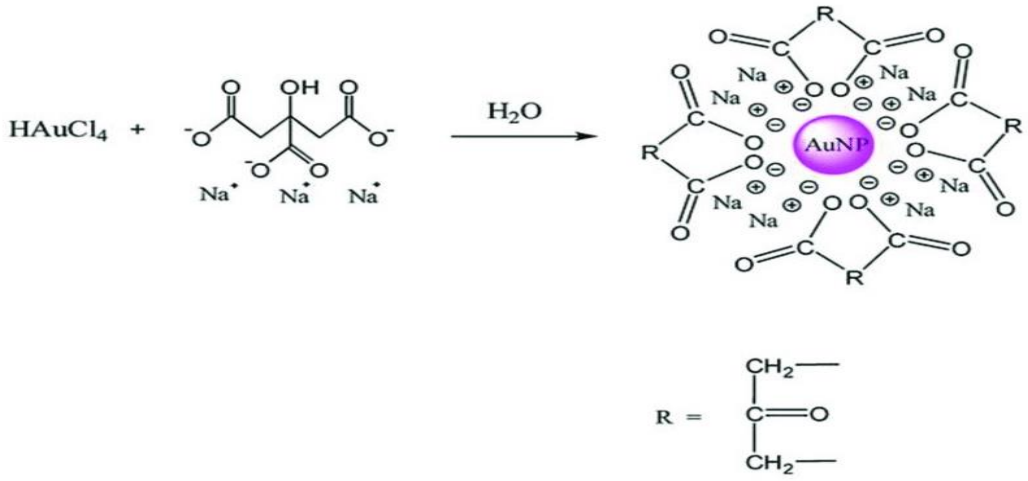
2.3.4.2. Kimyasal sentez

Bu sentez yöntemi, uygulama kolaylığı ve sentez verimliliğinin fazla olması sebebiyle en çok kullanılan sentez çeşididir. Nanoparçacıkların nükleasyonunu meydana getirmek ve sentezi başlatmak için sodyum borhidrür ($NaBH_4$), hidrazin ve sitrat gibi redüksiyon araçları kullanılmaktadır (Noruzi, 2015).

Turkevich ve diğ. (1951), altın nanoparçacıklarını sentezlemek için bir stabilizatör olarak sitrik asidi önerdi. Kaynatılan sulu tetrakloaurik asit çözeltisi üzerine belli bir konsantrasyondaki trisodyumsitrat ilavesi ile çözelti renginin şarap kırmızısı rengine dönüştüğü belirtildi.

Bu yöntem sonunda tetrakloraurik asit ve trisodyumsitrat reaksiyona girerek AuNP'ları oluştururlar. Yöntemde, trisodyumsitrat aynı zamanda indirgeyici ve stabilizör ajanı olarak görev alır. Sitrat konsantrasyonu nekadar fazlaysa stabilite etkisinin okadar iyi olduğu ve sentezlenen altın nanoparçacıkların boyutunun küçük olduğu belirlenmiştir (Kimling, 2006). Ayrıca Turkevich yöntemi ile sentezlenen altın nanoparçacıkların boyutları çözeltinin pH değeri, reaksiyon sıcaklığı gibi koşullardan da etkilenir. AuNP'ların 10-150 nm arasında değişen boyutlarda elde edilmesi başlangıçta reaksiyona katılan sodyum sitrat konsantrasyonu ile ilgilidir (Li ve diğ., 2011).

Şekil 2.9’da belirtildiği gibi, ilk adımda trisodyumsitrat, dikarboksilik asetona oksitlenir ve ikinci adımda ise aurik tuzlar bir auroz tuzuna indirgenir. A^0 atomları üzerinde oluşan toplanma sonucu altın nanoparçacıklar üretilmiş olur (Zhao ve diğ., 2013).

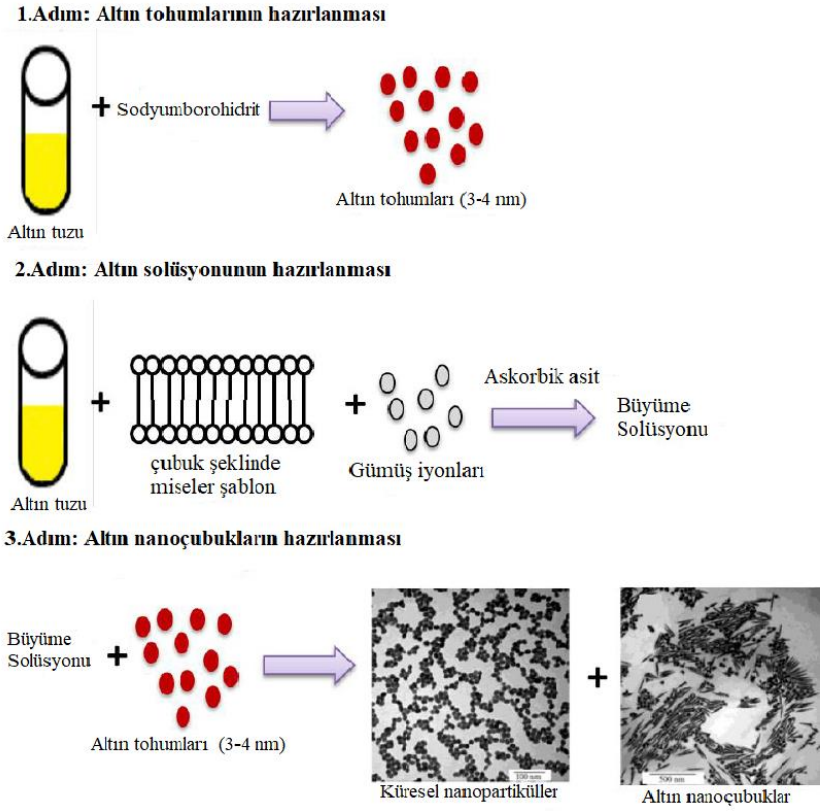


Şekil 2.9: AuNP sentez mekanizması (Zhao ve diğ., 2013).

Brust-Schiffrin Metodu, 1994’te geliştirilen bir AuNP sentez yöntemidir. Bu metodda, reaktif olarak tetraoktilamonyum bromür (TOAB) ve indirgeyici araç olarak ise sodyum borhidrür ($NaBH_4$) kullanılarak bifazik indirgenme yoluyla tiyollenmiş AuNP-tiyolatların üretimi yapılmaktadır. Alkil tiyollerin zincir uzunluğunun AuNP'lerin stabilizasyonu üzerindeki etkisini belirleyenbu metod, tiyolatla stabilize edilmiş AuNP'leri üretebilen ilk özel yöntemdir (Brust ve diğ.,1994).

2.3.4.3. Tohum aracılı büyüme

Bu sentez metodunda altın nanoçubukların ve altın nanokürelerin sentezi gerçekleştirilebilir. Şekil 2.10’da da gösterildiği gibi altın tuzunun kimyasal redüksiyonu, altın tohumları oluşturan sodyum borhidrür ($NaBH_4$) güçlü indirgeyici ajanı tarafından meydana gelmektedir (Jana ve diğ., 2001). Sonrasında, bu tohumlar, büyüme olayının sürdürülebilimesi adına hekzadesiltrimetilamonyum bromür ve askorbik asit gibi zayıf bir indirgeyici araç içeren altın tuzu çözeltisine eklenmektedir. Bu çözeltideki altın tohumları, nanoçubuk üretimi için nükleasyon işlemini gerçekleştirmektedir (Cai ve diğ., 2008).



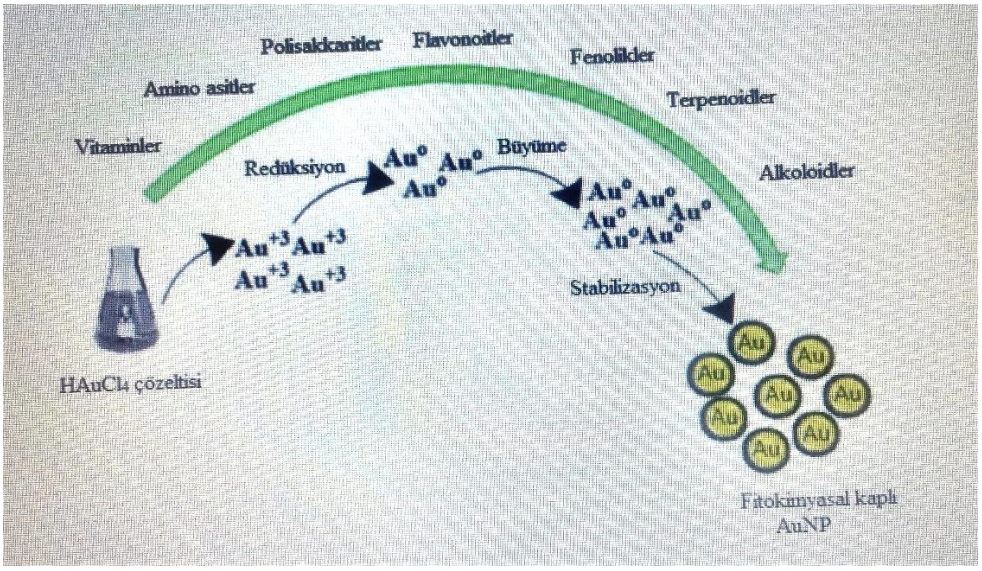
Şekil 2.10: Tohum aracılı nanopartikül sentezi

2.3.4.4. Biyolojik Sentez (Yeşil Sentez)

Nanopartikülleri sentezlemenin bir diğer yolu ise biyolojik sentezdir. Metal nanopartiküllernin sentezinde kullanılan bitkiler, mantarlar, bakteriler ve algler gibi çeşitli materyaller kullanılmaktadır. Bitki ekstraktları kullanılıp biyolojik sentez yoluyla üretilen AuNP'lerin, antibakteriyel (Soni ve Prakash, 2014), antiparaziter (Lakshmanan ve diğ. 2016), antioksidan (Patil ve Kim, 2017) ve antikanser aktiviteleri (Patil ve diğ., 2017) yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir.

AuNP'lerin bitkisel olarak sentezi, gerekli fitokimyasallara sahip bitki materyallerine (alkaloidler, terpenoidler, fenoller ve flavonoidler) ekstraksiyon işlemi yapılarak elde edilmektedir. Elde edilen bitki ekstraktı tetrakloroaurikasitin ($HAuCl_4$) sulu çözeltisi içinde çözündüğünde, Şekil 2.11'de gösterildiği gibi, iki kademeli reaksiyon gerçekleşmektedir.

İlk kademede, fitokimyasallar Au^{+3}, Au°'a indirgenirken, ikinci kademede, agregasyon ve stabilizasyon ile kolloidal AuNP'ler oluşur (Ovais ve diğ., 2017).



Şekil 2.11: AuNP'lerin bitki ekstraktı vasıtasıyla sentezi (Ovasi ve diğ., 2017).

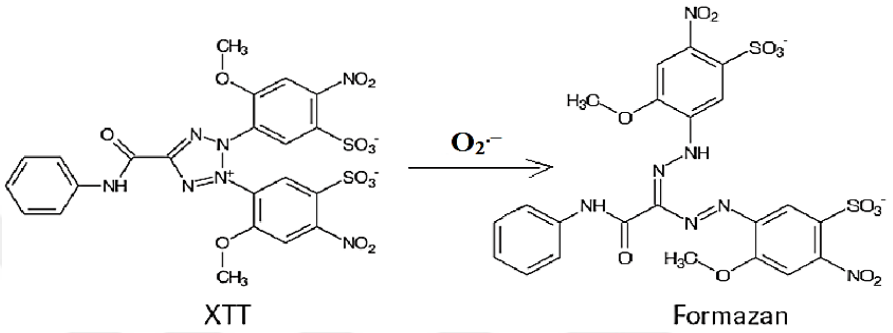
2.3.5. Altın Nanoparçacık Karakterizasyonu

Nanoparçacıklar genellikle boyutları, şekilleri, dağılımları ve yüzey alanlarına bağlı olarak karakterize edilebilirler (Jiang ve diğ., 2009). Nanoparçacıkların karakterize edilmesi için kullanılan teknikler şunlardır; UV-görünür bölge spektrofotometrisi, lazer desorpsiyon-iyonizasyon kütle spektrometrisi (LDI-MS) dinamik ışık saçılımı (DLS), taramalı elektron mikroskopisi (SEM), geçirimli elektron mikroskopisi (TEM), Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FTIR), Uv-görünür alan spektroskopisi kullanılarak 300-800 nm dalgaboylarındaki ışık sayesinde 2-100 nm boyutları arasındaki metal nanoparçacıklar karakterize edilebilir (Feldheim ve Foss, 2002). Benzer şekilde altın nanoparçacıkların ise 500-550 nm arasında spektrofotometrik absorbsiyon ölçümleri alınmaktadır (Shankar ve diğ., 2004).

2.4. SÜPEROKSİT ANYON RADİKAL SÜPÜRME VE DEDEKSİYON YÖNTEMLERİ İLE İLGİLİ LİTERATÜR ÇALIŞMALARI

Xu ve diğ., (2021), geliştirdikleri yöntemde Au-TeCDS (Altın tellür karbon nokta) nanoparçacık yardımıyla süperoksit anyon radikali süpürme aktivitesi ve dedeksiyonu belirlenmiştir. Bu çalışmada, tellür içeren karbon noktalar (TeCD') ile kompleks haline getirilmiş BSA (bovine-sığır serum albümin) ile modifiye edilmiş altın nanoparçacıklardan (AuNP) oluşan bir nanomalzeme (Au-TeCD) üretilmiştir. Süperoksit anyon radikal sentezi için ise; DMSO varlığında KO_2 ile enzimatik olmayan süperoksit anyon radikal üretim yolu tercih edilmiştir. Au -TeCD nanoparçacığın süperoksit anyon radikal süpürme aktivitesini belirlemek için çözelti ortamına ROS varlığında floresan özelliğe sahip olan DCFH-DA (Diklorofloresandiasetat) ilavesi yapılmıştır (Swift ve Sarvazyan 2000). Süperoksit anyon radikal süpürme aktivitesi tayini için yapılan denemelerde 370 nm'de uyarılan Au-TeCD nanoparçacıklarındaki ilgili TeCD ve AuNP bileşenlerinin, süperoksit anyonlarına maruz kaldıklarında 425 ve 640 nm'de iki emisyon tepesi oluşturdukları gözlemlenmiştir. Ayrıca daha sonra yapılan süreli çalışmalarda da aynı çözeltinin Au-TeCD nanoparçacık ilavesi ile belirli süreler sonrasında floresan değerlerinde azalmalar görülmüştür. Reaksiyon başladıktan 15 dakika sonra ortamdaki süperoksit anyon radikallerini süpürmüş olan Au-TeCD nanoparçacıkların bu noktada düşük floresans değeri vermesi tam da beklenilen bir sonuç olmuştur.

Agbe ve diğ., (2019), yapmış oldukları çalışmada ZnO-NP'ın fotokatalitik reaksiyonu sonu süperoksit anyon radikali üretilmiştir. Ardından moleküler bir prob olan 2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil (XTT) tetrazolyum tuzu kullanılarak kolorimetrik bir yolla süperoksit anyon radikal dedeksiyonu yapılmıştır. Süperoksit anyon radikali varlığında XTT tuzu koyu kırmızı bir renk oluşturur ve XTT formazana indirgenir. 478 nm'de maksimum absorbans veren XTT formazanın varlığı doğrudan süperoksit anyon radikali ile ilgilidir ve yapılan hesaplamalar sonucunda süperoksit anyon radikali dedeksiyonuna geçiş yapılmıştır.



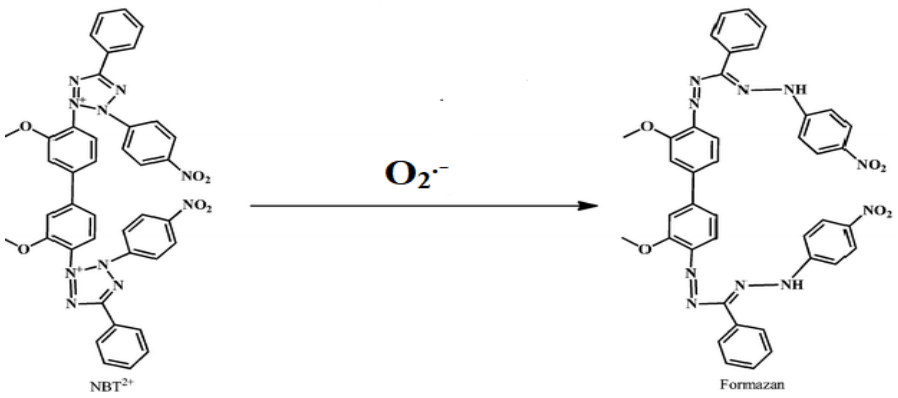
Şekil 2.12: XTT tetrazolyum tuzu ve XTT formazanın yapısı (Agbe ve diğ.,2019).

Nakkala ve diğ., (2016) geliştirdikleri yöntemde uzun biber bitkisi ekstraktından (PLFE) üretilen altın nanoparçacık (PLAuNP) ile antioksidanların katalitik aktivite tayini yapılmıştır. Bu çalışmada biyolojik sentez yoluyla altın nanoparçacık üretimi esas alınıp ve üretilen nanoparçacıkların oluşumu UV-görünür alan spektroskopisi ile doğrulanmıştır. Burada ROS süpürme aktivitelerinden faydalanılmıştır. Bir diğer ROS türevi olan süperoksit anyon radikali, PMS-NADH sistemi ile üretilip süpürme aktivitesi ise NBT yöntemiyle belirlenmiştir.

Sadeghian ve diğ., (2016), iskelet kası hücrelerinin ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile ürettikleri süperoksit anyon radikallerinin tespiti için sitokrom c (cyt-c) ile hareketsiz hale getirilimiş nano-altın gözeneklerine (NPG) dayanan bir elektrokimyasal biyosensör geliştirmişlerdir. Süperoksit konsantrasyonuyla ideal orantılı olarak elektrot yüzeyinde akım üretilmiştir. Eşitlik 2.11'da belirtildiği gibi immobilize halde olan cyt-c (Fe3+), ortamda bulunan süpeoksit anyon radikalleri ile reaksiyona girdiğinde cyt-c'ye (Fe^{2+}) indirgenir. Bu çalışmada tespit edilen süperoksit anyon radikallerinin dedeksiyon limiti (LOD) 3.7 nM olarak saptanmıştır.

$$\text{Cyt c-}Fe^{3+} + O_2^{\cdot -} \rightarrow \text{Cyt c-}Fe^{2+} + O_2 \qquad (2.11)$$

Süperoksit anyon radikalleri aynı anda oksidasyon ve redüksiyon özelliklerine sahiptirler. Süperoksit anyon radikal tayini için NBT ve sitokrom c probları çokça kullanılmaktadır. NBT ve sitokrom c bu radikal tarafından indirgenmektedir. İndirgenen bu problar spektrofotometrik olarak tayin edilebilirler. Yüksek hassasiyete sahip olan NBT yöntemi süperoksit anyon radikali süpürme aktivite ölçümü için çokça kullanılmaktadır. NBT yönteminde; Nitrobluetetrazolium reaktifi ve süperoksit anyon radikalinin arasında gerçekleşen reaksiyon neticesinde suyu içerisinde çözünmeyen mavi renkli bir formazan elde edilir bu ürün 560 nm'de maksimum absorpsiyon verir (Bekdeşer, 2012). Tez yönteminde; Zhang ve diğ. (2015) 'nin de yapmış olduğu çalışmaya göre süperoksit anyon radikali üretilmiştir ve artan miktarlarda antioksidan ilaveleriyle 560 nm'de absorbansın azalması, reaksiyon karışımında süperoksit anyon radikallerinin tüketildiğini gösterir (Köksal ve diğ., 2009).



Şekil 2.13: NBT'nin süperoksit anyon radikaliyle indirgenmesi (Nimse ve Pal, 2015).

Qu ve diğ., (2013) hücrelerde süperoksit anyonunu saptamak için SERS sensörü olarak bir altın nanopartiküller/sitokromc (cyt c) tasarlamışlardır. Oksitlenmiş Cyt c, süperoksit anyonu tarafından seçici olarak indirgenebilir, bu da Cyt c'nin SERS spektrumunun değişmesine neden olur. Bu nedenle, süperoksit anyon radikali konsantrasyonu, Cyt c konsantrasyonunun değişimi izlenerek nicel olarak hesaplanabilir. Okside olmuş ve okside olmamış Cyt c'nin Raman spektroskopisine göre sonuçları incelendiğinde aradaki farktan süperoksit anyon radikal dedeksiyonuna geçiş yapılmıştır. Aynı zamanda, nanosensör canlı HeLa'ya ve insan karaciğer hücrelerine iletilebilir ve floresan görüntüleme yoluyla hücre içi süperoksit anyon konsantrasyonunu gerçek zamanlı olarak izlenmesine izin verebilir, bu da biyosensörün, biyolojik sistemlerde süperoksit anyonunun kalitatif ve kantitatif analizi, böylece hücresel düzeyde oksidatif strese bağlı hastalıkların anlaşılması için uygun olacağını gösterir. SERS sensörünün algılama sınırı, 10 nmol/L'dir.

Shu ve diğ., (2021) reaktif SERS stratejisini (RSS) kullanarak süperoksit anyon radikalinin spesifik tespiti için bir yöntem geliştirmişlerdir ve konsantrasyonunu belirlemek için AuNPs/CLA nano probu oluşturmuşlardır. Kemilüminesans reaktifi olarak CLA (2metil6fenil3,7dihidroimidazopirazin-3-on), $O_2^{\cdot -}$ile seçici olarak reaksiyona girecek şekilde seçilmiştir. Bu yöntem, $O_2^{\cdot -}$ standart bir çözelti hazırlamaya gerek kalmadan $O_2^{\cdot -}$ konsantrasyonunu belirleme imkânı sağlar. Bu yöntem için LOD 9.0 nmol/L'dir.

Taubert ve diğ. (2003), süperoksit anyon radikali tayini için lusigenin probunu kullanıp enzimatik olmayan bu yöntemle farklı antioksidanlar için süperoksit anyonu süpürme hız sabitlerini ve IC_{50} değerlerini sunmuşlardır. Oluşan süperoksit anyon radikali konsantrasyonu lusigenin probunun kemilüminesans şiddeti ile doğrudan ilişkilidir. Bu yöntemde süperoksit anyon radikali potasyum süperoksit (KO_2) kullanılarak sentezlenmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal maddelerin tartılmasında RADWAG marka WAS 220X model analitik terazi, hazırlanmış çözeltilerin karışması ve homojenize olması içim Velp Scientifica markalı karıştırıcı kullanılmıştır, çözeltilerin pH'ının belirlenmesinde Hanna HI2202pH-metre ve bidistile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 bidistile su sistemi kullanılmıştır, hazırlanmış olan çözeltilerin inkubasyon için Memmert marka WNB 10 model su banyosu, absorbans ölçümleri için Agilent marka Cary 100 Bio model UV-Vis spektrofotometre ve ölçüm yapmak için Hellma marka 10 mm ışıma yollu kuartz küvet kullanılmıştır.

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; altın (III) klorür çözeltisi ($HAuCl_4$) (%30 (w/v)) seyreltik HCl içinde),1,4–Ditiyoeritritol (DTT), etanol (EtOH), nitrobluetetrazolium klorür (NBT), hidrojen peroksit (H_2O_2) (%30 (w/w)), sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$), kobalt (II)asetat tetrahidrat $(CH_3COO)_2Co.4H_2O$, disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), antioksidan bileşikler (gallik asit (GA), ferulik asit (FA), elajik asit (EA), kateşin (CAT), kuersetin (QR) ve epigallokateşingallat (EGCG)). Ksantin (X) (%99), ksantinoksidaz (XO) (frombuttermilk)' dır. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır. Bitki çayları lokal marketlerden alınmıştır.

3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.3.1. AuNP (Altın Nanoparçacık) Sentezi

AuNP çözeltisi Turkevic ve diğ., (1951) yöntemlerine göre hazırlandı. Tetrakloroaurat asidi çözeltisi (Au^{3+}) çözeltisi ,1 mM olacak şekilde 70µL alınıp 100 ml'ye distile su ile tamamlanarak hazırlandı. Çözelti yaklaşık 90 ℃'ye gelene kadar reflux altında karıştırıldı. Distile su ile hazırlanmış 38.8 mM trisodyumsitrat çözeltisinden 10 ml eklendi ve 15 dakika daha reflux altında karıştırıldı. Şarap kırmızısı renkli AuNP çözeltisi elde edildi ve oda sıcaklığına soğumaya bırakıldı.

Yöntemlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

1,4 ditiyoeritritol (DTT) çözeltisi; öncelikle 10^{-2} M stok çözeltisi için 0.038g tartılıp 25 mL'ye distile su ile tamamlandı ve buradan 5×10^{-5} M olacak şekilde tekrar 25 ml'ye distile su ile seyreltildi. Bu çözelti günlük olarak hazırlandı.

Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) çözeltisi; 0.2Molacak şekilde 0.84g tartılıp 50 mL'ye distile su ile hazırlandı.

Hidrojen peroksit (H_2O_2) çözeltisi; 10^{-2} M olacak şekilde ana çözeltiden 43µM alınarak 50 ml'ye distile su ile tamamlandı.

Kobalt (II) asetat($(CH_3COO)_2Co.4H_2O$) çözeltisi; 10^{-3} M olacak şekilde 0.012g tartılıp 50 ml'ye distile su ile tamamlandı sonrasında 10^{-4} M olacak şekilde seyreltildi.

Fosfat tamponu; 45mM ve pH=7.17 olacak şekilde disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($Na_2HPO4\cdot 2H_2O$)'tan 1.41 g ve sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($NaH_2PO4\cdot 2H_2O$)'tan 1.37g tartılıp ayrı ayrı 100'er mL'ye distile su ile tamamlandı ve tampon hazırlandı.

NBT çözeltisi; 300µM olacak şekilde 0.025g tartım alınıp ile 100mL'yedistile su ile tamamlanarak hazırlandı.

Antioksidan Bileşikler; kullanılan bütün standart antioksidan çözeltileri (1.0×10^{-2} M) stok çözeltisi olacak şekilde etil alkolde hazırlanıp ardından çalışma aralığı değerlerine (1.0×10^{-4} M-1.0×10^{-7}M) tekrardan etil alkol ile seyreltildi.

Ksantin; 0.0152 g ksantin yaklaşık 3 mL kadar 1M NaOH içinde çözülüp 100 ml'ye distile su ile seyreltildi ve stok çözelti olarak ayrıldı. Hazırlanan stok çözeltisinden25 ml alınıp 0.1 M HCl ile pH= 7.8-8 olarak hazırlandı ve su ile 50 ml'ye distile su ile seyreltildi. 1:30 olacak şekilde seyreltilip kullanıldı.

KsantinOksidaz; 10 mg tartım alınıp 25 mL'ye 1M pH=7.8-8.0 fosfat tamponu ile tamamlandı.

3.3.2. Bitki Çayı İnfüzyonlarının Hazırlanması:

Poşet bitki çayları kaynamış distile suya önce 2 dakika süresinde batırılıp çıkarılma işleminden sonra 3 dakika demlenmesi için bekletildi. Poşet bitki çayları sudan çıkarılıp çözeltiler 100 mL'ye distile su ile tamamlandı. Gerekli seyreltmeler de yapılıp hem geliştirilen AuNP-SOSA yönteminde hem de NBT yönteminde kullanıldı.

3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.4.1. Geliştirilen AuNP-SOSA Yöntemi

Tez çalışması kapsamında süperoksit anyon radikal (SO) üretimi için iki farklı yöntem kullanılmıştır.

İlk olarak; bikarbonat (HCO_3^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında, Co (II) iyonlarının fenton benzeri bir reaksiyonu tetikleyerek, süperoksit anyon radikali (SO) oluşturma sistemi kullanılmıştır (Zhang ve diğ., 2015).

Bu sisteme göre, A_0 tüpü (referans tüp) için; 0.2mL (5×10^{-5} M) DTT üzerine 1.8 mL H_2O, A_1 tüpü (antioksidan yokluğunda) için; 0.2mL (5×10^{-5} M) DTT, 0.2 mL (0.2 M) $NaHCO_3$, 0.5 mL (10^{-2} M) H_2O_2, 1.0 mL H_2O ve 0.1mL (10^{-4} M) Co (II), A_2 tüpü (antioksidan varlığında) için; 0.2 mL (5×10^{-5}M) DTT,0.2 mL (0.2 M) $NaHCO_3$, 0.5 mL (10^{-2} M) H_2O_2, 0.1mL (10^{-4} M) Co (II) ardından belli konsantrasyon ve hacimlerde x mL antioksidan ilaveleri yapılıp son olarak (1.0- x) mL H_2O ilavesi yapıldı. Sonrasında hazırlanan bu karışımlara su banyosunda 37℃'de 15 dakikalık inkübasyon işlemi uygulandı. İnkübasyon işlemi sonrasında ise bütün tüplere önce 1er mL fosfat tamponu (pH =7.17) ve1 mL AuNP eklenip (V_{son} =4 mL) bir dakika sonrasında 875-450 nm dalgaboyları arasında olacak şekilde distile suya karşı taramalar yapıldı.

Diğer SO üretme yöntemi ise ksantin-ksantin oksidaz (X-XO) enzimatik reaksiyon esasına dayanır. Ksantin oksidaz oksijen molekülü varlığında ksantinin yükseltgenmesini katalizler. Dolayısıyla yükseltgenen ksantin sonucu SO meydana gelir (Pei ve Li, 2000).

X-XO sistemine göre ise; A_0 tüpü (referans tüp) için; 0.2mL (5×10^{-5} M) DTT üzerine 1.8 mL H_2O, A_1 tüpü (antioksidan yokluğunda) için; 1.66×10^{-5}M 0.1mL X, 0.1 mL 0.0384U/mL XO, 0.2mL (5×10^{-5} M) DTT ve 1.6 mL H_2O, A_2 tüpü (antioksidan varlığında) için; 1.66×10^{-5} M 0.1 mL X, 0.1 mL 0.0384 U/mL XO, 0.2mL (5×10^{-5} M) DTT, x ml antioksidan ve son olarak

(1.0- x) mL H_2O ilavesi yapıldı. Aynı şekilde hazırlanan bu çözeltilere de su banyosunda 37℃'de 15 dakikalık inkübasyon işlemi uygulandı. İnkübasyon işlemi sonrasında ise bütün tüplere önce 1 mL fosfat tamponu (pH =7.17) ve 1 mL AuNP eklenip (Vson =4 mL) bir dakika sonrasında 875-450 nm dalgaboyları arasında olacak şekilde distile suya karşı taramalar yapıldı.

Antioksidanların % inhibisyon değerleri Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplandı.

$$\%\ \text{inhibisyon} = \frac{(A_2 - A_1)}{(A_0 - A_1)} \times 100 \qquad (3.1)$$

A_0; referans çözelti absorbansı, A_1 ve A_2 ise sırasıyla antioksidan yokluğunda ve varlığında inkübasyon karışımında bulunan altın nanoparçacıkların 675 nm dalga boyundaki absorbans değerleridir. Antioksidan bileşikler için Eşitlik 3.1'e göre hesaplanan % inhibisyon değerleri ile $C_{antioksidan}$ değerleri kullanılarak oluşturulan grafikten doğru denklemleri belirlendi ve buradan yola çıkarak antioksidan bileşiklerinin süperoksit anyon radikali süpürme aktiviteleri IC_{50} değeri olarak hesaplandı.

3.4.1.1. Reaksiyon karışımındaki çözeltilerin AuNP ile etkileşimleri

Reaksiyon çözeltilerinin AuNP ile herhangi bir etkileşime girip girmediğini tespit edebilmek adına çeşitli reaksiyon karışımları hazırlanarak, görünür alan spektrumları alındı. Hazırlanan karışımlarda çalışma konsantrasyonları geliştirilen AuNP-SOSA yönteminde kullanılan konsantarsyonlar olup, son hacim 4.0 mL'ye destile su ile tamamlanmıştır.

a) 0.2 mL DTT + 0.2 mL $NaHCO_3$ + 0.5 mL H_2O_2 +1 mL FT + 1 mL AuNP
b) 0.2 mL DTT +1 mL FT + 1 mL AuNP
c) 0.2 mL DTT + 0.2 mL $NaHCO_3$ + 0.1 mL Co (II) + 1 mL FT + 1 mL AuNP
d) 0.2 mL DTT + 0.3mL QR + 1 mL FT +1 mL AuNP
e) 0.2 mL DTT +1 mL SO + 0.3mL QR + FT + AuNP
f) 0.2 mL DTT +0.1 mL Co (II) + 0.5 mL H_2O_2 +1 mL FT + 1 mL AuNP
g) 0.1 mL Co (II) + 0.5 mL H_2O_2+ 1 mL FT + 1 mL AuNP
h) 0.3mL QR + 1 mL FT + 1 mL AuNP
i) 0.2 mL $NaHCO_3$ + 0.1 mL Co (II) + 1 mL FT + 1 mL AuNP
j) 1 mL SO + 0.3mL QR +1 mL FT + 1 mL AuNP
k) 0.2 mL $NaHCO_3$ +0.5 mL H_2O_2+ 1 mL FT + 1 mL AuNP
l) 1 mL AuNP
m) 1 mL FT + 1 mL AuNP
n) 1 mL SO + 0.2 mL DTT + 1 mL FT + 1 mL AuNP

3.4.2. NBT Yöntemi

Referans yöntemi olarak kullanılan NBT yönteminde (Choi ve diğ, 2006) reaksiyon karışımı; A_0 tüpü (referans tüp) için sırasıyla; 2.5 mL su, 0.4 mL $NaHCO_3$ ($2x10^5$µM), 0.2 mL Co (II) (100 µM), 1.0 mL H_2O_2 (10^4µM) ve 1.0 mL (300 µM) NBT çözeltisi, A tüpü (antioksidan varlığında) için; (2.5-x) mL su, x=antioksidan bileşikler (0.1-100µM arasındaki konsantrasyonlarda çalışıldı), 0.4 mL $NaHCO_3$ ($2x10^5$µM), 0.2 mL Co (II) (100 µM), 1.0 mL H_2O_2 (10^4µM) ve 1.0 mL (300 µM) NBT çözeltisi içermektedir. Son hacmi 5.1 mL olan reaksiyon çözeltisine 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyon işlemi uygulandıktan sonra 560 nm dalga boyunda destile suya karşı ölçümler alındı.

Bu yöntemle tüm süpürücü bileşiklerin % inhibisyon değerleri Eşitlik 3.2'e göre hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A_0 - A)}{(A_0)} \times 100 \qquad (3.2)$$

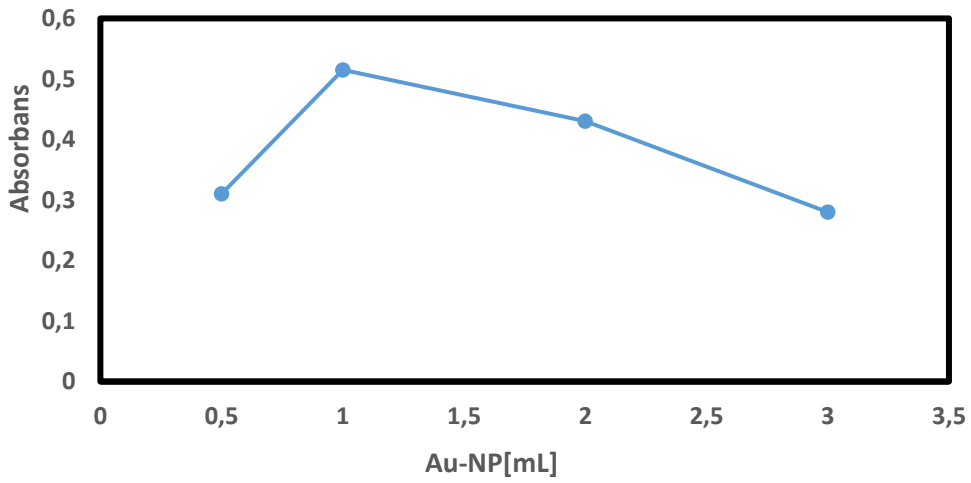
A_0 değeri; referans değeri olup içerisinde süpürücü bileşikler bulunmamaktadır. A değeri ise süperoksit anyon radikali ilesüpürücü bileşikleri de içeren absorbans değerleridir. Süpürücü bileşikler için Eşitlik 3.2'e göre hesaplanan % inhibisyon değerleri ile $C_{süpürücü}$ değerleri kullanılarak oluşturulan grafikten doğru denklemlerin elde edildi ve sonrasında süpürücü bileşiklerin süperoksit anyon radikali süpürme aktiviteleri IC_{50} değeri olarak hesaplandı.

4.BULGULAR

4.1. GELİŞTİRİLEN AuNP-SOSA YÖNTEM İÇİN OPTİMUM KOŞULLARIN BELİRLENMESİ

4.1.1. Optimum AuNP Hacminin Belirlenmesi

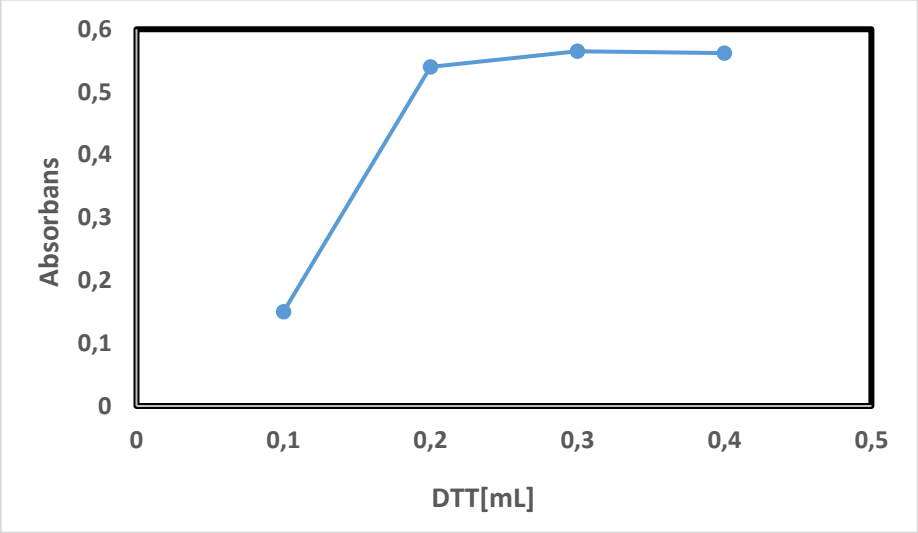
1mM Au-NP çözeltisinden 0.5-3.0 mL hacim aralığında alınarak 2 mL fosfat tamponu ve 0.2 mL DTT varlığında geliştirilen yöntem uygulanıp 675 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. En yüksek absorbans değeri 1 mL varlığında tespit edildiği için optimum Au-NP hacmi 1 mL olarak belirlendi.



Şekil 4.1 : Farklı Au-NP hacimlerine bağlı değişen absorbans değerleri.

4.1.2. Optimum DTT Hacminin Belirlenmesi

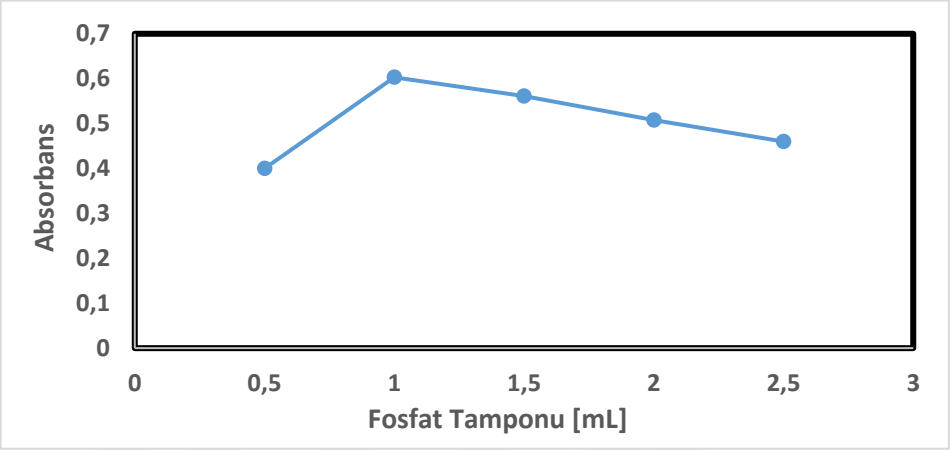
5×10^{-5} M DTT çözeltisinden 0.1-0.4 mL hacim aralığında alınarak 1 mL Au-NP ve 1mL fosfat tamponu varlığında geliştirilen yöntem uygulanıp 675 nm'deki absorbansları ölçüldü. En yüksek absorbans değeri 0.2 ml varlığında tespit edildiği için optimum DTT hacmi 0.2 ml olarak belirlendi.



Şekil 4.2: Farklı DTT hacimlerine bağlı değişen absorbans değerleri.

4.1.3. Optimum Fosfat Tamponu Hacminin Belirlenmesi

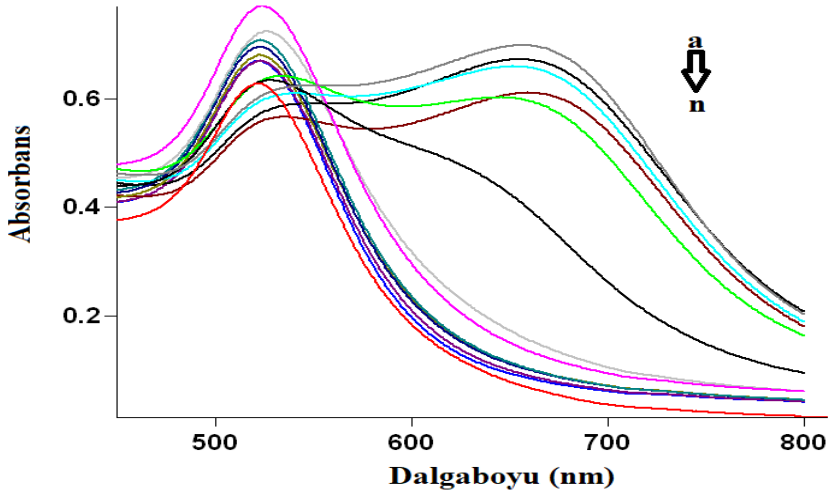
45 mM (pH=7.17) fosfat tamponu çözeltisinden 0.5-2.5 mL hacim aralığında alınarak 1 mL Au-NP ve 0.2 mL DTT varlığında geliştirilen yöntem uygulanıp 675 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. En yüksek absorbans değeri 1 mL varlığında tespit edildiği için optimum fosfat tamponu hacmi 1 mL olarak belirlendi.



Şekil 4.3: Farklı fosfat tamponu hacimlerine bağlı değişen absorbans değerleri.

4.1.4. Reaksiyon Karışımındaki Çözeltilerin AuNP ile Etkileşimleri

Yöntem için kullanılan kimyasalların kendi aralarındaki etkileşimleri incelendi. Reaksiyonu etkileyecek olumsuz bir sonuç vermediği Şekil 4.4'teki görünür alan spektrumları ile belirtildi.



Şekil 4.4: Reaksiyon karışımındaki çözeltilerin AuNP ile etkileşimleri.

a) DTT + $NaHCO_3$ + H_2O_2 + FT + AuNP ⟶ A_{525} = 0.632, A_{675} = 0.671

b) DTT + FT + AuNP ⟶ A_{525} = 0.561, A_{675} = 0.654

c) DTT + $NaHCO_3$ + Co (II) + FT + AuNP ⟶ A_{525} = 0.601, A_{675} = 0.642

d) DTT + QR + FT + AuNP ⟶ A_{525} = 0.638, A_{675} = 0.604

e) DTT + SO + QR + FT + AuNP ⟶ A_{525} = 0.770, A_{675} = 0.602

f) DTT + Co (II) + H_2O_2 + FT + AuNP ⟶ A_{525} = 0.634, A_{675} = 0.353

g) Co (II) + H_2O_2+ FT + AuNP ⟶ A_{525} = 0.695, A_{675} = 0.118

h) QR + FT + AuNP ⟶ A_{525} = 0.729, A_{675} = 0.112

i) $NaHCO_3$ + Co (II) + FT + AuNP ⟶ A_{525} = 0.681, A_{675} = 0.085

j) SO + QR + FT + AuNP ⟶ A_{525} = 0.775, A_{675} = 0.083

k) $NaHCO_3$ + H_2O_2+ FT + AuNP ⟶ A_{525} = 0.705, A_{675} = 0.082

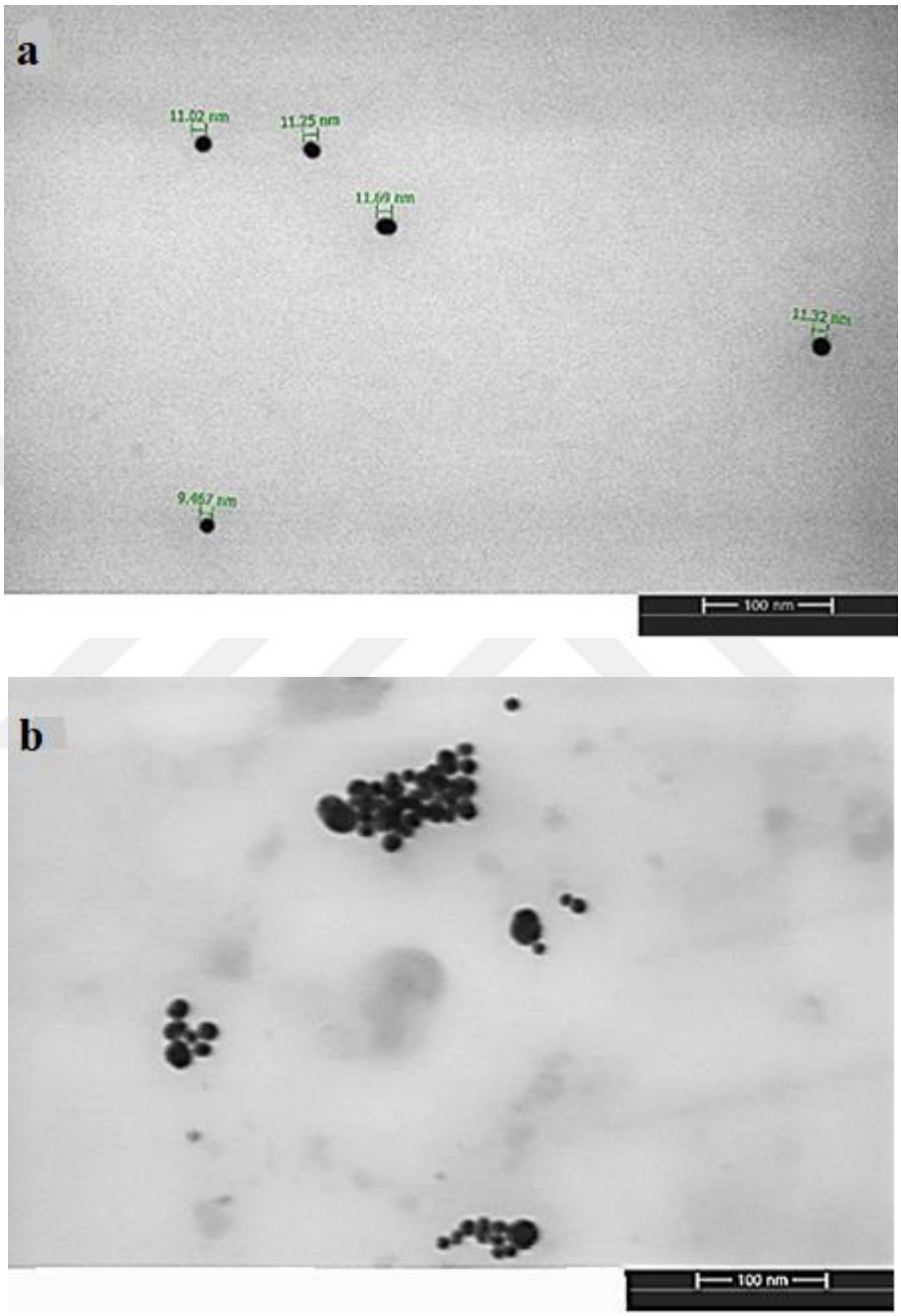
l) AuNP ⟶ A_{525} = 0.665, A_{675} = 0.074

m) FT + AuNP ⟶ A_{525} = 0.668, A_{675} = 0.072

n) SO + DTT + FT + AuNP ⟶ A_{525} = 0.665, A_{675} = 0.071

4.1.5. Altın NanoparçacıklarınKarakterizasyonu İçin SEM Görüntüleri

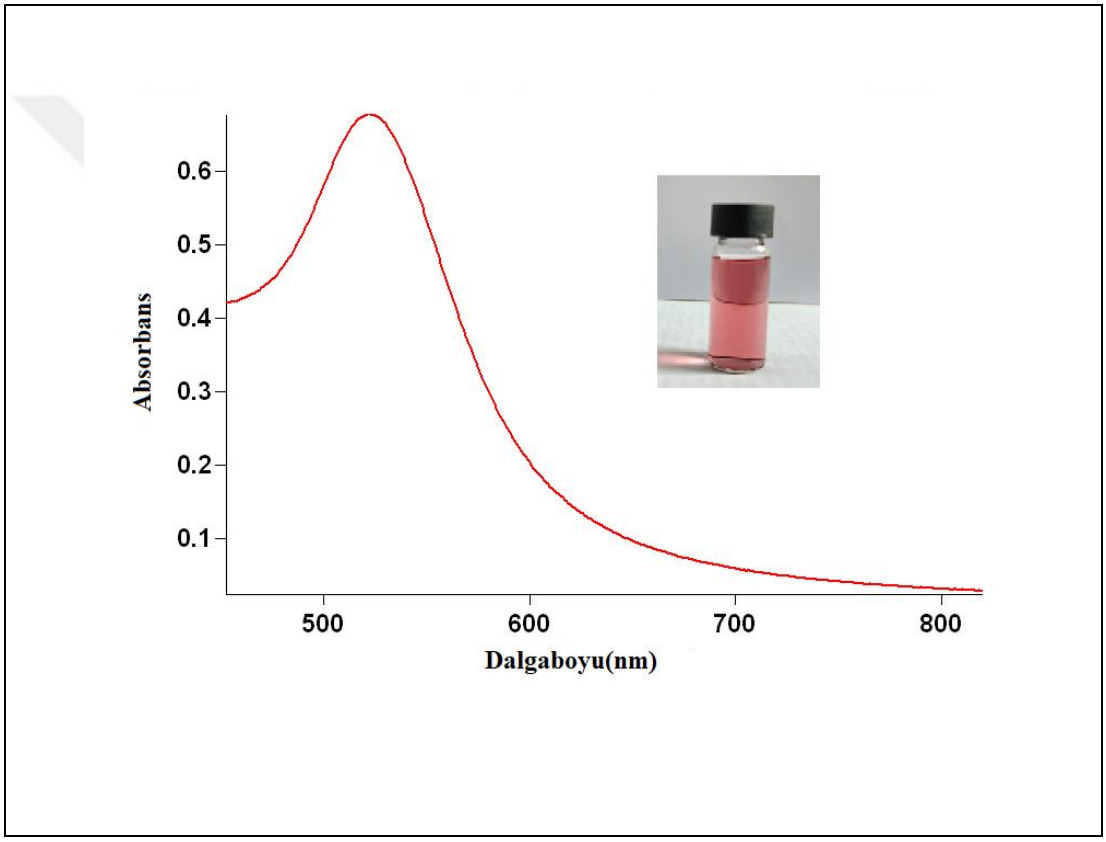
AuNP'nin DTT – SO karışımı ve DTT varlığında elde edilen SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.5a ve Şekil 4.5b'de belirtilmiştir.



Şekil 4.5: AuNP'nin (a) DTT – SO varlığında ve (b) DTT varlığında elde edilen SEM görüntüleri.

4.2. GELİŞTİRİLEN YÖNTEMİN ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERE UYGULANMASI

AuNP-SOSA yöntemi doğrultusunda altın nanoparçacık, Turkevich ve diğ. (1951) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak trisodyumsitrat varlığında Au (III) atomlarının Au (0)'a indirgenmesi ve stabilize edilmesi esasına dayanarak sentezlendi. Sentezlenen AuNP 520 nm'de maksimum absorbans vermiştir (Şekil 4.6).

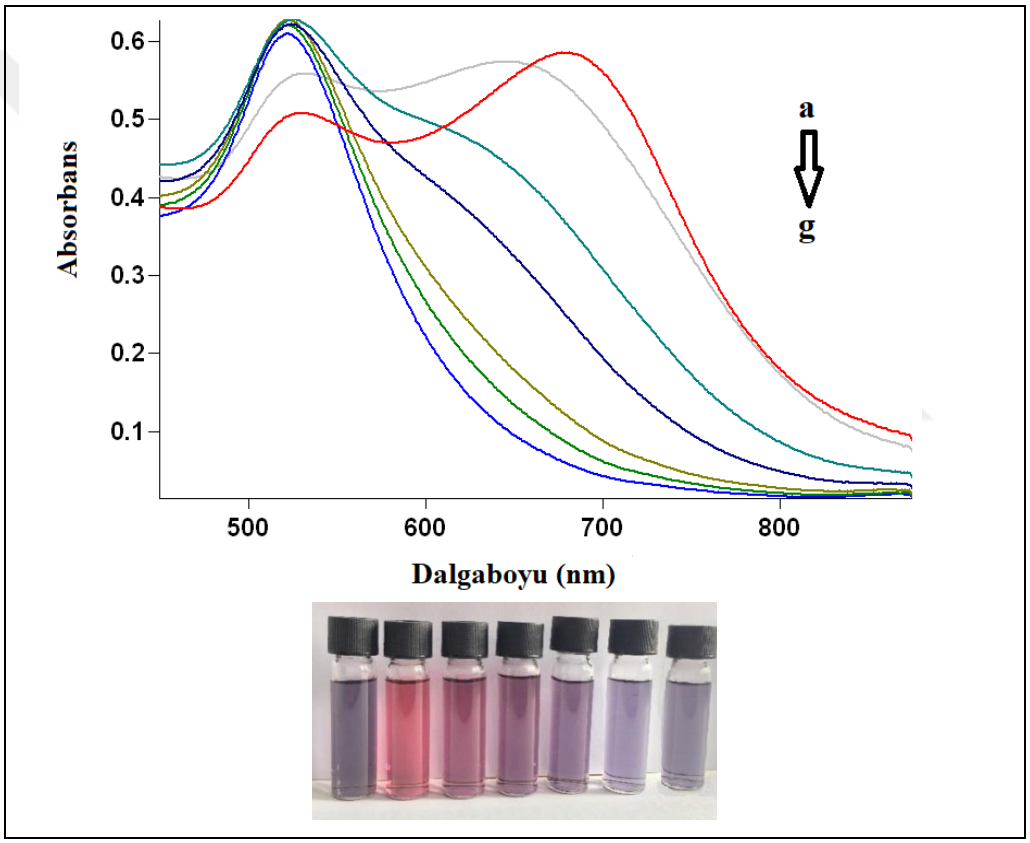


Şekil 4.6: AuNP plazmon rezonans spektrumu.

İlk olarak AuNP-SOSA yöntemi kullanılarak çeşitli antioksidan bileşiklerin HCO_3^-, Co^{2+}, H_2O_2, sistemi ile üretilen süperoksit anyon radikallerini süpürme aktiviteleri belirlendi.

AuNP-SOSA yöntemiyle çalışılan antioksidan bileşikler arasından elajik asit, kuersetin ve kateşin için elde edilen görünür alan spektrumları Şekil4.7, Şekil4.8, Şekil 4.9'da belirtilmektedir. Bu bileşikler için Eşitlik 3.2'ye göre hesaplanan % inhibisyon değerleri ile konsantrasyon arasında elde edilen doğru denklemleri Tablo 4.1, Tablo 4.2, Tablo 4.3'te kullanılarak IC_{50} değeri için örnek hesaplama gösterilmektedir.

AuNP-SOSA yönteminde; Elajik Asit (100 µM) kalibrasyonu;



Şekil 4.7: AuNP-SOSA yöntemine göre süperoksit anyon radikalik varlığında ve yokluğunda elde edilen görünür alan spektrumları (a)süperoksit anyon radikalik yokluğundaki referans, (b) 15 µM EA, (c) 10 µM EA, (d) 7.5 µM EA, (e) 5 µM EA, (f) 2.5 µM EA, (g) süperoksit anyon radikalik varlığında referans.

AuNp-SOSA yöntemine göre çalışılan Elajik Asit'in Eşitlik 3.2'ye göre %inhibisyon hesabı yapılmış olup Tablo 4.1'de belirtilmektedir.

Tablo 4.1: $C_{(EA)}$– %inhibisyon değerleri ve doğru denklemi.

$C_{(EA)}$ (µM)	**Absorbans**	**%inhibisyon**
2.5	0.091	5.44
5	0.128	12.90
7.5	0.260	39.51
10	0.380	63.70
15	0.546	97.17
A_0=0.583 A_1=0.06 y =7x10^6 c – 18.45 (y=%inhibisyon) r =0.9913		

Hesaplanan %inhibisyon değerleri ile süpürücü bileşiklerin değişen konsantrasyonları arasında oluşturulan grafiğe göre bir doğru denklemi elde edilip ve bu denkleme göre IC_{50} değerleri aşağıda belirtilen şekilde hesaplandı.

%50 inhibisyon hesabı için; y= 50

$$50=7x10^6.C_{(EA)}– 18.45$$

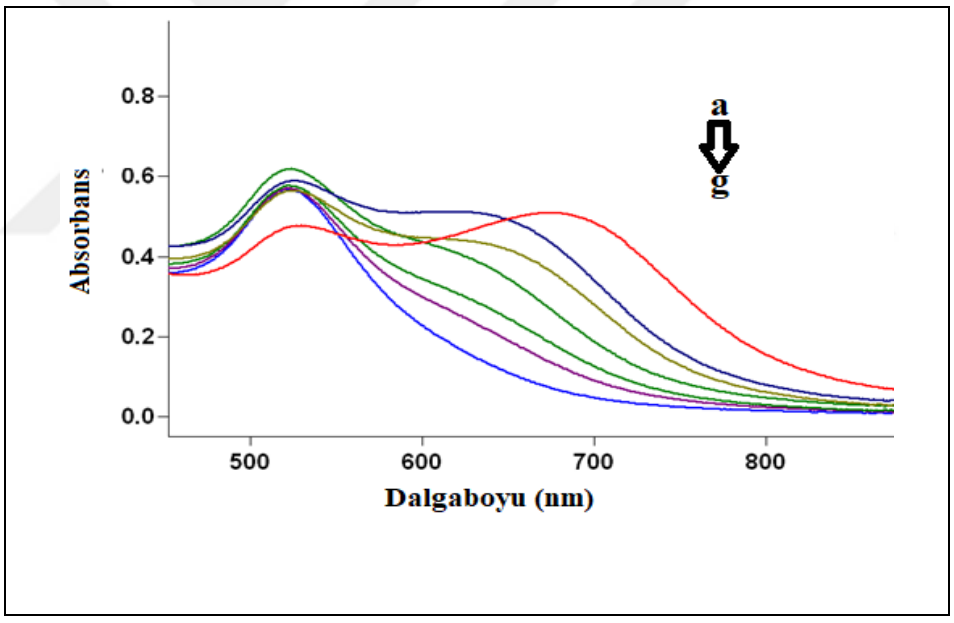
$$C_{(EA)}=8.72\mu M$$

IC_{50}= 8.72µM olarak bulunur.

AuNP-SOSA yönteminde; Kuersetin (1x10^{2}µM) kalibrasyonu;

Tablo 4.2: AuNP-SOSA yöntemi ile $C_{(QR)}$– %inhibisyon değerleri ve doğru denklemi.

C (RA) (µM)	**Absorbans**	**%inhibisyon**
2.5	0.129	15.55
5.0	0.184	27.77
7.5	0.260	44.66
8.75	0.363	67.55
10	0.431	82.66
A_0=0.509 A_1=0.059 y=88x10^5 c – 12.42 (y=%inhibisyon) r=0.969		

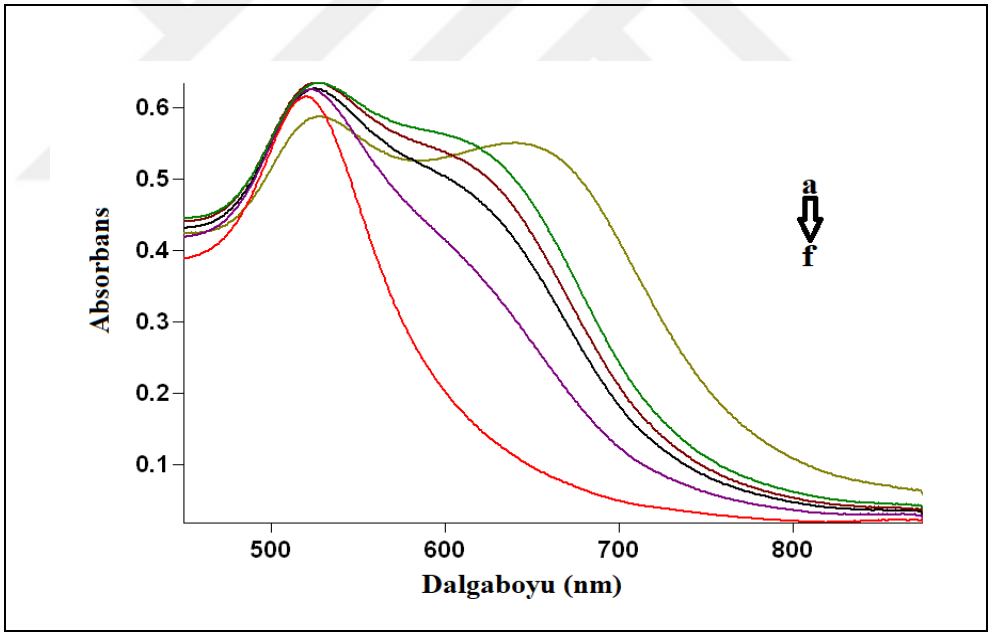


Şekil 4.8: AuNP-SOSA yöntemine göre süperoksit anyon radikali varlığında ve yokluğunda elde edilen görünür alan spektrumları. (a) süperoksit anyon radikali yokluğundaki referans, (b) 10 µM QR (c) 8.75 µM QR, (d) 7.5 µM QR, (e) 5 µM QR, (f) 2.5 µM QR (g) süperoksit anyon radikali varlığında referans.

AuNP-SOSA yönteminde; Kateşin (1µM) kalibrasyonu;

Tablo 4.3: $C_{(CAT)}$- %inhibisyon değerleri ve doğru denklemi.

C (CAT) (µM)	**Absorbans**	**%inhibisyon**
0.5	0.225	22.80
0.75	0.317	38.59
1	0.420	57.89
1.25	0.601	89.47
A_0=0.66 A_1=0.08 y =72x10^6 .c - 9.83 (y=%inhibisyon) r =0.912		



Şekil 4.9: AuNP-SOSA yöntemine göre süperoksit anyon radikali varlığında ve yokluğunda görünür alan spektrumları (a) süperoksit anyon radikali yokluğundaki referans, (b) 1.25 µM CAT, (c) 1 µM CAT, (d) 0.75 µM CAT, (e) 0.5 µM CAT, (f) süperoksit anyon radikali varlığında referans.

AuNP-SOSAyönteminegöreantioksidanlardan%inhibisyon-konsantrasyon değerleri arasında çizilen doğru denklemleri ve elde edilen IC_{50} değerleri Tablo 4.4'te belirtilmektedir.

Tablo 4.4: AuNP-SOSA yöntemine göre antioksidan bileşiklerinin IC_{50}değerleri.

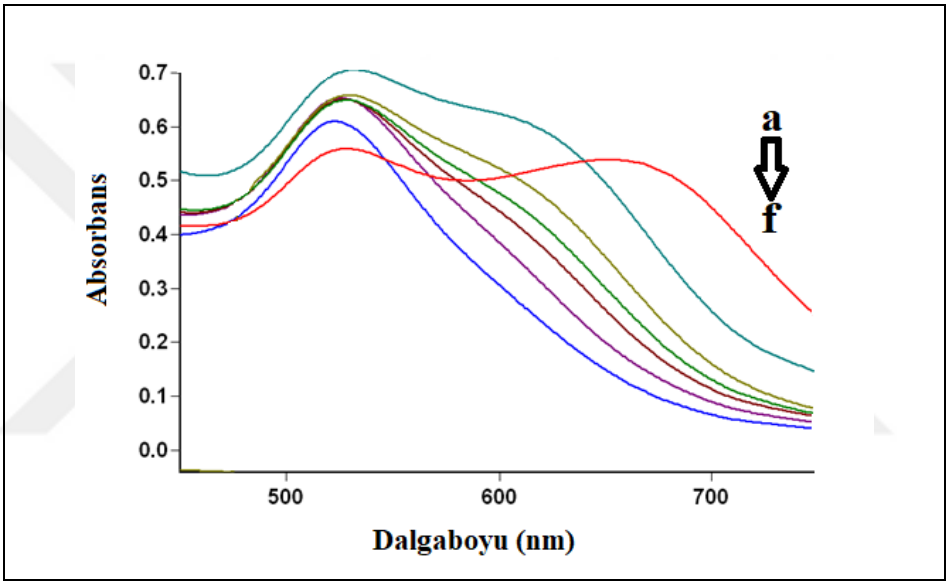
Antioksidan Bileşikler	**AuNP-SOSA Yöntemine Göre Lineer Eşitlik ve Korelasyo nKatsayısı**	**AuNP-SOSA YöntemineGöre Hesaplanan IC_{50} değerleri (µM)**
Kateşin (CAT)	$y=50x10^{9}c + 16.305$ r= 0.976	0.81 ± 0.09
Kuersetin (QR)	$y=88x10^{5}c -12.42$ r=0.969	7.01 ±0.09
Epigallo kateşin gallat (EGCG)	$y=35x10^{5} c + 5.75$ r=0.993	0.53±0.02
Ferulik Asit (FA)	$y=46x10^{5}c – 18.12$ r=0.982	14.6±0.30
Elajik Asit (EA)	$y= 77x10^{5} c-18.45$ r= 0.991	4.05±0.12
Gallik Asit (GA)	$y=33x10^{4}c – 0.638$ r=0.975	14.5±0.41

Ortalama ±SD (n=3)

İkincil olarak, AuNP-SOSA yöntemi kullanılarak çeşitli antioksidan bileşiklerin X-XO sistemi ile üretilen süperoksit anyon radikalleri süpürme aktiviteleri belirlenmiştir.

Geliştirilen yöntemde Bölüm 3.4.1'de de anlatıldığı gibi AuNP-SOSA yönteminin farklı yöntemlerle de üretilen süperoksit anyon radikaline uygulanabilirliğini kanıtlamak amacıyla enzimatik bir yol olan ksantin-ksantin oksidaz sistemi kullanıldı.

Yöntemde de kullanılmış olan kuersetin (QR) antioksidan bileşiği başlangıç konsantrasyonu 100µM olarak seri olacak şekilde çalışıldı. Görünür alan spektrumu ise Şekil 4.10'de belirtilmektedir.



Şekil 4.10: AuNP-SOSA yöntemine göre ksantin-ksantin oksidaz ile üretilen süperoksit anyon radikali varlığında ve yokluğunda görünür alan spektrumları (a) süperoksit anyon radikali yokluğundaki referans, (b) 37.5 µM QR, (c) 32.5µM QR, (d) 27.25µM QR, (e) 22.5µM QR, (f) 17.5 µM QR, (g) süperoksit anyon radikali varlığında referans.

AuNp-SOSA yöntemine göre X-XO sistemi ile üretilen SO için Eşitlik 3.2'ye göre %inhibisyon hesabı yapılmış olup Tablo 4.5'te belirtilmektedir.

Tablo 4.5: X-XO sistemine göre $C_{(QR)^-}$ %inhibisyon değerleri ve doğru denklemi.

$C_{(QR)}$ (µM)	**Absorbans**	**%inhibisyon**
17.5	0.171	16.60
22.5	0.203	23.80
27.5	0.254	36.66
32.5	0.370	64.28
37.5	0.510	97.61
A_0=0.52 A_1=0.110 $y=34x10^5$ c – 43.70 (y=%inhibisyon) r=0.941		

Hesaplanan %inhibisyon değerleri ile antioksidan bileşiğin değişen konsantrasyonları arasında oluşturulan grafiğe göre bir doğru denklemi elde edildi ve bu denkleme göre IC_{50} değerleri aşağıda belirtilen şekilde hesaplandı.

%50 inhibisyon hesabı için; y= 50

$$50=34x10^5\, C_{(QR)} - 43.70$$

$$C_{(QR)}=27.5\mu M$$

IC_{50}= 27.5µM olarak bulunur.

4.3. NBT YÖNTEMİNİN ANTİOKSİDANLAR ÜZERİNE UYGULANMASI

Referans yöntem için NBT yöntemi tercih edildi. Yöntem; 0,1-100 μM aralığında hazırlanan antioksidan bileşiklerine uygulandı. Bölüm 3.4.2'de anlatılan gibi uygulanan yöntem sonucunda elde edilen absorbans değerlerine göre % inhibisyon değerleri Eşitlik 3.2'teki gibi hesaplandı.

Kuersetin (1μM) için NBT yöntemine göre Eşitlik 3.2'e göre hesaplanan %inhibisyon değerleri Tablo 4.6'da belirtilmektedir.

Tablo 4.6. NBT yöntemine göre $C_{(QR)^-}$ %inhibisyon değerleri ve doğru denklemi.

$C_{(QR)}$ (μM)	**Absorbans**	**%inhibisyon**
0.1	1.073	33.27
0.2	0.775	51.79
0.3	0.529	67.07
0.4	0.447	72.21
0.5	0.425	73.57
A_0=1.6093 $y=10x10^7 c + 29.27$ (y=%inhibisyon) r=0.9362		

Hesaplanan %inhibisyon değerleri ile süpürücü bileşiklerin değişen konsantrasyonları arasında oluşturulan grafiğe göre bir doğru denklemi elde edildi ve bu denkleme göre IC_{50} değerleri aşağıda belirtilen şekilde hesaplandı.

%50 inhibisyon hesabı için; y= 50

$$50=10x10^7 .C_{(QR)}+29.97$$

$$C_{(QR)}=0.20\mu M$$

IC_{50}= 0.20μM olarak bulunur.

NBT Yönteminegöreantioksidanlardan elde edilen absorbans değerlerine bağlı doğru denklemleri ve elde edilen IC_{50} değerleri Tablo 4.7'de belirtilmektedir.

Tablo 4.7: NBT yöntemine göre süpürücü antioksidan bileşiklerinin IC_{50} değerleri.

SüpürücüBileşikler	**NBT Yöntemine Göre Lineer Eşitlik ve Korelasyon Katsayısı**	**NBT Yöntemine Göre Hesaplanan IC_{50} değerleri (µM)**
Kateşin (CAT)	$y=86x\ 10^{6}c - 14.04$ r= 0.971	0.74±0.02
Kuersetin (QR)	$y=10x10^{7}c + 29.27$ r=0.936	0.20±0.02
Epigallo kateşin gallat (EGCG)	$y=17x10^{7}c + 40.33$ r=0.912	0.05±0.04
Ferulik Asit (FA)	$y=80x10^{6}c + 7.40$ r=0.975	5.29±0.24
Elajik Asit (EA)	$y= 96x10^{6}c - 35.24$ r= 0.916	0.15±0.03
Gallik Asit (GA)	$y=94x10^{5}c + 29.08$ r=0.920	0.22± 0.12

Ortalama ±SD (n=3)

Süprücü bileşiklerin AuNP-SOSA ve NBT yöntemlerine göre IC_{50} değerleri hesaplanmış olup Tablo 4.8'de belirtilmektedir.

Tablo 4.8: AuNP-SOSA ve NBT yöntemlerine göre elde edilen süpürücü bileşiklerin IC_{50} değerleri.

SüpürücüBileşikler	**AuNP-SOSA YöntemineGöre Hesaplanan IC_{50} değerleri (µM)**	**NBT Yöntemine Göre Hesaplanan IC_{50} değerleri (µM)**
Kateşin (CAT)	0.81 ± 0.09	0.74±0.02
Kuersetin (QR)	7.01 ± 0.09	0.20±0.02
Epigallo kateşin gallat (EGCG)	0.53± 0.02	0.05±0.04
Ferulik Asit (FA)	14.60 ± 0.30	5.29±0.24
Elajik Asit (EA)	4.05± 0.12	0.15±0.03
Gallik Asit (GA)	14.5± 0.41	0.22± 0.12

p=0.05 için $F_{deneysel}$= 0.0884, F_{tablo} = 4.7472, $F_{deneysel} < F_{tablo}$

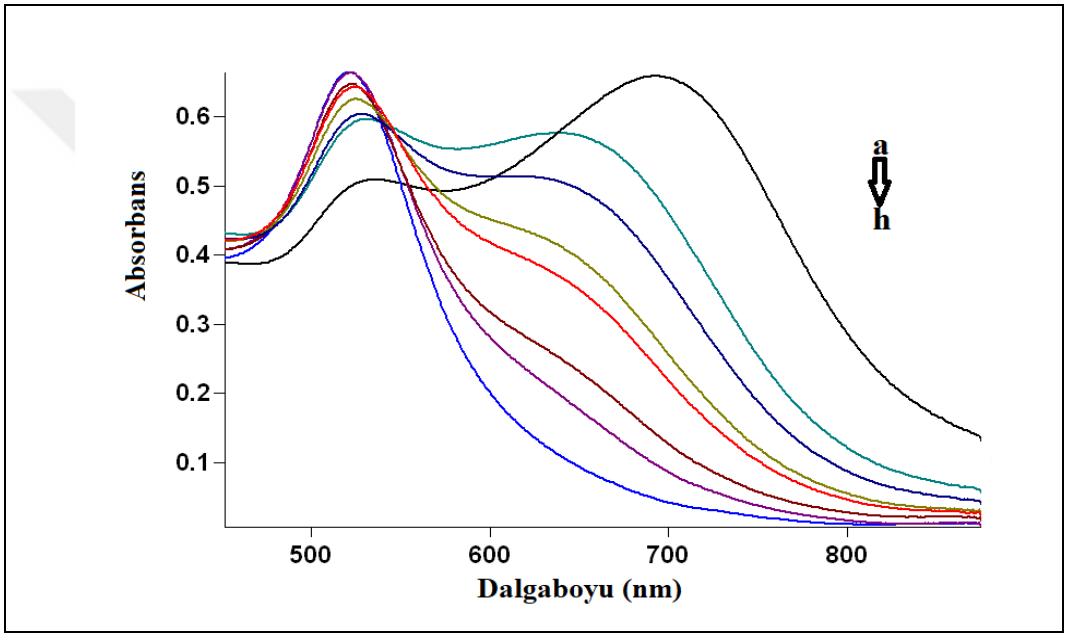
Ortalama ±SD (n=3)

4.4.BİTKİ ÇAYLARININ SÜPEROKSİT ANYON RADİKAL SÜPÜRME AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

4.4.1. AuNP-SOSA Yönteminin Bitki İnfüzyonlarına Uygulanması

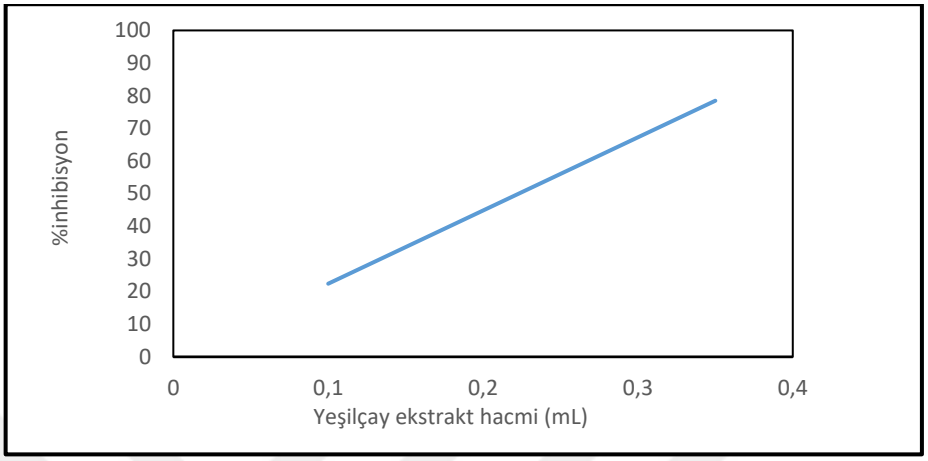
AuNP-SOSA yöntemine göre gerçek örnek çalışmaları için lokal marketlerden alınan paket yeşil çay, ada çayı, ıhlamur ve rezene çayları kullanıldı. Hazırlanan çay infüzyonlarına Bölüm 3.4.1'de anlatılan şekilde yöntem uygulandı.

Yeşil çayın AuNP-SOSA yöntemine göre görünür alan spektrumu Şekil 4.11'te belirtilmektedir.



Şekil 4.11: 1:15 oranında seyreltilmiş yeşil çay infüzyonunun AuNP-SOSA yöntemine göre süperoksit anyon radikali varlığında ve yokluğunda görünür alan spektrumları (a) süperoksit anyon radikali yokluğundaki referans, (b) 0.35 mL yeşil çay, (c) 0.30 mLyeşilçay, (d) 0.25 mLyeşil çay, (e) 0.2 mL yeşil çay, (f) 0.15 mL yeşil çay (g) 0.1mL yeşil çay, (h) süperoksit anyon radikali varlığındaki referans.

1:15 oranında seyreltilmiş olan yeşilçay ekstraktının AuNP-SOSA yöntemine göre hesaplanan % inhibisyon değerleri ile ekstrakt hacmi arasındaki ilişki Şekil 4.12'da gösterilmektedir.

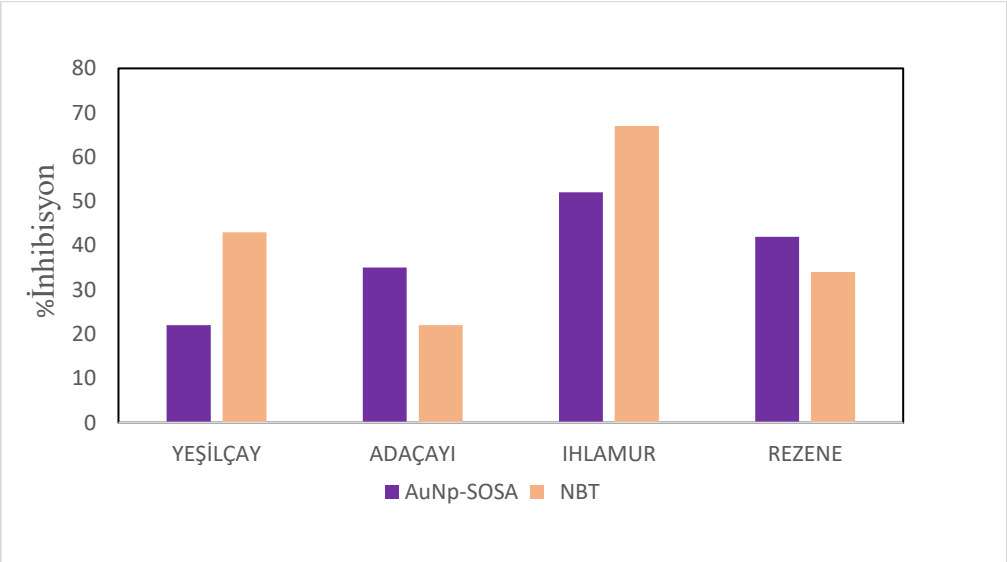


Şekil 4.12: 1:15 oranında seyreltilmiş yeşil çay infüzyon %inhibisyon değerleri ve hacmi arasındaki ilişki.

4.4.2. NBT Yönteminin Bitki İnfüzyonlarına Uygulanması

NBT yöntemine göre gerçek örnek çalışmaları için lokal marketlerden alınan paket yeşilçay, adaçayı, ıhlamur ve rezene çayları kullanıldı. Hazırlanan çay infüzyonlarına Bölüm 3.4.2'de anlatılan şekilde NBT yöntemi uygulandı.

Gerçek örnek numunelerinin hem NBT yöntem hem de geliştirilen AuNP-SOSA yöntemine göre %inhibisyon değerleri karışılaştırılması Şekil 4.13'te belirtilmektedir.



Şekil 4.13: 1:15 oranında seyreltilmiş 0.7 ml gerçek örnek numunelerinin % inhibisyon değerleri.

5. TARTIŞMA

Reaktif oksijen türleri oksijenden türetilen serbest radikallerdir. Reaktif oksijen türlerinin hücre zarını, DNA, RNA gibi genetik yapıları bozarak hücrelerde bozukluklara sebep olmaktadırlar (Eken, 2012). Süperoksit anyon radikalleri de bir çeşit reaktif oksijen türüdür, oksijen molekülünün (O_2) bir elektron alıp indirgenmesi sonucunda oluşur. Dolayısıyla oksidatif hasara sebep olduğu için bulunduğu ortamdan uzaklaştırılması, inhibe edilmesi önem taşımaktadır. Antioksidanlar, serbest radikalleri inhibe eden veya söndüren moleküllerdir. Reaksiyonları ve hücresel hasarı geciktirir veya engeller (Nimse ve Pal, 2015). Nanomateryaller, antioksidan varlığında reaktif oksijen türlerinin süpürülmesi dedeksiyonu gibi birçok güncel yöntemlerin gelişmesine katkıda bulunurlar ve geleneksel yöntemlere kıyasla daha hızlı ve kullanışlı yöntemler gelişmesine yardımcı olurlar. Soy metal nanoparçacıkların (NP) kullanımı, analitik kimyada nanomalzemelerin en son uygulamalarından birisi olarak bilinmektedir. Bu yöntemler metal, iyonlarını kolloidal dispersiyonlar şeklinde metal NP'lere indirgenmeye dayanır (Güngör, 2014).

Bu tez çalışmasında antioksidan bileşiklerin süperoksit anyon radikal ($O_2^{\cdot -}$) süpürme aktivitelerini belirlemek için altın nanoparçacık esaslı yeni bir kolorimetrik yöntem geliştirilmiştir. Altın nanoparçacık üretimi, Turkevich ve diğ. (1951) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak trisodyumsitrat varlığında Au (III) atomlarının Au (0)'a indirgenmesi ve stabilize edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntemde kullanılan AuNP, DTT ve fosfat tamponu miktarları optimize edilmiştir. AuNP çözeltisinden 0.5-3.0 mL aralığında değişen miktarlarda reaksiyon karışımına eklendiğinde en yüksek absorbans değeri 1.0 mLAuNP için ölçülmüştür (Şekil 4.1). Benzer şekilde reaksiyon karışımına, değişen miktarlarda DTT (0.1-0.4 mL) ve fosfat tamponu (0.5-2.5 mL) ilavesi sonucunda en yüksek absorbans değerleri sırasıyla 0.2 mL ve 1.0 mL değerlerinde ölçülmüştür (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Antioksidan bileşik (süpürücü) varlığında ve yokluğunda ölçülen absorbans şiddetleri arasındaki fark % inhibisyon değerinin hesaplanması için yeterli olduğundan inkübasyon süresi on beş dakika olarak belirlenmiştir. AuNP-SOSA yönteminde, inkübasyon işlemi sonrasında reaksiyon ortamına ilave edilen AuNP'nin agregasyonunun sadece reaksiyon ortamında okside olmadan kalan DTT'den kaynaklandığını göstermek için reaksiyon karışımındaki maddelerin ikili, üçlü karışımları hazırlanarak görünür alan spektrumları Şekil 4.4'te verilmiştir. Buna göre, hazırlanan karışımların absorbans değerleri beklenildiği gibi ölçülmüş olup sadece Co^{2+}/H_2O_2

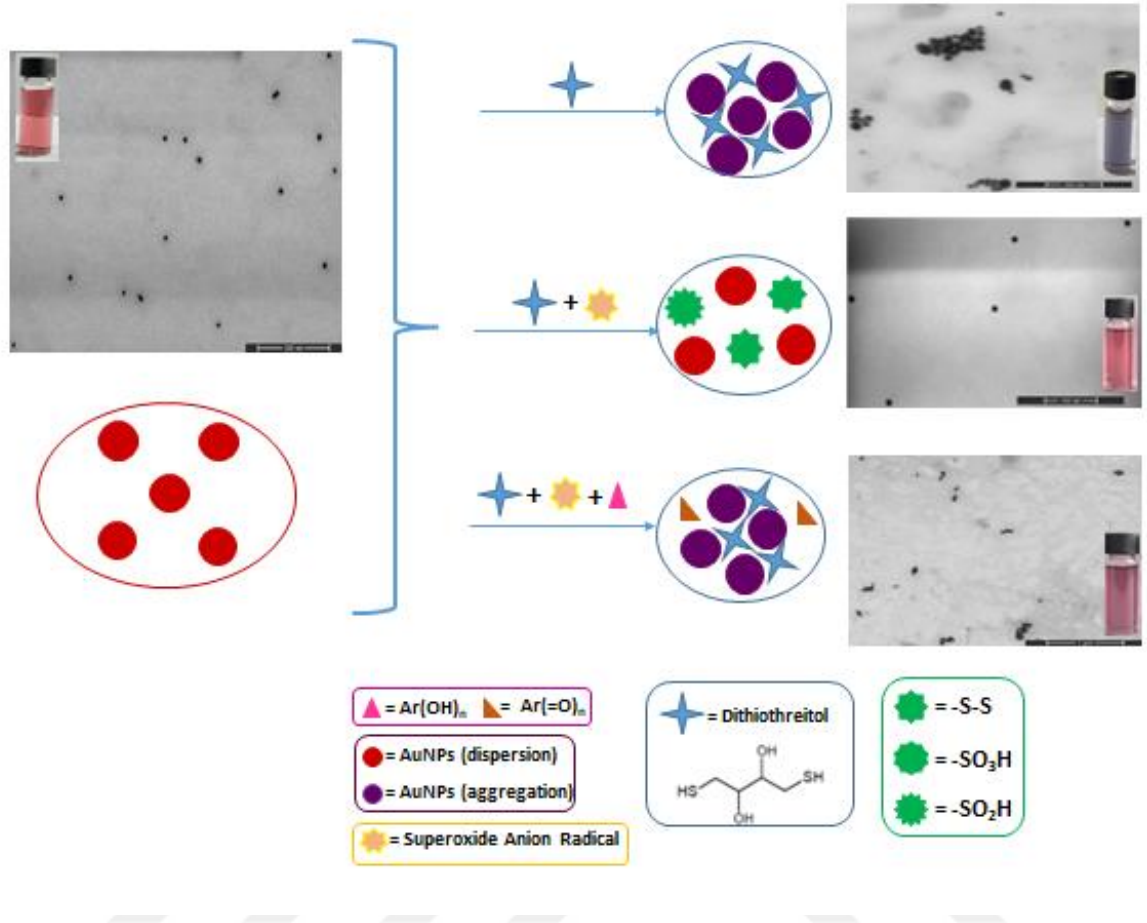
karışımını içeren tüpte AuNP'nin 675 nm'deki absorbans değeri yaklaşık 0.6 beklenilirken 0.4 olacak şekilde daha düşük ölçülmüştür. Bunun nedeni Co^{2+}/H_2O_2 karışımından hidroksil radikal üretiminin gerçekleşmesi ve son derece reaktif olan bu radikallerin reaksiyon ortamında bulunan DTT'yi okside ederek AuNP'nin agregasyonunu kısmen engellemesi olarak düşünülmektedir.

AuNP'lerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülerinden düzgün dağılmış nanoparçacıkların ortalama 9-10 nm boyutunda monodispers ve küresel şekilde olduğu görülmektedir (Şekil 4.5a).

SO süpürülmesine dayalı antioksidan aktivite tayini için geliştirilen AuNP-SOSA yönteminin esası, AuNP'lerin anti-agregasyonuna dayanmaktadır. DTT, güçlü kovalent S-Au bağı ve çapraz bağlanma yeteneğine sahip olduğundan AuNP'lerin agregasyonuna sebep olmaktadır (Şekil 4.5b). Sitrat stabilize hazırlanan altın nanoparçacıkların maksimum absorpsiyon (λ_{max}) spektrumu, yüzey plazmon rezonansını (SPR) ortaya çıkaran 520 nm'de ölçülmüştür (Şekil 4.6).

Sitrat kaplı Au-NP ile DTT reaksiyona girdiği zaman, DTT'nin tiyol grupları ile AuNP yüzeyinde bulunan sitratlar yer değiştirecektir. Dolayısıyla Au-S bağları oluşup Au-NP'ı agregasyona uğratacaktır. Burada renk mavi mora dönüşür (Lu ve diğ., 2013).

Şekil 5.1'de AuNP-SOSA yönteminin şematik olarak gösterimi verilmiştir.



Şekil 5.1: AuNP yönteminin şematik gösterimi.

Agregasyon nedeniyle reaksiyon çözeltisinde meydana gelen kırmızıdan maviye renk değişimi çıplak gözle gözlenebilmekte ve AuNP'ye ait maksimum absorpsiyon spektrumu 675 nm'de ölçülmektedir. DTT, fosfat tamponu ve AuNP'den oluşan reaksiyon karışımına ait görünür alan spektrumu Şekil 4.7a'da görülmektedir. Bununla birlikte reaksiyon ortamına $NaHCO_3/Co^{2+}/H_2O_2$ sistemi ile üretilen SO radikalleri ilave edildiğinde, DTT'nin sahip olduğu tiyol grupları kolaylıkla okside olacaktır (Winterbourn veMetodiewa,1999). Bu oksidasyon sonucunda elde edilen oksidatif türevlerin (disülfit bağları ve sülfinik asit) negatif yüklü AuNP yüzeyi üzerinde kimyasal olarak soğurulamaması nedeniyle, SO içermeyen referans çözeltide meydana gelen renk değişimi SO varlığında gözlenmeyecektir (Şekil 4.7b). DTT ve $NaHCO_3/Co^{2+}/H_2O_2$ sisteminden oluşan reaksiyon karışımına değişen miktarlarda antioksidan çözeltisi ilave edilip 15 dakika 37°C'lik inkübasyon işlemi uygulandığında, artan antioksidan konsantrasyonuna bağlı olarak reaksiyon ortamında kalan DTT miktarı artacaktır. Çünkü $NaHCO_3/Co^{2+}/H_2O_2$ sistemi ile oluşturulan SO radikalleri antioksidan bileşik tarafından süpürüleceğinden SO radikalleri ile DTT arasındaki oksidasyon reaksiyonu kısmen

engellenecek ve reaksiyon ortamına eklenen DTT, antioksidan bileşik içermeyen reaksiyon karışımındaki kadar okside olamayacaktır. İnkübasyon sonrasında reaksiyon karışımına AuNP çözeltisinin eklenmesi sonucunda ilgili antioksidan bileşiğin süpürme aktivitesi ve konsantrasyonuna bağlı olarak 675 nm'de ölçülen absorbans değerleri değişmektedir. Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9'da görüldüğü üzere görünür alan spektrumlarında artan antioksidan konsantrasyonlarıyla renk açık pembeden mavi-mora doğru kaymış dolayısıyla 675nm'deki absorbans değerleri de doğru orantılı olarak artmıştır. Antioksidanların SO radikallerini direkt olarak süpürebildiği bilinmektedir (Zhishen ve diğ., 1999). Dolayısıyla ortamda artan antioksidan miktarları ile SO radikalleri daha fazla süpürülmüştür bu yüzden DTT oksidasyona uğrayamamış ve yeniden AuNP'ı agregasyona uğratmıştır

AuNP'nin 675 nm dalgaboyunda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak çeşitli antioksidan bileşikler için Eşitlik 3.1 ile % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Antioksidan konsantrasyonu ile % inhibisyon kullanılarak çizilen grafikten elde edilen doğru denkleminden IC_{50} (radikalin yüzde ellisinin inhibe edildiği konsantrasyon) değerleri µM cinsinden hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

Benzer şekilde geliştirilen AuNP-SOSA yönteminin enzimatik SO radikal üretim yöntemi olan ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle de kullanılabilirliğini göstermek amacıyla kuersetin için IC_{50} değeri 27.5 µM olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde, SO radikallerinin enzimatik yöntemle üretildiği literatürdeki bir çalışmada kuersetin için IC_{50} değeri 30.3 µM olarak rapor edilmiştir (Hu ve diğ., 1995). Flavonoidlerin tek elektron transferi ile SO ve hidroksil radikallerini direkt olarak süpürebildiği bilinmektedir (Zhishen ve diğ., 1999). Hu ve diğerleri (1995) yaptıkları çalışmada flavonoidlerin SO radikal süpürme aktivitelerinin moleküler yapıyla ilişkili olduğunu vurgulamıştır. Bu çalışmada B halkasındaki hidroksil gruplarının sayısının artmasıyla süpürme kabiliyetinin arttığı, C3 konumunda hidroksil grubunun varlığının olumlu katkı yaptığı ve B halkası üzerinde bir kateşol (B halkasında o-dihidroksi) parçasına sahip flavonoidlerin aktivite sırası kateşin>taksifolin>kuersetin olarak rapor edilmiştir. Bu durum, hem doymuş bir C2-C3 bağının hem de C4 konumunda karbonil grubunun yokluğunun süperoksit süpürme aktivitesini geliştirdiğini gösterir (Hu, 1995). AuNP-SOSA yöntemi ile elde edilen IC_{50} değerleri referans yöntem olarak seçilen NBT yöntemi sonuçları ile Tablo 4.8'de görülmektedir. Deneysel bulgular %95 güvenilirlik düzeyinde benzerlik göstermektedir ($p=0.05$ için $F_{deneysel}= 0.0884$, $F_{tablo} = 4.7472$, $F_{deneysel}<F_{tablo}$). AuNP-SOSA yöntemi kullanılarak çeşitli bitki çayı infüzyonlarının SO radikal süpürme aktiviteleri belirlenmiştir. AuNP-SOSA yönteminde

çalışılan antioksidan bileşiklerinin IC_{50} değerleri büyükten küçüğe doğru ferulik>gallik asit>kuersetin>elajik asit>kateşin>epigallo kateşin gallat olarak hesaplanırken NBT yönteminde ise büyükten küçüğe ferulik asit>kateşin>gallik asit>kuersetin>elajik asit>epigallo kateşin gallat olarak hesaplanmıştır.

AuNP-SOSA yönteminde çalışılan antioksidan bileşikler arasında en düşük ve en yüksek IC_{50} değerleri sırasıyla EGCG (0.53 µM) ve ferulik asit (14.60 µM) olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde NBT yönteminde de en düşük ve en yüksek IC_{50} değerleri sırasıyla EGCG (0.05 µM) ve ferulik asit (5.29 µM) olarak hesaplanmıştır. Nanjo ve diğ., (2014) yapmış oldukları çalışmada en düşük IC_{50} değeri (1.8 µM) epigallo kateşin gallat için tespit etmişlerdir. B halkasında 3 pozisyonunda bir galloil parçasının varlığının, radikal süpürme yeteneğinin etkinliğini korumada önemli rolü olduğu belirtilmiştir. Unno ve diğ., (2000) ise yapmış oldukları çalışmada çay kateşinlerini incelemiş ve benzer şekilde epigallo kateşin gallat'ın IC_{50} değerini en az olarak bulmuşlardır. Bununla beraber çay kateşinlerinin flavan iskeletinin B-halkasına bağlı 3',4',5'-trihidroksil gruplarının varlığı, 3',4'-dihidroksil gruplarına kıyasla radikal süpürme etkinliklerini daha fazla arttırdığı tespit edilmiştir. Epigallo kateşin gallatın C halkasında bulundurğu trihidroksillerin süpürme etkinliğinde avantajı fazladır. Literatürde belirtildiği gibi kateşinin aktivitesi kuersetinden yüksek bulunmuştur ve tez için geliştirilen yöntem bu sonuçlarla desteklenmiştir.

Yöntemde farklı bir SO radikal sentezi sistemi olan X-XO ile çalışılmış sonuçlar AuNP-SOSA yöntemine benzer çıkmıştır. Böylece tez yöntemi bir başka yöntem ile de desteklenmiştir (Şekil 4.9).

Şekil 4.11'de artan yeşil çay infüzyon hacmi ile % inhibisyon değerinin arttığı görülmektedir. Ayrıca yeşil çay, adaçayı, rezene ve ıhlamur infüzyonları için hesaplanan % inhibisyon değerleri Şekli 4.13'te referans NBT yöntemi ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. AuNP-SOSA yönteminde çalışılan bitki çayı infüzyonları için yeşil çay> ada çayı>rezene> ıhlamur sırasıyla SO süpürme aktiviteleri artış göstermektedir. NBT yönteminde ise sırasıyla adaçayı> rezene>yeşilçay> ıhlamur SO süpürme aktiviteleri artış göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında antioksidan bileşiklerin süperoksit anyon radikallerini süpürme etkinliği ölçümü için altın nanoparçacık esaslı yöntem geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem SO süpürmesine dayalı ilk altın nanoparçacık esaslı yöntem olup kolorimetrik sensör olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Kolorimetrik yöntemlerin, zahmetli ön işlemlere ve pahalı enstrümantasyona gerek duymama ve tespit sinyalinin çıplak gözle görülebilmesi gibi avantajları vardır. Referans yöntem olarak kullanılan NBT yöntemi, renkli son ürün olan diformazanın çözünürlük sorunları ve üretilen radikal ile etkileşim nedeniyle önemli dezavantajlara sahiptir. SO radikal üretimi $NaHCO_3/Co^{2+}/H_2O_2$ sistemi ile gerçekleştirilerek yöntem daha ekonomik ve pratik olarak tasarlanmakla birlikte enzimatik radikal üretim yöntemi olan ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile SO radikal üretimi geliştirilen yönteme başarılı şekilde adapte edilmiştir.

Ayrıca geliştirilen yöntem kullanılarak gıda maddeleri ve biyolojik numuneler gibi çeşitli matrislerin SO radikal süpürme etkinliği, bu nanosensör kullanılarak basit bir spektrofotometre veya kolorimetre kullanılarak uygun ve ekonomik bir şekilde belirlenebilir ve yöntem süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin belirlenmesi için klinik prosedürlere kolayca uyarlanabilir. Bu yöntem, sadece süperoksit anyon radikalinin değil hastalıklara neden olan diğer reaktif oksijen türlerini de hassas ve nicel bir şekilde algılama kapasitesine sahiptir.

Bundan sonraki çalışmalarda, SO varlığında ve yokluğunda AuNP'lerin görünür alan spektrumundaki bu değişimden faydalanarak hem SO radikallerinin dedeksiyonu hem de başka antioksidan bileşiklerin SO radikal süpürülmesine dayalı antioksidan aktivite tayini yapılabilir. Geliştirilen bu yöntem geleneksel yöntemlere göre daha hızlı, hassas, güvenilir, yenilikçi olmasından dolayı literatüre çokça katkıları olacaktır.

KAYNAKLAR

Agbe, H., Raza, N., Arhin, D.D., Kumar, R.V., Kim, K.H., 2019, A Simple Sensing Of Hazardous Photo-İnducedSuperoxideAnionRadicals Using A Molecular Probe In Zno-NanoparticlesAqueousMedium, *Environmental Research*,176,108424.

Baykara, T. 2016, Nanoteknolojiler Dünyasına Doğru, 1. Basım, Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara, 456 s.

Bekdeşer, B., 2012, *Biyolojik Örneklerde Reaktif Oksijen Türleri Süpürme Etkinliği Ölçümü İçin Spektrofotometrik Yöntemler Geliştirilmesi*, Doktora, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schıffrın, D.J., Whyman, R. 1994, Synthesis of thiol-Derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 7, 801-802.

Boisselier, E., Astruc, D. (2009), Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations İmaging diagnostics the rapiesand toxicity, *Chemica lsociety reviews*, 38(6), 1759-1782.

Choi, H.S., Kim, J.W., Cha, Y., Kim, C., 2006, A quantitativenitrobluetetrazoliumassay for determining ıntracellular superoxide anion production in phagocyticcells, *Journal of Immunoassay&Immunochemistry*, 27, 31-44.

Cai, W., Gao, T., Hong, H., Sun, J., 2008, Applications of goldnanoparticles in cancer nanotechnology, *Nanotechnology Science And Applications*, 1, 17.

Carocho, M., Ferreria, C.F.R.I., 2013, A review on antioxidants, prooxidant sandrelated controversy: Natural and syntheticcompounds, screening and analysis methodologies and future perspectives, *Food and Chemical Toxicology*, 51, 1525.

Çağlayan, M.G., 2014, *Aminoglikozidlerin Altın ve Gümüş Nanoparçacıklar Kullanılarak Spektroskopik Tayinleri*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Daniel M.C., Astruc D., 2004, Gold nanoparticles: Assembly, SupramolecularChemistry Quantum-Size-RelatedProperties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology, *Chem. Review*,104 (1), 293-346.

Dolez, P.I.,2015, *NanomaterialsDefinitions, Classifications, and Applications*, Nanoengineering, Global Approaches to health and Safety Issues, Chapter 1.1, Elsevier, 3-40.

Ealias, A. M., Saravanakumar, M. P., 2017, A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application, *In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 14th Icset, Iop Publishing, 263(3), 032019.

Eken, A., 2012, Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri, *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 69-73.

Elahi, N., Kamali, M., Baghersad, M. H. 2018, Recent biomedical applications of gold nanoparticles :A review, *Talanta*, 184, 537-556.

Erden, P., 2010, *Ksantinve Ürik Asit Tayini İçin Farklı Medyatörlü Modifiye Karbon Pasta Enzim Elektrotların Hazırlanması,* Doktora, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Eustis, S., El-Sayed, M. A., 2006, Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of differentshapes, *Chem. Soc. Rev*., 35, 209−217.

Feldheım, D.L., Foss, C.A., 2002, Metal Nanoparticles, synthesis, characterization and applications, *Marcel DekkerInc*. New York, USA.

Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., Vandenabeele, P., 1999, More than one waytodie: apoptosis, necrosisand reactive oxygen damage, *Oncogene*, 18, 7719–7730.

Gryglewski, R.J., Palmer, R.M., Moncada, S., 1986, Superoxideanion is involved in the breakdown of end othelium-derived vascular relaxing factor, *Nature*,320, 454–456.

Güngör, N., 2014, *Antioksidanlara Duyarlı Soy Metal Nanoparçacık Esaslı Yeni Sensörler Geliştirilmesi*, Doktora, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Hu, J. P., Calomme, M., Lasure, A., De Bruyne, T., Pieters, L., Vlietinck, A.,Vanden Berghe, D. A. (1995), Structure-activity relationship of flavonoid swith superoxide scavenging activity, *Biologicaltrace element research*, *47*(1), 327-331.

Hulla, J., Sahu, S., Hayes, A. 2015, Nanotechnology: history and future, *Human and Experimental Toxicology*, 34 (12), 1318-1321.

Ilan, Y.A., Czapskı, G., Meısel, D., 1976, Theone-electron transfer redox potentials of free radicals. I. The oxygen/superoxide system, *Biochimica et Biophysica Acta*, 430, 209-224.

Jana, N. R., Gearheart, L., Murphy, C. J., 2001, Wet chemical synthesis of high a spectra tiocylindrical gold nanorods, *Th eJournal of Physical Chemistry B*, 105(19), 4065-4067.

Jensen, PK., 1966, Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles II. Steroideffects, *Biochim Biophysica Acta* 122(19), 167–174.

Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P., 2009, Characterization of size, surface charge, and agglomerationstate of nanoparticle dispersions for toxicological studies,*Journal of Nanoparticle Research*, 11, 77–89.

Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R, Shangari, N., O'Brien, P.J., 2005, Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, andtoxins: Focus on electron transfer, free radicals, ands tructure-activity relationships, *Current Medicinal Chemistry*, 12(22), 2601-2623.

Kirgöz, Ü.A., Timur, S., Wang, J. and Telefoncu, A. 2004, Xanthine oxidase modified glassy carbon pasteel ectrode, *Electrochemistry Communications*, 6, 913−916.

Kim, T., Lee, C.H., Joo, S.W., Lee, K., 2008, Kinetics of gold nanoparticle aggregation: experiments and modeling, *Journal of Colloid and Interface Science*, 318, 238–243.

Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., Plech, A., 2006, Turkevich method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 15700-15707.

Kara Z., William E. G., Sanjeev K., Marie-Christine D., 2012, Effect of high gold salt concentrations on the size and poly dispersity of gold nanoparticles prepared by an extended Turkevich–Frens method, *Gold Bull*, 45, 203-211.

Köksal, E., Gülçin, İ., Beyza, S., Sarıkaya, Ö., Bursal, E., 2009, InVitro Antioxidant Activity Of Silymarin, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(2), 395–405.

Lakshmanan, A., Umamaheswari, C., Nagarajan, N. S., 2016, A facilephyto-mediated synthesis of gold nanoparticle susing aqueous extract of Momordicacochinchinensisrhizome and their biological activitie, *Journal of Nano science and Technology*, 76-80.

Li, C., Li, D., Wan, G., Xu, J., Hou, W.,2011, Facile synthesis of concentrated gold Nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls, *Nanoscale Research Letters*, 6, 440.

Loschen, G., Azzı, A., Rıchter, C., Plohı, L.,1974, Superoxide Radicals As Precursors Of Mitochondrial Hydrogen Peroxide, *Febs Letters*, 42(1), 68-72.

Lu, L., Zhang, J., Yang, X., 2013, Simple and selective colorimetric detection of hypochlorite based on anti-aggregation of gold nanoparticles, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 184, 189-195.

Mahesh, V.K., Singh, K.S., Gulati, M., 2014, A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of nano suspensions of glipizide, *Powder Technology*, 256, 436-449.

Mansoori, G. A., Soelaiman, T. F., 2005, Nanotechnology-an introduction for the standards community, *Journal of ASTM International*, 2(6), 1-22.

Mie, G., 1908, Beiträgezur Optik trüberMedien, speziell kolloidaler metallösungen, *Annalen der Physik*, 330, 377-445.

Mıller, C. J.,Serrato, R.,Cardenas, R.M.J., Kundahl G.,2005, *The Handbook of Nanotechnology*, New Jersey, ISBN: 978-0-471-66695-0.

Moores, A., Goettmann, F., 2006, The plasmon band in noble metal nanoparticles: an introduction to the oryand applications, *New Journal of Chemistry*, 30, 1121-1132.

Nanjo, F., Mori, M., Goto, K., Hara Y., 2014, Radical Scavenging Activity of Tea Catechins and Their Related Compounds, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry,* 63 (9), 1621-1623

Niazov T., Pavlov V., Xiao Y., Gill R., Willner I., 2004, *Nano. Lett.*,4, 1683.

Nimse, S.B., Pal, D., 2015, Free radicals natural antioxidants and their reaction mechanism *The Royal Society of Chemistry,* 5, 27986-28006.

Nishikimi, M., Rao, Na., andYagi, K., (1972), The occurance of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 46(2), 849-854.

Noruzi, M., 2015, Biosynthesis of gold nanoparticles using plantextracts, *Bioprocessand Biosystems engineering*, 38(1), 1-14.

Oberdörster, G., Oberdörster, E., Oberdörster, J., 2005, Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultra fine particles, *Environ Health Perspect* 113(7), 823-39.

Okan, O.T., Varlıbaş, H., Öz, M., Deniz, İ., 2013, Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler, *Orman Fakültesi Dergisi,* 13(1), 48-59.

Ovais, M., Raza, A., Naz, S., Islam, N. U., Khalil, A. T., Ali, S., Shinwari, Z. K., 2017, Current state and prospects of the phyto synthesized colloidal gold nanoparticles and their applications in cancer the ranostics, *Applied microbiology and biotechnology*, 101(9), 3551-3565.

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(1), 79-92.

Patil, M. P., Ngabire, D., Thi, H. H. P., Kim, M. D., Kim, G. D., 2017, Eco-friendly synthesis of gold nanoparticles and evaluation of their cytotoxic activity on cancer cells. *Journal of Cluster Science*, 28(1), 119-132.

Pei, J., Li, X., 2000, Xanthine and hypoxanthine sensors based on xanthine oxidase immobilized on a $CuPtCl_6$ chemically modified electrode and liquid chromatography electrochemical detection, *Anal.Chim. Acta*, 414, 205–213.

Peiris, S., Mcmurtrie, J., Zhu, H., 2016, Metal nanoparticle photocatalysts: emerging processes for green organic synthesis, *Catal. Sci. Technol*., 6, 320-338.

Poh, T.Y., Ali N.A.B.M., Aogáin, M.M., Kathawala, M.H., Setyawati, M.I., Ng, K.W., Chotirmall, S.H., 2018, Inhaled nanomaterials and there spiratory microbiome: clinical, immunological and toxicological perspectives, *Particle and Fibre Toxicology*, 15 (46).

Qu, L.L., Li, D.W., Qin, L.X., Mu, J., Fossey, J.S., Long, Y.T., 2013, Selective and sensitive detection of intracellular O2(*-) using AuNPs/cytochrome c as SERS nanosensors, *Analytical Chemistry*, 85, 9549–9555.

Rawat, R.S., 2015, Dense Plasma Focus – From Alternative Fusion Source toVersatile High Energy Density Plasma Source for Plasma Nanotechnology, *Journal of Physics*, 591, 012021.

Ritchey, E.E., Wallin, J.D., Shah, S.V., 1981, Chemiluminescence and superoxide anion production by leukocytes from chronichemodialysis patients, *Kidney International*, 19, 349-358.

Robak, J., Grylewskı, R.J., 1988, Flavonoids are scavengers of superoxide anions, *Biochemical Pharmacology*, 37, 837-841.

Sadeghian, R.B., Ostrovidov, S., Han, J., Salehi, S., Bahraminejad, B., Bae, H., Chen, M., Khademhossein A., 2016, Online Monitoring of Superoxide Anions Released from Skeletal Muscle Cells Using an Electrochemical Biosensor Based on Thick-Film Nanoporous Gold, *ACSSensors*, 1, 921-928.

Sawyer, D.T., Valentine, J.S,1981, How Super Is Superoxide, *Acc. Chem. Res.*,14, 393−400.

Seller, R.M., Simic, M.G., 1976, Pulseradiolysisstudy of ther eactions of some reduced metal ions with molecular oxygen in aqueous solution, *Journal of American Chemical Society*, 98, 6145-6150.

Shahverdi, A.R., Shakibaie, M., Nazari, P., 2011, *Basic and practical procedures for microbial synthesis of nanoparticles*, Metal nanoparticles in microbiology, In: Rai, M., Duran, N. (ed.), Berlin: Springer, 177–197.

Shankar, S. S., Rai, A., Ahmad, A., Sastry, M., 2004, Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Aucore–Agshell nanoparticles using Neem (Azadirachtaindica) leafbroth, *Journal Colloid Interface Science*, 275, 496–502.

Shu, M., Ying, Y., Yang, H., 2021 Reactive strategy-based SERS determination of O_2(-) Generated from sunscreen, *Chem. Commun*, 57, 1018–1021.

Soni, N., Prakash, S., 2014, Green nanoparticles form osquito control, *The Scientific World Journal*.

Swift, L. M., Sarvazyan, N., 2000, *Localization of dichlorofluorescin in cardiacmyocytes: İmplications forassessment of oxidativestress,* AmericanJournal of Physiology, 278(3), H982−H990.

Taubert, D., Breıtenbach, T., Lazar, A., Censarek, P., Harlfınger, S., Berkels, R., Klaus, W., Roesen, R., 2003, Reaction rate constants of superoxide scavengıng by plant antioxidants, *Fre eRadica lBiology&Medicine*, 35, 1599-1607.

Turkevich, J., Stevenson, P. C., Hillier, J. (1951), A study of the nucleat ion and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *Discussions of the Faraday Society*, 11, 55-75.

Unno, T., Sugimoto, A., Kakuda, T., (2000), Scavenging effect of tea catechins and their epimers on superoxide anion radicals generated by a hypoxanthine and xanthine oxidase system, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 601-606.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, T.D.M., Mazur, M., Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry& Cell Biology,* 39, 44-84.

Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., İzakovic, M., Mazur, M., 2006, Free Radicals, Metals And Antioxidants in Oxidative stress-induced Cancer, *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1-40.

Vericat, C., Vela, M.E., Benitez, G., Carro, P., Salvarezza R.C., 2010, Self assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system, *Chemical Society Reviews*, 39, 1805-1834.

Winterbourn, C. C., Metodiewa, D. (1999). Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogenperoxide. *Free Radical Biology and Medicine*, *27*(3-4), 322-328.

Wrıedt, T., 2012, Mie Theory: A Review, Eds: W. Hergertand T. Wriedt, In: The Mie Theory, Springer Series in Optical Sciences 169, DOI: 10.1007/978-3-642-28738- 1_2, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Xia, Y., Halas, N. J., 2005, Shape-controlled synthesis and surface plasmonicproperties of metallic nanostructures, *MRS Bulletin*, 30, 338-347.

Xu, C., Zhang, W., Wang, R., Tan, S., Holub, M.J., Tang, B., 2021, Versatile Gold-Coupled Te-Carbon Dots for Quantitative Monitoring and Efficient Scavenging of Superoxide Anions, *Analytical Chemistry*, 93, 9111-9118.

Zhang, Z., Chen, Z., Pan, D., Chen, L., 2015, Fenton-likeReaction-MediatedEtching of Gold Nanorodsfor Visual Detection of Co^{2+}, *Langmuir*, 31, 643-650.

Zhao, P. X., Li, N., Astruc, D.,2013, State of the art in gold nanoparticle synthesis, Coordination Chemistry Reviews, 257, 638–665.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999, The Determination of Flavonoid Contents in Mulberry and Their Scavenging Effects on Superoxide Radicals, *Food Chemistry*, 64, 555-559.

Zoroddu, M.A., Medici, S., Ledda, A., Nurchi, V.M., Lachowicz, J.I., Peana, M., 2014 Toxicity of nanoparticles, *Curr Med Chem.*,21(33), 3837-53.

4801190827_Eğsap YILDIRIM

ORİJİNALLİK RAPORU

%11	%9	%1	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%2
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%2
3	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	%1
4	www.ulusaltezmerkezi.net İnternet Kaynağı	%1
5	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
6	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
7	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
8	www.researchgate.net İnternet Kaynağı	<%1
9	webmail.stuba.sk İnternet Kaynağı	<%1

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

☐**Etik Kurul izni gerekmektedir.**

☒**Etik Kurul izni gerekmemektedir.**

Eğsap YILDIRIM
(İmza)

KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

☐**Kurum izni gerekmektedir.**

☒**Kurum izni gerekmemektedir.**

Eğsap YILDIRIM
(İmza)