



T. C.

ORDU ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Elaeagnus umbellata* ile KONJUGE EDİLMİŞ GÜMÜŞ  
NANOPARTİKÜLLERİNE MARUZ BIRAKILAN  
*Acanthamoeba castellanii* TROFOZOİTLERİNDE KİST  
SPESİFİK PROTEİN (CSP21) ve SELÜLOZ SENTAZ II  
(CSII) GENLERİNİN İFADE ANALİZİ

BÜLENT KAYNAK

DOKTORA TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ORDU 2024

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan ve kullanılan intihal tespit programının sonuçlarına göre; bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**Bülent KAYNAK**

**Bu çalışma Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün B2219 numaralı projesi ile desteklenmiştir.**

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

## ÖZET

### *Elaeagnus umbellata* ile KONJUGE EDİLMİŞ GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİNE MARUZ BIRAKILAN *Acanthamoeba castellanii* TROFOZOİTLERİNDE KİST SPESİFİK PROTEİN (CSP21) ve SELÜLOZ SENTAZ II (CSII) GENLERİNİN İFADE ANALİZİ

Bülent KAYNAK

ORDU ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ, 143 SAYFA

(TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Zeynep KOLÖREN)

Serbest yaşayan parazitlerden olan *Acanthamoeba* türleri, korneada ülserasyon ve görme kaybına (*Acanthamoeba* keratiti) ve akciğerleri de tutan Merkezi Sinir Sistemi (MSS) enfeksiyonuna (Granülomatöz amibik ensefaliti) neden olmaktadır. *Acanthamoeba* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde günümüzde kullanılan antiparaziter ilaçlar, göz ve MSS gibi bazı anatomik bölgelerde istenilen düzeyde etkin olamamaktadır. Hem kistlere hem de trofozoitlere karşı etkili bir ajanın varlığı da henüz kanıtlanmamıştır.

Çalışmada *Elaeagnus umbellata* Thunb. bitkisinin etanolik meyve özütünün (EU), bu özüt kullanılarak yeşil yolla sentezlenmiş ve karakterizasyon testleriyle (UV-Vis, EDX, SEM, FTIR) doğrulanmış gümüş nanopartiküllerin (AgNP'lerin) ve *E. umbellata* özütünde Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GS MS) ile varlığı saptanan Laurik Asit'in (LA), *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde yüzde (%) canlılık etkileri araştırılmıştır. Farklı koşullar altında *A. castellanii*'nin oksidatif stres enzimlerini kodlayan Süperoksit dismutaz (SOD) ve Katalaz (CAT) genleri ile parazitin pseudokist ve kist oluşumundan sorumlu sırasıyla Selüloz sentaz II (CSII) ve Kist spesifik protein (CSP21) genlerinin ekspresyonu Revers-Transkriptaz Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) ile analiz edilmiştir. EU'nun, LA'nın ve AgNP'lerin DNA koruyucu aktivitesi pBR322 Plazmid DNA'sı üzerinde test edilmiştir. Ayrıca EU'nun MTT Sitotoksikite testi HeLa hücre kültüründe yapılmıştır.

*E. umbellata* özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde 40mg/ml konsantrasyonda 24. saatin sonunda trofozoitlerin büyük bir bölümünde letal etki göstermiş, aynı konsantrasyonda 48. saatten sonra canlı trofozoite rastlanmamıştır. EU'nun 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0.9, 1.09 ve 1.15mg/ml olarak bulunmuştur. En yüksek canlılık 0.625mg/ml'de olurken en düşük canlılık ise 40mg/ml'de ölçülmüştür. En yüksek canlılık 24. saat sonunda olurken en düşük canlılık 72. saatin sonunda ölçülmüştür. Tüm özüt konsantrasyonlarının *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki % canlılık sonuçları, Temel Bileşenler Analizi (PCA) ile test edilmiştir. PCA analizine göre 40, 20, 10, 5 ve 2.5mg/ml'deki dozlar ile kontrol, 1.25 ve 0.625mg/ml dozlar arasında negatif korelasyon bulunmuştur.

Sentezlenen AgNP'ler, karakterizasyon testleri ile doğrulandıktan sonra *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde amoebisidal aktivitesi incelenmiştir. AgNP'lerin 20mM/ml konsantrasyonda 24. saatin sonunda trofozoitlerin büyük bir bölümünde letal etki gösterdiği, aynı konsantrasyonda 48. saatten sonra canlı trofozoite rastlanmadığı ve *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 0.65, 0.8 ve 1mM/ml olarak bulunmuştur. En yüksek canlılık 0.5mM/ml'de olurken en düşük canlılık ise 20mM/ml'de ölçülmüştür. Tüm AgNP konsantrasyonlarının PCA sonuçlarına göre 20, 10, 5, 1mM/ml'deki dozlar ile kontrol ve 0.5mM/ml dozu arasında negatif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmada, LA'nın *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde amoebisidal aktivitesi incelenmiştir. LA'nın 1mM/ml konsantrasyonda 24. saatin sonunda trofozoitlerin büyük bir bölümünde letal etki gösterdiği, aynı konsantrasyonda 48. saatten sonra canlı trofozoite rastlanmadığı belirlenmiştir. *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 0.19, 0.25 ve

0.34mM/ml olarak bulunmuştur. Tüm LA konsantrasyonlarının PCA sonuçlarına göre 1, 0.8, 0.6 ve 0.4mM/ml'deki dozlar ile kontrol ve 0.2mM/ml dozu arasında negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir.

Çalışmada EU'nun, LA'nın ve AgNP'lerin Hidroksil radikali (-OH) ile indüklenen DNA hasarını engelleme aktivitesi pBR322 plazmid DNA'sı ile incelenmiştir. EU'nun 5mg/ml konsantrasyonu ile LA'nın tüm konsantrasyonlarının (1, 0.8, 0.6, 0.4mM/ml) -OH tarafından oluşturulan DNA hasarını engelleme üzerine etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. AgNP'lerin tüm konsantrasyonlarının ise (20, 10, 5, 1, 0.5mM/ml) DNA hasarını engelleme üzerine etkilerinin bulunmadığı tespit edilmiştir.

Çalışmada EU'nun, etanolik meyve özütünün farklı konsantrasyonlarda (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312mg/ml) memeli hücreleri üzerine sitotoksik etkisi HeLa hücre hattı kullanılarak MTT analizi ile değerlendirilmiştir. EU'nun, doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Ancak 72. saatin sonunda en yüksek konsantrasyonda (40mg/ml) dahi hücrelerin yarıdan fazlası (%53.82) için sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir. IC<sub>50</sub> değerinin 40mg/ml'den daha yüksek dozlarda bulunabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada metanol ile strese maruz bırakılan *A. castellanii* trofozoitleri ile EU, AgNP's ve LA ayrı olarak muamele edilmiş ve sadece metanol ile strese maruz bırakılan pozitif kontrol (PK) ve hiçbir maddeye maruz bırakılmayan kontrol (K) ile karşılaştırmalı yapılan çalışmalarla araştırılmıştır. Buna göre CSII geninin ekspresyonunda en fazla inhibitör etkiyi 1.88±0.94 ile EU gösterirken en fazla inhibisyon 30. dakikada 1.65±0.87 olarak ölçülmüştür. PCA analizi sonuçlarına göre; K, EU, AgNP's, LA ile PK arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir. Tüm koşullar ve uygulanan sürelerde ekspresyon verileri değerlendirildiğinde 30. dakikadaki ekspresyon eşik değeri olarak kabul edilmiştir CSP21 geninin ekspresyonunda en fazla inhibitör etkiyi 2.64±0.73 ile LA gösterirken en fazla inhibisyon 24. saatte 2.56±1.05 olarak ölçülmüştür. PCA analizi sonuçlarına göre; K, EU, AgNP's, LA ile PK arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir. Tüm koşullar ve uygulanan sürelerde ekspresyon verileri değerlendirildiğinde 24. saatteki ekspresyon eşik değeri olarak kabul edilmiştir.

*A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu gen CAT'ın ekspresyonu bakımından incelendiğinde; PK, K ve CAT'ın spesifik inhibitörü olan 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) ile karşılaştırıldığında, gruplar içinde en fazla inhibitör etkiyi 2.25±0.83 ile EU gösterirken en fazla inhibisyon 1. saatte 2.33±0.90 olarak ölçülmüştür. PCA analizi sonucuna göre; K, EU, LA, 3-AT ile PK, AgNP's arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir. Tüm koşullar ve uygulanan sürelerde CAT geninin ekspresyonu üzerinde 30. dakika, 1. ve 12. saat dilimindeki değerler ile 2., 24. ve 48. saatlerdeki ekspresyon değerleri arasında negatif korelasyon görülmüştür. Diğer antioksidan aktiviteden sorumlu gen olan SOD'un ekspresyonu bakımından incelendiğinde; PK, K ve SOD'un spesifik inhibitörü olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile karşılaştırıldığında, gruplar içinde en fazla inhibitör etkiyi 1.86±0.63 ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gösterirken en fazla inhibisyon 30. dakikada 1.68±0.76 olarak ölçülmüştür. PCA analizi sonucuna göre K, AgNP's, EU, LA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile PK arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir. Tüm koşullar ve uygulanan sürelerde SOD geninin ekspresyonu üzerinde 30. dakika, 1. ve 48. saat ekspresyon değerleri ile 2., 12. ve 24. saat ekspresyon değerleri bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon görülmüştür.

*Acanthamoeba* türlerinin hem kistlerine hem de trofozoitlerine karşı etkili bir tedavinin varlığı henüz kanıtlanmamıştır. EU'nun, AgNP'lerin ve LA'nın *Acanthamoeba* kaynaklı hastalıkların tedavisinde alternatif ya da kombine tedavi yöntemleri için potansiyel aday olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Acanthamoeba castellanii*, *Elaeagnus umbellata*, Gümüş Nanopartikül (AgNP), Katalaz (CAT), Kist Spesifik Protein (CSP21), Selüloz Sentaz II (CSII), Süperoksit Dismutaz (SOD)

## ABSTRACT

### EXPRESSION ANALYSIS of CYST-SPECIFIC PROTEIN (CSP21) and CELLULOSE SYNTHASE II (CSII) GENES in *Acanthamoeba castellanii* TROPHOZOITES EXPOSED to SILVER NANOPARTICLES CONJUGATED with *Elaeagnus umbellata*

Bülent KAYNAK

ORDU UNI ORDU UNIVERSITY INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

PHD THESIS, 143 PAGES

(SUPERVISOR: Prof. Dr. Zeynep KOLÖREN)

*Acanthamoeba* species, which are free-living parasites, cause corneal ulceration and vision loss (*Acanthamoeba* keratitis) and Central Nervous System (CNS) infection (Granulomatous amoebic encephalitis) involving the lungs. Antiparasitic drugs currently used in the treatment of infections caused by *Acanthamoeba* species are not as effective as desired in some anatomical regions such as the eye and CNS. The existence of an effective agent against both cysts and trophozoites has not yet been proven.

In this study, ethanolic fruit extract (EU) of *Elaeagnus umbellata* Thunb., silver nanoparticles (AgNPs) synthesized by green method using this extract and confirmed by characterization tests (UV-Vis, EDX, SEM, FTIR), and Lauric Acid (LA), which was detected in *E. umbellata* extract by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GS MS), were investigated for their percentage (%) viability effects on *A. castellanii* trophozoites. Under different conditions, the expression of Superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT) genes encoding oxidative stress enzymes of *A. castellanii* and Cellulose synthase (CSII) and Cyst specific protein (CSP21) genes responsible for pseudocyst and cyst formation of the parasite, respectively, were analyzed by Reverse-Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR). DNA protective activity of EU, LA and AgNPs was tested on pBR322 plasmid DNA. In addition, the MTT Cytotoxicity assay of EU was performed on HeLa cell line.

*E. umbellata* extract had a lethal effect on *A. castellanii* trophozoites at a concentration of 40mg/ml at the end of 24 h. at the same concentration, no viable trophozoites were found after 48 h. The approximate IC<sub>50</sub> values of EU at 72, 48 and 24 hours were 0.9, 1.09 and 1.15mg/ml, respectively. The highest viability was measured at 0.625mg/ml and the lowest viability was measured at 40mg/ml. The highest viability was measured at the end of 24<sup>th</sup> hour and the lowest at the end of 72<sup>nd</sup> hour. The % viability results of all extract concentrations on *A. castellanii* trophozoites were tested by Principal Component Analysis (PCA). According to PCA analysis, there was a negative correlation between the doses at 40, 20, 10, 5 and 2.5mg/ml and the control, 1.25 and 0.625mg/ml doses.

After the synthesized AgNPs were confirmed by characterization tests, their amoebicidal activity on *A. castellanii* trophozoites was investigated. AgNPs at a concentration of 20mM/ml showed a lethal effect on most of the trophozoites at the end of 24 hours, no viable trophozoites were found after 48 hours at the same concentration and the approximate IC<sub>50</sub> values on *A. castellanii* trophozoites at 72, 48 and 24 hours were found to be 0.65, 0.8 and 1mM/ml, respectively. The highest viability was measured at 0.5mM/ml and the lowest at 20mM/ml. According to PCA results of all AgNP concentrations, doses at 20, 10, 5, 1mM/ml, control and 0.5mM/ml were negatively correlated.

In this study, the amoebicidal activity of LA on *A. castellanii* trophozoites was investigated. It was determined that LA at a concentration of 1mM/ml had a lethal effect on most of the trophozoites at the end of 24 hours and no viable trophozoites were found after 48 hours at the same concentration. The approximate IC<sub>50</sub> values on *A. castellanii* trophozoites at 72, 48 and 24 hours were 0.19, 0.25 and 0.34mM/ml, respectively. According to the PCA results of all LA concentrations, it was determined that

there was a negative correlation between the doses at 1, 0.8, 0.6 and 0.4mM/ml and the control and 0.2mM/ml doses.

In the present study, the activity of EU, LA and AgNPs in inhibiting Hydroxyl radical (-OH) induced DNA damage was examined with pBR322 plasmid DNA. It was found that 5mg/ml concentration of EU and all concentrations of LA (1, 0.8, 0.6, 0.4mM/ml) had effects on the inhibition of DNA damage induced by -OH. All concentrations of AgNPs (20, 10, 5, 1, 0.5mM/ml) were found to have no effect on the inhibition of DNA damage.

In the study, the amoebicidal activity of LA on *A. castellanii* trophozoites was examined. It was determined that LA had a lethal effect on the majority of trophozoites at the end of the 24<sup>th</sup> hour at a concentration of 1mM/ml, and no viable trophozoites were found after the 48<sup>th</sup> hour at the same concentration. Approximate IC<sub>50</sub> values on *A. castellanii* trophozoites at the 72<sup>nd</sup>, 48<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> hours were found to be 0.19, 0.25 and 0.34mM/ml, respectively. According to the PCA results of all LA concentrations, it was determined that there was a negative correlation between the doses at 1, 0.8, 0.6 and 0.4mM/ml and the control and 0.2mM/ml doses.

In the study, the cytotoxic effect of EU, ethanolic fruit extract at different concentrations (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312mg/ml) on mammalian cells was evaluated by MTT analysis using the HeLa cell line. It has been determined that EU reduces cell viability depending on the dose. However, at the end of the 72<sup>nd</sup> hour, it was determined that it did not have a cytotoxic effect on more than half of the cells (53.82%) even at the highest concentration (40mg/ml) and it is thought that the IC<sub>50</sub> value may be found at doses higher than 40mg/ml.

In the study, *A. castellanii* trophozoites exposed to stress with methanol and EU, AgNPs and LA were treated separately and investigated in comparative studies with the positive control (PK) exposed to stress only with methanol and the control (K) not exposed to any substance. Accordingly, EU showed the most inhibitory effect on the expression of the CSII gene with  $1.88\pm 0.94$ , while the maximum inhibition was measured as  $1.65\pm 0.87$  at the 30<sup>th</sup> minute. According to the results of PCA analysis, K, EU, AgNPs show a negative correlation between LA and PK. When the expression data were evaluated in all conditions and applied periods, the expression at the 30<sup>th</sup> minute was accepted as the threshold value. While LA had the most inhibitory effect on the expression of the CSP21 gene with  $2.64\pm 0.73$ , the maximum inhibition was measured as  $2.56\pm 1.05$  at the 24<sup>th</sup> hour. According to the results of PCA analysis; EU shows a negative correlation between AgNP's, LA and PK. When expression data were evaluated under all conditions and applied periods, the expression at the 24<sup>th</sup> hour was accepted as the threshold value.

When examined in terms of expression of CAT, the gene responsible for antioxidant activity in *A. castellanii* trophozoites, when compared with 3-AT, which is the specific inhibitor of PK, K and CAT, EU showed the highest inhibitory effect among the groups with  $2.25\pm 0.83$ , the highest inhibition was measured as  $2.33\pm 0.90$  in the 1<sup>st</sup> hour. According to the results of PCA analysis, a negative correlation was detected between K, EU, LA, 3-AT and PK, AgNPs. In all conditions and applied times, a negative correlation was observed between the expression values of the CAT gene at the 30<sup>th</sup> minute, 1<sup>st</sup> and 12<sup>th</sup> hour, and the expression values at the 2<sup>nd</sup>, 24<sup>th</sup> and 48<sup>th</sup> hour. When examined in terms of expression of the other gene responsible for antioxidant activity, SOD, when compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which is the specific inhibitor of PK, K and SOD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> showed the most inhibitory effect among the groups with  $1.86\pm 0.63$ , while the highest inhibition was measured as  $1.68\pm 0.76$  at the 30<sup>th</sup> minute. A significant negative correlation was observed on the expression of the SOD gene in all conditions and applied periods in terms of 30<sup>th</sup> minute, 1<sup>st</sup> and 48<sup>th</sup> hour expression values and 2<sup>nd</sup>, 12<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> hour expression values.

The existence of an effective treatment against both cysts and trophozoites of *Acanthamoeba* species has not yet been proven. It was concluded that EU, AgNPs and LA can be used as potential candidates for alternative or combined treatment methods in the treatment of diseases caused by *Acanthamoeba*.

**Keywords:** *Acanthamoeba castellanii*, Catalase (CAT), Cellulose Synthase II (CSII), Cyst Specific Protein (CSP21), *Elaeagnus umbellata*, Silver Nanoparticle (AgNP), Superoxide Dismutase (SOD)

## TEŐEKKÖR

B-2219 Kodlu Doktora Tez Projem'i destekleyen Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)'ne teőekkÖr ederim.

Tez konusunu belirlenmesi, çalışmanın yÖrÖtÖlmesi ve yazımı sırasında başta danıőmanım Sayın Prof. Dr. Zeynep KOLÖREN'e ve tez yazım aőamasında desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. ÖlkÖ KARAMAN Doç. Dr. Sercan ERGÖN ve Doç. Dr. Hasan İLHAN'a teőekkÖr ederim.

Manevi desteklerini her zaman Özerimde hissettiĐim eőim Meliha KAYNAK'a ve ocuklarım Berk ve Zeynep'e teőekkÖrÖ bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>TEZ BİLDİRİMİ</b> .....	I
<b>ÖZET</b> .....	II
<b>ABSTRACT</b> .....	IV
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	VI
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	X
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	XII
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	XIV
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1 Bitkilerin Medikal Alandaki Önemi.....	1
1.2 Nanopartikül Kavramı ve Yeşil (Green) Sentezle Gümüş Nanopartikül (AgNP) Sentezi.....	4
1.3 Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali.....	7
1.3.1 <i>Elaeagnus umbellata</i> Thunb. ....	7
1.4 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	9
1.4.1 <i>Escherichia coli</i> .....	9
1.4.2 Serbest Yaşayan Amipler.....	11
1.4.2.1 <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	12
1.4.2.2 <i>Acanthamoeba</i> Türlerinin Dağılımı, Morfolojisi ve Yaşam Döngüsü.....	12
1.4.2.3 <i>Acanthamoeba</i> Kaynaklı Önemli Hastalıklar.....	17
<b>2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b> .....	24
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b> .....	44
3.1 Bitki Materyali.....	44
3.2 Bitkinin Meyve Özütünün Hazırlanması.....	44
3.3 <i>E. coli</i> Kültürü.....	45
3.4 <i>A. castellanii</i> Trofozoit Kültürü, Sayım ve Canlılık Testi.....	46
3.5 Bitki Özütünün Amoebisidal Aktivitesinin Test Edilmesi.....	46
3.6 Gümüş Nanopartüküllerinin Hazırlanması.....	47
3.7 Nanopartikül Karakterizasyon Analizleri.....	47
3.7.1 UV-Vis Analizi.....	47
3.7.2 EDX Analizi.....	47
3.7.3 FTIR Analizi.....	47
3.7.4 SEM Analizi.....	48
3.8 <i>A. castellanii</i> Trofozoit Kültürü ve Sentezlenen AgNP'lerin Amoebisidal Aktivitesinin Test Edilmesi.....	48
3.9 <i>E. umbellata</i> Meyve Özütünün GC MS Analizi.....	49
3.9.1 Laurik Asit'in Amoebisidal Aktivitesinin Test Edilmesi.....	49
3.10 MTT Sitotoksosite Testi.....	50
3.11 <i>E. umbellata</i> Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in Amoebisidal Aktivitelerinin İstatistiksel Analizi.....	51
3.12 <i>E. umbellata</i> Özütünün, Laurik Asit'in ve AgNP'lerin DNA Koruyucu Aktivitesinin İncelenmesi.....	52
3.12.1 Çözeltilerin Hazırlanması.....	52
3.12.2 Agaroz Jel Hazırlanması.....	53
3.12.3 Mix Tüpünün Hazırlanması ve Örneklerin Elektroforeze Yüklenmesi.....	53



3.13 Farklı Koşullarda Oluşturulan Stres Altında <i>A. castellanii</i> 'nin Antioksidan Enzimlerinden (CAT ve SOD) Sorumlu Genler ile Pseudokistleşme (CSII) ve Asıl Kistleşme (CSP21) Süreçlerinden Sorumlu Genlerin İfade Analizleri .....	54
3.13.1 <i>E. umbellata</i> 'nın Etanolik Meyve Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in <i>A. castellanii</i> Trofozoitlerindeki Pseudokistleşmeden (CSII) Sorumlu Genin İfade Analizi .....	54
3.13.2 <i>E. umbellata</i> 'nın Etanolik Meyve Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in <i>A. castellanii</i> Trofozoitlerindeki Asıl Kistleşmeden (CSP21) Sorumlu Genin İfade Analizi .....	56
3.13.3 <i>E. umbellata</i> 'nın Etanolik Meyve Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in CAT ve SOD Antioksidan Enzimlerinden Sorumlu Genlerin İfade Analizi .....	57
3.13.4 Total RNA İzolasyonu (Qiagen 74104 Rneasy Mini Kit 50) .....	58
3.13.5 DNA'nın Uzaklaştırılması (DNase Treatment and Removal Reagents (Cat. No: AM1906) .....	59
3.13.6 cDNA Sentezi (Invitrogen cat no: 11904-018) .....	60
3.13.6.1 Premiks I Havuzunun Hazırlanması .....	60
3.13.6.2 Premiks II Havuzunun Hazırlanması .....	60
3.13.7 RT-qPCR ile Kantitatif Analiz (Blastaq2xqPCR master mix, Cat. No: G891) .....	61
3.13.7.1 CAT, SOD ve CSII'nin ifade analizi için 30. Dakika, 1., 2. saat Kombinasyonları .....	61
3.13.7.2 CAT, SOD ve CSP21'in İfade Analizi için 12., 24. ve 48. saat Kombinasyonları .....	62
3.13.8 RT-qPCR Sonuçları İçin İstatistiksel Analiz .....	63
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA</b> .....	64
4.1 <i>A. castellanii</i> Trofozoitleri Üzerinde <i>E. umbellata</i> 'nın Etanolik Meyve Özütünün Farklı Konsantrasyon Serilerinin Amoebisidal Aktivitesi .....	64
4.2 <i>A. castellanii</i> trofozoitleri üzerinde <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütü kullanılarak yeşil (green) sentezle elde edilen AgNP'lerin, karakterizasyon test bulguları ve farklı konsantrasyon serilerinin amoebisidal aktivitesi .....	70
4.2.1 UV-Vis Bulguları .....	70
4.2.2 EDX Bulguları .....	71
4.2.3 FTIR Bulguları .....	72
4.2.4 SEM Bulguları .....	72
4.2.5 <i>A. castellanii</i> trofozoitleri üzerinde AgNP'lerin farklı konsantrasyon serilerinin amoebisidal aktivitesi .....	73
4.3 <i>A. castellanii</i> trofozoitleri üzerinde <i>E. umbellata</i> 'nın meyve özütünde GC MS ile tespit edilen Laurik Asit'in farklı konsantrasyon serilerinin amoebisidal aktivitesi .....	78
4.4 <i>E. umbellata</i> Meyve Özütünün GC MS ile Kimyasal Kompozisyonun Belirlenmesi .....	83
4.5 <i>E. umbellata</i> Meyve Özütünün, Laurik Asit'in ve AgNP'lerin Hidroksil Radikali Tarafından Oluşturulan DNA Hasarına Karşı Koruyucu aktivitesi Üzerine Etkileri .....	85
4.6 <i>E. umbellata</i> 'nın Etanolik Meyve Özütünün HeLa Hücrelerinde Doza Bağlı Sitotoksik Aktivitesi .....	86
4.7 <i>E. umbellata</i> 'nın Etanolik Meyve Özütünün, <i>E. umbellata</i> Meyve Özütüyle Sentezlenen AgNP'lerin ve <i>E. umbellata</i> Özütünün Kimyasal Bir Bileşiği Olan	

Laurik Asit'in <i>A. castellanii</i> Trofozoitlerinin Stres Altında Antioksidan Enzimlerinden (CAT ve SOD) Sorumlu Genler ile Pseudokistleşme (CSII) ve Asıl Kistleşme (CSP21) Süreçlerinden Sorumlu Genlerin İfadesi Üzerine Etkileri...	87
4.7.1 <i>E. umbellata</i> 'nın Etanolik Meyve Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in <i>A. castellanii</i> Trofozoitlerindeki Pseudokistleşmeden (CSII) Sorumlu Genin İfadesi Üzerine Etkileri .....	87
4.7.2 <i>E. umbellata</i> 'nın Etanolik Meyve Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in <i>A. castellanii</i> Trofozoitlerindeki Asıl Kistleşmeden (CSP21) Sorumlu Genin İfadesi Üzerine Etkileri .....	93
4.7.3 <i>E. umbellata</i> 'nın Meyve Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in <i>A. castellanii</i> Trofozoitlerindeki CAT Geninin İfadesi Üzerine Etkileri .....	98
4.7.4 <i>E. umbellata</i> 'nın Meyve Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in <i>A. castellanii</i> Trofozoitlerindeki SOD Geninin İfadesi Üzerine Etkileri .....	104
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	122
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	128
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	142

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1 AgNP'lerin hücrede etki mekanizması.....	5
Şekil 1.2 Nanopartiküllerin yeşil sentezinde kullanılan biyolojik kaynaklar .....	6
Şekil 1.3 <i>E. umbellata</i> 'nın Türkiye'deki yayılış alanları.....	7
Şekil 1.4 <i>E. umbellata</i> 'nın genel görünüşü.....	8
Şekil 1.5 Işık mikroskobunda (1000x) <i>E. coli</i> 'nin gram boyama görüntüsü.....	10
Şekil 1.6 <i>Acanthamoeba</i> türlerinin yaşam döngüsü ve insanlara bulaşma yolları.....	13
Şekil 1.7 <i>Acanthamoeba</i> türlerinin trofozoit (a) ve kist (b) görüntüsü .....	15
Şekil 1.8 AK'nin (A, B, C) yarık lamba fotoğrafları. (A) Psödodendritli epitelit. (B) radyal nöritli epitelit. (C) Halka infiltrasyonu ve hipopyon. ....	19
Şekil 1.9 GAE'nin serebral MR görüntüsü.....	19
Şekil 1.10 <i>Acanthamoeba</i> kaynaklı kutanöz lezyonlar ve lezyonlardan alınan, hematoksilen ve eozinle boyanmış örneklerin ışık mikroskobundaki görüntüsü.....	20
Şekil 3.1 <i>E. umbellata</i> bitkisinin doğal görüntüsü.....	44
Şekil 3.2 <i>E. umbellata</i> meyvelerinin temizlenmesi ve etanolün evaporatörde uzaklaştırılması aşamaları.....	45
Şekil 3.3 Kaba filtrasyon ve vakumlu filtrasyon uygulama aşamaları .....	45
Şekil 3.4 <i>A. castellanii</i> trofozoitlerine farklı konsantrasyonlardaki bitki özütünün eklenmesi .....	46
Şekil 3.5 <i>A. castellanii</i> trofozoitlerine farklı konsantrasyonlardaki AgNO <sub>3</sub> eklenmesi .....	48
Şekil 3.6 <i>A. castellanii</i> trofozoitlerine farklı konsantrasyonlardaki Laurik Asit'in eklenmesi .....	50
Şekil 3.7 Ct değerlerinin hesaplanmasında kullanılan formül .....	63
Şekil 4.1 <i>A. castellanii</i> trofozoitleri üzerinde <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütünün farklı doz ve sürelerde amoebisidal etkisinin grafiği .....	65
Şekil 4.2 Işık mikroskobunda <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin canlı (A) ve ölü (B) görüntüsü (orijinal büyütme 40x objektif).....	65
Şekil 4.3 Farklı konsantrasyonlardaki <i>E. umbellata</i> özütünün PCA ile gösterimi ....	69
Şekil 4.4 <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütünün farklı doz ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi.....	69
Şekil 4.5 AgNP'lerin pH 5 (A) ve pH 11 (B) UV-Vis spektrofotometre görüntüsü .	70
Şekil 4.6 <i>E.umbellata</i> özütünün (A) ve pH'sı 9 olan AgNP'lerin (B) UV-Vis spektrofotometre görüntüsü .....	71
Şekil 4.7 AgNP'lerin EDX Element haritalama görüntüsü .....	71
Şekil 4.8 AgNP'lerin FTIR spektrofotometre görüntüsü.....	72
Şekil 4.9 AgNP'lerin SEM görüntüsü .....	73
Şekil 4.10 <i>A. castellanii</i> trofozoitleri üzerinde <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin farklı doz ve sürelerde amoebisidal etkisinin grafiği .....	73
Şekil 4.11 Farklı konsantrasyonlardaki AgNP'lerin PCA ile gösterimi .....	77
Şekil 4.12 AgNP'lerin farklı doz ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi .....	77
Şekil 4.13 Laurik Asit'in <i>A. castellanii</i> trofozoitleri üzerinde farklı doz ve sürelerde amoebisidal etkisinin grafiği.....	78

Şekil 4.14	Farklı konsantrasyonlardaki Laurik Asit'in PCA ile gösterimi.....	82
Şekil 4.15	Laurik Asit'in farklı doz ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi ....	82
Şekil 4.16	<i>E. umbellata</i> meyve özütünün GC MS analiz grafiği.....	83
Şekil 4.17	Hidroksil radikalının neden olduğu pBR322 plazmid DNA hasarı üzerinde <i>E.umbellata</i> , AgNP ve Laurik Asit örneklerinin DNA koruyucu aktivitesini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüleri .....	86
Şekil 4.18	Farklı konsantrasyonlardaki <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütünün 72. saatte HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksosite grafiği.....	87
Şekil 4.19	Farklı grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ifadesi üzerinde inhibitör etkisini gösteren grafik.....	88
Şekil 4.20	Farklı grupların CSII gen ekspresyonunun PCA ile gösterimi.....	91
Şekil 4.21	CSII gen ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi .....	92
Şekil 4.22	Farklı grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geni üzerinde inhibisyon grafiği .....	93
Şekil 4.23	Farklı grupların CSP21 gen ekspresyonunun PCA ile gösterimi .....	96
Şekil 4.24	CSP21 gen ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi .....	97
Şekil 4.25	Farklı grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinde antioksidan etkiden sorumlu CAT geni üzerinde inhibisyon grafiği .....	98
Şekil 4.26	Farklı grupların CAT gen ekspresyonunun PCA ile gösterimi .....	102
Şekil 4.27	CAT gen ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi .....	103
Şekil 4.28	Farklı grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinde antioksidan etkiden sorumlu SOD geni üzerinde inhibisyon grafiği .....	104
Şekil 4.29	Farklı grupların SOD gen ekspresyonunun PCA ile gösterimi .....	108
Şekil 4.30	SOD gen ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi .....	109

## ÇİZELGE LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1 <i>E. umbellata</i> 'nın Thunb. Sistematığı .....	9
Çizelge 1.2 <i>E. coli</i> 'nin sistematığı .....	11
Çizelge 1.3 <i>A. castellanii</i> 'nin sistematığı .....	12
Çizelge 1.4 <i>Acanthamoeba</i> 'nın genotipleri ve insanlarda görülen hastalıklar ile olan ilişkisi .....	16
Çizelge 3.1 Mix tüpünün içeriği .....	53
Çizelge 3.2 Örneklerin jel elektroforez kuyucuklarına yüklenmesi .....	54
Çizelge 3.3 CAT, SOD ve CSII'nin 30. dakika kombinasyonunun pipetlenmesi .....	62
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan RT-qPCR koşulu .....	62
Çizelge 3.5 CAT, SOD ve CSII'nin 12. saat kombinasyonunun pipetlenmesi .....	63
Çizelge 4.1 <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütünün farklı dozlarda <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi .....	66
Çizelge 4.2 <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütünün farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi .....	66
Çizelge 4.3 <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütünün farklı doz ve sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi .....	67
Çizelge 4.4 <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütünün farklı doz ve sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi .....	68
Çizelge 4.5 Farklı konsantrasyondaki <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütünün <i>A. castellanii</i> trofozoitleri üzerindeki IC <sub>50</sub> değeri .....	68
Çizelge 4.6 <i>E. umbellata</i> özütünün özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi .....	70
Çizelge 4.7 AgNP'lerin EDX Element haritalama spektrum bulguları .....	71
Çizelge 4.8 <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin farklı dozlarda <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi .....	74
Çizelge 4.9 <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi .....	74
Çizelge 4.10 <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin farklı doz ve sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi .....	75
Çizelge 4.11 <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin farklı doz ve sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisinin grafiği .....	76
Çizelge 4.12 <i>E. umbellata</i> 'nın etanolik meyve özütü ile sentezlenen farklı konsantrasyondaki AgNP'lerin <i>A. castellanii</i> trofozoitleri üzerindeki IC <sub>50</sub> değeri .....	76
Çizelge 4.13 AgNP'lerin özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi .....	78
Çizelge 4.14 Laurik Asit'in farklı dozlarda <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi .....	79
Çizelge 4.15 Laurik Asit'in farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi .....	79
Çizelge 4.16 Laurik Asit'in farklı doz ve sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi .....	80
Çizelge 4.17 Laurik Asit'in farklı doz ve sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisinin grafiği .....	81

<b>Çizelge 4.18</b> Farklı konsantrasyondaki Laurik Asit'in <i>A. castellanii</i> trofozoitleri üzerindeki IC <sub>50</sub> değeri.....	81
<b>Çizelge 4.19</b> Laurik Asit'in özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi.....	83
<b>Çizelge 4.20</b> <i>E. umbellata</i> meyve özütünün kimyasal kompozisyonu .....	84
<b>Çizelge 4.21</b> Farklı grupların <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi .....	89
<b>Çizelge 4.22</b> Farklı grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi .....	89
<b>Çizelge 4.23</b> Farklı grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi .....	90
<b>Çizelge 4.24</b> Farklı grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi .....	90
<b>Çizelge 4.25</b> Grupların özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi .....	92
<b>Çizelge 4.26</b> Farklı grupların <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi.....	94
<b>Çizelge 4.27</b> Grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi.....	94
<b>Çizelge 4.28</b> Farklı grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi.....	95
<b>Çizelge 4.29</b> Farklı grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi.....	95
<b>Çizelge 4.30</b> CSP21'in özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi .....	97
<b>Çizelge 4.31</b> Farklı grupların <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi.....	99
<b>Çizelge 4.32</b> Grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi .....	100
<b>Çizelge 4.33</b> Farklı grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi .....	100
<b>Çizelge 4.34</b> Farklı grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi.....	101
<b>Çizelge 4.35</b> CAT'ın özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi .....	103
<b>Çizelge 4.36</b> Farklı grupların <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi.....	105
<b>Çizelge 4.37</b> Grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi .....	106
<b>Çizelge 4.38</b> Farklı grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinde aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi.....	106
<b>Çizelge 4.39</b> Farklı grupların farklı sürelerde <i>A. castellanii</i> trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi.....	107
<b>Çizelge 4.40</b> SOD'un özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi .....	109

## SİMGELER ve KISALTMALAR LİSTESİ

---

<b>AIDS</b>	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
<b>AgNP</b>	: Gümüş Nanopartikül
<b>AK</b>	: <i>Acanthamoeba</i> Keratiti
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CSII</b>	: Selüloz Sentaz II
<b>CSP21</b>	: Kist Spesifik Protein
<b>°C</b>	: Santigrat Derece
<b>EDX</b>	: Enerji Dağıtıcı X-Işını
<b>FTIR</b>	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
<b>GAE</b>	: Granülomatöz Amibik Ensefalit
<b>g</b>	: Gram
<b>GS MS</b>	: Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi
<b>HeLa</b>	: İnsan Serviks Adenokarsinoma Hücresi
<b>HIV</b>	: Human Immunodeficiency Virus
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>MSS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>M</b>	: Molar
<b>MR</b>	: Manyetik Rezonans
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-Dimetiltiazol2-Y1)-2,5-Difeniltetrazolyum-Bromür
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>PBS</b>	: Fosfat Tamponu
<b>PCA</b>	: Temel Bileşenler Analizi
<b>rpm</b>	: Dakikada Devir Sayısı
<b>RT-qPCR</b>	: Revers-Transkriptaz Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskopu
<b>SOD</b>	: Süperoksit Dismutaz
<b>UV-Vis</b>	: Ultraviyole-Görünür Spektrofotometri
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü

---

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Bitkilerin Medikal Alandaki Önemi

Diğer canlılar gibi insanoğlu da temel besin gereksinimlerini bitkilerden karşılar ve bu nedenle bitkiler, canlılar için gerekli protein, lipid, karbonhidrat vb. primer makromoleküllerin temel kaynağıdır (Cox, 1990; Aydın, 2008). Ayrıca bitkiler, canlılar için önemli biyolojik aktivitesi olan ve geniş çeşitlilikte bulunan, primer metabolitler ve sekonder metabolitler adı verilen kimyasal bileşikler bünyesinde barındırmaktadırlar (Berber ve ark., 2013; Kaynak, 2017).

En eski uygarlıklardan bugüne kadar birçok hastalığın önlenmesinde veya iyileştirilmesinde akla gelen ilk doğal materyal, bitkilerden elde edilmiştir. İnsanoğlu, varolduğu günden beri bitkilerle olan bağı sürdürmüş ve doğayı tabii bir eczane gibi görüp, doğada yetişen bitkilerden baharat, ilaç, besin ve şifa bulmak gibi çeşitli amaçlarla faydalanmıştır (Mindell, 2003; Gül ve Seçkin Dinler, 2016).

Fitoterapi, insanoğlunun bildiği eski sağlık uygulamalarından birisidir. Geçmişte bitkiler, hastalıkların tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmış ve günümüze kadar bu durum gelenek halinde sürdürülmüştür. Bitkilerin faydalı etkileri genellikle tesadüfen, bazıları deneme yanılma ile anlaşılmış, kulaktan kulağa yayılarak herkes tarafından öğrenilmiş ve zamanla farklı bitkilerin farklı hastalıklara şifa olduğu tespit edilmiştir. Kilikya'lı bir hekim olarak bilinen Pedanios Dioscorides'in M.S. 1. asırda derlediği 'De Materia Medica' (Şifalı Bitkiler) adlı eseri; şifalı bitkiler hakkındaki ilk bilimsel eser olarak bilinmektedir (Kopar ve Rencüzoğulları, 2012; Kaynak, 2017).

İnsanoğlunun ilk çağlardan bu yana gıda temini veya sağlık problemlerini gidermek için öncelikli olarak bitkilerden yararlandığı düşüncesi arkeolojik bulgulardan da anlaşılmaktadır (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011; Kaynak, 2017). Şanidar Mağarası'nda (Kuzey Irak) 1960'lı yıllarda yapılan araştırmalarda Neandertal insan kalıntılarıyla birlikte mezarda bulunanlar, insan-bitki ilişkisinin başlangıcı olarak değerlendirilmiştir. Altmış bin yıllık olan mezarda bazı şifalı (gül hatmi, efedra, kanarya otu, civanperçemi, peygamber çiçeği vb.) bitki türleri bulunmuştur. Ölülerini gömdüğü anlaşılan bu toplumda ölen kişinin yaşama yeniden döndüğünde birlikte gömdükleri bitkileri kullanabileceği düşünülmüş ve bu bitkilerin seçiminde



yenilebilen ve şifalı bitkilerin tercih edildiği dikkat çekmektedir. Aynı bitkiler, halen günümüzde dahi tıbbi bitkiler olarak önemini sürdürmektedir (Lewin, 2000; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Gelişmemiş ülkelerde nüfusun 4/5'inin, temel sağlık gereksinimleri için çoğunlukla bitkisel orijinli ilaçlara güvendiğini, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ortaya koymuştur. Modern farmakolojik metotlarla üretilmiş ilaçların etken maddelerinin ¼'ü de bitki orijinlidir. Maliyetin düşük olması, toksik ve yan etkilerinin hafif oluşu, doğal olarak üretilmiş olması gibi nedenlerle gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ilaç yapımında doğal bitkilere olan talebin arttığı gözlenmektedir (Sekar ve Kandavel, 2010; Kaynak, 2017).

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde, bitkilerden sentezlenen (kininler, alkaloidler, flavonoidler, taninler vb.) fitokimyasalların kullanımı oldukça yaygındır (Hussain ve ark., 2011). Birçok mikroorganizmanın üremesini baskılayan bu bileşikler doğal koşullarda yetişen bitkilerin (kök, gövde, yaprak, tohum, gibi) bazı bölümlerinden izole edilmektedir. Ayrıca çoğu bitkinin antihipertansif, antioksidan, antitümöral, antimikrobiyal gibi birçok önemli etkileri olduğu belirtilmiştir (Berber ve ark., 2013).

Türkiye; Avrupa-Sibirya, İran-Turan, Akdeniz olarak önemli 3 Fitocoğrafik bölgeyi bünyesinde bulunduran, iklim ve toprak özellikleri bakımından çeşitli coğrafi bölgelere sahip, güçlü zirai potansiyeli ve zengin bitki çeşitliliği yönüyle, Dünya'nın önemli gen merkezlerinden biri olan ülke konumundadır (Kendir ve Güvenç, 2010). Ayrıca Türkiye, geniş yüzölçümü, coğrafi konumu ve bitki çeşitliliği ile aromatik ve tıbbi bitki ticaretinde lider ülkelerden biridir. Türkiye'de, Güneydoğu Anadolu, Doğu Karadeniz, Marmara, Akdeniz ve Ege Bölgeleri tıbbi ve aromatik bitkilerin yoğun olarak toplandığı bölgelerdir (Bayram ve ark., 2010; Kaynak, 2017). Tıbbi amaçlı 800 civarında bitkinin varlığı tahmin edilmekte ve bunun iki yüz kadarının da ihraç potansiyelinin olduğu bilinmektedir (Berber ve ark., 2013).

Tıbbi açıdan önemi olan bitkiler, tüm Dünya ülkelerinde olduğu kadar Türkiye'de de halk arasında baharat, çay, ilaç gibi amaçlarla yıllarca kullanılmaktadır. Bununla beraber bitkiler, yaygın olarak çeşitli boya, süs eşyası, gıda katkıları, parfüm,

kostik ajan ve kozmetik sanayi alanlarında kullanılmaktadır (Dülger ve ark., 2002; Çopuroğlu, 2013).

Tıbbi ve aromatik bitkilerle yapılan araştırmaların son yıllarda artmasının sebepleri arasında;

- ✓ Bazı sentetik bileşiklerin ciddi ve tehlikeli yan etkiler sergilemesi,
- ✓ Kalkınmakta olan ülkelerin maddi durumlarındaki yetersizlik ve kimya endüstrilerinin gelişmemesi nedeniyle tıbbi ve aromatik bitkilerle ucuz ve kolay tedavi metot arayışları,
- ✓ İlkel ilaç maddelerinin bazılarının, bitkisel droglardan, sentetik olanlara kıyasla ucuz ve kolayca temin edilebilmesi,
- ✓ Bitki orijinli drogların etki alanlarının geniş olması (Abay, 2006; Aslan Öz, 2017),
- ✓ Enfeksiyon etkeni ve hastane enfeksiyonlarına yol açan mikroorganizmaların çoğunun günümüzde tedavi amaçlı kullanılan birçok antibiyotiğe direnç kazanmış olması (Janovská ve ark., 2003; Berber ve ark., 2013),
- ✓ Antibakteriyel, antifungal, antiparaziter ve antiviral ilaçların bazılarının ciddi toksisitesi sebebiyle kullanımlarının sınırlandırılmış olması (Maregesi ve ark., 2008),
- ✓ Günümüzde kullanılan sentetik ilaçlara karşı bakterilerin kolayca direnç geliştirmeleridir.

Yukarıda maddeler halinde bahsedilen nedenlerden dolayı doğal bitkisel kaynakların taşıdığı potansiyel, tıbbi bitkilerin önemini kat kat artırmaktadır (Dağcı ve ark., 2002; Kaynak, 2017).

Bitkisel tedavinin atalardan kalan miras oluşu, kolayca ulaşılabilir ve ucuz olmasına rağmen, bitkiler arası etkileşimler hakkında yapılan kapsamlı araştırma sayısı çok fazla değildir (Ma ve ark., 2009; Kirbag ve ark., 2013; Doğan ve Darcan, 2022). Ancak, yeni nesil ilaç üretiminin yüksek maliyetli oluşu, mevcut tedavilerde kullanılan antimikrobiyal ilaçlara karşı mikroorganizmaların direncinin artması gibi nedenler ilaç sektörlerini alternatif antimikrobiyal ajanlar aramaya hatta bu sahada daha fazla araştırma yapmaya mecbur bırakmıştır (Singh ve ark., 2011).

## 1.2 Nanopartikül Kavramı ve Yeşil (Green) Sentezle Gümüş Nanopartikül (AgNP) Sentezi

Nanoteknoloji; 100nm'ye kadar boyutlarda olan nanopartiküllerin veya nanomalzemelerin nano ölçekli düzeylerde gerçekleştirilen ve biyoteknoloji, mühendislik, (özellikle havacılık-uzay ve elektronik) kimya, kozmetik, fizik, tıp ve ekoloji alanlarında araştırma alanı olarak büyük ilgi gören, yeni, hızlı ilerleme gösteren bilim dalıdır (Hulkoti ve Taranath, 2014; Chandra ve ark., 2020).

Nanopartiküller; doğal, antropojenik ve mühendislik nanopartikülleri olmak üzere üç bölümde incelenmektedir. Nanopartiküllerin diğer partiküllerle kolayca etkileşime girebilme yetenekleri, geniş yüzey/hacim oranı, eşsiz fizikokimyasal özellikleri, yüksek penetrasyon kabiliyetleri gibi bazı önemli özellikleri, son zamanlarda AgNP'lere olan ilgiyi arttırmaktadır (Buzea ve ark., 2007; Karakurt, 2019). Uygun morfoloji ve boyutlara sahip olan metalik nanopartiküllerin sentezinde geliştirilen yeni protokoller, nanoteknoloji ve biyoteknoloji sahasındaki araştırmacıların son yıllarda ilgisini cezbetmektedir (Sharma ve ark., 2009; Gopinath ve ark., 2012; Salehi ve ark., 2016).

Nanopartiküllerin biosentezi, özellikle tıp ve ilaç endüstrisinin güncel odağı olmuştur. Bunun nedeni, yeni nanoteknoloji temelli ilaçların maliyetinin ve tedavi sürecinde görülen yan etkilerinin geleneksel yöntemlere kıyasla daha az olmasıdır (Dağlıoğlu, 2016; Salehi ve ark., 2016). Yeşil (green) sentez şeklinde de adlandırılan biyolojik sentez; düşük (enerji, pH, basınç ve sıcaklık) koşullarda ve zehirli kimyasallar kullanılmadan nanopartiküllerin sentezinin gerçekleştiği ekonomik, pratik ve çevre dostu olan yöntemdir (Karnani ve Chowdhary 2013; Nartop, 2019).

AgNP'lerin yeşil sentezinde; biyolojik materyallerin içerisindeki flavonoidler, ketonlar, aldehitler, tanenler, karboksilik asitler, fenolikler, membran proteinleri, karbonhidratlar gibi farklı biyomoleküller ve negatif yüklü fonksiyonel gruplar  $Ag^+$  iyonunun  $Ag^0$ 'a indirgenmesinde (Gümüşün biyoindirgenmesinde) ve kararlaştırılmasında rol oynamaktadır (Wang ve ark., 2019; Vanlalveni ve ark., 2021).

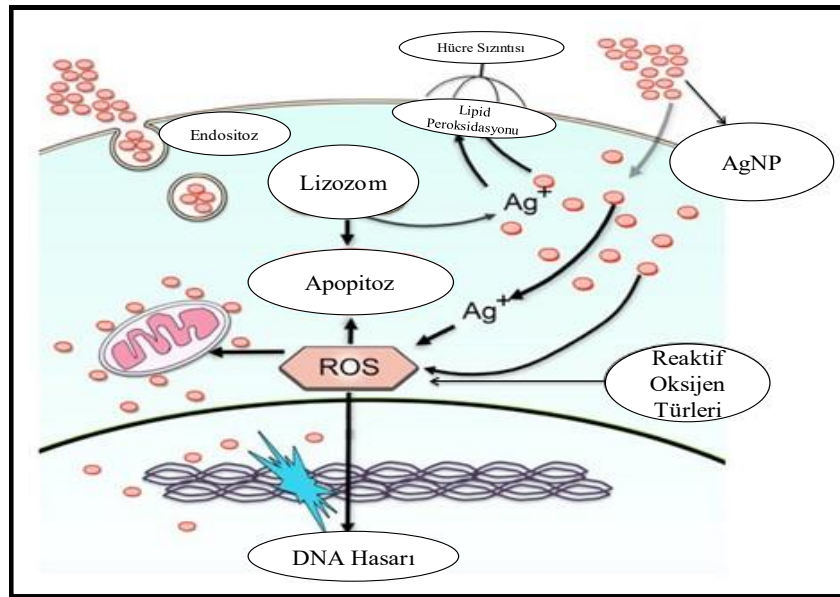
Metalik nanopartiküllerin bitki kullanılarak gerçekleştirilen yeşil sentezinde bitkilerin bazı bölümleri (kök, gövde, yaprak, tohum vb.) kullanılmaktadır (Shamaila ve ark., 2016). Biyolojik sentez sürecinde, bitkinin bu bölümlerine ait sekonder metabolitler, sentezin aktif bileşeni olarak değerlendirilmekle beraber bazı önemli

indirgeyici ajanları (alkoloidler, terpenler, polifenoller, tiaminler, karboksilik asit, aminoasitler, karbonhidratlar vb.) bünyesinde barındırmaktadır (Sengani ve ark., 2017).

Metal nanopartiküller arasında olan AgNP'ler, mikrobiyoloji, kimya, gıda teknolojisi, hücre biyolojisi, farmakoloji, parazitoloji vb. gibi geniş uygulama sahaları nedeniyle araştırmacılar tarafından ilgi görmektedir. AgNP'lerin antibakteriyel etki mekanizmaları aşağıda verilmiştir.

- Bakterinin hücre çeperi ve zar bütünlüğünü bozarak, zar geçirgenliğini ve hücre elemanlarının sızmasını teşvik edip hücre ölümünü indükler,
- Sülfidril ile birleşip solunum zinciri reaksiyonunu durdurarak DNA ve proteinlerin lipid peroksidasyonu ile oksidatif hasarına neden olur,
- DNA'nın kükürt ve fosfor gruplarına bağlanarak DNA'ya hasar verip transkripsiyon ve translasyon mekanizmasını bozar,
- Fosfotirozinlerin fosforilasyonunu destekleyerek hücre sinyali iletimine ve hücrelerin öldürülmesi işlemine müdahale eder,
- Aerobik şartlarda  $Ag^+$  iyonlarını ortama yayarak bakteri hücre membranı ve hücre duvarıyla etkileşime girer (Abamor, 2020).

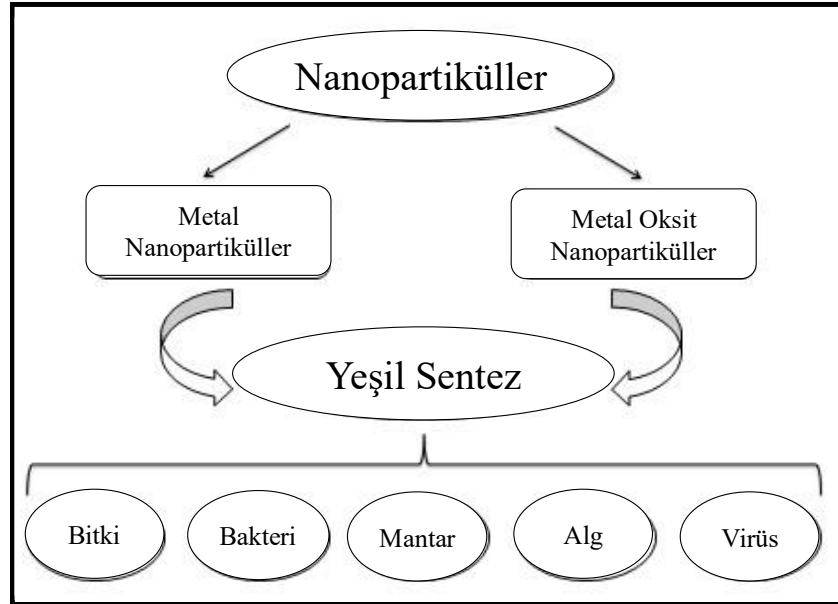
Şekil 1.1'de AgNP'lerin hücrede etki mekanizması sunulmuştur.



Şekil 1.1 AgNP'lerin hücrede etki mekanizması (Wei ve ark., 2015)

Nanopartiküller arasında genellikle tercih edilen AgNP'ler, özellikle biyosensörler, farmasötikler, fotonikler, biyokataliz ve anti-anjiyojenik, antimikrobiyal ve antikanser olarak kullanım potansiyeli olan ajanlardır. AgNP'ler, oksidatif stres, DNA üzerinde yıkıcı etki, mitokondriyal hasar ve apoptoz indüksiyonu yoluyla çok çeşitli mikroorganizmalar için güçlü toksisite özelliği sergilemektedir. Ayrıca diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, çevre dostu ve biyolojik aracılı bir sentez olan AgNP'lerin sentezi en çok tercih edilmekle birlikte, indirgeyici ve stabilize edici maddeler gerektirmeyen ve güvenli bir çözüm sağlayan tek adımlı, solventsiz bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Salehi ve ark., 2016).

Şekil 1.2'de nanopartiküllerin yeşil sentezinde kullanılan biyolojik kaynaklar verilmiştir.



**Şekil 1.2** Nanopartiküllerin yeşil sentezinde kullanılan biyolojik kaynaklar (Shankar ve ark., 2016)

AgNP'lerin mantar, maya, bakteri ve parazit vb. patojenlere karşı antimikrobiyal etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark. 2007; Anwar ve ark., 2020). Yeşil sentez ile sentezlenen AgNP'lerin kemoterapide ciddi potansiyele sahip olduğu da belirtilmiştir (Ahmed ve ark. 2016; Anwar ve ark., 2020). Bitki özütleri kullanılarak elde edilen ve nanopartiküllerle konjuge edilmiş saf doğal ürünlerin, enfeksiyon hastalıklarına karşı ilaç geliştirmede önemli ölçüde terapötik değerlere sahip olduğu da belirtilmektedir (Kuppusamy ve ark. 2016; Anwar ve ark., 2020).

### 1.3 Çalışmada Kullanılan Bitki Materyali

#### 1.3.1 *Elaeagnus umbellata* Thunb.

Japon iğdesi veya güz zeytini olarak da adlandırılan *E. umbellata*, Elaeagnaceae familyasına ait bir tür olup, Japonya'nın doğusundan Doğu Asya'daki Himalayalara kadar yayılış göstermektedir (Bayraktar, 2018; Anonim, 2021a). Bununla beraber Çin, Japonya ile Kore'ye has bir tür olan güz zeytini, Güney Avrupa, Afganistan ve Hindistan'da da bulunmaktadır (Potter, 1995; Minhas ve ark., 2013).

Bitkinin azotu köklerine bağlayıp burada depolayarak en verimsiz topraklarda bile yaşama yeteneği, ayrıca verimsiz toprakları da verimli hale getirebilmesi, -35°C 'ye varan soğuğa dayanıklılığı ve meyvelerini yiyen kuşların bitki tohumlarını sindiremeyip dışkıları ile uzak noktalara taşıması sonucu uzak alanlara kadar yayılabilmesi bitkinin önemli özelliklerindedir (Minhas ve ark., 2013; Bayraktar, 2018; Anonim, 2021a).

Bitki, Türkiye'de ilk olarak 2000'li yılların başında Samsun'da yetiştirilmeye başlanmıştır. Daha sonra da Karadeniz Bölgesi'nin doğusunda (Giresun, Ordu, Rize) üretim sahaları kurulmuştur. Günümüzde Sakarya ve Bursa'da üretimi yapılan bitkinin Türkiye'nin diğer bölgelerinde de yetiştirilmesi planlanmaktadır (Anonim, 2021d).

Şekil 1.3'te Türkiye'de *E. umbellata*'nın yayılış alanları sunulmuştur.



Şekil 1.3 *E. umbellata*'nın Türkiye'deki yayılış alanları (Anonim, 2021g)

Kış mevsiminde yaprak döken bitki, 6m boy ve 9m genişliğe kadar büyüyen çalı ve bodur ağaç formunda olup yoğun dalları sayesinde yuvarlak bir şekle sahiptir (Fordham ve ark., 2001; Minhas ve ark., 2013; Bayraktar, 2018). Bitkinin yoğun ve dikenimsi bir tacı bulunmaktadır. Yaprakları almaşık, ortalama 7cm uzunluğa ve 3cm genişliğe sahip, yaprak kenarları dalgalıdır. Yapraklar, baharda ilk ortaya çıktığında gümüş renkte olup, ancak yaz aylarına doğru olgunlaşarak yeşil renge döner (Minhas ve ark., 2013; Bayraktar, 2018; Anonim, 2021a).

Meyveleri ise; yuvarlak, 0.65cm-0.85cm uzunluğunda ve önceleri gümüş sarı renkte olup, olgunlaştıkça gümüş, kırmızı ve kahverengiye dönmektedir. Olgunlaşan meyveler yenilebilir veya kurutularak daha sonra da tüketilebilir, meyvenin çekirdekleri de yenilebilmektedir (Ahmad ve ark., 2005; Bayraktar, 2018; Anonim, 2021a). Meyve; A, C, E vitaminleri, flavonoid, esansiyel yağ asitleri (Chopra ve ark., 1986; Minhas ve ark., 2013), likopen, karoten, lutein, fitoflavin ve fitoen bakımından oldukça zengindir (Kohlmeier ve ark., 1997; Fordham ve ark., 2001; Minhas ve ark., 2013). Bununla birlikte meyveyi önemli kılan içerdiği likopen oranıdır. 100g meyve aynı miktar domatesten on yedi kat fazla likopen barındırmaktadır. Bitki, antioksidanları da bünyesinde barındırır (Sabir, 2007; Anonim, 2021a). Olgun bir güzel zeytini, 20.000 ila 54.000 arasında değişen tohum sayısı ile yılda 0.9kg ila 3.4kg kadar meyve üretebilmektedir (Eckardt, 1987; Minhas ve ark., 2013). Şekil 1.4'te *E. umbellata*'nın genel görünüşü sunulmuştur.



Şekil 1.4 *E. umbellata*'nın genel görünüşü (Anonim, 2021e)

Birçok çalışma, likopenin miyokard enfarktüsüne (Kohlmeier ve ark., 1997; Sabir, 2007), çeşitli kanser türlerine (serviks, gastrointestinal sistem, prostat, vb.) karşı koruduğunu kanıtlamıştır (Matthews, 1994; Minhas ve ark., 2013). Bitkinin tohumları öksürük tedavisinde, tohum yağı ise, pulmoner hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Chopra ve ark., 1986; Sabir, 2007). Çiçeklerinden palmitik asit (%16.9), öjenol (%11.1), metil palmitat (%10.5), 4-metil anizol (%33-42.7) ve 4-metil fenol (%10.9-13.3) gibi çeşitli fitokimyasallar izole edilmiştir (Matthews, 1994; Sabir, 2007).

Çizelge 1.1'de *E. umbellata*'nın Thunb. Sistematığı verilmiştir.

**Çizelge 1.1** *E. umbellata*'nın Thunb. Sistematığı (Anonim, 2021b)

Regnum:	Plantae
Divisio:	Magnoliophyta
Classis:	Magnoliopsida
Ordo:	Rosales
Familia:	Elaeagnaceae
Genus:	<i>Elaeagnus</i>
Species:	<i>E. umbellata</i>

Bitki özleri ve bitkinin kimyasal bileşenleri, terapötik tedavilerde büyük önem taşıyabilen antimikrobiyal etkilere sahiptir. Erozyonu önleme özelliği de olan bu tür, bazı tarımsal ormancılık uygulamalarında da kullanılmaktadır. Bitkinin meyveleri sulu, hoş tada sahip ve asidik olup ayrıca reçel veya konserve halinde de tüketilebilmektedir. Son derece yararlı olmasının yanında antioksidan içeren meyveleri bahçecilikte, bitkinin yaprak ve çiçekleri peyzaj alanında kullanılabilir (Fordham ve ark., 2001; Bayraktar, 2018).

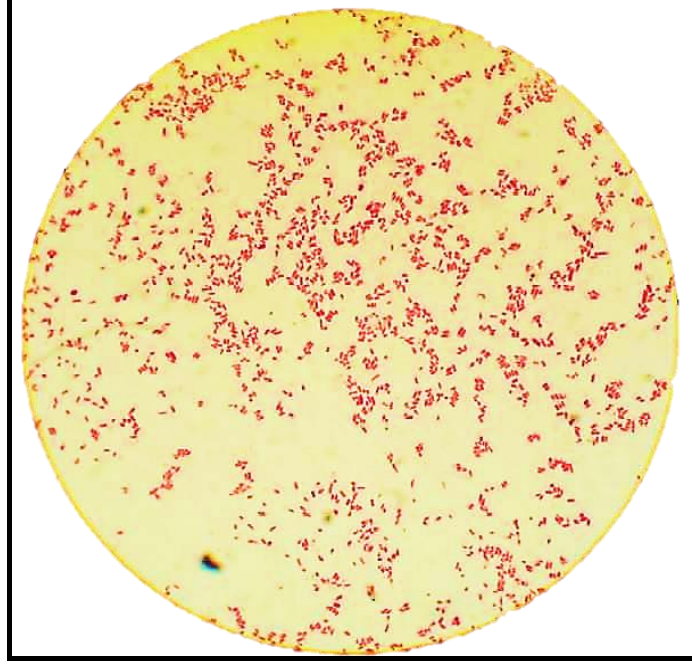
## 1.4 Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

### 1.4.1 *Escherichia coli*

*E. coli*; ortalama 4µm boyunda, çomak şeklinde (Bilgihan, 1996; Kaynak, 2017) ve Enterobacteriaceae familyasına ait olan, sporsuz, gram negatif, fakültatif anaerob, laktöz fermentasyonu yapan basildir (Akdoğan ve Akpolat, 2023).



Şekil 1.5'te *E. coli*'nin ışık mikroskopunda (1000x) gram boyama görüntüsü sunulmuştur.



**Şekil 1.5** Işık mikroskopunda (1000x) *E. coli*'nin gram boyama görüntüsü (Anonim, 2021ı).

*E. coli*, sıcakkanlı (homioi term) canlıların sindirim kanallarında bulunur ve burada K vitamini gibi birçok vitaminleri sentezleyerek içinde yaşadığı canlıya fayda sağlamaktadır (Hasenekoğlu ve Yeşilyurt, 2007; Kaynak, 2017). *E. coli*'nin farklı serolojik özellikte alt türleri bulunmakta ve bunların tanımlanmasında, bakterinin yüzeyindeki flagellar H antijenleri, O polisakkarit antijenleri ve kapsüler K antijenleri kullanılmaktadır (Debroy ve ark., 2011; Akdoğan ve Akpolat, 2023). *E. coli*'nin bazı türleri patojendir ve Enteropatojen de denen bu türlerde K antijeni bulunmaktadır. Bakteri K antijeni yardımıyla ince bağırsak yüzeylerine yerleşerek burada kolonize olmaktadır. Ürettikleri enterotoksin sayesinde bebek ve çocuklarda dizanteri benzeri ölümcül ishale sebep olmaktadır. Ayrıca yaşlı kişilerde veya vücut direnci zayıf olanlarda idrar yolları enfeksiyonlarına da sebep olabilmektedirler (Hasenekoğlu ve Yeşilyurt, 2007; Kaynak, 2017).

*E. coli*'nin sistematığı Çizelge 1.2'de sunulmuştur.

**Çizelge 1.2** *E. coli*'nin sistematığı (Anonim, 2021f)

Regnum:	Eubacteria
Phylum:	Proteobacteria
Classis:	Gammaproteobacteria
Ordo:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Genus:	Escherichia
Species:	<i>E. coli</i> .

İnsanlarda enfeksiyonlara sebep olan *E. coli*'nin farklı patojenik grupları; intestinal sistemde enfeksiyonlara neden olan diyarejenik *E. coli* (DEC) grubu ve intestinal sistem dışından hastalıklara neden olan extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) grubu olarak bilinmektedir. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) ve diffusely adheren *E. coli* (DAEC), DEC grubu içerisinde, neonatal menenjitte sorumlu *E. coli* (NMEC), uropathogenic *E. coli* (UPEC), ve sepsis ilişkili *E. coli* (SePEC) ise ExPEC grubu içerisinde bulunmaktadır (Kaper ve ark., 2004; Akdoğan ve Akpolat, 2023).

#### 1.4.2 Serbest Yaşayan Amipler

Serbest yaşayan amipler (SYA), 1960'lı yıllardan bu yana veterinerlik ve tıp alanlarındaki araştırmacıların odağı haline gelmiştir. Bunun sebebi ise, bu grupta yer alan farklı cins ve türdeki amiplerin hayvanlarda ve insanlarda ölümcül prognozlu parazitözlere yol açtığıın anlaşılmasıdır (Saygı ve Polat, 2003; Kaynak ve ark., 2018).

SYA'lar, başta toprak ve su olmak üzere çevrede yaygın olarak bulunan ökaryotik protozoonlardır (Khan, 2006; Aykur, ve Dagci, 2023). *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Sappinia* ve *Balamuthia*, SYA'lardan olup bu cinslere ait bazı türler ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır (Delafont ve ark., 2018; Aykur ve Dagci, 2023).

SYA'ların özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış olan bireylerde ölümle sonuçlanabilen klinik tablolara neden olduğu bildirilmiştir. SYA'lar arasında, insanlar için patojen olabilen *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* ve birçok *Acanthamoeba* türünün, ciddi enfeksiyonlardan sorumlu olduğu belirtilmiştir (Visvesvara ve ark., 2007; Muchesa ve ark., 2014; Yazar ve ark., 2019).

#### 1.4.2.1 *Acanthamoeba castellanii*

*Acanthamoeba* cinsi amipler, ilk defa Aldo Castellani tarafından 1930 yılında *Cryptococcus pararoseus* kültüründe tespit edilerek tanımlanmıştır. *Acanthamoeba* cinsi, daha sonra da 1931 yılında Volkonsky tarafından sınıflandırılmıştır. Volkonsky, *Hartmonella* cinsini baz alarak 3 cinse ayırmıştır. *Hartmonella*: Düz duvarlı ve yuvarlak kistler ile karakterize iken *Glaeseria*; kist formda çekirdek bölünmesiyle karakterizedir. *Acanthamoeba* ise; mitoz bölünme, çift duvarlı olan kistler ve dış tabakada düzensiz olan sivri uçların varlığı ile karakterizedir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Kaynak, 2017). Çizelge 1.3'te *Acanthamoeba castellanii*'nin sistematigi sunulmuştur.

**Çizelge 1.3** *A. castellanii*'nin sistematigi (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Kaynak, 2017)

Regnum:	Protista
Phylum:	Sarcomastigophora
Classis:	Lobosea
Ordo:	Amoebida
Familia:	Acanthamoebidae
Genus:	<i>Acanthamoeba</i>
Species:	<i>A. castellanii</i>

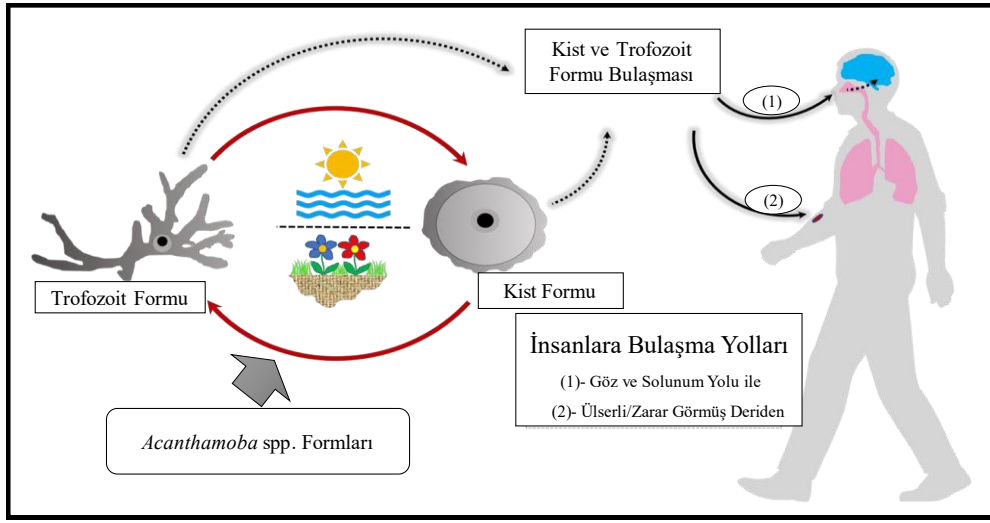
*Acanthamoeba* türleri laboratuvarında ksenik ya da aksenik kültür ortamlarında üretilmektedir. Canlı ya da ölü bakteri içeren ancak herhangi bir besin içermeyen veya düşük miktarda besin içeren (%0.05 yeast extract, %0.05 pepton ve %0.1 glukoz, agar) besiyerine amiplerin ekilmesine ksenik kültür denilmektedir. Ksenik kültürlerde çoğunlukla mukoid koloni olmayan *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. ya da *E. coli* kullanılmaktadır (Shuster, 2002; Berberoğlu, 2017; Kaynak, 2017). Aksenik kültürlerde ise bakteri kullanılmayıp standart besiyeri bileşenleri (pepton, glukoz, yeast extract) kullanılmaktadır. Ayrıca bakteri kontaminasyonunu önlemek için besiyerine penisilin, gentamisin ve streptomisin gibi antibiyotikler de eklenebilmektedir (Zeybek ve ark., 2009; Berberoğlu, 2017; Kaynak, 2017).

#### 1.4.2.2 *Acanthamoeba* Türlerinin Dağılımı, Morfolojisi ve Yaşam Döngüsü

*Acanthamoeba* türleri, Dünya'da geniş yayılım gösteren, çevrede yaygın olarak bulunan protozoonlardır. *Acanthamoeba* türlerinin yaşam alanları; toprak, deniz, okyanus sedimenti, kaplıcalar, yüzme havuzları, lağımlar, akvaryumlar, şebeke suları ile şişe suları, klimalar, hastaneler, diş tedavi birimleri, diyaliz üniteleri, kontakt lens

saklama konteynerleri ile lens dezenfektanları, bakteri, mantar ve memeli hücre kültürleridir (John ve Howard, 1996; Madencioğlu, 2014; Kaynak ve ark., 2019).

Ayrıca, bazı bitkiler ve omurgalı canlılar (balık, amfibi, sürüngen ve memeliler) ile sağlıklı görünen insanların nazal mukoza, boğaz, toraks, enfekte beyin ve akciğer dokusu ile immün sistemi baskılanmış bireylerin deri lezyonları ve keratitli hastaların kornea dokusu *Acanthamoeba* türlerinin diğer habitatlarıdır (Dykova ve ark., 1999; Madencioğlu, 2014; Kaynak ve ark., 2019). Şekil 1.6'da *Acanthamoeba*'nın hayat döngüsü ve insanlara bulaşma yolları sunulmuştur.



**Şekil 1.6** *Acanthamoeba* türlerinin yaşam döngüsü ve insanlara bulaşma yolları Aykur ve Dağcı, 2021'den modifiye edilmiştir.

Yaşam döngüsünde iki evre bulunan *Acanthamoeba* türlerinin birinci evresi, büyüme, beslenme, hareket ve üreme faaliyetlerinin yürütüldüğü trofozoit evre, ikinci evresi ise, olumsuz çevre koşullarına dayanıklı olan kist evresidir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Kaynak ve ark., 2018).

Çevresel şartların uygun olmadığı dönemlerde (elverişsiz pH koşulları, 20-56°C dışındaki sıcaklıklar, kuruluk, ultraviyole radyasyon, çeşitli kimyasalların varlığı, toksinler, ozmolaritedeki değişiklikler, besin sınırlaması vb.) trofozoitler çift cidarlı kistlere (ekzokist: dış duvar ve endokist: iç duvar) farklılaşmaktadırlar. *Acanthamoeba* türlerinin kistik formu dezenfeksiyona karşı dirençli olup olumsuz koşullar altında uzun süre yaşayabilmektedir. *Acanthamoeba* türlerinin genellikle tek olan çekirdeği, genetik bilgiyi depolamakta, hücresel aktiviteleri ve farklı genlerin ekspresyonunu da kontrol etmektedir (Kaynak, 2017; De Lacerda ve Lira, 2021).

*Acanthamoeba* türlerinin kist ve trofozoit formlarının boyutları türler arasında farklılık göstermektedir. Ancak trofozoit ve kist formu; büyük, merkezi çekirdekçiği olan bir çekirdeğe sahiptir. Trofozoit formu olumsuz çevre koşullarında farklılaşarak çift duvarlı kist formuna dönüşmektedir. Çevre şartları uygun ise kistler trofozoitlere dönüşmektedir (Khan, 2006; Madencioğlu, 2014; Kaynak ve ark., 2019).

**Trofozoit Form:** Büyüklükleri ortalama 40µm olup genelde yavaş hareketlerini parmak şeklindeki acanthopodium denen dikensi yalancı ayaklar ile sağlamaktadırlar (Polat ve ark., 2007). Sitoplazması 2 bölümden oluşmaktadır. Birinci bölüm yumurta akı kıvamında, hiyalen görünümde, parazitin hareket ve savunma faaliyetlerinde görev alan ektoplazmadır. İkinci bölüm ise granüler bir yapıda olan beslenme ve kontraktıl vakuolleri ile çekirdek gibi parazitin yaşamsal organlarının bulunduğu bölüm olan endoplazmadır (Saygı ve Polat, 2003; Kaynak ve ark., 2019). Trofozoitler, çevredeki partikül halinde bulunan besinleri (alg, bakteri, mantar, organik partiküller) fagositozla, sıvı ortamda eriyik halde bulunan besinleri de pinositozla bünyesine katarak beslenmektedirler (Aydın, 2008; Madencioğlu, 2014; Kaynak ve ark., 2019).

Ökaryotik canlılardan olan *Acanthamoeba* türlerinin organelleri, golgi kompleksi, düz ve kıvrımlı olan endoplazmik retikulum, besin vakuolleri, serbest ribozomlar, mitokondri ve mikrotübüllerdir. Üç katlı olan plazma membranı sitoplazmik içeriğini çevrelemiştir. Hücrede su dengesini sitoplazmada bulunan kontraktıl vakuoller kontrol etmektedir. Çekirdek ve büyük merkezi bir çekirdekçik bulunmaktadır. Üreme, eşeysiz olarak, ikiye bölünme biçimindedir (Saygı, 2002; Aydın, 2008; Kaynak ve ark., 2019).

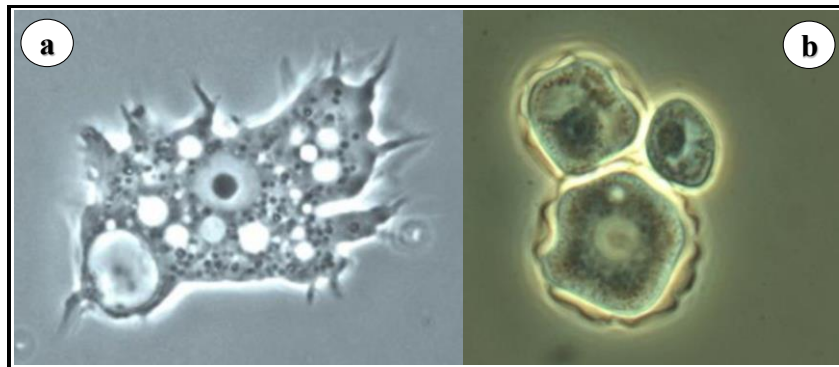
**Kist Formu:** Yuvarlak ve tek çekirdeklidir. Çeperleri endokist ve ektokist adı verilen çift tabakadan oluşmaktadır. Dış katmanı hafif kıvrık, iç katmanı polihedral görünümde olan kistlerin ortalama büyüklüğü ise 16µm civarındadır. Kist formu, klor, dezenfektan ve antibiyotiklere oldukça dirençlidirler. Düşük sıcaklıklarda hatta 0°C'de bile canlılığını sürdürebilmektedir. Çevre koşulları uygun olduğunda, kistler trofozoitlere dönüşmektedir (John, 1998; Polat ve ark., 2007; Aydın, 2008; Kaynak ve ark., 2019). Hava yoluyla da taşınabilen kistler *Acanthamoeba* türlerinin çevrede yayılmasına ve uygun konaklara ulaşmasına yardımcı olmaktadır. Kistlerin uzun

süre patojenitesini devam ettirerek canlı kalabildiği birçok çalışma ile gösterilmiştir (Madencioğlu, 2014; Kaynak ve ark., 2019).

*Acanthamoeba* kistinin dış duvarı, proteinlerden ve polisakkaritlerden oluşurken, iç duvarı selülozdan oluşmaktadır. *A. castellanii*'nin T4 genotipine ait türleri incelendiğinde, kist duvarının bileşiminin %33'ü protein, %4-6'sı lipid, %35'i karbonhidrat (genellikle selüloz), %8'i kuru madde ve %20'si tanımlanamayan materyal olduğu gözlenmiştir. Kist duvarlarının karbonhidrat bileşimi yüksek oranda galaktoz, glikoz ve az miktarda mannoz ile ksilozdur (Siddiqui ve Khan, 2012).

*Acanthamoeba*'daki selüloz biyosentezi, hücresel glikojenin glikojen fosforilaz yoluyla glikoza dönüştürülmesiyle elde edilmektedir (Moon ve ark., 2014). Selüloz, iç kist duvarının primer bileşenlerinden biri olduğundan, *Acanthamoeba*'da kist oluşum süreci için selüloz sentezi esastır. Selüloz sentezinde görev alan 3 enzim; glikojen fosforilaz, UDP-glukoz pirofosforilaz ve selüloz sentazdır. Bu enzimleri kodlayan genler, kistleşme sürecinin 1. ve 2. gününde yüksek oranda eksprese edilmektedir (Moon ve Kong, 2012). Ayrıca kist duvarlarının diğer ana bileşenleri aside dirençli proteinlerdir. Bunlardan biri de trofozoit formunda bulunmayıp sadece kist formuna özgü bir protein olan, arginin ve glutamik asitler açısından zengin, hidrofilik yapıda, 21kDa moleküler ağırlığa sahip ve kistleşme sürecinde ifade edilen kist spesifik protein (CSP21) olup biyosentezi mRNA seviyesinde düzenlenmektedir. CSP21 geninin, *Acanthamoeba* taksonomisini karakterize etmek için kullanıldığı bilinmektedir (Anwar ve ark., 2018).

Şekil 1.7'de *Acanthamoeba* türlerinin ışık mikroskobunda trofozoit ve kist görüntüsü verilmiştir.



**Şekil 1.7** *Acanthamoeba* türlerinin trofozoit (a) ve kist (b) görüntüsü (Carnt ve Stapleton, 2016; Efe, 2023)

Bugüne kadar, *Acanthamoeba*'nın 25 türü ve 22 farklı genotipi (T1-T22) tanımlanmıştır (De Lacerda ve Lira, 2021). Ancak Tayland'da yapılan bir çalışma, *Acanthamoeba*'nın yeni bir genotipinin (T23) tanımlandığını ortaya koymuştur. Yeni olan genotip T23'ün 18S rRNA geni, mevcut tüm genotiplerle karşılaştırıldığında %7.82-28.44 dizi farklılıklarının olduğu vurgulanmıştır (Putaporntip ve ark., 2021).

Çizelge 1.4'te *Acanthamoeba*'nın genotipleri ve insanlarda görülen hastalıklar ile olan ilişkisi sunulmuştur.

**Çizelge 1.4** *Acanthamoeba*'nın genotipleri ve insanlarda görülen hastalıklar ile olan ilişkisi (Corsaro ve ark., 2017; Jercic ve ark., 2019)

Genotip	İnsanlarda Neden Olduğu Hastalık/Hastalıklar
T1	Granüloamatöz Amibik Ensefalit (GAE)
T2	Keratit
T3	Keratit
T4	Keratit, GAE
T5	Keratit
T6	Keratit
T7	Bilinmiyor
T8	Bilinmiyor
T9	Bilinmiyor
T10	GAE
T11	Keratit
T12	GAE
T13	Keratit
T14	Bilinmiyor
T15	Keratit
T16	Keratit
T17	Bilinmiyor
T18	Bilinmiyor
T19	Bilinmiyor
T20	Bilinmiyor
T21	Bilinmiyor
T22	Bilinmiyor
T23	Bilinmiyor

Serbest radikaller, organizma bünyesinde moleküler düzeyde önemli etkilere sebep olmaktadır. Reaktif oksijen türlerindeki (ROS) artış, hücreler için toksik olup hücredeki protein, yağ ve nükleik asitleri hasara uğratmak suretiyle hücre içi sinyal iletimini bozmaktadır (Lopez-Alarcona ve Denicola, 2013). Organizma bünyesinde devamlı üretilen serbest radikaller vücutta doğal metabolizmada üretilen antioksidan savunma sistemleri tarafından yok edilmektedir. Antioksidan ajanlar hücrede serbest radikalleri temizleyerek hücrel hasarı önlemektedir (Lobo ve ark., 2010).

*Acanthamoeba* türlerinde oksidatif strese karşı, Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPx) ve Glutasyon redüktaz (GR) gibi

antioksidan enzimleri savunma sistemlerini oluşturmaktadır (Motavallihaghi ve ark., 2022). *A. castellanii*'nin mitokondrisi büyük miktarda antioksidan enzim olan CAT içermektedir (Trocha ve Stobienia, 2007). SOD, oksijeni moleküler oksijene ve hidrojen peroksite (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dönüştüren, böylece süperoksit radikallerini ortadan kaldıran antioksidan metaloenzimlerdir. *Acanthamoeba* sitoplazmasında Fe-SOD (Demir içeren SOD, 50 kDa) ve CuZn-SOD (Bakır ve Çinko içeren SOD, 38 kDa) olmak üzere iki adet SOD bulunmaktadır (De Obeso Fernandez del Valle ve Scheckhuber, 2022). GPx, mitokondri ve sitozolde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'yi suya parçalayan antioksidan enzimdir (Aslankoç ve ark., 2019).

*Acanthamoeba*, konakçının makrofajları tarafından fagosite edilmesi sırasında, ROS'a maruz kaldığında oksidatif strese karşı koyup konakçının bağışıklık sisteminden kaçmaktadır. Bu sebeple *Acanthamoeba*'nın oksidatif stres durumunda en önemli savunma mekanizmalarının, önce antioksidan enzimlerin miktarını artırmak sonra da mevcut kistleşme mekanizmasını aktifleştirmek olduğu düşünülmektedir (Motavallihaghi ve ark., 2022).

#### **1.4.2.3 *Acanthamoeba* Kaynaklı Önemli Hastalıklar**

*Acanthamoeba* türleri, SYA'lar içerisinde diğer türlere kıyasla çevrede daha fazla bulunmaktadır. *Acanthamoeba*'nın hem kist hem trofozoit formları insan vücuduna çeşitli yollardan (göz, intranazal yol, bütünlüğü bozulmuş cilt) girebilmektedir. Özellikle su ve toprakla yoğun temas halinde olan kişilerde hastalık oluşturabilme ihtimali oldukça fazladır. Ayrıca, AIDS ve kanser hastalarında, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde, organ transplantasyonu yapılan hastalarda, yetersiz ve dengesiz beslenen ve uzun süreli stres yaşayan bireylerde patojenik *Acanthamoeba* türlerinin hastalık oluşturabilme riski daha da artmaktadır (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Kaynak ve ark., 2019).

Genellikle kontakt lens kullananlarda görülen *Acanthamoeba* Keratiti (AK), çoğunlukla ölümle sonuçlanabilen Granülomatöz Amoebik Ensefalit (GAE), Kutanöz *Acanthamoebiasis* *Acanthamoeba* kaynaklı önemli hastalıklardır. Bununla beraber immün sistemi zayıflamış bireylerde görülen pnömoni, yayılım enfeksiyonu, deri lezyonları parazitin sebep olduğu diğer hastalıklardır. Parazit, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium avium*, *Legionella pneumophila* gibi çeşitli bakteriyel



ajanlar dahil, birçok virüs ve bakteri orijinli hastalıkları bulaştırmada aracı konumundadır (Schuster ve Visvesvara, 2004; Kaynak ve ark., 2019).

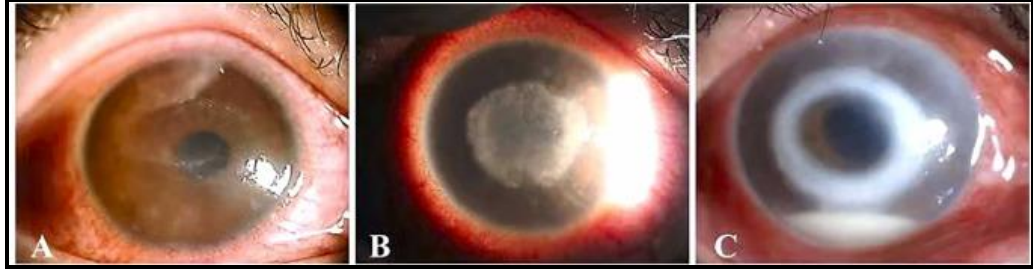
*Acanthamoeba Keratiti*; etkeni bazı *Acanthamoeba* türleri olan, görme sağlığını tehdit eden, ağrılı seyreden, tedavi edilmediği takdirde ilerleyerek körlüğe yol açabilen korneal bir hastalıktır (Ertabaklar ve ark., 2009; Kaynak ve ark., 2019). Hastalığa sekiz *Acanthamoeba* türünün (*A. griffini*, *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. rhysodes*, *A. hatchetti*, *A. quina*, *A. lugdunesis*, *A. culbertsoni*) sebep olduğu araştırmalar sonucu saptanmıştır (Yünlü ve ark., 2015; Efe, 2023).

*Acanthamoeba Keratiti*, ilk olarak 1974'te İngiltere'de Nagington tarafından keşfedilmiş olup, 1980'li yıllarda kontakt lens kullanımındaki artışa paralel olarak lens hijyenin yetersiz olması nedeniyle salgınlar görülmüş ve bu yıllardan sonra da hastalığın insidansında ciddi bir artış gözlenmiştir (Khan, 2006; Madencioğlu, 2014; Kaynak ve ark., 2018). Türkiye'de ilk AK vakası 1996 yılında Elâzığ ilinden, ikinci vaka ise 1999 yılında İzmir'den bildirilmiştir (Yazar ve ark., 2019).

AK'nin ana risk faktörleri; bireysel hijyen eksikliği, lenslerin zamanından fazla kullanılması, kontakt lenslerde oluşan biyofilm, kontakt lens temizliğinin uygunsuz yapılması, korneal travma, etkenle kontamine sulara maruz kalma olarak sayılabilmektedir (Siddiqui ve Khan, 2012; Kaynak 2017).

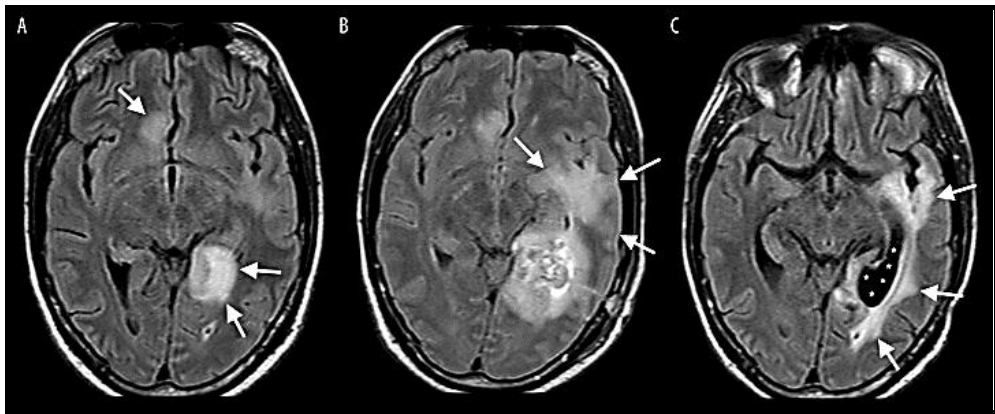
Gözlerde görülen kızarıklık, ağrı, bulanık görme, fotofobi, gözlerde batma, sulanma, göz kapağında ödem, yanma ve pitozis, korneada beyaz leke oluşumu, gözün saydamlığını kaybetmesi, kornea epitelinin gevşekliği ve kornea içinde halka oluşumu AK'nin majör belirtileri arasındadır (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Kaynak ve ark., 2018).

Şekil 1.8’de AK’nin yarıık lamba görüntüleri sunulmuştur.



**Şekil 1.8** AK’nin (A, B, C) yarıık lamba fotoğrafları. (A) Psödodendritli epitelit. (B) radyal nöritli epitelit. (C) Halka infiltrasyonu ve hipopyon. Zhang ve ark., 2023’ten modifiye edilmiştir.

Nadiren görülen ve ölümcül seyreden Granülomatöz Amibik Ensefalit, ilk kez Jager ve Stamm tarafından 1972 yılında tanımlanmıştır. Bazı *Acanthamoeba* türlerinin sebep olduğu GAE, yavaş ilerleyen, kronikleşerek akciğerleri tutan MSS enfeksiyonuyla karakterize bir hastalıktır. Bağışıklık sistemini zayıf veya güçlü olan çocuklar ve/veya yetişkinlerde görülebilmektedir. Burun ve solunum yoluyla vücuda giren GAE etkeni, kan yoluyla vücuda yayılır, kan-beyin bariyerini aşarak MSS’ye ulaşmaktadır (Khan, 2006; Madencioğlu, 2014; Kaynak ve ark., 2019). Baş ağrısı, görme fonksiyonundaki bozuklukları, bulantı ve kusma, uyuşma, ateş, halüsinasyon, konfüzyon, fokal nörolojik defisit, kafa basıncında artış ve koma GAE’nin majör belirtileridir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Malatyalı ve ark., 2011; Madencioğlu, 2014; Kaynak ve ark., 2018). Şekil 1.9’da GAE’nin serebral MR (Manyetik Rezonans) görüntüsü sunulmuştur.

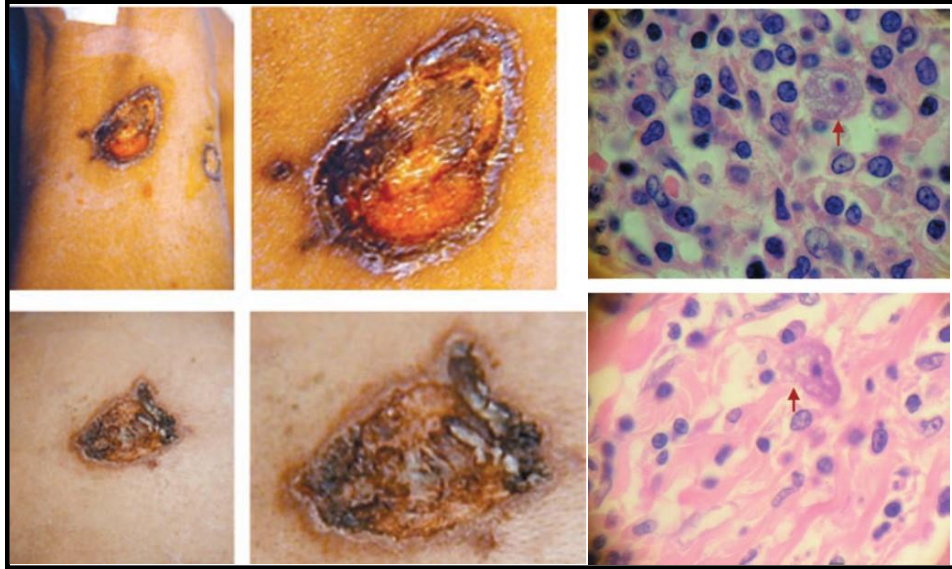


**Şekil 1.9** GAE’nin serebral MR görüntüsü (Keane ve ark., 2020)

Genellikle AIDS hastalarında MSS enfeksiyonuyla beraber veya yalnız görülen, sert eritamatöz nodüller ve deri ülserleriyle karakterize bir enfeksiyon olan

Kutanöz Acanthamoebiasis, organ nakli için immünsupresif tedavisi gören hastalarda, HIV olmayan GAE'li hastalarda veya immün sistem rahatsızlığı olan kişilerde görülebilmektedir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Kaynak, 2017).

Kutanöz Acanthamoebiasis'de lezyonlar; nodüller, papüller, ülserler, skarlar ya da abseler şeklinde görülmektedir. Genellikle kutanöz lezyonlar irinli bir materyal toplayarak sonrasında iyileşmeyen sert ülserlere dönüşen sert papülonodüller olup GAE'li hastalarda acanthamoebiasisin geç semptomlarıdır. Amip, vücuda girdikten sonra kan yoluyla akciğer ve beyne ulaşmaktadır. Sinsi ve yavaş ilerleyen bu hastalığın, MSS'nin tutulumu ile beraber prognozu daha da kötüleşerek bireyin ölümü ile sonuçlanmaktadır (Stetkevich ve ark., 2022). *Acanthamoeba* türlerinin neden olduğu kutanöz lezyonlar ve bu lezyonlardan alınan hematoksilen ve eozinle boyanmış örneklerin ışık mikroskobundaki görüntüsü Şekil 1.10'da sunulmuştur.



**Şekil 1.10** *Acanthamoeba* kaynaklı kutanöz lezyonlar ve lezyonlardan alınan, hematoksilen ve eozinle boyanmış örneklerin ışık mikroskobundaki görüntüsü (Galarza ve ark., 2009)

*Acanthamoeba* kaynaklı enfeksiyonlar gün geçtikçe ciddi sağlık sorunu haline dönüşmektedir. Bilhassa kontakt lens kullanımının artmasıyla sorun daha da gün yüzüne çıkmıştır. *Acanthamoeba* trofozoitleri; antiseptikler, antiprotozon ilaçlar, antibiyotikler ve antifungallere ve farklı tedavilere duyarlı iken, kistler tedaviye karşı oldukça dirençli olup, kornea yüzeyinde uzun süre kalabildikleri için enfeksiyonun kronikleşmesinden sorumludurlar. Hem kistlere hem de trofozoitlere karşı etkili bir ajanın varlığı henüz kanıtlanmamıştır (De Lacerda ve Lira, 2021).

*Acanthamoeba* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde günümüzde kullanılan antiparaziter ilaçlar, göz ve MSS gibi anatomik bölgelerde istenilen düzeyde etkin olamamaktadır (Fiori ve ark., 2006; Kaynak, 2017). Bunun yanısıra *Acanthamoeba* tedavisinde antifungaller, antiseptikler ve bazı antibiyotikler (makrolit grubu), test edilmiş fakat her zaman başarılı olunamamıştır (Mattana ve ark., 2004; Kaynak, 2017).

Granülatöz Amibik Ensefalit (GAE), *Acanthamoeba* kaynaklı MSS’inde oluşan enfeksiyondur. *Acanthamoeba Keratiti*’ne (AK) göre daha az görülmekle beraber standart bir tedavisi henüz bulunamamıştır (Ergüden, 2015; Kaynak, 2017). Anti-ameobik ilaçlardan bazıları sadece amoebastatik etki göstermekte, bazıları da konakta sitotoksik etkiye neden olmaktadır. Ayrıca bu tedaviler, uzun süre uygulandığında, hastalar ilacı iyi tolere edememekte ve bu ilaçlara karşı gün geçtikçe mikroorganizmalar tarafından direnç geliştirilebilmektedir (Aydın, 2008; Kaynak, 2017).

Mevcut sorunlar nedeniyle *Acanthamoeba* türlerinin trofozoit ve kist formları üzerinde iyi tolere edilebilen, etkin ve non-sitotoksik ilaç arayışları halen sürmektedir (Saygı ve Polat, 2003; Kaynak, 2017). Günümüzde uygulanmakta olan tedavilerin istenilen düzeyde aktivite ve selektivitede olmaması, tedavi sürelerinin uzaması buna bağlı advers etkilerin oluşması, kist formlarının kronik enfeksiyonlarda ilaçlara dirençli oluşu gibi sorunların elimine edilmesi için alternatif tedavi yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır. Bu noktadan hareketle modern tıp ve ilaç endüstrisi alanlarında bitkisel kaynaklı kimyasalların tercih edilmesi yönünde eğilimin de giderek arttığı görülmektedir (Inbaneson ve ark., 2012; Kaynak, 2017).

Kapsamlı literatür taraması sonucunda *E. umbellata* Thunb. ile konjuge edilmiş gümüş nanopartiküllerine maruz bırakılan *A. castellanii* trofozoitlerinde kist-spesifik protein (CSP21) ve selüloz sentaz II (CSII) genlerinin ifade analizi daha önce çalışılmamıştır. Bu bağlamda **araştırmadan elde edilecek yaygın etkiler;**

- *E. umbellata*'nın amoebisidal aktivitesinin araştırılmasına yönelik ilk çalışma olmasının yanısıra, çalışma neticesinde elde edilecek verilerin, Türkiye'de bitkisel kaynak kullanımına ciddi oranda katkı sağlayacağı düşünülmektedir.
- Klinikte amoebisidal etkileri kanıtlanmış olan bazı antiparazitik ilaçların uzun süreli kullanımı sonucunda görülen yan etkileri, bilimsel ve toplumsal bir sorun oluşturmaktadır. Mevcut çalışma ile paraziter enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir bitkiye ait fitokimyasalların azami dozları belirlenebilecek ve AgNP'lerin antiamoebik aktiviteleri de tespit edilecektir.
- Araştırma neticesinde elde edilecek verilerin, farmasötik sanayi alanı için de önemli olabileceği tahmin edilmektedir.
- AgNP'lerin biyolojik uygulamalar için güvenli bir seçim olması dikkate alınarak bu nanopartikülün *Acanthamoeba* trofozoitleri üzerinde amoebisidal aktivite gösterirken konakta da sitotoksik etki oluşturmayacağı tahmin edilmektedir.
- Günümüzde tıbbi cihaz kaplamalarında hatta yara bakımında da antimikrobiyal ajan olarak kullanılan AgNP'lerin sentezinde bitki özütlerinin kullanılması, yani nanopartiküllerin biyosentezi; hızlı, non-toksik, çevre dostu teknoloji olarak bilinmektedir. Bu durumda, çalışmada yapılan yeşil sentez yoluyla AgNP'lerin kullanımı çevre dostu bir çalışmayı temsil edecek, tıp ve farmakolojik endüstri alanlarına katkı sağlayacaktır.
- Oksidatif strese karşı *Acanthamoeba*'nın en önemli savunma mekanizmalarının, önce antioksidan enzimlerin miktarını artırmak sonra da mevcut kistleşme mekanizmasını aktifleştirmek olduğu düşünülmektedir (Motavallihaghi ve ark., 2022). *Acanthamoeba* oksidatif stres koşullarında CAT ve SOD gibi enzimleri aktive ederek savunma mekanizmasını başlatmaktadır. *E. umbellata*'nın meyve özütünün ve yeşil sentez yoluyla sentezlenen AgNP'lerin parazitin oksidatif stres enzimleri (CAT ve SOD) üzerinde inhibitör etki yapması ve parazitin strese karşı

savunma mekanizmasının baskılanması hedeflenmiştir. Böylece kistleşme süreci de durdurularak tedavide başarı olasılığını arttıracak yeni yaklaşımların geliştirilmesine bu çalışma öncülük edecektir.

- Ayrıca *A. castellanii*, stres tepkisi olarak kistleşme sürecine girerken CSP21 ve CSII genlerinin mRNA seviyelerindeki değişiklikler hassas bir teknik olan RT-qPCR yöntemiyle tespit edilecektir. Çalışmada *E. umbellata* bitki özütü ve bu bitki özütü kullanılarak sentezlenmiş AgNP'lerin *A. castellanii* kistleri üzerindeki stres tepkisi, ilgili genlerin mRNA seviyelerinin kantitatif analizleri ile gözlenecektir. *Acanthamoeba* spp.'nin hem kistlerine hem de trofozoitlerine karşı etkili bir tedavinin varlığı henüz kanıtlanmamıştır (De Lacerda ve Lira, 2021). Bu durumda yapılması planlanan çalışmanın alternatif tedavi yöntem arayışında etkili olabileceği düşünülmektedir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Sabir ve ark., (2007) *E. umbellata*'nın çiçeklerinden (eter, kloroform, etanol, metanol), yapraklarından (aseton, kloroform, etanol, metanol) ve meyvelerinden (saf su, aseton, kloroform, metanol) farklı çözücüler kullanılarak elde edilen özütü dirençli *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), üzerinde antibakteriyel aktivitelerini test etmişlerdir. Çalışmada, çiçeğin eter ile hazırlanan özütünün EHEC, *P. aeruginosa*, *S. aureus* ve *B. subtilis*'e oldukça etkili olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca yaprakların etanol ile hazırlanan özütünün tüm bakterilere karşı bakterisidal aktivite sergilediğini ortaya koymuşlardır. Meyvenin saf su ile hazırlanan özütünün ise EHEC ve *S. aureus*'un büyümesini inhibe ederken, *B. subtilis*'in daha az inhibisyon bölgesi sergilediğini gözlemlemişlerdir. Çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa*'nın, saf su ile hazırlanan meyve özütüne karşı tamamen dirençli bulunurken meyvenin aseton ile hazırlanan özütünün, *P. aeruginosa*'ya karşı güçlü bakterisidal aktivite gösterdiğini vurgulamışlardır.

Oh ve Lee, (2008) *Elaeagnus multiflora*'nın etanolik meyve ve tohum özütlerinin antioksidatif ve sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Özütlerin, 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) radikali üzerindeki etkilerini, lipid peroksidasyonu üzerindeki önleyici etkilerini ve 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT) etkilerini, Ayrıca İnsan serviks adenokarsinoma hücrelerinde (HeLa), Meme kanseri hücrelerinde (MCF-7) ve Mide kanseri hücrelerinde (SNU-638) inhibitör etkilerini değerlendirmişlerdir. *E. multiflora* meyve ve tohumun etanol özütlerinin DPPH radikal üretimini ( $36.91 \pm 1.00$ ,  $94.17 \pm 0.37$ ) ve lipid peroksidasyonunu (sırasıyla  $28.18 \pm 5.02$ ,  $40.30 \pm 1.45$ ) inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Tohum özütlerinin HeLa hücreleri ( $6.93 \pm 1.92$ ,  $84.97 \pm 0.47$ ), MCF-7 hücreleri ( $5.45 \pm 0.41$ ,  $84.97 \pm 0.47$ ) ve SNU-638 hücreleri ( $19.39 \pm 0.43$ ,  $76.84 \pm 0.63$ ) üzerinde meyve özütüne göre antikanser etkisinin fazla olduğunu belirterek *E. multiflora* tohumlarının antikanser fonksiyonel gıdası olarak koruyucu ve diyetetik tedaviye aday olduğunu vurgulamışlardır.

Jain ve ark., (2009) ise; *Carica papaya* meyvesinden deiyonize su ile hazırlanan özütünü kullanarak AgNP (90ml 1mM AgNO<sub>3</sub> 10ml meyve özütü kullanılarak oda sıcaklığında 5 saat) sentezlemişlerdir. AgNP'ler karakterizasyon

analizlerinde Ultraviyole görünür spektrofotometri (UV-Vis) ile, 450nm dalga boyunda olduğunu, Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile sentezlenen parçacıkların ortalama boyutunun 15nm olup, kübik ve altıgen şekilli olduğunu ve X-ışını difraktometresi (XRD) analiziyle 10-80 arasında, 2θ değerindeki tüm spektrumda üç yoğun tepe gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca sentezlenen AgNP'lerin, Ampisilin, Tetrasiklin, Cefixime ve Rifampisin'e dirençli *E. coli* ve *P. aeruginosa* üzerinde bakterisidal aktivite sergilediğini vurgulamışlardır.

Patel ve ark., (2009) *Solanum nigrum* meyvelerinin HeLa hücre hattı üzerinde antikanser aktivitesini araştırmışlardır. *S. nigrum* metanolik meyve özütünün, HeLa hücresi üzerindeki sitotoksitesini Sülförodamin B (SRB) testi ve MTT testi ile değerlendirmişlerdir. SRB analizinde özütün, 10mg/ml ila 0.0196mg/ml arasındaki konsantrasyon aralığında HeLa hücre hattı üzerinde önemli sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve ayrıca aynı konsantrasyon aralığında HeLa hücre hattı üzerinde inhibitör etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak bitkinin antikanser ajan olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Kliescikova ve ark., (2011) *Acanthamoeba*'nın (T4 genotipi) çeşitli konsantrasyonlardaki (%1, %10, %25, %50) organik çözücülere [metanol, aseton ve Dimetil sülfoksit (DMSO)] karşı zamana bağlı stres tepkisini ve psödokistlerin hidrasyon, pH (3-12) ve ısıya (40-65°C) karşı dirençlerini araştırmışlardır. Psödokistlerin 25°C'de susuz 1 haftaya kadar, 6-11 arası pH ve maksimum 55°C sıcaklığa kadar dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca organik çözücüler belirli zamanda, (0, 30., 60., 90., 120. dakika, 6., 8., 12., 24., 48., 72. saat) farklı konsantrasyonlara (%1, %10, %25, %50) maruz bırakıldıktan sonra CSP21, CSI ve CSII, Glikojen fosforilaz (GP) ve 18S rDNA (Housekeeping) genlerinin ekspresyon seviyelerini de incelemişlerdir. Dört izolatın tamamındaki canlı trofozoitlerin %1 ila %10 arasındaki konsantrasyonlarda metanol, aseton veya DMSO'ya maruz bırakılması, maruziyetten sonraki 30 dakika içinde bölünmeyi inhibe ettiğini ve solventlerin daha yüksek konsantrasyonlarının (%25; %50) öldürücü olduğunu tespit etmişlerdir. CSP21'in yalnızca eksistasyon sırasında ifade edildiğini ve en yüksek ifadenin 24. saatte görüldüğünü tespit etmişlerdir. CSI ve CSII'nin hem kist hem de psödokist olarak farklılaşma sırasında eksprese olduğunu ve ekspresyonun 30. ve 60. dakika arasında görüldüğünü belirtmişlerdir. Buna karşılık, GP'nin büyüyen ve



bölünen hücrelerin yanı sıra her iki farklılaşma işlemi sırasında da eksprese edildiğini ifade etmişlerdir.

Saxena ve ark., (2011) raf ömrünü uzatmak amacıyla radyasyon ve düşük sıcaklıkta depolanan ve 28 gün bekletilen Liçi (*Litchi chinensis*) meyvesinin antioksidan ve radyokoruyucu özelliklerini araştırmışlardır. Liçi meyvesinin antioksidan ve radyokoruyucu özellikler açısından önemli ölçüde zengin olduğunu ve antioksidan parametrelerinin fenolik ve flavonoid içerikleri ile önemli korelasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. pBR322 plazmid DNA'sı üzerinde radyasyonun neden olduğu hasara karşı koruma özelliğini de gözlemlediklerini vurgulamışlardır. Bu nedenle meyvelerin radyasyon veya düşük sıcaklıkta depolamaya duyarlı olmadığını belirtmişlerdir.

Meng ve ark., (2012) ise, *Garcinia xanthochymus*'un yaprak, kök ve meyvelerin çeşitli özütlerinin (petrol eteri, saf su, etil asetat, n-butanol) in vitro antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Bitkinin en fazla etil asetat yaprak özütü olmak üzere tüm özütlerin pBR322 plazmid DNA'sı üzerinde güçlü bir antioksidan aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Phanjom ve ark., (2012) *Elaeagnus latifolia*'nın saf su ile hazırlanan yaprak özütünü kullanarak AgNP sentezlemişlerdir. AgNP'lerin karakterizasyonunda UV-Vis, XRD ve Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanmışlardır. AgNP'lerin, UV-Vis'de 450nm dalga boyunda olduğunu, XRD'de 111, 200, 220 ve 311'de bantlar gözlemlediklerini ve TEM'de AgNP'lerin boyutunun 30-50nm aralığında olduğunu belirtmişlerdir.

Minhas ve ark., (2013a) tarafından yapılan başka bir çalışmada *E. umbellata*'nın yaprak ve kökü kullanılarak çeşitli çözücüler (eter, aseton, etil saf su asetat, kloroform, etanol, metanol) ile hazırlanan özütlerini üç farklı gram-pozitif (*S. aureus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecium*), beş farklı gram-negatif (*E. coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*), bakteriler ile bir maya (*Saccharomyces cerevisiae*) ve bir mantara (*Aspergillus flavus*) karşı toksik potansiyellerini araştırmışlardır. Bitkinin saf su dışındaki özütlerinin tüm bakteriler üzerinde önemli antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğunu ayrıca kloroform, etanol özütlerinin orta derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiğini ve saf

su ile hazırlanan özütün tüm bakterilere karşı hiçbir antimikrobiyal aktivite göstermediğini gözlemlemişlerdir. Etanol ve metanol ile hazırlanan özütlerin mantar ve mayaya karşı önemli antimikrobiyal aktivite gösterdiğini ve bitkinin kök özütlerinin mikroorganizmalara karşı daha etkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Minhas ve ark., (2013b) *E. umbellata*'nın tamamının kimyasal bileşenlerini incelemişlerdir. 1- 7-Hidroksi-kromen-2-on, 2- 7, 8 Dihydroxychromen-2-one, 3- 3-(2,2,3,4,5-Pentahidroksi-heksiloksi)-kromen-2-on, 4- antrakınon, 5-  $\beta$ -sitosterol glikokopiranosid, 6-lupeol gibi bileşikler tespit etmişlerdir. İzole edilen bileşiklerin yapısal incelemesini spektroskopik çalışmalarla yapmışlardır. Bileşik 1 ile 4'ün *Plasmodium falciparum*'a karşı antimalaryal aktivitesini de incelemişler ve parazitin büyümesinin kısmi olarak baskılandığını tespit etmişlerdir.

Natarajan ve ark., (2013) *Elaeagnus indica*'nın yaprak özütüyle AgNP sentezlemişler ve karakterizasyon testleriyle de doğrulamışlardır. TEM ile AgNP'lerin ortalama boyutunun ~30nm çapında ve küresel şekilde olduğunu tespit etmişlerdir. AgNP'lerin, UV-Vis'de 412-473nm dalga boyunda olduğunu belirtmişlerdir. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ve Dinamik ışık saçılımı (DLS) karakterizasyon testleriyle de doğrulamışlardır. Sentezlenen AgNP'lerin bakterisidal ve fungusidal etkilerini de birkaç patojen mikroorganizmalara karşı test etmişlerdir.

Vahabi ve ark., (2014) ise, *Pyracantha coccinea* meyvesinin metanol özütünün HeLa hücrelerinde sitotoksik etkisini, meyvelerin metanol ve sulu özütlerinin ise antioksidan özellikleri ile toplam fenolik içeriğini değerlendirmişlerdir. Metanol özütün 800 $\mu$ g/ml konsantrasyondaki sitotoksitesinin diğer konsantrasyonlardan yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Metanol özütün toplam fenolik içerik ve antioksidan özelliğinin sulu özütten daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Ya ve ark., (2014) *Elaeagnus angustifolia*'nın etil asetat meyve özütünün farklı fraksiyonlarının antitümör ve antioksidan aktivitelerini belirlemek için MTT testi, DPPH radikal temizleme aktivitesi ve indirgeme gücü yöntemi ile araştırmışlardır. Sonuç olarak konsantrasyon ve polarite arttıkça özütlerin antioksidan aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir. Özütlerin in vitro HeLa hücreleri üzerinde inhibitör etki sergilediğini belirtmişlerdir. İlk 48 saat boyunca inhibisyon etkisi ile konsantrasyon ve

polarite arasında bağımlı bir ilişki olup, konsantrasyon ve polarite ne kadar yüksekse, inhibisyon etkisinin o kadar güçlü olduğunu belirtmişlerdir

Aziz ve ark., (2015) *E. umbellata*'nın kabuk ve meyve özütlerinin (kloroform, metanolik, diklorometan, petrol eteri, etil asetat) antibakteriyel, antifungal, insektisidal ve fitotoksik aktivitelerini araştırmışlardır. Bitkinin petrol eteri özütleri *E. faecalis*'e karşı önemli antibakteriyel aktivite gösterdiğini, diklorometan özütünün *S. aureus*'a karşı etkili olduğunu saptamışlardır. Kloroform özütünün *S. flexenari*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* ve *E. coli*'ye karşı düşük antibakteriyel aktivite gösterdiğini, etil asetat özütünün, *K. pneumoniae*'ye karşı anlamlı antibakteriyel aktivite sergilerken, metanolik özütünün, *E. coli*'ye karşı önemli antibakteriyel aktivite sergilediğini belirtmişlerdir. Tüm özütlerin düşük fitotoksik aktivite gösterdiğini ancak diklorometan özütünün orta derecede insektisidal aktivite sergilerken diğer özütlerin düşük insektisidal aktivite gösterdiğini vurgulamışlardır.

Ramesh ve ark., (2015) ise, *Emblica officinalis*'in saf su ile hazırlanan meyve özütünden AgNP sentezlemişlerdir. Nanopartiküllerin karakterizasyon analizlerinde; nanopartiküllerin dalga boyunu UV-Vis (432-436nm) ile, *E. officinalis*'teki biyomoleküllerin varlığını F-TIR analizi ile şeklini ve boyutunu ise SEM ve XRD ile incelemişlerdir. AgNP'lerin ortalama boyutunu yaklaşık 15nm olarak bulmuşlardır. Ayrıca pH'nın AgNP sentezine etkisini de (10ml meyve özütü ve 1mM AgNO<sub>3</sub> kullanılarak) çeşitli pH'larda (2, 4, 6, 8, 10) incelemişlerdir. Aşırı asidik ve aşırı alkali koşullar altında biyomoleküllerin inaktive olduğunu vurgulamışlardır. Sentezlenen AgNP'lerin antibakteriyel aktivitesini test etmişlerdir. Gram-pozitif (*S. aureus* ve *B. subtilis*) ve gram-negatif (*E. coli* ve *K. pneumoniae*) bakterilere karşı bakterisidal aktivitesinin olduğunu vurgulamışlardır.

Shibula ve ark., (2015) ise; *Annona muricata*'nın metanolik yaprak özütünün biyoaktif bileşiklerini GC MS ile tanımlamışlardır. Özütte bulunan bileşiklerin kütle spektrumları Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST) kütüphanesi ile eşleştirmişlerdir. 4H-Piran-4-on, Tetradekanoik asit, 2,3-dihidro-3,5-dihidroksi-6, Heksadekanoik asit metil ester, n-Heksadekanoik asit, Fitol, 2,4-Dihidroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-one ve Oktadekanoik asit gibi bazı fitobileşikleri tespit etmişler ve bu bitkinin geleneksel tedavide kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Swamy ve ark., (2015) *Momordica cymbalaria*'nın metanolik meyve özütünü kullanarak AgNP sentezlemişlerdir. AgNP'lerin UV-vis analizinde 450nm'de boyuna sahip olduğunu ve X-XRD desenlerinin, yüz merkezli kübik şekilde olduğunu tespit etmişlerdir. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve SEM analiz sonuçlarına göre AgNP'lerin parçacık boyutunun ortalama 15.5nm'ye sahip olduğunu ve küresel şekilli olduğunu belirtmişlerdir. Sentezlenen AgNP'lerin, çoklu ilaca dirençli patojenik bakteri suşlarına karşı güçlü antibakteriyel aktivite gösterdiğini ve meyve özütüne (%60.4) göre daha yüksek serbest radikal temizleme aktivitesinin (%74.2) olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca hem meyve özütünün hem de sentezlenen AgNP'lerin farklı konsantrasyonlarda Rat L6 iskelet kası hücre hattına karşı sitotoksikite gösterdiğini ve en yüksek inhibisyon yüzdesinin AgNP'ler için 100µg/ml konsantrasyonda olduğunu belirtmişlerdir.

Abu Bakar ve ark., (2016) üç yabancı Rubus cinsine (*Rubus moluccanus* L., *Rubus fraxinifolius* Poir. ve *Rubus alpestris* blume) ait meyvelerin metanolik özütünün fitokimyasal içeriklerini (toplam fenolikler, flavonoid, antosiyanin ve karotenoid içeriği), antioksidan aktivitesini (DPPH, Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) ve Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite (ABTS) testleri ile, antiasetilkinesteraz ve antibakteriyel aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Fitokimyasalların miktarının belirlemek için GC MS analizi yapmışlardır. *R. alpestris*'in en yüksek toplam fenolik maddeyi içerdiğini ve en yüksek DPPH temizleme ve FRAP aktivitelerinin olduğunu belirtmişlerdir. En yüksek toplam flavonoidin ve antosiyanin içeriğinin *R. moluccanus*'ta bulunduğunu tespit etmişlerdir. Antibakteriyel etkileri ise *R. moluccanus* ve *R. alpestris* özütlerinin *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis*'e karşı hafif inhibisyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Tüm özütlerin antikolinesteraz aktivitesinin %23-26 aralığında olduğunu vurgulamışlardır. GC MS analizi ile *R. alpestris*, *R. moluccanus* ve *R. fraxinifolius*'un özütlerinde sırasıyla 12, 21 ve 7 organik bileşik tespit etmişler ve üçünde de ortak olan bileşiğin 2,4-Dihidroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-one olduğunu tespit etmişler. Bu bileşiğin antibakteriyel aktiviteye katkıda bulunabileceğini vurgulamışlardır.

Salehi ve ark., (2016) ise; *Artemisia marschalliana*'nın etanol ile hazırlanan özütünü kullanarak sentezledikleri AgNP'leri incelemişlerdir. Sentezlenen AgNP'leri, UV-Vis, X-ışını ile analiz etmişlerdir. AgNP'lerin UV-vis'de 430nm dalga boyunda

olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada insan mide karsinomu (AGS) hücrelerine karşı AgNP'lerin doza bağlı inhibitör etki yaptığını ve antikanser özellik gösterdiğini vurgulamışlardır. RT-qPCR ile kanserli ve normal hücrelerde Bax ve Bcl-2 genlerinin ekspresyonunu da araştırmışlardır. Pro-apoptotik Bax ekspresyonunun mRNA seviyelerinin yukarı regüle edildiğini, anti-apoptotik Bcl-2 gen ekspresyonunun ise normal hücrelere kıyasla AgNP'lerle tedavi edilen hücrelerde azaldığını belirtmişlerdir. Ek olarak, AgNP'ler *P. aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter baumannii*, *S. aureus*, gibi patojenik bakterilere karşı bakterisidal etkisinin olduğunu vurgulamışlardır.

De Souza ve ark., (2017) *Eugenia brejoensis* (EBEO), *Hyptis pectinata* (HPEO), *Hyphenia salzmannii* (HSEO), *Lippia macrophylla* (LMEO) ve *Syagrus Coronata* (SCEO) tohumlarından elde edilen esansiyel yağların kimyasal bileşimini ve in vitro antitrypanosomal etkilerini araştırmışlardır. GC MS analiziyle 114 fitobiyetik tanımlamışlardır: ana bileşiklerin: EBEO için  $\delta$ -kadinen (%15.88), transkaryofilen (%9.77) ve  $\alpha$ -Muurolol (%9.42); HPEO için trans-karyofilen (%15.24), bisiklogermakren (%7.33) ve cis-kalamenen (%7.15); HSEO için trans-karyofilen (%30.91), karyofillen oksit (%13.19) ve spathulenol (%5.68); HSEO için ksantoksin (%17.20) trans-karyofilen (%14.34) ve metil-öjenol (%5.60); LMEO için timol (%49.81), karvakrol (%31.6) ve  $\sigma$ -simen (%10.27) ve SCEO için oktanoik asit (%38.83) dodekanoik asit (%38.45) ve dekanoik asit (%20.51) olduğunu tespit etmişlerdir. Test edilen yağların tümünün, *Trypanosoma cruzi*'nin bütün formları üzerinde antitrypanosomal etki gösterdiğini ve memeli hücrelerine karşı orta düzeyde sitotoksikite ( $100 < CC_{50} < 500 \mu\text{g/ml}$ ) gösterdiğini vurgulamışlardır.

Huang ve ark., (2017) *A. castellanii* standart suş hücrelerini (ATCC 30010) [1 saat süreyle Poliheksametilen biguanid (PHMB) ile işleme tabi tutulan], Ulusal Cheng Kung Üniversitesi Hastanesi'nde PHMB tedavisi gören hastalardan izole edilen izolat B'yi ve yine aynı hastanede tedavi gören ve PHMB'ye yüksek direnç sahip hastalardan alınan izolat D'yi karşılaştırmışlardır. PHMB tedavisinin etkinliğini aydınlatmak ve *Acanthamoeba* türlerinin PHMB'ye duyarlılıklarını belirlemek için uyguladıkları in vitro ilaç testi sonucunda,  $100 \mu\text{g/ml}$ 'de her iki klinik izolatın (B ve D) PHMB'ye toleransının ATCC30010'dan fazla olduğunu ve izolat D'nin en yüksek toleransı gösterdiğini belirtmişlerdir. Sekanslama ve genotipleme için 18S rDNA

kullanmışlardır. PHMB tedavisi boyunca, izolat B ve izolat D'nin bazı popülasyonlarının psödokistlere dönüşerek hayatta kaldığını gözlemlemişlerdir. Bu davranışın, ATCC30010 suşunda gözlenmediğini belirtmişlerdir. İzolatların farklı tepkilerini teyit etmek için, *A. castellanii* enkistasyonunun ve psödokist transformasyonunun korelatif gen ekspresyon seviyesini kontrol etmişler ve kist dönüşümü ile ilişkili marker olan CSP21 için gen ekspresyonunun tespit edilmediğini gözlemlemişlerdir. PHMB tedavisinin ilerlemesi sırasında, psödokist dönüşümünde anahtar enzim olan CSII'nin gen ekspresyon seviyeleri, izolat B'de ATCC 30010'dan daha yüksek, izolat D'de ise oranının önemli ölçüde değişmediğini belirtmişlerdir.

Issa ve Abd-Aljabar, (2017) *Morus nigra* meyvelerinin etanolik, flavonoid ve antosiyanin özütlerinin kimyasal bileşimini araştırmışlardır. Karbonhidratların, glikozitlerin, fenolik bileşiklerin varlığını ve alkaloidler, saponinler, serbest amino asitler, proteinler ve tanenlerin bulunmadığını tespit etmişlerdir. Özütlerin DNA koruyucu etkisini pBR322 plazmid DNA'sı ile test etmişlerdir. En yüksek DNA koruyucu etkisinin antosiyanin özütünde olduğunu belirtmişlerdir. Tüm özütlerin bazı patojen bakterilere karşı güçlü antibakteriyel aktivitesinin olduğunu vurgulamışlardır.

Mier-Giraldo ve ark., (2017) olgun *Physalis peruviana* meyvelerinin etanol ve izopropanol özütlerinin biyolojik potansiyelini araştırmışlardır. İnterlökin-6, interlökin-8 ve monosit kemoattractan protein-1 (MCP-1) ekspresyonunun sitotoksik ve immünomodülatör etkilerini, HeLa ve fare fibroblast hücrelerinde değerlendirmişlerdir. Her iki özütte de ursolik asit ve rosmarinik asit varlığını tespit etmişler. Ancak gallik asitin, kuersetinin ve epikateşinin izopropanol özütünde daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Toplam polifenol içeriğinin, antioksidan aktivite ve sitotoksik aktivite arasında kullanılan çözücüye bağlı bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. İzopropanol özütünün IC<sub>50</sub> değerinin HeLa hücrelerinde 60.48±3.8µg/ml ve fare fibroblast hücrelerinde (L929) 66.62±2.67µg/ml olduğunu belirtmişlerdir. Özütlerin interlökin-6, interlökin-8 ve MCP-1 salınımını doza bağlı bir şekilde azalttığını ve bitkinin yeni tamamlayıcı farmasötik ürünlerin geliştirilmesi için antikanser ve immünomodülatör potansiyelinin olduğunu vurgulamışlardır.

Mittal ve ark., (2017) *Inospora cordifolia* yapraklarının deiyonize sulu özütü ve 5mM gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) çözeltisinin kombinasyonu kullanılarak AgNP

sentezlemişlerdir. Farklı pH'lardaki (3, 5, 7, 9 ve 11) çözeltileri kullanmışlar ve asidik ortamın (pH 3 ve pH 5) AgNP'lerin sentezinde inhibitör etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Maksimum pik yoğunluğunu pH 11'de gözlemlemişlerdir. Ayrıca reaksiyonu farklı sıcaklıklarda (20, 40, 60, 80, 100°C) gerçekleştirmişler ve AgNP sentezi için optimum sıcaklığın 30-40°C aralığında olduğunu belirtmişlerdir. AgNP karakterizasyon sürecinde, UV-vis'de 440nm dalga boyunda olduğunu, SEM'de ve TEM'de AgNP'lerin boyutunun, küresel morfolojiye sahip ve 30-50nm aralığında olduğunu belirtmişlerdir. AgNP'lerin kristal yapısını, XRD ile tanımlamışlardır. AgNP'lerin *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* gibi bakterilere ve bitki patojenik mantarları olan *Fusarium oxysporum* ve *Sclerotinia sclerotiorum*'a karşı toksik olduğunu vurgulamışlardır.

Musa ve ark., (2017) ise; *Pandanus tectorius*'un etil asetat meyve özütünü HeLa hücre hattında antioksidan aktivitesini ve sitotoksitesini değerlendirmişlerdir. Radikal temizleme aktivitesini DPPH yöntemiyle, sitotoksitesini ise HeLa hücre dizilerine karşı MTT ile test etmişlerdir. *P. tectorius* etil asetat meyve özütünün yüksek antioksidan özelliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir. Özütün HeLa hücrelerine karşı sitotoksik aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. *P. tectorius* meyvesinin antioksidan ve antikanser aktivite bakımından güçlü potansiyelinin olduğunu vurgulamışlardır.

Rashid ve ark., (2017) *Momordica charantia*'nın sulu özütünde bulunan fitobileşenleri karakterize etmişler ve gümüş özütlü nanopartiküllerin (Ag-özüt-NP'ler) antimikrobiyal etkinliğini değerlendirmişlerdir. Fitokimyasalların taranmasından sonra; AgNP'leri ve sulu özütü iyice karıştırarak polianilin ile kaplamışlardır. AgNP'lerin karakterizasyonunu UV-Vis, FTIR, SEM ve TEM ile yapmışlardır. *S. aureus*, *S. typhi*, *E. coli*, *P. aeruginos*'ya karşı bakterisidal etkilerini değerlendirmişlerdir. UV-Vis'de 408nm dalga boyunda olduğunu, Ag-özüt-NP'lerin FTIR spektrumunda -CH, -NH, -COOH vb. varlığını, SEM ve TEM ile sentezlenen NP'lerin parçacık boyutunun 78.5-220nm aralığında olduğunu tespit etmişlerdir. Ag-özüt-NP'lerin, *E. coli*'ye karşı  $34.6 \pm 0.8$ mm inhibisyon bölgesi gösterirken, siprofloksasin için  $25.6 \pm 0.5$ mm'lik inhibisyon bölgesi gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ag-özüt-NP'ler için maksimum inhibisyon bölgesi, *S. typhi*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*'da sırasıyla  $24.8 \pm 0.7$ mm,  $26.4 \pm 0.4$ mm,  $7.4 \pm 0.4$ mm olduğunu belirtmişlerdir. Ag-özüt-NP'lerin, AgNP'lere ve *M. charantia* özütüne göre daha fazla

antibakteriyel etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca gram negatif bakterilerin (*S. typhi* hariç) Ag-özüt-NP'lere gram pozitif bakterilerden daha duyarlı olduğunu vurgulamışlardır.

Lakshmanan ve ark., (2018) *Cleome viscosa*'nın meyve özütünü kullanarak AgNP sentezlemişler ve elde edilen AgNP'lerin karakterizasyonunu UV-Vis, FTIR, XRD, Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM), Element enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi (EDAX) ve TEM analizi ile doğrulamışlardır. Sentezlenen AgNP'lerin, bazı bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesi incelendiğinde en fazla *S. aureus* üzerinde antibakteriyel aktivite sergilediğini belirtmişlerdir. Ayrıca, sentezlenen AgNP'lerin, akciğer ve yumurtalık kanser hücre hatlarında antikanser aktivitesinin olduğunu da vurgulamışlardır. Biyosentezlenmiş AgNP'lerin varlığı UV-Vis (410–430nm dalga boyunda) ile doğrulanmış, XRD analizi ile AgNP'lerin kristal doğası, FTIR spektrumunda da biyomoleküllerde nanopartiküller için bir kaplama ajanı görevi gören farklı fonksiyonel grupların varlığını doğrulamak için kullanmışlardır. AgNP'lerin morfolojisini, SEM kullanılarak analiz etmişler ve nanopartiküllerin boyutunun TEM ile 20–50nm aralığında olduğunu belirtmişlerdir.

Renda ve ark., (2018) *Crataegus microphylla*'nın kurutulmuş yaprak, gövde kabuğu ve meyveleri ile hazırlanan özütler ile (etanol, asit-etanol, etanol-su, metanol, asit-metanol, metanol-su, su ve asit-su) farklı dozlarda DPPH radikal temizleme, FRAP analizleri ile oksidatif DNA hasarının önleme, asetilkolinesteraz, tirozinaz,  $\alpha$ -glukosidaz inhibisyonu ve antioksidan etkilerini araştırmışlardır. Kök kabuklarının asit-metanol özütünün, diğer özütlerle karşılaştırıldığında en yüksek asetilkolinesteraz ve tirozinaz inhibisyonu sergilediğini belirtmişlerdir. Yaprakların asit-etanol özütünün,  $\alpha$ -glukosidaza karşı en etkili özüt olduğunu ( $15.78 \pm 0.14 \mu\text{g/ml IC}_{50}$ ) belirtmişlerdir. DPPH için asit-etanol özütünün  $IC_{50}$  değerinin  $9.89 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$  olduğunu vurgulamışlardır. Yaprakların ve gövde kabuklarının  $125 \mu\text{g/ml}$  dozundaki metanol özütlerinin, pBR322 plazmid DNA üzerinde DNA hasarına karşı koruyucu aktivite sergilediğini vurgulamışlardır.

Tessema ve ark., (2018) *Embeli schimperi*'nin meyve (sulu metanol, n-hekzan etil asetat) özütlerinin biyoaktif bileşiklerini ve in vitro antihelmintik etkisini araştırmışlardır. Özütler arasında *Caenorhabditis elegans*'a karşı en yüksek



antihelmintik aktiviteyi n-heksan özütünün gösterdiğini belirtmişler ve bu özütün GC MS yapısal karakterizasyonunda içinde dodecanoic acidin de bulunduğu yağ asitlerinin (do-, tri-, tetra-, heksadekanoik asit, palmitoleik, oleik, linoleik, linolenik asit) varlığını tespit etmişlerdir.

Ahirrao, (2019) *Momordica dioica* meyvelerinin antikanser aktivitesini MTT ile değerlendirmiştir. *M. dioica* meyvelerinin sulu özütünü, insan yumurtalık karsinomu (PA-1) hücre hattında ve HeLa hücre hattında çeşitli konsantrasyonlarda test etmiştir. *M. dioica* meyvelerinin sulu özütü sırasıyla 40µg/ml konsantrasyonunda PA-I ve HeLa hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini belirtmiştir. Sonuç olarak *M. dioica*'nın, kanser tedavisinde kullanılabilecek bazı önemli kimyasal bileşenleri içerdiğini vurgulamıştır.

Anwar ve ark., (2019a) amip ve fungus enfeksiyonlarında kullanılan Amfoterisin B, Nistatin ve Flukonazol isimli ilaçları altın nanopartiküller (AuNP) ile konjuge etmişlerdir. Karakterizasyon doğrulamasında ise AFM (Nyst-AuNP'ler 10-50nm iken, Amp-AuNP'ler ve Flu-AuNP'lerin 50-200nm), UV-Vis (Amp-AuNP'ler, Nys-AuNP'ler ve Flu-AuNP'ler, sırasıyla 555, 561 ve 525nm) ve FTIR kullanmışlardır. Bu ilaçlar ve bunların altın nanokonjugatlarını *A. castellanii*'ye karşı amoebisidal aktivitesini test etmişlerdir. Ayrıca, konak hücre sitotoksitesite deneylerini de gerçekleştirmişlerdir. Amp-AuNP'ler ve Flu-AuNP'lerin, tek başına ilaçlarla karşılaştırıldığında 10µM'de en belirgin amoebisidal etkiyi gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, ilaçlarla konjuge edilen altın nanopartiküller ile muamele edilen amipler HeLa hücrelerine karşı flukonazol hariç tüm ilaç kaplı nanopartiküllerin konak hücrede daha az sitotoksitesite gösterdiğini vurgulamışlardır.

Anwar ve ark., (2019b) Oleik Asit'in etanolik özütünü ve bu özütü beraber sentezledikleri AgNP'leri (OA-AgNP'ler) *A. castellanii*'ye karşı antiamoebik etkilerini ve laktat dehidrojenaz salınımı ile belirledikleri amip aracılı konak hücre sitotoksitesitesini araştırmışlardır. UV-Vis (408nm), AFM (OA-AgNP'ler, 20-90nm arasında geniş boyut dağılımı ile küresel şekilli), DLS ve FTIR ile karakterizasyon doğrulamasını yapmışlardır. Canlılık, büyüme inhibisyonu, kistleşme ve eksitasyon deneylerini, tek başına 10 ve 5µM Oleik Asit konsantrasyonu ve Oleik Asit'le konjuge AgNP'ler ile yapmışlardır. Biyoanalizlerin, tek başına Oleik Asit'in ve Oleik Asit'le

konjuge AgNP'lerin önemli anti-amoebik aktivite sergilediğini, nanopartikül konjugasyonunun ise Oleik Asit'in etkinliğini daha da arttırdığını vurgulamışlardır. Fenotip farklılaşma deneylerinde ayrıca, 5µM'de kistleşme ve eksistasyonun önemli ölçüde inhibe edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca, Oleik Asit ve Oleik Asit'le konjuge AgNP'lerin, laktat dehidrojenaz salınımı ile belirlendiği üzere amip aracılı konak hücre sitotoksitesini de inhibe ettiğini vurgulamışlardır.

Chegeni ve ark., (2019) *Myrtus communis*'in sulu ve etanolik özütlerinin *Acanthamoeba* trofozoitlerine ve kistlerine karşı amoebisidal aktivitesini değerlendirmişlerdir. *M. communis* özütlerini çeşitli konsantrasyonlarda (1.25, 2.5, 5, 10mg/ml) hazırlamışlar ve *Acanthamoeba* üzerinde 3 farklı zamanda (24., 48. ve 72. saat) test etmişlerdir. *M. communis*'in etanolik özütünün trofozoitlerin ve kistlerin canlılık yüzdesini sırasıyla %0 ve %8.62 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca, *M. communis*'in sulu özütünün 10mg/ml konsantrasyonunda canlılık oranının 72 saat sonra trofozoitlerde %0 ve kistlerde ise %31.10 olduğunu belirtmişlerdir. Bu özütün, *Acanthamoeba* trofozoitlerine ve kistlerine karşı güvenli bir amoebisidal ajan olarak kullanılabilceğini ve bu bitkinin antiparaziter ilaç olarak etkilerinin hayvan modellerinde ve gönüllü enfekte kişilerde ileri araştırmaların yapılması gerektiğini vurgulamışlardır.

Korkmaz (2019), yaptığı çalışmada, Afrika Menekşesinin (*Saintpaulia*) deiyonize su ile hazırlanan yaprak özütüyle AgNP sentezleyerek karakterizasyonunu yapmıştır. Karakterizasyon sonucunda, UV-Vis'de ~432nm dalga boyunda olduğunu, XRD, SEM ile 40.4nm ve küresel boyutta AgNP'lerin oluştuğunu belirtmiştir. AgNP'lerin 4 farklı gram-pozitif ve 4 farklı gram-negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite ve biyofilm inhibisyonu gösterdiğini belirtmiştir. 10mM konsantrasyondaki AgNP'lerin tüm bakteri suşlarına karşı bakterisidal etki gösterdiğini vurgulamıştır.

Salari ve ark., (2019) tarafından yapılan çalışmada, *Prosopis farcta* meyvelerinin deiyonize suyla hazırlanan özütüyle AgNP sentezlemişlerdir. Optimizasyon çalışmasında, özüt konsantrasyonunun etkisini (100, 110, 120, 130 ve 140µL), reaksiyon sıcaklığının etkisini (50, 60 ve 70°C), reaksiyon süresinin etkisini (25 ve 45 dakika) incelemişlerdir. Karakterizasyon için UV-vis, TEM ve XRD

kullanmışlardır. Ayrıca hazırlanan meyve özütü ve AgNP'lerin antibakteriyel aktivitesini gram-pozitif ve gram-negatif bazı bakterilere karşı değerlendirmişlerdir. AgNP'lerin, gram-negatif bakterilere karşı daha etkili olduğunu vurgulamışlardır. İlave olarak AgNP'lerin toplam fenolik ve flavonoid bileşiminin meyve özütüne oranla daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Biyosentezlenmiş AgNP'lerin tek başına *P. farcta* meyve özü ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir antioksidan ve antibakteriyel aktivite gösterdiğini vurgulamışlardır.

Srinivasan ve ark., (2019) *E. indica* 'nın hekzan, kloroform, aseton ile etil asetat ve metanolla hazırlanan yaprak özütlerini, antimikrobiyal, antioksidan, antiproliferatif ve fitokimyasal özellikleri açısından test etmişlerdir. Aseton ile hazırlanan özütün, *in vitro* güçlü antioksidan potansiyelinin olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca *E. indica*'nın tüm özütlerinin, çalışmada kullanılan patojenlerin çoğuna karşı geniş bir antimikrobiyal potansiyelinin olduğunu belirtmişlerdir. *E. indica*'nın metanol ile hazırlanan özütünün, *S. epidermidis*'e karşı oldukça yüksek antibakteriyel potansiyel sergilediğini ortaya koymuşlardır. *E. indica*'nın aseton ile hazırlanan özütünün güçlü antiproliferatif aktivitesinin olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırmaya göre, *E. indica*'nın aseton ile hazırlanan özütünün antiproliferatif, antimikrobiyal ve antioksidan kapasitesinin güçlü olduğunu vurgulamışlardır.

Suganya ve ark., (2019) ise, kahverengi deniz yosunu (*Sargassum wightii*) ve yeşil deniz yosunu (*Halimeda gracilis*) olmak üzere iki deniz yosunu türünün farklı özütlerini (aseton, kloroform, metanol, etanol, su) incelemişlerdir. Özütlerin fenolik ve flavonoid içeriğiyle beraber antioksidan aktivitelerini de değerlendirmişlerdir. *S. wightii*'nin etanolik özütünün, *H. gracilis* özütüne kıyasla daha güçlü antioksidan aktivite sergilediğini ve aynı zamanda daha yüksek toplam fenolikler ve flavonoidler içerdiğini belirtmişlerdir. Ek olarak, bu deniz yosunlarındaki biyoaktif bileşiklerin karakterizasyon doğrulamasını FTIR ve GC MS ile yapmışlar, her iki türde ortak olan fitobileşik Dimethylsulfoxonium formylmethylide olmak üzere *S. wightii*'de 9 *H. gracillis*'de 4 fitobileşik tespit etmişlerdir. Ayrıca özütlerin antimikrobiyal aktivitesini üç patojenik gram-negatif bakterinin biyofilm oluşumuna karşı test etmişlerdir. *S. wightii* ve *H. gracillis*'in etanolik özütleri, biyofilm oluşumunda %40-75'e kadar önemli bir azalmayla en yüksek biyofilm önleyici etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Son

olarak, bu özütlerin insektisidal potansiyelleri, sıtma vektörlerinin (*Anopheles stephensi*), Dang Humması ve Zika Virüsü vektörlerinin (*Aedes aegypti*) ve Japon ensefalit vektörünün (*Culex tritaeniorhynchus*) üçüncü dönem larvalarına karşı değerlendirmişlerdir. *S. wightii* etanolik özütünün LC<sub>50</sub> değerinin 50ppm'den düşük olduğunu vurgulamışlardır.

Anwar ve ark., (2020) *Polyalthia longifolia var pendula*'dan izole edilen Quersetin (QT), kolavenik asit (PGEA) ve *Caesalpinia pulcherrima*'nın metanolik özütünü (CPFLM) kullanarak *Acanthamoeba* T4 genotipine ait bir keratitli hastadan izole edilen *A. castellanii*'nin klinik izolatına karşı etkilerini belirlemek için AgNP'ler ile birleştirmişlerdir. Bileşiklerin UV-Vis ve AFM ile karakterizasyon doğrulamasını yapmışlardır. Quersetin kaplı AgNP'lerin (QT-AgNPs), 443nm dalga boyunda olduğunu ve ortalama boyut dağılımının 45nm civarında olduğunu belirtmişlerdir. QT-AgNP'lerin spesifik olarak anti-amoebik etkiler sergilediğini ve bu bileşiklerin de insan hücrelerinde sitotoksik etkiler göstermediğini vurgulamışlardır.

Ali ve ark., (2020) ise; *E. umbellata* yaprakları ile 5 farklı özüt [hekzan (EUH), etil asetat (EUE), diklorometan (EUD), bütanol (EUB) ve su (EUW)] hazırlamışlar ve bu özütlerden AgNP sentezleyerek karakterizasyon testleriyle doğrulamışlardır. Ayrıca *S. aureus* ile *E. coli*'ye karşı bakterisidal aktivitesini ve insan makrofaj hücrelerinde de sitotoksik etkisini araştırmışlardır. pH 7, 30°C sıcaklık, 1 saat süreyle 1000rpm karıştırma hızı ve konsantrasyon (1mM AgNO<sub>3</sub> ve 1mg/ml ekstrakt) gibi reaksiyon parametrelerini her reaksiyon sırasında muhafaza ederek deney düzenlemişlerdir. UV-vis'de AgNPsEUW, AgNPsEUB ve AgNPsEUD, sırasıyla 407, 412 ve 418nm dalga boylarında olduğunu, AgNPsEUE 398nm dalga boyunda olduğunu ve AgNPsEUH'de absorpsiyon göstermediğini belirtmişlerdir. AFM ve SEM incelemelerinde boyut olarak tek tip olmadıklarını ve boyutların 20-100nm arasında değiştiğini bununla birlikte, AgNPsEUW, yaklaşık 40nm'lik tek dağılımlı boyuta sahip olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca tüm nanopartiküllerin *E. coli* üzerinde daha aktif olduklarını ve AgNPsEUW'nin diğerlerine göre antibakteriyel etkisinin daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Yine AgNPsEUE, AgNPsEUD, AgNPsEUB ve AgNPsEUW'nin sitotoksitesini MTT ile farklı konsantrasyonlarda (5 ila 250µg/ml) nanopartiküller ve özütler kullanılarak araştırmışlardır. AgNPsEUW'nin yüksek

konsantrasyonda dahi nonsitotoksik olduğunu ve sito-uyumluluk özellikler sergilediğini vurgulamışlardır.

Artanti ve ark., (2020) Parijoto meyvesinin (*Medinilla speciosa* Reinw.ex.), antikanser potansiyeli olan sekonder metabolit bileşiklerini ve metanol özütünün sitotoksik etkisini MTT testi ile araştırmışlardır. Sonuçlar, Parijoto meyvesinin (MEP) metanol özütünün, HeLa hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiğini, HeLa hücrelerine karşı sisplatinin (kanser tedavisinde kullanılan bir ilaç) IC<sub>50</sub> değerinin ise 12.8µg/ml olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak, MEP'in sisplatin ile sinerjistik sitotoksikite etkisi dikkate alındığında ortak kemoterapi ajanı olarak potansiyelinin var olduğunu vurgulamışlardır.

Öztürk ve Öztürk (2020) *Tilia rubra*'nın deiyonize suyla hazırlanan özütü ile sentezlenen AgNP'lerin antifungal (*C. albicans*) etkisini değerlendirmişlerdir. AgNP'lerin biyosentezi UV-Vis'de 427nm dalga boyunda olduğunu, TEM görüntüleri ile nanopartiküllerin küresel morfolojiye sahip ve 5-15nm boyutlarında olduğunu gözlemlemişlerdir. XRD analizi ile partiküllerin kübik ve kristal yapıda olduğunu belirtmişlerdir. Gümüşün biyo-indirgenmesinden sorumlu fitobileşikleri tanımlamada FTIR analizi kullanmışlardır. AgNP'lerin *C. albicans* üzerindeki antifungal etkisi incelemişler ve sonuç olarak sentezlenen AgNP'lerin güçlü antifungal aktivitesi olduğunu vurgulamışlardır.

Renuka ve ark., (2020) *Phyllanthus emblica* bitkisinden deiyonize suyla hazırlanan meyve özütünü kullanılarak AgNP sentezlemişler ve AgNP'lerin karakterizasyonunu UV-vis ve FTIR ile doğrulamışlardır. XRD ile ortalama boyutun 19-45nm arasında değişen kristal yapı oluşturduğunu belirtmişlerdir. SEM ile AgNP'lerin altıgen şeklinde olduğunu belirtmişlerdir. Sentezlenen nanopartiküllerin, *K. pneumoniae* ile *S. aureus*'a en az konsantrasyonda dahi (10µg) önemli derecede antibakteriyel etki gösterdiğini vurgulamışlardır.

Singha ve ark., (2020) farklı (Alev çekirdeksiz, Kishmish chorni, Red Globe ve Thompson çekirdeksiz) üzüm özütlerinin antioksidan etkilerini ve radyasyon kaynaklı hasara karşı DNA koruyucu aktivitelerini araştırmışlardır. Üzüm özütlerinin radyasyonun neden olduğu plazmid DNA hasarını önemli ölçüde önlediğini ve süper sarmal pBR322 plazmid DNA'sının (~%93) tamamen 150 Gy gama-radyasyon

dozunda açık dairesel (~%97) ve doğrusal (~%2) forma dönüştüğünü belirtmişlerdir. Üzüm kabuğunda bulunan antosiyaninin muhtemel radyokoruyucu aktivitesinin bulunduğunu vurgulamışlardır.

Francis ve ark., (2021) *Jatropha curcas*'nın yaprak özütlerinin *Phaeoisariopsis personata*'ya karşı antifungal etkinliğini test etmişlerdir. *J. curcas* yaprak özütünde GC MS ile tanımlanan, Hexadecane, *n*-hexadecanoic acid, phenol, 2, 4 bis (-dimethylethyl), phytol and hexadecanoic methyl ester, 1,2,3-propanetriol; monoacetate gibi bazı bileşiklerin antifungal aktiviteden sorumlu olan ana fitobileşikler olabileceğini belirtmişlerdir.

Nazir ve ark., (2021) *E. umbellata* meyveleri kullanılarak hazırlanan kloroform özütünün aktif bileşenlerini, çeşitli spektroskopik teknikler kullanarak morin, floroglüsinol ve 1-heksil benzen izole etmişlerdir. İzole edilen bileşiklerin antioksidan, antibakteriyel ve antidiyabetik aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Morin, DPPH ve ABTS radikallerine karşı güçlü in vitro antiradikal potansiyel sergilediğini ayrıca seçilmiş bakteri türlerine karşı (*E. coli*, *B. cereus*, *S. typhi*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa* ve *Proteus mirabilis*) belirgin antibakteriyel aktiviteler sergilediğini belirtmişlerdir.

Miranda ve ark., (2021) *A. muricata*'nın (EtOHAm) etanolik özütlerinin *Toxoplasma gondii*'nin in vitro ve in vivo antiparaziter etkisini araştırmışlardır. Ayrıca bitkinin etil asetat (EtOAcAm), *n*-bütanol (BuOHAm), sulu (H<sub>2</sub>OAm), heksan (HexAm) ve diklorometan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>Am) özütlerinin de sitotoksitesini NIH/3T3 fibroblastlarda değerlendirmişlerdir. EtOHAm, EtOAcAm, BuOHAm, H<sub>2</sub>OAm, 200µg/ml dozlarına kadar düşük sitotoksite sergilerken HexAm ve CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>Am, 100µg/ml dozlardan itibaren toksisite gösterdiğini, EtOHAm, HexAm ve CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>Am in vitro parazitin canlılığını azalttığını tespit etmişlerdir. Canlılarda EtOHAm, HexAm ve CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>Am, enfekte hayvanların hayatta kalma oranını artırdığını yalnızca EtOHAm'ın ince bağırsak ve akciğerdeki parazit canlılığını azalttığını belirtmişlerdir.

Mortazavi-Derazkola ve ark., (2021) *E. angustifolia* ağaç kabuğunun metanol özütünün antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Biyosentezlenmiş AgNP'lerin karakterizasyonu için XRD, FTIR, enerji dağıtıcı X-ışını analizi (EDS) ve FESEM teknikleri ile doğrulamışlardır. AgNP'lerin oluşumunu 424nm'de maksimum

adsorpsiyon ile belirlemiştir. Ayrıca FESEM sonuçları, sentezlenen nanopartiküllerin homojen ve 65-90nm boyutunda, küresel morfolojide olduğunu vurgulamışlardır. *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* için minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerlerini sırasıyla 1.5, 2.5 ve 20ug/ml olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*'nin minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) değerlerini sırasıyla 2.5, 5, 20µg/ml olarak tespit etmişlerdir.

Tailulu ve ark., (2021) kuru noni (*Morinda citrifolia*) meyvesinin metanolik özütünün aktif bileşenlerini araştırmışlardır. Özütün, *E. coli*, *Streptococcus thermophilus*, *S. aureus*, *S. cerevisiae* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Özütte GC MS ile yirmi bir fitobileşik olduğunu ve içlerinde 2,4-dihidroxy-2,5-dimehtyl-3(2H)-furan-3-one bileşiğinin de bulunduğunu belirtmişlerdir.

Catrawardhana ve ark., (2022) *Mangifera kemanga*'nın etanol, etil asetat ve n-heksan özütlerinin içeriklerini, HeLa hücrelerinde de sitotoksik etkilerini MTT analizi ile incelemişlerdir. Fitokimyasal testlerle özütlerin flavonoid, tanen, triterpenoid ve alkaloid içerdiğini belirtmişlerdir. MTT analizi sonucu HeLa hücreleri için, sırasıyla etanol, etil asetat, n-heksan özütleri için IC<sub>50</sub> değerlerini, 44.34, 16.41 ve 43.23ppm olarak tespit etmişlerdir. *M. kemanga* meyve özütü rahim ağzı kanserine karşı antikanser ajan olarak potansiyele sahip olduğunu vurgulamışlardır.

Jha ve ark., (2022) *Jasminum sambac*'ın uçucu yağında GC MS analiziyle ana bileşik olarak Dimetilsülfoksonyum formilmetilidin (%85.33) ve ardından Asetik asit, fenilmetil esterin (%4.09); Dietil Ftalat (%2.17); ve Feniletıl Alkol (%1.33) tespit etmişlerdir. Esansiyel yağın 9 bakteriye karşı antibakteriyel ve 3 mantara karşı antifungal etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Yağın, düşük konsantrasyonlarda dahi, *P. falciparum*'un ilaca dirençli ve ilaca duyarlı süşlarına karşı güçlü anti-sıtma etkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

Motavallihaghi ve ark., (2022) *A. castellanii*'nin oksidatif strese karşı direnç mekanizmalarını incelemişlerdir. *A. castellanii*'nin trofozoitlerini farklı konsantrasyonlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele ederek IC<sub>50</sub> değerini MTT analizi kullanılarak belirlemiştir. SOD, CAT, GPx ve GR aktiviteleri belirleyerek, CAT ve SOD'un gen ekspresyon miktarları RT-qPCR ile analiz etmişlerdir. Ayrıca CAT ve SOD'un spesifik

inhibitörleri olarak sırasıyla 3-AT ve potasyum siyanür (KCN) kullanmışlardır. Hücre döngüsü analizini ve apoptozu, akış sitometrisi ile değerlendirmişlerdir. SOD, CAT, GR ve GPx aktivitelerinin oksidatif strese artış gösterdiğini vurgulamışlardır. Apoptozun oksidatif stres altında CAT ve SOD'un spesifik inhibisyonundan sonra önemli ölçüde arttığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak parazitin SOD ve CAT enzimlerinin aktivitesinin azaltılması veya engellenmesi yoluyla *A. castellanii* enfeksiyonu ile baş etmenin mümkün olabileceğini vurgulamışlardır.

Sifaoui ve ark., (2022) klorheksidinin *A. polifaga*'nın oksidatif stres durumu üzerindeki etkisini ABTS, DPPH ve FRAP gibi farklı antiradikal yöntemler kullanarak incelemişlerdir. Klorheksidinin, ROS'nin aşırı ekspresyonu yoluyla ve/veya antioksidan enzimlerini inhibe ederek hücrelerde oksidatif dengesizliği tetiklediğini belirtmişlerdir. Klorheksidinin, oksidatif strese tepki olarak antiradikal aktiviteyi arttırmasının yanı sıra, iki antioksidan enzim olan SOD ve indirgenmiş flavin adenin dinükleotid-fumarat redüktazın (NADH-FRD) aktivitesini sırasıyla %30 ve %40'a düşürebildiğini belirtmişlerdir. Hem SOD hem de NADH-FRD aktivitelerinin inhibisyonunun, hücre oksidatif dengesizliğinde önemli bir role sahip olabileceğini vurgulamışlardır.

Qanash ve ark., (2022) ise, Kei Elması'nın (*Dovyalis caffra*) metanolik özütünün Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve GC MS analizlerini yapmışlar ve biyolojik (antiviral ve antikanser) aktivitelerini değerlendirmişlerdir. HPLC ile klorojenik asitin ( $2107.96 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$ ), kateşinin ( $168 \pm 0.58 \mu\text{g/g}$ ) ve gallik asidin ( $15.66 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ ) varlığını tespit etmişlerdir. 2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-one bileşiğinin yanı sıra levoglukozenon, izokiapin B, dotriakontan, 7-nonononik asit ve terteksadekanetiylol içeren farklı biyolojik aktivitelere sahip fitobileşikleri GC MS ile tanımlamışlardır. Test edilen özütün,  $1000 \mu\text{g/ml}$ 'de Hepatoselüler karsinom hücrelerine (Hep G2) karşı potansiyel antikanser aktivite (%58.90 toksisite) sergilediğini belirtmişlerdir. Antibakteriyel etki bakımından en fazla *E. coli* ve *Proteus vulgaris*'e karşı gözlemlendiğini, bunu *S. aureus* ve *B. Subtilis*'in takip ettiğini belirtmişlerdir. *C. Albicans*'a karşı zayıf aktivite gösterirken, insan koronavirüsüne (229E) karşı antiviral aktivite gösterdiğini, ancak insan H3N2'ye (SI) virüsüne karşı etkisinin zayıf olduğunu vurgulamışlardır.



Zulfiqar ve ark., (2022) *E. umbellata* (meyve) kullanılarak AgNP sentezlemişler ve karakterizasyon testleriyle doğrulamışlardır. AgNP'lerin antibakteriyel, antioksidan ve fitotoksik aktivitelerini de değerlendirmişlerdir. AgNP'lerin UV-vis'de, 456nm dalga boyunda olduğunu gözlemlemişlerdir. AgNP'lerin SEM ve XRD analizlerinde küresel yapıda olduklarını ve ortalama  $11.94 \pm 7.325$ nm boyuta sahip olduklarını belirtmişlerdir. Sentezlenen AgNP'lerin, bazı bakterilere karşı güçlü antibakteriyel etkisinin yanında, DPPH'ye karşı %69 inhibisyonla güçlü antioksidan aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Ahmed ve ark., (2023) *Myristica cinnamomea* king meyvesinin etil asetat özütünü, *A. castellanii*'ye (ATCC 50492) karşı değerlendirmişlerdir. Özütün IC<sub>50</sub> değerini  $45.102 \pm 4.62$ µg/ml olarak tespit etmişlerdir. Özütten izole ettikleri asilfenollerin *A. castellanii*'ye karşı amoebisidal aktivitelerini de test etmişlerdir. Test edilen bileşikler arasında Malabaricone B'nin IC<sub>50</sub> değerini  $101.31 \pm 17.41$ µM ve Malabaricone C'nin IC<sub>50</sub> değerini  $49.95 \pm 6.33$ µM olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca hem özütün hem de Malabarikonların aynı zamanda *A. castellanii*'nin kistleşme ve eksistasyonunu önemli ölçüde ( $p < 0.05$ ) inhibe ederken, test edilen daha düşük konsantrasyonlarda insan keratinosit hücrelerine (HaCaT) karşı minimum toksisite gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca saflaştırılmış bileşiklerin olası etki mekanizmasını da kromatinin durumunun tespiti ile değerlendirmişlerdir. Hoechst/PI 33342 çift boyaması, Malabaricones'un (AC) 8 saatlik tedavisinden sonra *A. castellanii* trofozoitlerinde nekrotik hücre ölümünün olduğunu tespit etmişlerdir. Malabaricones B ve C'nin *A. castellanii* enfeksiyonlarına karşı alternatif tedavi seçeneği olabileceğini vurgulamışlardır.

Anjuwon ve ark., (2023) ise, *P. falciparum* ve *Plasmodium berghei*'nin seçilmiş izolatlarının antimalaryal ajanlara ve *Glyphaea brevis*'in yaprak özütlerinin GC MS analizini ve in vitro antimalaryal duyarlılığını değerlendirmişlerdir. *P. falciparum*'ye karşı IC<sub>50</sub> aralığı  $1.03$ µg/ml– $7.63$ µg/ml iken *P. berghei*'ye karşı IC<sub>50</sub> değerleri  $4.32$ µg/ml– $7.89$ µg/ml aralığında tespit etmişlerdir. GC MS analizinde tanımladıkları dodekanoik asit, metil ester, karotol, heksadekanoik asit, oleik asit, metil stearat, heptadekanoik asit vb. tespit edilen bu bileşiklerin sıtmaya karşı etkilerinin olabileceğini vurgulamışlardır.

Habib ve ark., (2023) Palmiye meyvesi poleni özütünün (PFPE), antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, enzim inhibisyonu, DNA koruyucu aktivitesini ve fenolik bileşiklerini araştırmışlardır. Sonuçlar, PFPE'nin DPPH gibi radikal temizleme analizlerinde güçlü antioksidan aktivite sergilediğini belirtmişlerdir. PFPE ayrıca bazı patojenik bakterilere karşı antimikrobiyal etki sergilediğini vurgulamışlardır. PFPE'nin asetilkolinesteraz, tirozinaz ve  $\alpha$ -amilaz enzim aktivitelerini de azalttığını belirtmişlerdir. PFPE'nin kolon karsinomu (Caco-2), hepatoma (HepG-2) ve meme karsinomu (MDA) kanser hücrelerine karşı antikanser etkisi olduğu vurgulamışlardır. PFPE'le tedavi edilen hücrelerde doza bağlı apoptoz meydana geldiğini ve hücre döngüsünün durduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca meme kanseri hücrelerinde PFPE, Bcl-2 ve p21'yi aşağı regüle ederken p53 ve Caspase-9'u yukarı regüle ettiğini belirtmişlerdir.

Zafar ve Mehmood, (2023) tarafından yapılan çalışmada Tolipeer Azad Jammu ve Keşmir'de yetişen *E. umbellata*'nın metabolik ve diyet profillerini, meyvenin toplam fenolik içeriğini (TPC) ve toplam flavonoid içeriğini (TFC) test etmişlerdir. Antioksidan aktiviteyi değerlendirmede DPPH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> temizleme analizlerini kullanmışlardır. *E. umbellata*'nın bazı bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesini incelemişlerdir. *E. umbellata* metanolik meyve özütünün, en yüksek TPC ve TFC seviyelerine sahip olduğunu, DPPH radikallerine karşı en güçlü antioksidan aktiviteyi gösterdiğini vurgulamışlardır. *E. umbellata*'nın *P. aeruginosa*'ya karşı en güçlü antibakteriyel aktiviteyi sergilediğini (15.00 ± 1.0mm) ve çeşitli enfeksiyon ve hastalık türlerinin kontrolünde alternatif bir antioksidan ve antibakteriyel ajan olarak potansiyelinin varlığını vurgulamışlardır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1 Bitki Materyali

*Elaeagnus umbellata* Thunb. Ordu ili Altınordu ilçesinde sahile yakın bahçelerden toplanmıştır. Şekil 3.1’de *E. umbellata*’nın genel görünüşü sunulmuştur.



Şekil 3.1 *E. umbellata* bitkisinin doğal görüntüsü

#### 3.2 Bitkinin Meyve Özütünün Hazırlanması

Bitkinin meyveleri önce musluk suyu ile sonra deiyonize suyla yıkanıp kurutma kâğıtları ile kurutulmuştur. Kurutulan meyvelerden 100g hassas terazide (Radwag AS220/C/2) tartılıp, 300ml etanol ile bir öğütücüde birleştirilerek öğütülmüştür. Sonra karışım steril bir payrex şişesine alınıp 150rpm hız, %35±5 nem ve 20±2°C’deki çalkalayıcıda (Grotech GP08) 72 saat bekletilmiştir. 72 saat sonra karışım, filtre kâğıdından süzülerek kaba filtrasyon yapılmış sonra da evaporatörde (Heidolph HB Digital) 35°C’de etanol uzaklaştırılmıştır. Sonrasında bakteri filtresi bulunan (por çapı: 0.45µm) vakumlu filtreden süzülerek bakteri izolasyonu sağlanmıştır. Son hacim, 100ml’de %99 meyve özütü ile steril saf su, %1 etanol olacak şekilde ayarlanarak özütün son konsantrasyonu 40mg/ml hesaplanmıştır (Kaynak, 2017; Kaynak ve ark., 2018, 2019).

Şekil 3.2’de *E. umbellata* meyve özütünün temizlenmesi ve etanolün evaporatörde uzaklaştırılması aşamaları verilmiştir.



Şekil 3.2 *E. umbellata* meyvelerinin temizlenmesi ve etanolün evaporatörde uzaklaştırılması aşamaları

Şekil 3.3’te ise *E. umbellata* meyve özütünün kaba filtrasyon ve vakumlu filtrasyon uygulama aşamaları verilmiştir.



Şekil 3.3 Kaba filtrasyon ve vakumlu filtrasyon uygulama aşamaları

### 3.3 *E. coli* Kültürü

*E. coli*’den (ATCC 25922) Eosin Methylene Blue (EMB) (Merck Cat.No: WM754747635) besiyerine ekim yapılarak inkübatörde (Binder BD56) 36°C etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. Sarı-yeşil metalik refle veren koloniler steril Ringer broth ile yıkanarak steril ependorf tüplerine toplanmıştır (Kaynak, 2017; Kaynak ve ark., 2018, 2019).

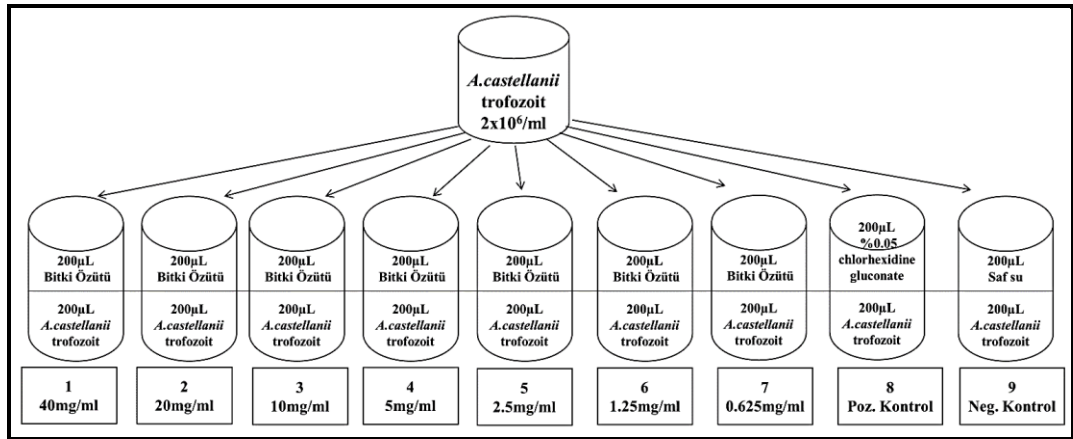
### 3.4 *A. castellanii* Trofozoit Kültürü, Sayım ve Canlılık Testi

Ringer agar besiyerlerine (Cat. no:1155250001, Merck) ilk olarak 0.5'er ml Ringer broth besiyeri eklendikten sonra önceden hazırlanan 1ml *E. coli* (ATCC 25922) süspansiyonu eklenmiş, sonra *A. castellanii* (ATCC 30010) suşundan aynı besiyerine 300µL ilave edilerek steril öze ile ekimi yapılmıştır. 26°C etüvde (Binder BD56) 96 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra trofozoitler Ringer broth besiyeri ile yıkanarak toplanmış ve thoma lamında ml'deki trofozoit sayısı ve %0.4'lük trypan blue (Sigma T-8154) boyası ile canlılık testi yapılmıştır. Deneye  $2 \times 10^6$ /ml trofozoit sayısı ve %100 canlılıkla başlanılmıştır.

### 3.5 Bitki Özütünün Amoebisidal Aktivitesinin Test Edilmesi

*E. umbellata* meyve özütleri 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanarak 200µL olacak şekilde ependorf tüplerine konulup her bir ependorf tüpünün üzerine 200'er µL *A. castellanii* trofozoiti eklenmiştir (Şekil 3.4). Negatif kontrol tüpü (trofozoit+%99 steril saf su ve %1etanol) ve pozitif kontrol tüpü (trofozoit+%0.05 chlorhexidine gluconate) hazırlanarak 26°C'de etüvde 24, 48, 72 saat tutulmuş ve her süre bitiminde 25µL parazit+bitki özütü karışımına 25µL %0.4'lük trypan blue eklenerek vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletilip ölü ve canlı trofozoitler ayrı ayrı thoma lamında sayılmıştır. Her bir sayım üç kez tekrarlanmıştır (Malatyalı ve ark. 2011; Kaynak, 2017).

*A. castellanii* trofozoitlerine farklı konsantrasyonlardaki bitki özütünün eklenmesi Şekil 3.4'te sunulmuştur.



Şekil 3.4 *A. castellanii* trofozoitlerine farklı konsantrasyonlardaki bitki özütünün eklenmesi

### **3.6 Gümüş Nanopartüküllerinin Hazırlanması**

Gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) konsantrasyonları 20, 10, 5, 1 ve 0.5mM/ml ( $\text{AgNO}_3 \geq \%99$ , Sigma-Aldrich) hazırlanarak 45'er ml ve  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 'deki deiyonize suya 500rpm ısıtıcılı manyetik (Heidolph MR3001K) karıştırıcıdayken ilave edilmiştir. Özütlerin pH'sı sırasıyla 5, 6, 7, 8, 9, 10 ve 11'e ayarlanıp 5'er ml deiyonize su ve  $\text{AgNO}_3$  karışımına damla damla ilave edilip, 30 dakika boyunca  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de (Çözelti sıcaklığı) 500rpm ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda bekletilmiştir. Sonra da örnekler alüminyum folyoya sarılarak oda sıcaklığında karanlık ortamda 48 saat bekletilmiştir. Ali ve ark.,'nın (2020) protokolü modifiye edilerek kullanılmıştır. Süre sonunda karışımlar 50ml'lik falkon tüplerine alınmış ve 10.000rpm'de 30 dakika santrifüj (Universal 320-R, Hettich-Zentrifugen) edilmiştir. Karışımlar ayrı ayrı 3 defa deioze su ile yıkanmıştır (Anwar ve ark. 2020). AgNP'lerin oluşumu nanopartikül karakterizasyon testleriyle doğrulanmıştır.

### **3.7 Nanopartikül Karakterizasyon Analizleri**

#### **3.7.1 UV-Vis Analizi**

Deioze su ile hazırlanan  $\text{AgNO}_3$  çözeltisi 10 dakika sonikatörde sonike edilmiştir. Spektrofotometrede önce 1ml deioze su ile kör numune okuması yapılmış ve sonra da 1ml  $\text{AgNO}_3$  çözeltisi kullanılarak spektrum analizi yapılmıştır. Sonra AgNP'lerin karakterizasyonu UV-Vis'de (UV1240, Shimadzu) 300-700nm dalga boyu aralığında absorbansı alınmıştır.

#### **3.7.2 EDX Analizi**

Metalik gümüş iyonlarının varlığı ve element analizi EDX detektörü (Hitachi, SU 1510) kullanılarak incelenmiştir. Sentezlenen AgNP'ler karbon film üzerine dökülerek kurutulmuştur. Sonra numune SEM cihazına yerleştirilip yüksek vakum altında 15kV'de analizi yapılarak örnek içerisindeki elementlerin yarı kantitatif tayinleri gerçekleştirilmiştir. Numuneden elde edilen spektrum daha sonra elektronik işlemeyle birlikte X ışınlarının tespiti için yarı bir iletken kullanılarak analiz edilmiştir.

#### **3.7.3 FTIR Analizi**

FTIR (Spectrum65, Perkin Elmer, USA) ile nanopartüküllerin kapatılmasında ve stabilizasyonunda yardımcı olan fonksiyonel gruplar ve adsorbe edilmiş kimyasallar doğrulanmıştır. AgNP'ler  $400-4000\text{cm}^{-1}$ 'de taranmıştır. AgNP'lerin

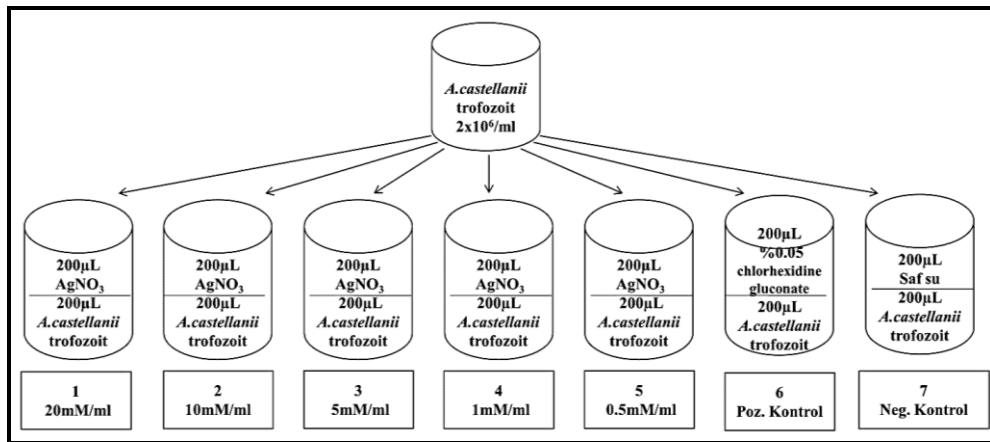
sentezinde, özütlerin içerdiği biyoindirgeyici maddeler nanopartiküllerin yüzeyine adsorbe edilmektedir.

### 3.7.4 SEM Analizi

Sentezi yapılan AgNP'lerin yüzey morfolojisi ve yapısal analizi, 0.1-30Kv aralığında 10x-1000000x büyütmede çalıştırılabilen SEM ile (Jeol JSM-7001F) yapılmıştır. Numuneden stabların üzerindeki karbon bant üzerine 30µL damlatıldıktan sonra oda sıcaklığında kurutularak SEM'de 15Kv voltajda AgNP'lerin görüntüleri alınmıştır.

### 3.8 *A. castellanii* Trofozoit Kültürü ve Sentezlenen AgNP'lerin Amoebisidal Aktivitesinin Test Edilmesi

Önce *A. castellanii* trofozoit kültürü yapılarak thoma lamında ml'deki trofozoit sayısı belirlenmiş ve canlılık testi yapılmıştır. Deneye  $2 \times 10^6$ /ml trofozoit sayısı ve %100 canlılıkla başlanmıştır. 20, 10, 5, 1, 0.5mM/ml konsantrasyonlarda hazırlanan ve optimizasyonu yapılmış AgNP'ler, 200'er µL olarak endorf tüplerine konulmuştur. Her bir endorf tüpünün üzerine 200'er µL trofozoit eklenmiştir. Negatif kontrol tüpü (trofozoit + steril saf su) ile pozitif kontrol tüpü de (trofozoit + %0.05 chlorhexidine gluconate) hazırlanmıştır. 26°C etüvde 24, 48, 72 saat tutulmuş ve her süre sonunda 25µL parazit+nanopartikül karışımına 25µL %0.4'lük trypan blue eklenerek karıştırılıp, oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Ölü ve canlı trofozotler ayrı ayrı thoma lamında sayılmıştır. Her bir sayım üç kez tekrarlanmıştır (Malatyalı ve ark. 2011; Kaynak, 2017). Şekil 3.5'te *A. castellanii* trofozoitlerine farklı konsantrasyonlardaki AgNO<sub>3</sub> eklenmesi sunulmuştur.



Şekil 3.5 *A. castellanii* trofozoitlerine farklı konsantrasyonlardaki AgNO<sub>3</sub> eklenmesi

### 3.9 *E. umbellata* Meyve Özütünün GC MS Analizi

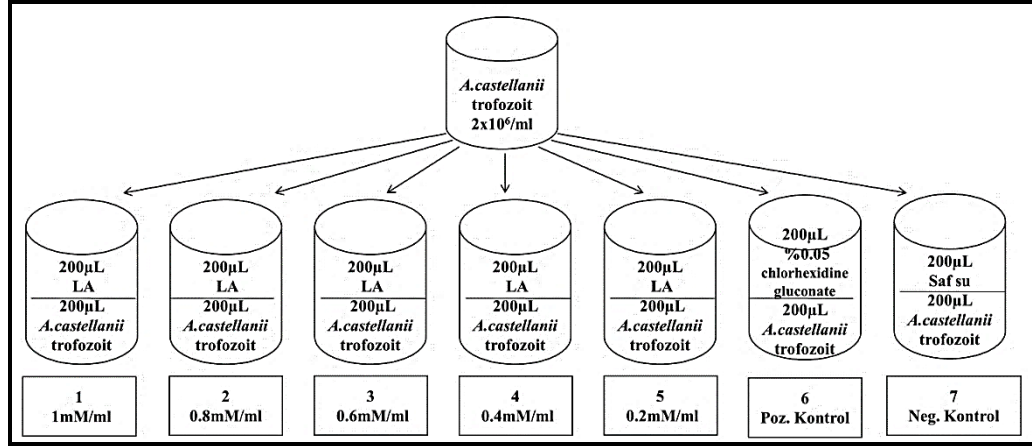
*E. umbellata* meyve özütünden 200ml steril evaporatör balonuna alınarak içerisindeki etanol ve su evaporatörde tamamen uzaklaştırılmıştır. Daha sonra DMSO (sigma-aldrich, D2650/Merck) ile 2000ppm konsantrasyonda hazırlanan özütün GC MS analizi şu şekilde yapılmıştır (Shimadzu, GCMS- QP2010 Ultra). Restek-Rtx-5 kapiller kolonda (30.0m x 0.25mm x 0.25µm) 70ev'de elektron darbe modunda helyum (%99) gazı kullanılmıştır. 1ml/dakika sabit akışta taşıyıcı gaz ve enjeksiyon 1µL hacimde kullanılmıştır (split ratio 1/10) enjektör sıcaklığı 240°C, fırın sıcaklığı 40°C, iyon sıcaklığı 200°C'de 2 dakikadan başlayarak 4°C/dakikalık bir artışla 240°C'ye (10 dakika) çıkarılmış olup, toplam çalışma süresi 55 dakikadır. Sonuçların değerlendirmesinde, Aroma ve Koku Doğal ve Sentetik Bileşikler Kütüphanesi (FFNSC3), NIST ve özel bir kütle spektral veritabanı (WILEY) kütüphanelerinden faydalanılmıştır. Pai ve Shenoy, (2020) protokolü modifiye edilerek kullanılmıştır.

#### 3.9.1 Laurik Asit'in Amoebisidal Aktivitesinin Test Edilmesi

Laurik Asit (LA) konsantrasyon serileri şu şekilde hazırlanmıştır. Beş adet steril endorf tüpüne 1, 0.8, 0.6, 0.4 ve 0.2mM/ml konsantrasyonlarda sırasıyla 200, 160, 120, 80 ve 40mg (Molekül ağırlığı 200g/lt) Laurik Asit tartılıp üzerine 1000µL etanol (Laurik Asit'i oda sıcaklığında saf suya oranla daha hızlı çözdüğünden) ilave edilerek vortekslenmiştir. Sonra buradan 10'ar µL yeni endorf tüplerine alınarak üzerine 990µL deiyonize su eklenmiştir. 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2mM/ml konsantrasyonlarda hazırlanan Laurik Asit'ler 200'er µL olarak endorf tüplerine konularak her bir endorf tüpünün üzerine 200'er µL *A. castellanii* trofozoiti eklenmiştir. Negatif kontrol tüpü (trofozoit+saf su) ile pozitif kontrol tüpü (trofozoit+%0.05 chlorhexidine gluconate) hazırlanarak 26°C etüvde 24, 48, 72 saat tutulmuş her süre bitiminde 25µL parazit + Laurik Asit karışımına 25µL %0.4'lük trypan blue eklenip karıştırılarak, 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ölü ve canlı trofozoitler ayrı ayrı thoma lamında sayılmıştır. Her bir sayım üç kez tekrarlanmıştır (Malatyalı ve ark., 2011; Kaynak, 2017).



Şekil 3.6’da *A. castellanii* trofozoitlerine farklı konsantrasyonlardaki Laurik Asit’in eklenmesi verilmiştir.



Şekil 3.6 *A. castellanii* trofozoitlerine farklı konsantrasyonlardaki Laurik Asit’in eklenmesi

### 3.10 MTT Sitotoksosite Testi

*E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156mg/ml konsantrasyonlarda memeli hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi HeLa hücre hattı kullanılarak test edilmiştir. HeLa hücreleri %10 Fetal Sığır Serumu (FBS) ile 2mM L-glutamin ihtiva eden yüksek glukozlu modifiye bir besiyeri (DMEM; Dulbecco's Modified Eagle Medium) olan kültür ortamında 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde T75'lik hücre kapları içerisinde büyütülmüştür. Çoğalan hücreler tripsin aracılığıyla pasajlanmıştır. Tripsin ile kaldırılan ve thoma lamında sayılan HeLa hücrelerinin şeffaf düztabanlı 96 kuyucuklu hücre kültürü kapları içerisine kuyucuk başına 10<sup>4</sup> hücre olacak şekilde %10 FBS ihtiva eden DMEM besiyeri içerisine hücre ekimi yapılmıştır. Ertesi gün hücrelere meyve özütü, farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Hücreler 72 saat boyunca bitki meyve özütüne maruz bırakılmıştır. Uygulama sonunda sitotoksitenin test edilmesi için Elabscience MTT Cell Proliferation and Cytotoxicity Assay Kiti (Cat. No: E-CK-A341) kullanılmıştır. Kit protokolüne göre kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılıp her kuyucuğa 50µL serumsuz DMEM ve 50µL MTT reaktifi eklenmiştir. Kontrol için, yalnızca ortam içeren (hücre içermeyen) bir kuyucuğa 50µL MTT reaktifi eklenmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültürü %5 CO<sub>2</sub> ve 37°C etüvde 3 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda her bir kuyucuğa 150µL MTT solvent eklenmiştir. 96 kuyucuklu hücre kültürü kabı folyo ile sarılarak 15 dakika orbital bir çalkalayıcıda çalkalanmıştır. 15

dakika sonunda Tecan i-control™ Microplate Reader'da 570nm'de absorbansı okutulmuştur.

### **3.11 *E. umbellata* Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in Amoebisidal Aktivitelerinin İstatistiksel Analizi**

Bitki özütünün eklenmediği kontrol grubu ve bitki özütünün 7 farklı konsantrasyonunun, AgNP'lerin ilave edilmediği kontrol grubu ile AgNP'lerin 5 farklı konsantrasyonunun ve Laurik Asit'lerin ilave edilmediği kontrol grubu ile Laurik Asit'lerin 4 farklı konsantrasyon serilerinin ilave edildiği test gruplarındaki hücresel farklılıklar karşılaştırmalı şekilde incelenmiştir. Kontrol grubu ile AgNP'lerin, bitki özütlerinin, ve Laurik Asit'in bulunduğu test gruplarınının 24., 48., 72. saatlerdeki değişimlerine ait veriler ile farklı konsantrasyonlardaki bitki özütlerinin memeli hücreleri (HeLa) üzerinde sitotoksikite testine ait veri girişi Microsoft Excel ile IBM SPSS Statistics 27.0.1 programları ile yapılmıştır. Grafikler ile tanımlayıcı veri analizi de IBM SPSS Statistics 27.0.1 programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama (Mean)±standart sapma (Sd) olarak ifade edilmiştir. IBM SPSS Statistics 27.0.1 programında, “p” ifadesi, (probability anlamındaki olasılık) %1 hatayı kabul ederek karşılaştırma yapılmıştır. Güven aralıkları %99 olasılıkla (%1 hata ile) belirlenmiştir. Özütlerin, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in amoebisidal aktivitesini gösteren % canlılık sayım sonuçları IBM SPSS Statistics 27.0.1 kullanılarak post-Hock çoklu karşılaştırma analizi, Tukey ve Duncan ikili grup karşılaştırılması yapılarak değerlendirilmiştir. Trofozoitler ve HeLa hücrelerinde letal aktivite gösteren AgNP'lerin, bitki özütlerinin ve Laurik Asit'in farklı konsantrasyonları, %50 inhibitör (IC<sub>50</sub>) değerlerinin hesaplanmasında logaritmik regresyon analizi kullanılmıştır. %50 hücre ölümünü sağlayan farklı özüt, AgNP ve Laurik Asit konsantrasyonlarının değerleri logaritmik regresyon grafiği ile hesaplanmıştır. Deneylerde uygulanan farklı saatlerde bitki özütü, AgNP ve Laurik Asit konsantrasyonlarının amoebisidal etki gösterenlerinin kontrol hücreleriyle kıyaslandığında gösterdiği % hücre ölümü değerleri hesaplanmıştır. İnhibitör konsantrasyonları (IC<sub>50</sub>) üç tekrarlı denemelerle yapılmıştır. Ayrıca açıklayıcı değişkenler ve tüm konsantrasyonların sonuçlarını özetlemede Temel Bileşenler Analizi (Principal Component Analysis; PCA) Jamovi 2.4.11 programı ile görselleştirilmiştir.

### 3.12 *E. umbellata* Özütünün, Laurik Asit'in ve AgNP'lerin DNA Koruyucu Aktivitesinin İncelenmesi

*E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün, *E. umbellata* meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin ve Laurik Asit'in hidroksil radikali (-OH) ile indüklenen DNA hasarına karşı etkisini araştırmak için in vitro deney dizayn edilmiştir. Çol ve ark., 2018'in protokolü modifiye edilerek kullanılmıştır.

#### 3.12.1 Çözeltilerin Hazırlanması

- 37.5mM Demir sülfoksit ( $Fe_2SO_4$ ) stok çözeltisi hazırlamak için; 26.06mg  $Fe_2SO_4$  tartılarak 2.5ml saf suda çözdürülmüştür. Hazırlanan bu stoktan 2.5mM  $Fe_2SO_4$  için 100 $\mu$ L alınıp 1400 $\mu$ L saf su ile birlikte bir ependorfta birleştirilmiştir.
- 37.5mM Disodyum Etilendiamin tetraasetikasit ( $Na_2EDTA$ ) stok çözeltisi hazırlamak için; 75 $\mu$ L 0.5M Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) alınıp 925 $\mu$ L saf su ile bir ependorfta birleştirilmiştir. Daha sonra hazırladığımız bu stoktan 2.5mM  $Na_2EDTA$  için 100 $\mu$ L alınıp 1400 $\mu$ L saf su ile birlikte bir ependorfta birleştirilmiştir.
- 0.08M Trolox stok çözeltisinin hazırlamak için; 5mg Trolox tartılarak 250 $\mu$ L etanolde çözdürülmüştür. 133 $\mu$ M Trolox çözeltisi hazırlamak için; 3.3 $\mu$ L hazırladığımız stoktan alınıp 1996.7 $\mu$ L saf su ile birlikte bir ependorfta birleştirilmiştir.
- %2'lik  $H_2O_2$  stok çözeltisi hazırlamak için; 100 $\mu$ L %30'luk  $H_2O_2$  alınıp 1400 $\mu$ L saf su ile birlikte bir ependorfta birleştirilmiştir.
- 50mM Steril Fosfat Tamponu (PBS) çözeltisi hazırlamak için; 100mM'lık PBS'ten 500 $\mu$ L alınıp 500 $\mu$ L saf su ile birlikte bir ependorfta birleştirilmiştir.
- 0.5M EDTA (pH 8) çözeltisi için; 46.53g EDTA tartılıp 200ml deiyonize su eklenerek çözdürüldükten sonra Sodyum Hidroksit (NaOH) ile pH'sı 8'e ayarlanarak final hacim 250ml'ye tamamlanmıştır.
- 10x Elektroforez Tamponu, Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE) hazırlamak için; 48.4g Tris tartıldıktan sonra 11.2ml glasiyal asetik asit ve 20ml 0.5M EDTA ile beraber 800ml saf suda birleştirilip iyice karıştırıldıktan sonra final hacim 1000ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan 10x TAE'den 100ml alınarak 900ml deiyonize su eklenerek xTAE hazırlanmıştır.

### 3.12.2 Agaroz Jel Hazırlanması

Agaroz jel %08 olarak hazırlanmıştır. 0.6gr agaroz tartılıp 75ml xTAE ile bir erlende birleştirilerek mikrodalga fırında eritilmiştir. Jel 50°C civarındayken üzerine 0.5µL Etidyum bromür eklenerek alt ve üst taraklar takılıp elektroforez tankına dökülmüştür. Jel donduktan sonra elektroforez tankı üzerine 600ml xTAE ilave edilmiştir. Sonra taraklar çıkarılarak örnekler elektroforez jel kuyucuklarına yüklenmiştir (Çizelge 3.2).

### 3.12.3 Mix Tüpünün Hazırlanması ve Örneklerin Elektroforeze Yüklenmesi

Çizelge 3.1'deki gibi mix tüpü hazırlanmış ve hazırlanan mix tüpünden pozitif kontrol tüpüne 15µL mix, 15µL Trolox ve 1µL pBR322 plazmid DNA'sı eklenmiştir. Negatif kontrol tüpüne 15µL mix, 15µL nükleaz içermeyen H<sub>2</sub>O ve 1µL pBR322 plazmid DNA'sı eklenmiştir. Geri kalan diğer tüplere de 7.5'er µL mix ile *E. umbellata* özütü, Laurik Asit ve AgNP konsantrasyon serilerinden 7.5'er µL eklenmiş ve sonra her birine 0.5'er µL plazmid DNA'sı eklenmiştir. 37°C'deki ısıtıcı blokta 30 dakika inkübe edildikten sonra yükleme boyası (loading dye) ile muamele edilen örnekler kuyucuklara yüklenmiştir (Çizelge 3.2). Jelin alt ve üst 1. kuyucuklarına 0.5µL plazmid DNA'sı ve 4.5µL nükleaz içermeyen H<sub>2</sub>O, 1µL yükleme boyasıyla muamele edildikten sonra ısıtıcı blokta bekletilmeden doğrudan jele yüklenmiştir. Örnekler jel elektroforezde 100V akımda 50 dakika yürütülmüştür. Çizelge 3.1'de Mix içeriği, Çizelge 3.2'te örneklerin jel elektroforez kuyucuklarına yüklenme sırası verilmiştir.

**Çizelge 3.1** Mix tüpünün içeriği

2.5mM Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1µL x20	20µL
2.5mM Na <sub>2</sub> EDTA	1µL x20	20µL
%2'lik H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1µL x20	20µL
50mM PBS	4µL x20	80µL
pBR322 Plazmid DNA	0.5µLx20	10µL
Toplam Hacim		150µL

Hazırlanan örnekler jel elektroforez kuyucuklarına Çizelge 3.2’teki gibi yüklenmiştir.

**Çizelge 3.2** Örneklerin jel elektroforez kuyucuklarına yüklenmesi

<b>Üst Kuyucuklar</b>	
1.Plazmid DNA	0.5µL pBR322 Plazmid DNA + 4.5µL H <sub>2</sub> O + 1µL Loading dye
2.Negatif Kontrol	7.5µL mix+ 7.5µL H <sub>2</sub> O +3µL Loading dye
3.Pozitif Kontrol	7.5µL mix+ 7.5µL Trolox + 3µL Loading dye
4.Bitki Özütü	7.5µL mix+ 7.5µL <i>E. U.</i> özütü (40mg/ml) + 3µL Loading dye
5. Bitki Özütü	7.5µL mix+ 7.5µL <i>E. U.</i> özütü (20mg/ml) + 3µL Loading dye
6. Bitki Özütü	7.5µL mix+ 7.5µL <i>E. U.</i> özütü (10mg/ml) + 3µL Loading dye
7. Bitki Özütü	7.5µL mix+ 7.5µL <i>E. U.</i> özütü (5mg/ml) + 3µL Loading dye
8. Bitki Özütü	7.5 µL mix+ 7.5 µL <i>E. U.</i> özütü (2.5mg/ml) + 3 µL Loading dye
9. Bitki Özütü	7.5 µL mix+ 7.5 µL <i>E. U.</i> özütü (1.25mg/ml) + 3 µL Loading dye
10. Bitki Özütü	7.5 µL mix+ 7.5 µL <i>E. U.</i> özütü (0.625mg/ml) + 3 µL Loading dye
<b>Alt kuyucuklar</b>	
1. Plazmid DNA	0.5µL pBR322 Plazmid DNA + 4.5µL H <sub>2</sub> O + 1µL Loading dye
2.NegatifKontrol	7.5µL mix+ 7.5µL H <sub>2</sub> O +3µL Loading dye
3.Pozitif Kontrol	7.5µL mix+ 7.5µL Trolox + 3µL Loading dye
4. AgNO <sub>3</sub>	7.5µL mix+ 7.5µL AgNO <sub>3</sub> (20mM/ml) + 3µL Loading dye
5. AgNO <sub>3</sub>	7.5µL mix+ 7.5µL AgNO <sub>3</sub> (10mM/ml) + 3µL Loading dye
6. AgNO <sub>3</sub>	7.5µL mix+ 7.5µL AgNO <sub>3</sub> (5mM/ml) + 3µL Loading dye
7. AgNO <sub>3</sub>	7.5µL mix+ 7.5µL AgNO <sub>3</sub> (1mM/ml) + 3µL Loading dye
8. AgNO <sub>3</sub>	7.5µL mix+ 7.5µL AgNO <sub>3</sub> (0.5mM/ml) + 3µL Loading dye
9. Laurik Asit	7.5µL mix+ 7.5µL LA. (1mM/ml) + 3µL Loading dye
10. Laurik Asit	7.5µL mix+ 7.5µL LA. (0.8mM/ml) + 3µL Loading dye
11. Laurik Asit	7.5µL mix+ 7.5µL LA. (0.6mM/ml) + 3µL Loading dye
12. Laurik Asit	7.5µL mix+ 7.5µL LA. (0.4mM/ml) + 3µL Loading dye

### **3.13 Farklı Koşullarda Oluşturulan Stres Altında *A. castellanii*’nin Antioksidan Enzimlerinden (CAT ve SOD) Sorumlu Genler ile Pseudokistleşme (CSII) ve Asıl Kistleşme (CSP21) Süreçlerinden Sorumlu Genlerin İfade Analizleri**

#### **3.13.1 *E. umbellata*’nın Etanolik Meyve Özütünün, AgNP’lerin ve Laurik Asit’in *A. castellanii* Trofozoitlerindeki Pseudokistleşmeden (CSII) Sorumlu Genin İfade Analizi**

*Acanthamoeba* kültürü yapılıp, 4 gün sonra trofozoitler toplanmıştır. Son konsantrasyonda 5x10<sup>6</sup>/ml trofozoit olacak şekilde aşağıda belirtildiği gibi deney dizaynı gerçekleştirilmiştir.

**CSII geninin ifade analizi için 30. dakika, 1. ve 2. saat kombinasyonları:**

- a- *A. castellanii* 100µL
- b- *A. castellanii* 100µL + %15 metanol 100µL
- c- *A. castellanii* 100µL + %15 metanol 100µL + *E. umbellata* (2mg/ml) 100µL
- d- *A. castellanii* 100µL + %15 metanol 100µL + AgNO<sub>3</sub> (1mM) 100µL
- e- *A. castellanii* 100µL + %15 metanol 100µL + 3-AT (0.7M) 100µL
- f- *A. castellanii* 100µL + %15 metanol 100µL + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30) 100µL
- g- *A. castellanii* 100µL + %15 metanol 100µL + Laurik Asit (1mM) 100µL

CSII kombinasyonları, 30.dk için; 1 (a, b, c, d, e, f, g), 1. saat için; 2 (a, b, c, d, e, f, g), 2. saat için ise; 3 (a, b, c, d, e, f, g) olarak numaralandırılmıştır. Sonra 26°C etüvde 30 dk, 1 ve 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.

*Acanthamoeba* trofozoitleri %15 metanol içeren ortama maruz bırakılarak stres oluşturulmuştur. 30dk, 1saat, 2saat sonra her saat aralığında yukarıda tanımlanan 7 koşuldaki ependorf tüpleri 3500rpm'de 5 dakika santrifüjlenip süpernatant atılarak 20'şer µL hacme kadar indirgenmiştir. Sonra üzerlerine hacimlerinin 5 katı kadar RNA later eklenerek -20°C buzdolabında saklanmıştır. Daha sonra her bir farklı saat ve koşuldaki tüplerden RNA izole edilmiştir.

**1mM Laurik Asit hazırlama;** Bir ependorf tüpüne 200mg (Molekül ağırlığı 200g/L) Laurik Asit tartılmış, üzerine 1000µL etanol (Laurik Asit'i oda sıcaklığında saf suya oranla daha hızlı çözdüğünden) ilave edilerek vortekslenmiştir. Sonra buradan 10µL alınarak yeni bir ependorfa konmuş ve üzerine 990µL saf su ilave edilmiştir.

**0.7M 3-AT hazırlama;** Bir ependorf tüpüne 58.8mg (Molekül ağırlığı 0.084g/lt) 3-AT tartılmış ve 1000µL saf suda çözdürülmüştür.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30) hazırlama;** Bir ependorf tüpüne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stoğundan 300µL alınmış ve üzerine 700µL saf su ilave edilerek hazırlanmıştır.

### 3.13.2 *E. umbellata*'nın Etanolik Meyve Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in *A. castellanii* Trofozoitlerindeki Asıl Kistleşmeden (CSP21) Sorumlu Geninin İfade Analizi

#### CSP21 geninin ifade analizi için 12., 24. ve 48. saat kombinasyonları:

- a-*A. castellanii* 100µL
- b-*A. castellanii* 100µL + %2 metanol 100µL
- c-*A. castellanii* 100µL + %2 metanol 100µL + *E. umbellata* (0.625mg/ml) 100µL
- d-*A. castellanii* 100µL + %2 metanol 100µL + AgNO<sub>3</sub> (0.5mM) 100µL
- e-*A. castellanii* 100µL + %2 metanol 100µL + 3-AT (0.5M) 100µL
- f-*A. castellanii* 100µL + %2 metanol 100µL + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30) 100µL
- g-*A. castellanii* 100µL + %2 metanol 100µL + Laurik Asit (0.2mM) 100µL

CSP21 kombinasyonları 12. saat için; 4 (a, b, c, d, e, f, g), 24. saat için; 5 (a, b, c, d, e, f, g), 48. saat için ise; 6 (a, b, c, d, e, f, g) olarak numaralandırılmıştır. Sonra 26°C etüvde 12, 24, 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.

*Acanthamoeba* trofozoitleri %2 metanol içeren ortama maruz bırakılarak stres oluşturulmuştur. 12saat, 24saat ve 48saat sonra her saat aralığında yukarıda tanımlanan 7 koşuldaki ependorf tüpleri 3500rpm'de 5 dakika santrifüjlenip süpernatant atılarak 20'şer µL hacme kadar indirgenmiştir. Sonra üzerlerine hacimlerinin 5 katı kadar RNA later eklenmiş ve -20°C buzdolabında saklanmıştır. Daha sonra her bir farklı saat ve koşuldaki tüplerden RNA izole edilmiştir.

**0.2mM Laurik Asit hazırlama;** Bir ependorf tüpüne 40mg (Molekül ağırlığı 200g/L) Laurik Asit tartılmış, üzerine 1000µL etanol ilave edilerek vortekslenmiştir. Sonra buradan 10µL alınarak yeni bir ependorfa konmuş ve üzerine 990µL saf su ilave edilmiştir.

**0.5M 3-AT hazırlama;** Bir ependorf tüpüne 42mg (Molekül ağırlığı 0.084g/lt) 3-AT tartılmış ve 1000µL saf suda çözündürülmüştür.

### 3.13.3 *E. umbellata*'nın Etanolik Meyve Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in CAT ve SOD Antioksidan Enzimlerinden Sorumlu Genlerin İfade Analizi

*A. castellanii*'nin CAT ve SOD gibi oksidatif stres enzimleri üzerinde spesifik antioksidan enzim inhibitörleri sırasıyla 3-AT ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> olarak belirlenmiştir. *E. umbellata*'nın meyve özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in de parazit in oksidatif stres enzimlerine karşı inhibitör gibi davranıp davranmadığını belirlemek için aşağıda verilen deney kombinasyonu dizayn edilmiştir.

#### **CAT ve SOD genlerinin ifade analizi için; 30. dakika, 1., 2. saat kombinasyonları:**

- a- *A. castellanii* 100µL
- b- *A. castellanii* 100µL + %15 metanol 100µL
- c- *A. castellanii* 100µL + %15 metanol 100µL + *E. umbellata* (2mg/ml) 100µL
- d- *A. castellanii* 100µL + %15 metanol 100µL + AgNO<sub>3</sub> (1mM) 100µL
- e- *A. castellanii* 100µL + %15 metanol 100µL + 3-AT (0.7M) 100µL
- f- *A. castellanii* 100µL + %15 metanol 100µL + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30) 100µL
- g- *A. castellanii* 100µL + %15 metanol 100µL + Laurik Asit (1mM) 100µL

#### **CAT ve SOD genlerinin ifade analizi için; 12., 24., 48. saat kombinasyonları:**

- a-*A. castellanii* 100µL
- b-*A. castellanii* 100µL + %2 metanol 100µL
- c-*A. castellanii* 100µL + %2 metanol 100µL + *E. umbellata* (0.625mg/ml) 100µL
- d-*A. castellanii* 100µL + %2 metanol 100µL + AgNO<sub>3</sub> (0.5mM) 100µL
- e-*A. castellanii* 100µL + %2 metanol 100µL + 3-AT (0.5M) 100µL
- f-*A. castellanii* 100µL + %2 metanol 100µL + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30) 100µL
- g-*A. castellanii* 100µL + %2 metanol 100µL + Laurik Asit (0.2mM) 100µL

CAT ve SOD kombinasyonları 30. dakika için; 1 (a, b, c, d, e, f, g), 1. saat için ise; 2 (a, b, c, d, e, f, g), 2. saat için ise; 3 (a, b, c, d, e, f, g), 12. saat için; 4 (a, b, c, d, e, f, g), 24. saat için; 5 (a, b, c, d, e, f, g), 48. saat için ise; 6 (a, b, c, d, e, f, g) olarak numaralandırılmıştır. Sonra 26°C etüvde 30 dk, 1, 2, 12, 24, 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.



*Acanthamoeba* trofozoitleri %15 metanol içeren ortama maruz bırakılarak stres oluşturulmuş, 30dk, 1 ve 2 saat sonra her saat aralığında yukarıda tanımlanan ilk 7 koşuldaki gibi hazırlanan ependorf tüpleri 3500rpm'de 5 dakika santrifüjlenip süpernatant atılarak 20'şer  $\mu$ L hacme kadar indirgenmiştir. Sonra üzerlerine hacimlerinin 5 katı kadar RNA later eklenmiş ve -20°C buzdolabında saklanmıştır. Her bir farklı saat ve koşuldaki tüplerden RNA izole edilmiştir. *Acanthamoeba* trofozoitleri %2 metanol içeren ortama maruz bırakılarak stres oluşturulmuş, 12, 24 ve 48 saat sonra her saat aralığında yukarıda tanımlanan ikinci 7 koşuldaki gibi hazırlanan ependorf tüpleri 3500rpm'de 5 dakika santrifüjlenip süpernatant atılarak 20'şer  $\mu$ L hacme kadar indirgenmiştir. Sonra üzerlerine hacimlerinin 5 katı kadar RNA later eklenmiş ve -20°C buzdolabında saklanmıştır. Daha sonra her bir farklı saat ve koşuldaki tüplerden RNA izole edilmiştir.

### **3.13.4 Total RNA İzolasyonu (Qiagen 74104 Rneasy Mini Kit 50)**

- Derin dondurucuda önceden hazırlanan buzlar kırılarak temiz bir kapta buz havuzu oluşturulmuş ve tüm çalışma bu buz üzerinde yapılmıştır.
- -20°C'de buzdolabında sakladığımız 30. dakika kombinasyonları buzdolabından çıkarılarak çözdürülmüştür.
- Çözülünce üzerlerine 350'şer  $\mu$ L RLT Buffer eklenerek homojen olana kadar vortekslenmiştir.
- Sonra (120+350=470) 470'er  $\mu$ L %70'lik etanol eklenmiş ve pipetle ver/çek yapılarak karıştırılmıştır (Total hacim 940 $\mu$ L).
- Kitte bulunan 2ml'lik steril collection tüpleri içine steril Rneasy mini spin column tüpleri numaralandırılarak konulmuştur 1(a, b, c, d, e, f, g).
- 940'ar  $\mu$ L'lik örnek Rneasy mini spin column tüplerine aktarılmıştır. 23°C'de, 10.000rpm'de 15 saniye santrifüjlendikten sonra collection tüpüne biriken sıvı kısım atılmıştır.
- 700'er  $\mu$ L RW1 Buffer, spin column tüplerine eklenmiştir. 23°C'de, 10.000rpm'de 15 saniye santrifüjlendikten sonra collection tüpüne biriken sıvı kısım atılmıştır.
- 500'er  $\mu$ L RPE Buffer spin column tüplerine konularak 23°C, 10.000rpm'de ve 15 saniye santrifüjlendikten sonra collection tüpüne biriken sıvı kısım atılmıştır.

- Sonra 500'er  $\mu\text{L}$  RPE Buffer spin column tüplerine konmuş ve  $23^\circ\text{C}$ 'de, 10.000rpm'de 2 dakika santrifüjlenmiştir.
- Yeni collection tüplerine mevcut spin column tüpleri yerleştirilip  $23^\circ\text{C}$ 'de, 14.000rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
- Sonra yeni steril ependorf (1.5ml'lik) tüpleri numaralandırılarak üzerlerine spin column tüpleri yerleştirilmiş ve (spin column tüpünün tam ortasına gelecek şekilde) üzerlerine 50'şer  $\mu\text{L}$  Rnase free water eklenmiştir.  $23^\circ\text{C}$ 'de, 10.000rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Bu işlemler tüm kombinasyonlar için de uygulanmıştır.

Kullandığımız RNA izolasyon kiti (Qiagen, 74104 RNeasy mini-Kit)  $100\mu\text{g/ml}$  kadar RNA izole ettiği için elde ettiğimiz RNA'ların konsantrasyonları Nanodropta ölçülmemiştir. Ayrıca DNA-free™ Kit ile muamele etmek için RNA'nın konsantrasyonu  $\leq 200\mu\text{g/ml}$  olması gerektiğinden DNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak için doğrudan DNA-free™ Kit kullanılmıştır.

### 3.13.5 DNA'nın Uzaklaştırılması (DNase Treatment and Removal Reagents (Cat. No: AM1906)

RNA'dan DNA'yı uzaklaştırmak (DNA kontaminasyonunu önlemek için) için kullanılmıştır.

#### Dna-Free Kit Prosedürü

Total RNA örneği .....50 $\mu\text{L}$

10x DNase 1 buffer.....5 $\mu\text{L}$  (0.1 volüm;  $50 \times 0.1 = 5\mu\text{L}$ )

RNase-Free DNase 1.....1 $\mu\text{L}$

- Yukardaki karışımın bulunduğu ependorf tüpüne parmağımızla hafifçe vurarak karıştırıldıktan sonra  $37^\circ\text{C}$ 'deki ısıtıcı blokta 30 dakika tutulmuştur.
- DNase inaktivasyon solüsyonu her kullanımdan önce vortekslenmiştir.
- DNase inaktivasyon solüsyonu 0.1 hacim ( $50\mu\text{L} \times 0.1 = 5\mu\text{L}$ ) yani 5 $\mu\text{L}$  pipetle verçek yaparak eklenmiştir.
- Oda sıcaklığında 2 dakika tutulan tüplere 3 kez parmağımızla hafifçe vurarak karıştırılmıştır.
- Süre sonunda tüpler  $4^\circ\text{C}$  10.000rpmde 90 saniye santrifüjlenmiştir.

- Alttaki pellete dokunmadan süpernatant (RNA) dikkatlice yeni steril ependorfa alınmıştır. RNA örneği küçük volümlerde steril PCR tüplerine (8.1'er µL hacimde numaralandırılarak) bölünerek -20 °C'de saklanmıştır.

### 3.13.6 cDNA Sentezi (Invitrogen cat no: 11904-018)

c-DNA sentezine başlamadan önce kuru blok ısıtıcı (Biosan TDB-120) 65°C'ye ayarlanmıştır. Buzluktaki buzlar kırılarak kırık buz elde edilmiştir. Ayrıca PCR cihazında bulent cDNA koşul 2 programı seçilerek cihazın 70°C'ye gelmesi sağlanmıştır.

#### 3.13.6.1 Premiks I Havuzunun Hazırlanması

(Her bir süre için 7 kombinasyon olduğundan kimyasallar 7.1 ile çarpılmıştır)

10mM dNTPs .....1x7.1 = 7.1µL

Oligo dt.....1x7.1 = 7.1µL

Toplam Hacim .....= 14.2µL

Önceki aşamada elde ettiğimiz 8'er µL olan RNA örnek tüplerine yukarıda hazırladığımız Premiks I havuzundan 2'ser µL dağıtılmış ve tüpler pipetle ver-çek yapılarak karıştırılmış ve kuru blok ısıtıcıda 65°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Sonra 1 dakika buzda tutulmuştur (Sonra kuru blok ısıtıcı 42°C'ye ayarlanmıştır).

#### 3.13.6.2 Premiks II Havuzunun Hazırlanması

(Her bir süre için 7 kombinasyon olduğundan kimyasallar 7.1 ile çarpılmıştır)

10x RT tamponu .....2x7.1= 14.2µL

25mM MgCl<sub>2</sub>.....4x7.1= 28.4µL

0.1M DTT.....2x7.1= 14.2µL

RNaseout (RNA'yı uzaklaştıran solüsyon 40U/µL) ...1x7.1= 7.1µL

Toplam Hacim.....= 63.9µL

- Yukarıda hazırlanan Premiks II havuzundan 9'ar µL alınarak RNA ve Premiks I içeren örnek tüplerine ilave edilmiştir. Yavaşça pipetle ver/çek yapılarak karıştırılmıştır.
- Kuru blok ısıtıcıda 42°C'de 2 dakika bekletildikten sonra tüpler cihazdan uzaklaştırılmaksızın üzerlerine 1'er µL Superscript Revers Transcriptaz enzimi eklenmiştir.

- Sonra kuru blok ısıtıcıda 42°C’de 50 dakika bekletilmiştir. (Örnekler buradan PCR cihazında 70°C’de 15 dakika tutulmak üzere alınırken kuru blok ısıtıcı 37°C’ye ayarlanmıştır).
- 70°C’de 15 dakika PCR cihazında tutulmuştur.
- Örnekler buz üzerinde 10 dakika bekletilip, vortekslenmiş ve kısa spin-down yapılarak tüm karışım dipte toplanmıştır.
- Örneklerle 1’er µL Endoribonükleaz (RNase H) solüsyonu eklenip 37°C’de 20 dakika bekletilmiş ve tekrar vortekslenerek kısa spin-down yapılmıştır. Elde edilen cDNA’lar -20°C’de saklanmıştır.

### 3.13.7 RT-qPCR ile Kantitatif Analiz (Blastaq2xqPCR master mix, Cat. No: G891)

Tüm kombinasyonlardan elde edilen cDNA’lar nanodropta ölçülerek her biri 100µg/ml olacak şekilde Nükleaz içermeyen su (NFW) ile dilüsyonları yapılmıştır. Daha sonra elimizdeki 100mM konsantrasyonda olan stok primerler (GAPDH, SOD, CAT, CSII ve CSP21) NFW ile yeni steril ependorflara 10’ar mM konsantrasyonda (10µL 100mM’lık stok primerden alınarak üzerine 90µL NFW eklenmiştir) hazırlanmıştır. CSII’nin 30. dakika kombinasyonunun ifade analizi için; GAPDH (A), CSII (B), CAT (C) ve SOD (D) olmak üzere aşağıdaki protokole göre 4 ayrı havuz hazırlanmıştır.

#### 3.13.7.1 CAT, SOD ve CSII’nin ifade analizi için 30. Dakika, 1., 2. saat Kombinasyonları

NFW .....	6 x 7.1= 42.6µL
GAPDH/SOD/CAT/CSII F1(10mM) .....	0.25 x 7.1= 1.775µL
GAPDH/SOD/CAT/CSII R1(10mM) .....	0.25 x 7.1= 1.775µL
Master mix.....	2.5 x 7.1= 17.75µL
cDNA.....	= 1µL
Toplam Hacim.....	= 10µL

Hazırlanan bu havuzlardan RT-qPCR plakasına 9’ar µL pipetlenmiştir. A, B, C, D’nin 1. kuyucuğu Kontrol (K) olduğundan sadece 10’ar µL NFW pipetlenmiştir. Daha sonra önceden elde edilen cDNA’lardan 1’er µL hacimde pipetlendikten sonra 500rpm’de 20 saniye santrifüjlenmiştir (Hermle Z 306). Sonra da Çizelge 3.5’te gösterilen koşula göre RT-qPCR cihazına verilmiştir. İşlem üç kez tekrar edilmiştir.

CAT, SOD ve CSII'nin ifade analizinde; 1. ve 2. saat kombinasyonları için de yukarıdaki protokol izlenmiştir. Çizelge 3.3'te CAT, SOD ve CSII'nin 30. dakika kombinasyonunun pipetlenmesi sunulmuştur.

**Çizelge 3.3** CAT, SOD ve CSII'nin 30. dakika kombinasyonunun pipetlenmesi

CSII (30.dk.)	1 (K)	2	3	4	5	6	7	8
A (GAPDH)	NFW	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g
B (CSII)	NFW	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g
C (SOD)	NFW	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g
D (CAT)	NFW	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g

Çizelge 3.4'te çalışmada kullanılan RT-qPCR koşulu sunulmuştur.

**Çizelge 3.4** Çalışmada kullanılan RT-qPCR koşulu

Ezim aktivasyonu	95°C	3 dakika	1 döngü
Denaturasyon	95°C	15 saniye	
extention	60°C	1 dakika	
Melt-curve	65°C /0;05		
	95°C /0.5		
End		40 döngü	

### 3.13.7.2 CAT, SOD ve CSP21'in İfade Analizi için 12., 24. ve 48. saat Kombinasyonları

CSP21'in 12. saat kombinasyonunun ifade analizi için; GAPDH (A), CSP21 (B), CAT (C) ve SOD (D) olmak üzere aşağıdaki protokole göre 4 ayrı havuz hazırlanmıştır.

NFW .....	6 x 7.1= 42.6µL
GAPDH/SOD/CAT/CSP21 F1(10mM) .....	0.25 x 7.1= 1.775µL
GAPDH/SOD/CAT/CSP21 R1(10mM) .....	0.25 x 7.1= 1.775µL
Master mix.....	2.5 x 7.1= 1.775µL
cDNA.....	= 1µL
Toplam Hacim.....	=10µL

Hazırlanan bu havuzlardan RT-qPCR plakasına 9'ar µL pipetlenmiştir. A, B, C, D'nin 1. kuyucuğu Kontrol (K) olduğundan sadece 10'ar µL NFW pipetlenmiştir. Daha sonra önceden elde edilen cDNA'lardan 1'er µL hacimde pipetlendikten sonra 500rpm'de 20 saniye santrifüjlenmiştir. Sonra da Çizelge 3.4'te gösterilen koşula göre

RT-qPCR cihazına verilmiştir. İşlem üç kez tekrar edilmiştir. CSP21'in ifade analizinde; 24. ve 48. saat kombinasyonları için de yukarıdaki protokol izlenmiştir.

CAT, SOD ve CSP21'in 12. saat kombinasyonu Çizelge 3.5'deki gibi pipetlenmiştir.

**Çizelge 3.5** CAT, SOD ve CSP21'in 12. saat kombinasyonunun pipetlenmesi

CSP21 (12. Saat)	1 (K)	2	3	4	5	6	7	8
A (GAPDH)	NFW	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g
B (CSP21)	NFW	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g
C (SOD)	NFW	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g
D (CAT)	NFW	4a	4b	4c	4d	4e	4f	4g

### 3.13.8 RT-qPCR Sonuçları İçin İstatistiksel Analiz

RT-qPCR ile CSP21, CSII, SOD ve CAT genlerinin ekspresyon değerleri GAPDH referans (housekeeping) geni ile normalize edilmiştir. RT-qPCR yönteminde Ct (Crossing points) değerleri elde edilmiştir. Hiçbir maddeye maruz bırakılmayan trofozoitler kontrol grubunu temsil ederken metanole maruz bırakılmış trofozoitler pozitif kontrol grubunu temsil etmiştir. Bitki özütü, AgNP ve Laurik Asit'e maruz bırakılmış trofozoitlerde CAT, SOD, CSP21 ve CSII genlerinin ekspresyon değerleri açısından kıyaslama yapılmıştır. Karşılaştırma yapılırken elde edilen Ct değerleri hesaplanmasında kullanılan formül Şekil 3.7'de verilmiştir.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\text{Örnek } \Delta Ct (\text{Gen-Referans}) - \text{Kontrol } \Delta Ct (\text{Gen-Referans})]}$$

**Şekil 3.7** Ct değerlerinin hesaplanmasında kullanılan formül

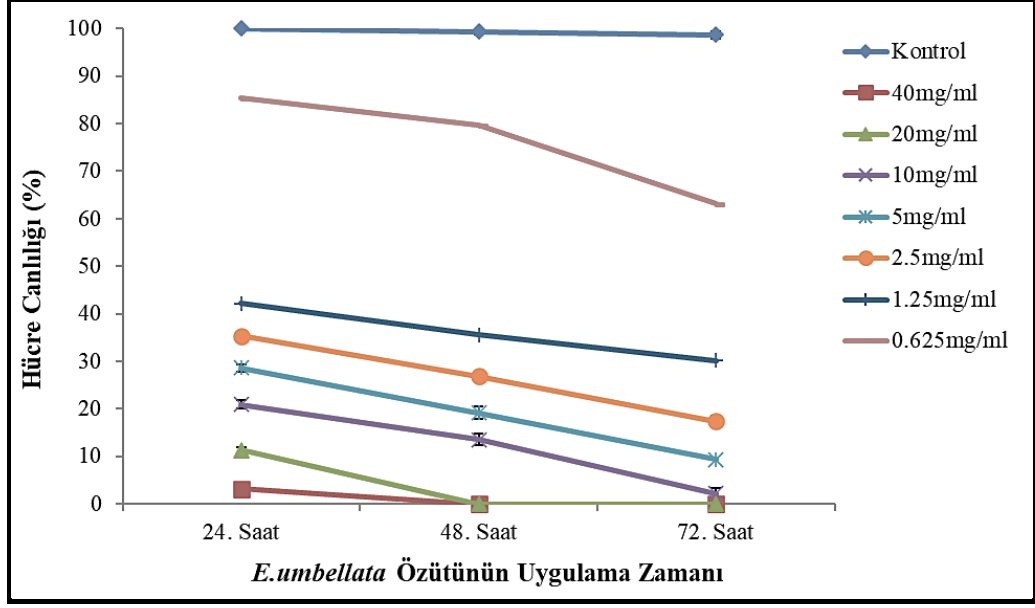
Microsoft Excel ve IBM SPSS Statistics 27.0.1 programları ile veriler analiz edilmiştir (Ergün ve ark., 2018, 2019a, 2019b, 2020). Ayrıca Tüm konsantrasyonların sonuçlarını özetlemek için de açıklayıcı değişkenler, Temel Bileşenler Analizi (PCA), Jamovi 2.4.11 programı ile görselleştirilmiştir.

#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

- *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün, farklı konsantrasyon serilerinin amoebisidal aktivitesinin,
- *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütü kullanılarak yeşil (green) sentezle elde edilen AgNP'lerin karakterizasyon testlerinin ve farklı konsantrasyon serilerinin amoebisidal aktivitesinin,
- *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *E. umbellata*'nın meyve özütünde GC MS analiziyle tespit edilen Laurik Asit'in farklı konsantrasyon serilerinin amoebisidal aktivitesinin,
- *E. umbellata* meyve özütünün GC MS analizi ile kimyasal kompozisyonunun,
- *E. umbellata* özütünün, Laurik Asit'in ve AgNP'lerin -OH radikaliyle oluşturulan DNA hasarına karşı koruyucu etkilerinin,
- *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün HeLa hücrelerinde doza bağlı sitotoksik aktivitesinin,
- *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün, *E. umbellata* meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin ve *E. umbellata* özütünün kimyasal bir fitobileşiği olan Laurik Asit'in *A. castellanii* trofozoitlerinin stres altında antioksidan enzimlerinden (CAT ve SOD) sorumlu genler ile pseudokistleşme (CSII) ve asıl kistleşme (CSP21) süreçlerinden sorumlu genlerin ifade analizlerinin araştırıldığı çalışmada elde edilen bulgular bölümler halinde sunulmuştur.

##### 4.1 *A. castellanii* Trofozoitleri Üzerinde *E. umbellata*'nın Etanolik Meyve Özütünün Farklı Konsantrasyon Serilerinin Amoebisidal Aktivitesi

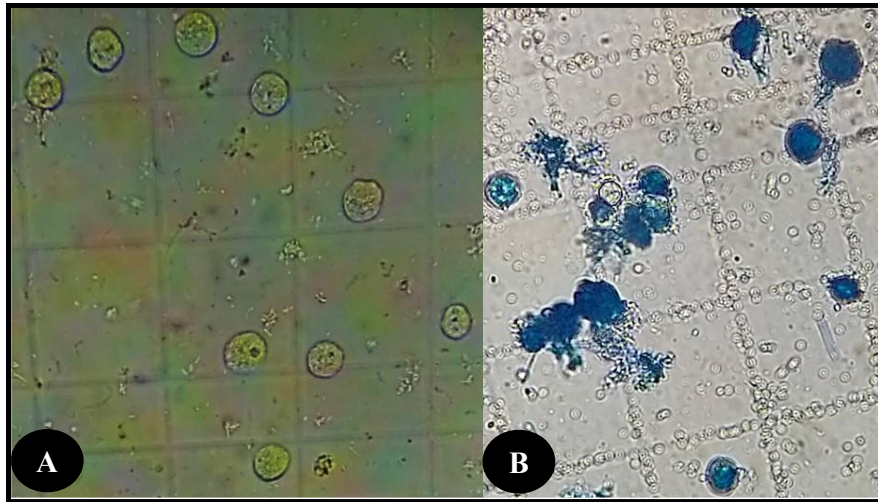
*A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün farklı doz ve sürelerde amoebisidal etkisinin grafiği Şekil 4.1'de sunulmuştur.



**Şekil 4.1** *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün farklı doz ve sürelerde amoebisidal etkisinin grafiği

Şekil 4.1 incelendiğinde *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün 40mg/ml konsantrasyonda 24. saatte trofozoitlerin önemli bir bölümünde letal etki gösterdiği, 48. saatten sonra aynı konsantrasyonda canlı trofozoite rastlanmadığı, 20mg/ml konsantrasyonda 24. ve 48. saatlerde önemli oranda letal etki gösterdiği 72. saatten sonra aynı konsantrasyonda canlı trofozoite rastlanmadığı, 10mg/ml konsantrasyonda ise 72. saatte önemli oranda letal etki gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Şekil 4.2'de ışık mikroskopunda *A. castellanii* trofozoitlerinin canlı (A) ve ölü (B) görüntüsü sunulmuştur.



**Şekil 4.2** Işık mikroskopunda *A. castellanii* trofozoitlerinin canlı (A) ve ölü (B) görüntüsü (orijinal büyütme 40x objektif)



*E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün farklı dozlarda *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi (Mean±SD) Çizelge 4.1'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1** *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün farklı dozlarda *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi

Doz (mg/ml)	Mean±SD
Kontrol	99.54±0.90 <sup>a</sup>
0.625	75.98±10.14 <sup>b</sup>
1.25	35.95±5.29 <sup>c</sup>
2.5	26.54±7.85 <sup>d</sup>
5	19.04±8.47 <sup>e</sup>
10	12.22±8.33 <sup>f</sup>
20	5.43±5.01 <sup>g</sup>
40	1.04±1.58 <sup>h</sup>
p	<0.01

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

*E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi (Mean±SD) Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.2** *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi

Süre (Saat)	Mean±SD
24	40.85±33.00 <sup>a</sup>
48	34.96±34.49 <sup>b</sup>
72	27.59±34.13 <sup>c</sup>
p	<0.01

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.1 ve 4.2 incelendiğinde *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde uygulanan özüt dozlarının ve bu dozların uygulanma sürelerinin istatistiksel olarak hücre canlılığına etkisinin önemli olduğu ( $p<0.01$ ) bulunmuştur. Özüt dozlarının hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, özüt dozu arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık en düşük doz olan 0.625mg/ml'de olurken en düşük canlılık ise en yüksek dozda (40mg/ml) ölçülmüştür. Uygulama sürelerinin hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, bekleme süresi arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 24. saatin sonunda olurken en düşük canlılık 72. saatin sonunda ölçülmüştür.

Çizelge 4.3'te *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün farklı doz ve farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi (Mean±SD) verilmiştir.

**Çizelge 4.3** *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün farklı doz ve sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi

Süre (Saat)	Doz (mg/ml)	Mean±SD
24	Kontrol	100±0.00 <sup>a</sup>
	0.625	85.13±1.42 <sup>b</sup>
	1.25	42.21±0.72 <sup>c</sup>
	2.5	35.31±0.84 <sup>f</sup>
	5	28.62±1.03 <sup>g</sup>
	10	20.93±1.55 <sup>h</sup>
	20	11.31±1.16 <sup>j</sup>
	40	3.14±0.34 <sup>lm</sup>
48	Kontrol	100±0.00 <sup>a</sup>
	0.625	79.56±1.29 <sup>c</sup>
	1.25	35.51±0.50 <sup>f</sup>
	2.5	26.90±1.31 <sup>g</sup>
	5	19.18±1.32 <sup>h</sup>
	10	20.93±2.04 <sup>ij</sup>
	20	4.97±1.64 <sup>kl</sup>
	40	0.00±0.00 <sup>m</sup>
72	Kontrol	98.63±1.18 <sup>a</sup>
	0.625	63.08±3.00 <sup>d</sup>
	1.25	30.15±1.38 <sup>g</sup>
	2.5	17.42±1.96 <sup>hi</sup>
	5	9.31±2.14 <sup>jk</sup>
	10	2.18±1.89 <sup>lm</sup>
	20	0.00±0.00 <sup>m</sup>
	40	0.00±0.00 <sup>m</sup>
p	<0.01	

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.3 incelendiğinde; *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde uygulanan özüt dozlarının ve uygulama sürelerinin hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Tüm süreler ve dozlar arasında ( $p<0.01$ ) anlamlı istatistiksel farklılıklar bulunmuştur.

*E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün farklı doz ve sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisinin özet tablo olarak gösterimi Çizelge 4.4'de sunulmuştur.

**Çizelge 4.4** *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün farklı doz ve sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi

Doz/Süre	24.Saat	48.Saat	72.Saat	Σ
Kontrol	100±0.00 <sup>a</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	98.63±1.18 <sup>a</sup>	99.54±0.90 <sup>a</sup>
0.625mg/ml	85.13±1.42 <sup>b</sup>	79.56±1.29 <sup>c</sup>	63.08±3.00 <sup>d</sup>	75.98±10.14 <sup>b</sup>
1.25mg/ml	42.21±0.72 <sup>e</sup>	35.51±0.50 <sup>f</sup>	30.15±1.38 <sup>g</sup>	35.95±5.29 <sup>c</sup>
2.5mg/ml	35.31±0.84 <sup>f</sup>	26.90±1.31 <sup>g</sup>	17.42±1.96 <sup>hi</sup>	26.54±7.85 <sup>d</sup>
5mg/ml	28.62±1.03 <sup>g</sup>	19.18±1.32 <sup>h</sup>	9.31±2.14 <sup>jk</sup>	19.04±8.47 <sup>e</sup>
10mg/ml	20.93±1.55 <sup>h</sup>	20.93±2.04 <sup>ij</sup>	2.18±1.89 <sup>lm</sup>	12.22±8.33 <sup>f</sup>
20mg/ml	11.31±1.16 <sup>j</sup>	4.97±1.64 <sup>kl</sup>	0.00±0.00 <sup>m</sup>	5.43±5.01 <sup>g</sup>
40mg/ml	3.14±0.34 <sup>lm</sup>	0.00±0.00 <sup>m</sup>	0.00±0.00 <sup>m</sup>	1.04±1.58 <sup>h</sup>
Σ	40.85±33.00 <sup>a</sup>	34.96±34.49 <sup>b</sup>	27.59±34.13 <sup>c</sup>	

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

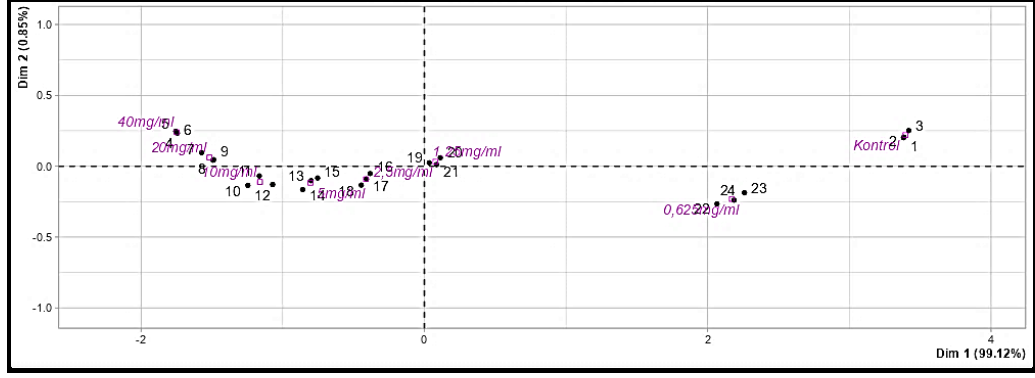
*E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0.9, 1.09 ve 1.15mg/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5).

**Çizelge 4.5** Farklı konsantrasyondaki *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri

<i>A. castellanii</i>	Uygulanan Saat	%50 İnhibitör Konsantrasyon (IC <sub>50</sub> )
Trofozoit	72	0.9mg/ml
	48	1.09mg/ml
	24	1.15mg/ml

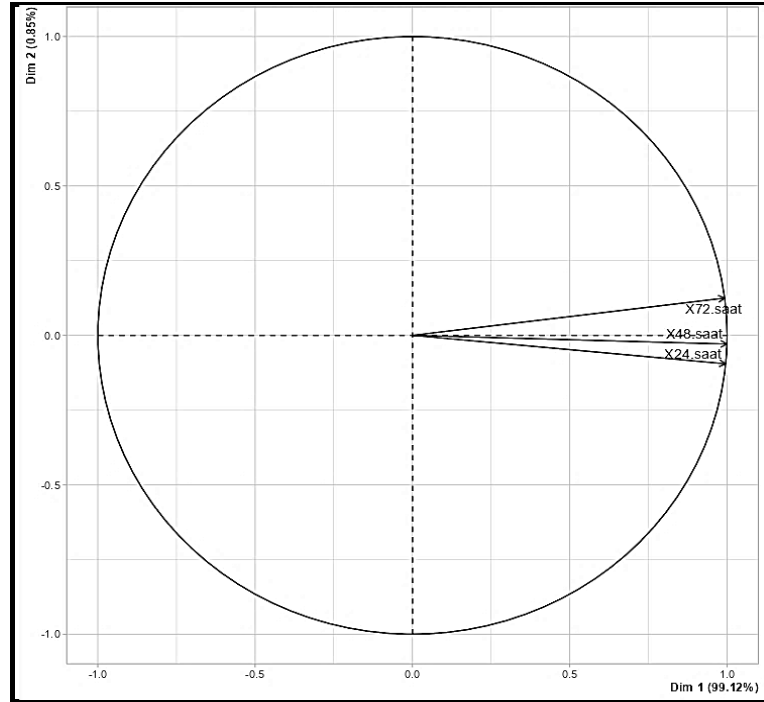
Tüm özüt konsantrasyonlarının *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki % canlılık sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, Temel Bileşenler Analizi (PCA) ile görselleştirilmiştir. Şekil 4.3 farklı konsantrasyonların farklı saatlerdeki değerlerinin PCA biplotunu göstermektedir. Hem birinci (F1, %99.12) hem de ikinci (F2, %0.85) temel bileşenler toplu olarak veri setindeki en büyük varyasyona (%99.97) katkıda bulunmuştur.

Şekil 4.3'te farklı konsantrasyonlardaki *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün PCA ile gösterimi sunulmuştur.



Şekil 4.3 Farklı konsantrasyonlardaki *E. umbellata* özütünün PCA ile gösterimi

Şekil 4.3 incelendiğinde açıklama oranı (%99.97) olan eksenin sağ ve sol tarafını ayırdığımızda 40, 20, 10, 5 ve 2.5mg/ml'deki dozlar ile kontrol, 1.25 ve 0.625mg/ml dozlar arasında negatif korelasyon göstermektedir. Şekil 4.4'te farklı konsantrasyonlardaki *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün % canlılık üzerine etkisinin farklı sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi sunulmuştur.



Şekil 4.4 *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün farklı doz ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi

Şekil 4.4 incelendiğinde, *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün uygulanan tüm dozların 24 saatlik dilimindeki % hücre canlılığı değerleri ile 72 saatteki değerler arasında önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir, ( $p < 0.05$ ). 48. saat hücre canlılığı verileri eksenin ortasında yer alıp, bu zamandan sonraki zaman periyodunda

hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Bu bağlamda 48. saat tüm dozlar için eşik değer kabul edilebilir. Çizelge 4.6'da *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi verilmiştir.

**Çizelge 4.6** *E. umbellata* özütünün özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi

	Özdeğer	Varyans Yüzdesi	Kümülatif %
Dim. 1	2.97350	99.1165	99.1
Dim. 2	0.02547	0.8489	100.0

Çizelge 4.6 incelendiğinde tüm eksenler varyansların %100'ünü açıklamaktadır.

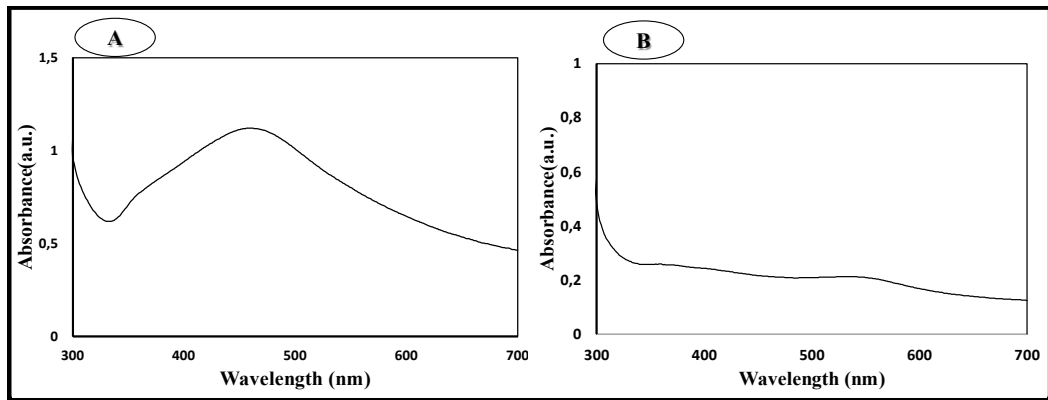
#### 4.2 *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütü kullanılarak yeşil (green) sentezle elde edilen AgNP'lerin, karakterizasyon test bulguları ve farklı konsantrasyon serilerinin amoebisidal aktivitesi

*E. umbellata*'nın etanolik meyve özütü kullanılarak yeşil (green) sentezle elde edilen AgNP'ler karakterizasyon testleri ile doğrulanmıştır. Karakterizasyon test bulguları bölümler halinde sunulmuştur.

##### 4.2.1 UV-Vis Bulguları

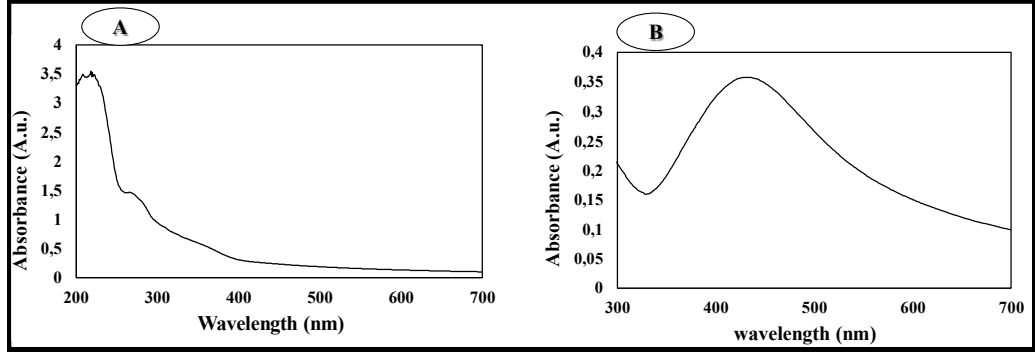
AgNP'ler UV-Vis'de 300-700nm dalga boyu aralığında 436nm dalga boyunda absorbans alınmıştır. Elde edilen AgNP'lerin Şekil 4.5 incelendiğinde aşırı asidik ( $\text{pH} \leq 5$ ) ve aşırı bazik ( $\text{pH} \geq 11$ ) ortamda UV dalga boyları beklenen ve istenen düzeyde olmadığı gözlenmiştir.

Şekil 4.5'te AgNP'lerin pH 5 (A) ve pH 11 (B) UV-Vis spektrofotometre görüntüsü sunulmuştur.



**Şekil 4.5** AgNP'lerin pH 5 (A) ve pH 11 (B) UV-Vis spektrofotometre görüntüsü

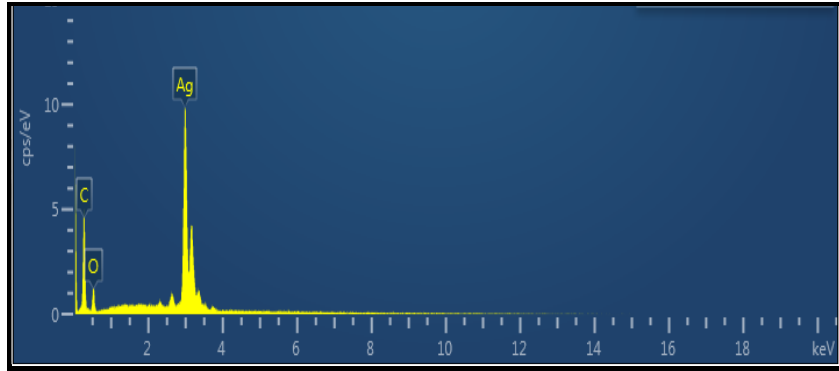
AgNP'ler içinde en güçlü amoebisidal aktiviteyi pH'sı 9 olan AgNP gösterdiğinden çalışmanın sonraki aşamalarında pH 9'da sentezlenen AgNP'ler kullanılmıştır. *E.umbellata* özütünün ve pH'sı 9 olan AgNP'lerin UV-Vis görüntüsü Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6 *E.umbellata* özütünün (A) ve pH'sı 9 olan AgNP'lerin (B) UV-Vis spektrofotometre görüntüsü

#### 4.2.2 EDX Bulguları

EDX analizi sonucuna göre, sentezlenen AgNP'lerin içeriğinin büyük oranda gümüş karbon ve oksijen elementlerinin varlığı gözlenmiştir. Şekil 4.7'de AgNP'lerin EDX Element haritalama görüntüsü sunulmuştur.



Şekil 4.7 AgNP'lerin EDX Element haritalama görüntüsü

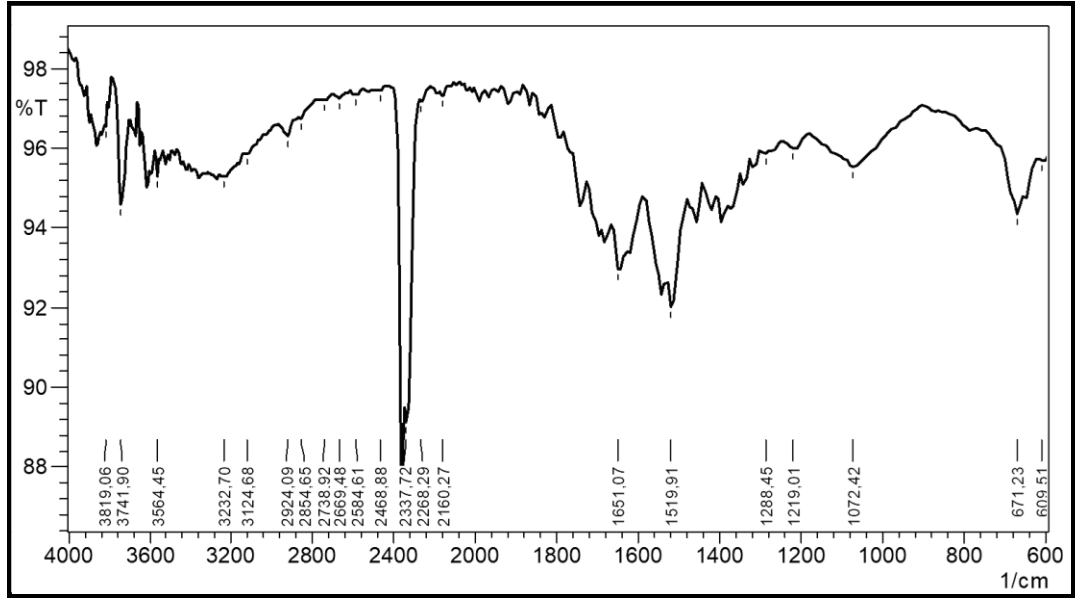
Çizelge 4.7'de AgNP'lerin EDX Element haritalama spektrum bulguları verilmiştir.

Çizelge 4.7 AgNP'lerin EDX Element haritalama spektrum bulguları

Element	Ağırlık %	Atomik %
C	14.87	45.44
O	13.10	30.05
Ag	72.03	24.51
Toplam	100.0	100.0

### 4.2.3 FTIR Bulguları

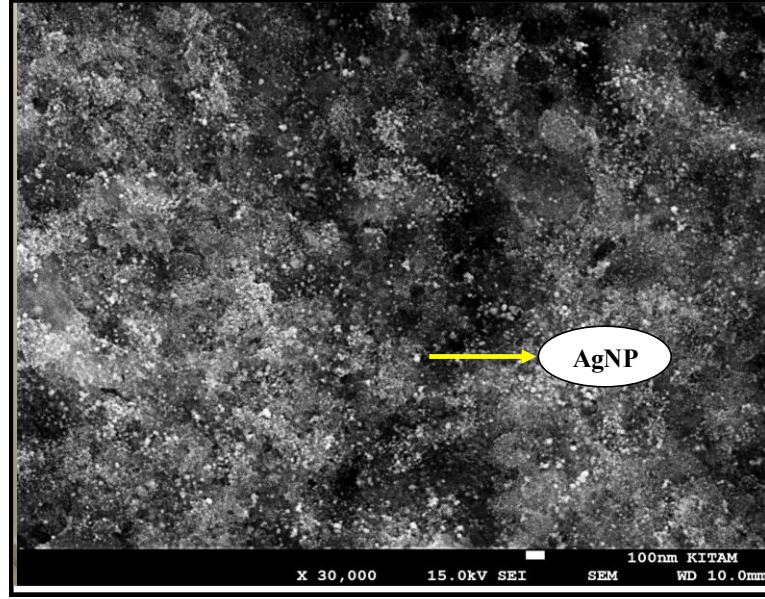
*E. umbellata* meyve özütü ile sentezlenen AgNP'lerin FTIR spektrumunu gösteren Şekil 4.8 incelendiğinde; 3819, 3741, 3564, 3232 ve 3124 $\text{cm}^{-1}$  bantları alkol ve fenol bileşiklerinin O-H bağlarını, 2924, 2854 ve 2738 $\text{cm}^{-1}$  bantları, C-H alken bağlarını, 2669, 2584 ve 2468 $\text{cm}^{-1}$  H-bağlı karboksilik asit bantlarını, 2337 ve 2266 $\text{cm}^{-1}$  C $\equiv$ N Nitril bantlarını, 2160 $\text{cm}^{-1}$  C $\equiv$ C Alkin bandını, 1651 $\text{cm}^{-1}$  C=C Alken bandını, 1519 $\text{cm}^{-1}$  C=C Aromatik halka bandını, 1288 ve 1219 $\text{cm}^{-1}$  C-N Amin ve Amid bantlarını, 1072 $\text{cm}^{-1}$  C-O Alkol, eter, ester ve karboksilik asit bantlarını, 671 ve 609 $\text{cm}^{-1}$  C-H ile -OH gruplarının titreşimlerini göstermektedir (Socrates, 2004; Zulfiqar, 2022). Şekil 4.8'de *E. umbellata* meyve özütü ile sentezlenen AgNP'lerin FTIR spektrofotometre görüntüsü sunulmuştur.



Şekil 4.8 AgNP'lerin FTIR spektrofotometre görüntüsü

### 4.2.4 SEM Bulguları

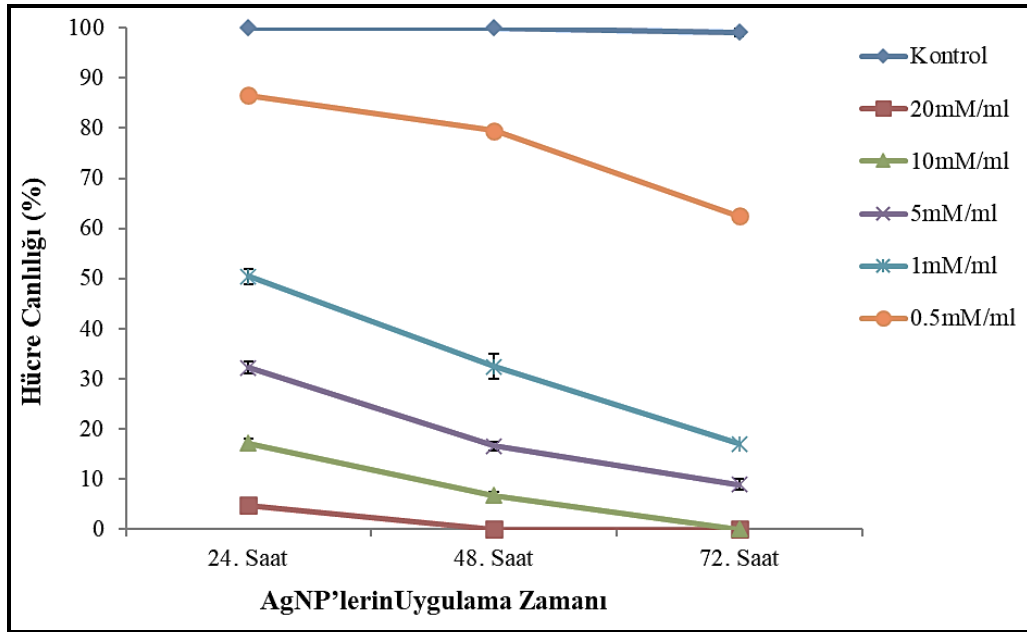
Sentezi yapılan AgNP'lerin yüzey morfolojisi ve yapısal analizi, SEM'de yapılmış ve 10nm boyutunda, yuvarlak şekilli AgNP görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.9'da AgNP'lerin SEM görüntüsü sunulmuştur.



Şekil 4.9 AgNP'lerin SEM görüntüsü

#### 4.2.5 *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde AgNP'lerin farklı konsantrasyon serilerinin amoebisidal aktivitesi

Şekil 4.10'da *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütü kullanılarak yeşil sentezle elde edilen AgNP'lerin farklı doz ve sürelerde amoebisidal etkisinin grafiği gösterilmiştir.



Şekil 4.10 *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin farklı doz ve sürelerde amoebisidal etkisinin grafiği



Şekil 4.10 incelendiğinde, *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütü kullanılarak yeşil sentezle elde edilen AgNP'lerin 20mM/ml konsantrasyonda 24. saatte trofozoitlerin önemli bir bölümünde letal etki gösterdiği, 48. saatten sonra aynı konsantrasyonda canlı trofozoite rastlanmadığı ve 10mM/ml konsantrasyonda ise 24. ve 48. saatlerde önemli oranda letal etki gösterdiği, 72. saat sonrasında aynı konsantrasyonda canlı trofozoite rastlanmadığı görülmektedir.

*E. umbellata*'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin farklı dozlarda *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi (Mean±SD) Çizelge 4.8'de verilmiştir.

**Çizelge 4.8** *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin farklı dozlarda *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi (Mean±SD)

Doz (mM/ml)	Mean±SD
Kontrol	99.71±0.85 <sup>a</sup>
0.5	76.15±10.84 <sup>b</sup>
1	33.28±14.74 <sup>c</sup>
5	19.20±10.43 <sup>d</sup>
10	7.95±7.56 <sup>e</sup>
20	1.57±2.58 <sup>f</sup>
p	<0.01

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

*E. umbellata*'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi (Mean±SD) Çizelge 4.9'da verilmiştir.

**Çizelge 4.9** *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi

Süre (Saat)	Mean±SD
24	48.50±35.84 <sup>a</sup>
48	39.18±38.69 <sup>b</sup>
72	31.24±38.17 <sup>c</sup>
p	<0.01

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.8 ve 4.9 incelendiğinde *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde uygulanan özüt dozlarının

ve bu dozların uygulanma sürelerinin istatistiksel olarak hücre canlılığına etkisinin önemli olduğu bulunmuştur. Tüm süreler ve dozlar arasında ( $p<0.01$ ) anlamlı istatistiksel farklılıklar tespit edilmiştir. AgNP dozlarının hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, AgNP dozu arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık en düşük doz olan 0.5mM/ml’de olurken en düşük canlılık ise en yüksek dozda (20mM/ml) ölçülmüştür. Uygulama sürelerinin hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, bekleme süresi arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 24. saat sonunda olurken en düşük canlılık 72. saatin sonunda ölçülmüştür. Çizelge 4.10’da *E. umbellata*’nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP’lerin farklı doz ve farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi (Mean±SD) verilmiştir.

**Çizelge 4.10** *E. umbellata*’nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP’lerin farklı doz ve sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi

Süre (Saat)	Doz (mM/ml)	Mean±SD
24	Kontrol	100±0.00 <sup>a</sup>
	0.5	86.53±2.08 <sup>b</sup>
	1	50.42±2.02 <sup>c</sup>
	5	32.21±2.08 <sup>f</sup>
	10	17.16±1.55 <sup>g</sup>
	20	4.71±2.12 <sup>hi</sup>
48	Kontrol	100±0.00 <sup>a</sup>
	0.5	79.47±1.74 <sup>c</sup>
	1	32.42±2.70 <sup>f</sup>
	5	16.52±1.65 <sup>g</sup>
	10	6.68±1.36 <sup>h</sup>
	20	0.00±0.00 <sup>i</sup>
72	Kontrol	99.14±1.48 <sup>a</sup>
	0.5	62.46±1.84 <sup>d</sup>
	1	16.99±4.28 <sup>g</sup>
	5	8.87±1.93 <sup>h</sup>
	10	0.00±0.00 <sup>i</sup>
	20	0.00±0.00 <sup>i</sup>
p	<0.01	

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

*E. umbellata*'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin farklı doz ve sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisinin özet tablo olarak gösterimi Çizelge 4.11'de sunulmuştur.

**Çizelge 4.11** *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin farklı doz ve sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisinin grafiği

Doz/Süre	24.Saat	48.Saat	72.Saat	Σ
Kontrol	100±0.00 <sup>a</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	99.14±1.48 <sup>a</sup>	99.71±0.85 <sup>a</sup>
0.5mM/ml	86.53±2.08 <sup>b</sup>	79.47±1.74 <sup>c</sup>	62.46±1.84 <sup>d</sup>	76.15±10.84 <sup>b</sup>
1mM/ml	50.42±2.02 <sup>e</sup>	32.42±2.70 <sup>f</sup>	16.99±4.28 <sup>g</sup>	33.28±14.74 <sup>c</sup>
5mM/ml	32.21±2.08 <sup>f</sup>	16.52±1.65 <sup>g</sup>	8.87±1.93 <sup>h</sup>	19.20±10.43 <sup>d</sup>
10mM/ml	17.16±1.55 <sup>g</sup>	6.68±1.36 <sup>h</sup>	0.00±0.00 <sup>i</sup>	7.95±7.56 <sup>e</sup>
20mM/ml	4.71±2.12 <sup>hi</sup>	0.00±0.00 <sup>i</sup>	0.00±0.00 <sup>i</sup>	1.57±2.58 <sup>f</sup>
Σ	48.50±35.84 <sup>a</sup>	39.18±38.69 <sup>b</sup>	31.24±38.17 <sup>c</sup>	

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

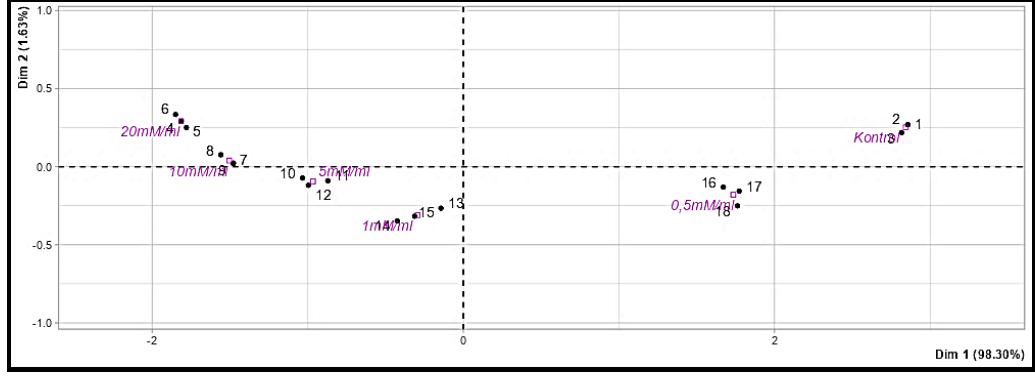
*E. umbellata*'nın etanolik meyve özütüyle yeşil sentez yolu ile elde edilen AgNP'lerin *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 0.65, 0.8 ve 1mM/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 4.12).

**Çizelge 4.12** *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütü ile sentezlenen farklı konsantrasyondaki AgNP'lerin *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri

<i>A. castellanii</i>	Uygulanan Saat	%50 İnhibitör Konsantrasyon (IC <sub>50</sub> )
	72	0.65mM/ml
Trofozoit	48	0.8mM/ml
	24	1mM/ml

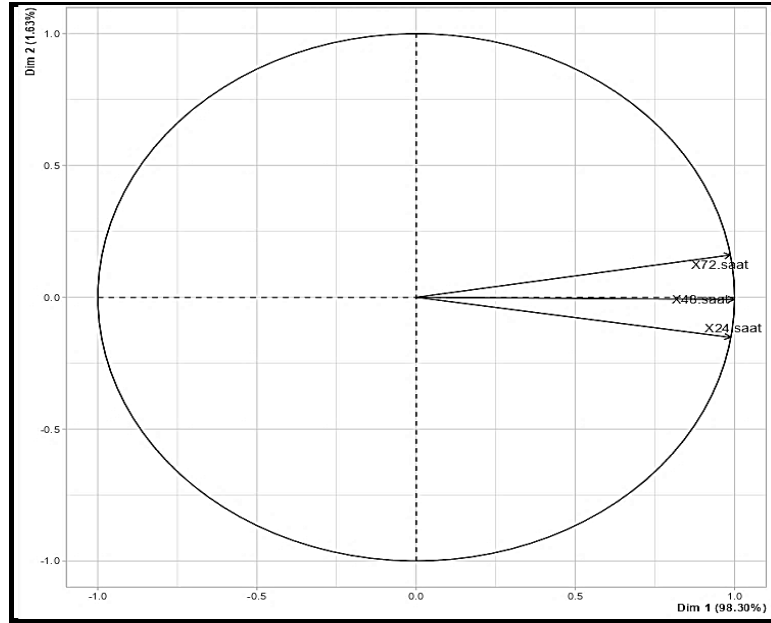
Tüm AgNP konsantrasyonlarının *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki % canlılık sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile görselleştirilmiştir.

Şekil 4.11 farklı konsantrasyonların farklı saatlerdeki değerlerinin PCA biplotunu göstermektedir. Hem birinci (F1, %98.30) hem de ikinci (F2, %1.63) temel bileşenler toplu olarak veri setindeki en büyük varyasyona (%99.93) katkıda bulunmuştur.



**Şekil 4.11** Farklı konsantrasyonlardaki AgNP'lerin PCA ile gösterimi

Şekil 4.11 incelendiğinde açıklama oranı (%99.93) olan eksenin sağ ve sol tarafını ayırdığımızda 20, 10, 5 ve 1mM/ml'deki dozlar ile kontrol ve 0.5mM/ml dozu negatif korelasyon göstermektedir. Şekil 4.12'de farklı konsantrasyonlardaki AgNP'lerin % canlılık üzerine etkisinin farklı doz ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi sunulmuştur.



**Şekil 4.12** AgNP'lerin farklı doz ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi

Şekil 4.12 incelendiğinde AgNP'lerin tüm uygulanan dozların 24 saatlik dilimindeki % hücre canlılığı değerleri, 72 saatteki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir, ( $p < 0.05$ ). 48. saat hücre canlılığı verileri eksenin ortasında yer alıp, bu zamandan sonraki zaman periyodunda hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Bu bağlamda 48. saat tüm dozlar için eşik değer olarak kabul

edilebilir. Çizelge 4.13'te AgNP'lerin özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi verilmiştir.

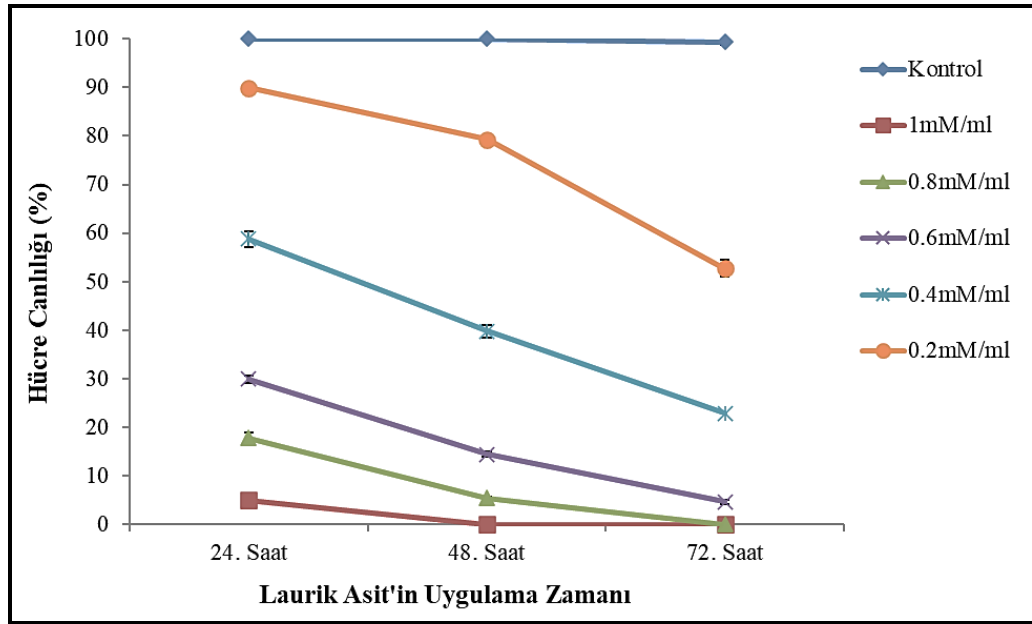
**Çizelge 4.13** AgNP'lerin özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi

	Özdeğer	Varyans Yüzdesi	Kümülatif %
Dim. 1	2.94900	98.2999	98.3
Dim. 2	0.04895	1.6316	99.9

Çizelge 4.13 incelendiğinde tüm eksenler varyansların %99.9'unu açıklamaktadır.

#### 4.3 *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *E. umbellata*'nın meyve özütünde GC MS ile tespit edilen Laurik Asit'in farklı konsantrasyon serilerinin amoebisidal aktivitesi

Şekil 4.13'te GC MS ile *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünde tespit edilen Laurik Asit'in *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde farklı doz ve sürelerde amoebisidal etkisinin grafiği gösterilmiştir.



**Şekil 4.13** Laurik Asit'in *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde farklı doz ve sürelerde amoebisidal etkisinin grafiği

Şekil 4.13 incelendiğinde, GC MS ile *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünde tespit edilen Laurik Asit'in 1mM/ml konsantrasyonda 24. saatte trofozoitlerin önemli bölümünde letal etki gösterdiği, 48. saatten sonra aynı konsantrasyonda canlı trofozoite rastlanmadığı ve 0.8mM/ml konsantrasyonda 48. saatte önemli oranda letal etki gösterdiği 72. saatte aynı konsantrasyonda canlı

trofozoite rastlanmadığı, 0.6mM/ml konsantrasyonda ise 72. saatte önemli oranda letal etki gösterdiği görülmektedir.

Çizelge 4.14'te Laurik Asit'in farklı dozlarda *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi (Mean±SD) gösterilmiştir.

**Çizelge 4.14** Laurik Asit'in farklı dozlarda *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi

Doz (mM/ml)	Mean±SD
Kontrol	99.77±0.66 <sup>a</sup>
0.2	73.98±16.68 <sup>b</sup>
0.4	40.48±15.68 <sup>c</sup>
0.6	16.35±11.08 <sup>d</sup>
0.8	7.75±7.98 <sup>e</sup>
1	1.68±2.58 <sup>f</sup>
p	<0.01

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.15'te Laurik Asit'in farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi (Mean±SD) sunulmuştur.

**Çizelge 4.15** Laurik Asit'in farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi

Süre (Saat)	Mean±SD
24	50.25±36.71 <sup>a</sup>
48	39.82±38.94 <sup>b</sup>
72	29.93±37.16 <sup>c</sup>
p	<0.01

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.14 ve 4.15 incelendiğinde GC MS ile *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünde tespit edilen Laurik Asit'in *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde uygulanan dozlarının ve bu dozların uygulanma sürelerinin istatistiksel olarak hücre canlılığına etkisinin önemli olduğu bulunmuştur, ( $p<0.01$ ). Laurik Asit'in dozlarının hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, Laurik Asit'in dozu arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık en düşük doz olan 0.2mM/ml'de olurken en düşük canlılık ise en yüksek doz olan 1mM/ml'de ölçülmüştür. Uygulama sürelerinin hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, bekleme süresi arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 24. saat sonunda olurken en düşük canlılık 72. saatin sonunda ölçülmüştür.

*E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünde GC MS ile tespit edilen Laurik Asit'in farklı süre ve dozda *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi (Mean±SD) Çizelge 4.16'da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.16** Laurik Asit'in farklı doz ve sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisi

Süre (Saat)	Doz (mM/ml)	Mean±SD
24	Kontrol	100±0.00 <sup>a</sup>
	0.2	89.94±1.39 <sup>b</sup>
	0.4	58.76±2.38 <sup>d</sup>
	0.6	29.95±1.32 <sup>g</sup>
	0.8	17.81±2.10 <sup>hi</sup>
	1	5.04±1.13 <sup>jk</sup>
48	Kontrol	100±0.00 <sup>a</sup>
	0.2	79.28±0.64 <sup>c</sup>
	0.4	39.79±2.75 <sup>f</sup>
	0.6	14.44±0.94 <sup>i</sup>
	0.8	5.44±0.55 <sup>j</sup>
	1	0.00±0.00 <sup>k</sup>
72	Kontrol	99.33±1.15 <sup>a</sup>
	0.2	52.72±2.98 <sup>e</sup>
	0.4	22.89±2.14 <sup>h</sup>
	0.6	4.65±0.83 <sup>jk</sup>
	0.8	0.00±0.00 <sup>k</sup>
	1	0.00±0.00 <sup>k</sup>
p	<0.01	

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.17’de GC MS ile *E. umbellata*’nın etanolik meyve özütünde tespit edilen Laurik Asit’in farklı doz ve sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisinin özet tablo olarak gösterimi sunulmuştur.

**Çizelge 4.17** Laurik Asit’in farklı doz ve sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin hücre canlılığı üzerine etkisinin grafiği

Doz/Süre	24.Saat	48.Saat	72.Saat	Σ
Kontrol	100±0.00 <sup>a</sup>	100±0.00 <sup>a</sup>	99.33±1.15 <sup>a</sup>	99.77±0.66 <sup>a</sup>
0.2mM/ml	89.94±1.39 <sup>b</sup>	79.28±0.64 <sup>c</sup>	52.72±2.98 <sup>e</sup>	73.98±16.68 <sup>b</sup>
0.4mM/ml	58.76±2.38 <sup>d</sup>	39.79±2.75 <sup>f</sup>	22.89±2.14 <sup>h</sup>	40.48±15.68 <sup>c</sup>
0.6mM/ml	29.95±1.32 <sup>g</sup>	14.44±0.94 <sup>i</sup>	4.65±0.83 <sup>jk</sup>	16.35±11.08 <sup>d</sup>
0.8mM/ml	17.81±2.10 <sup>hi</sup>	5.44±0.55 <sup>j</sup>	0.00±0.00 <sup>k</sup>	7.75±7.98 <sup>e</sup>
1mM/ml	5.04±1.13 <sup>jk</sup>	0.00±0.00 <sup>k</sup>	0.00±0.00 <sup>k</sup>	1.68±2.58 <sup>f</sup>
Σ	50.25±36.71 <sup>a</sup>	39.82±38.94 <sup>b</sup>	29.93±37.16 <sup>c</sup>	

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır

*E. umbellata*’nın etanolik meyve özütünde GC MS analiziyle tespit edilen Laurik Asit’in *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 0.19, 0.25 ve 0,34mM/ml olarak bulunmuştur (Çizelge 4.18).

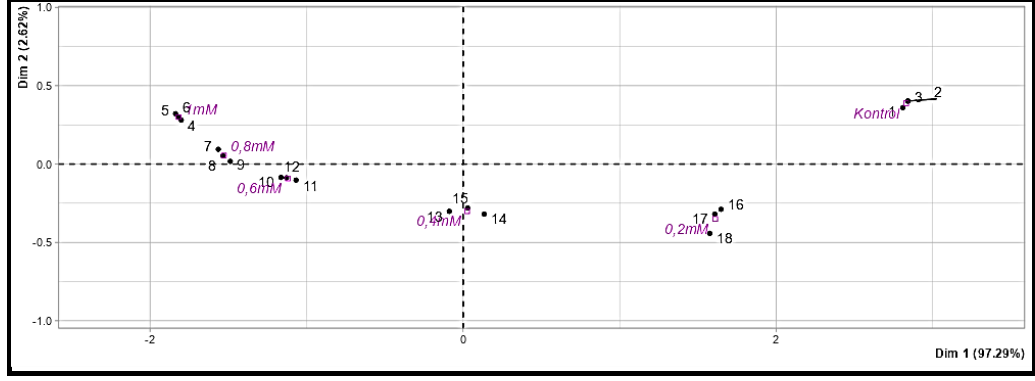
**Çizelge 4.18** Farklı konsantrasyondaki Laurik Asit’in *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri

<i>A. castellanii</i>	Uygulanan Saat	%50 İnhibitör Konsantrasyon (IC <sub>50</sub> )
Trofozoit	72	0.19mM/ml
	48	0.25mM/ml
	24	0.34mM/ml

Tüm Laurik Asit konsantrasyonlarının *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki % canlılık sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile görselleştirilmiştir.

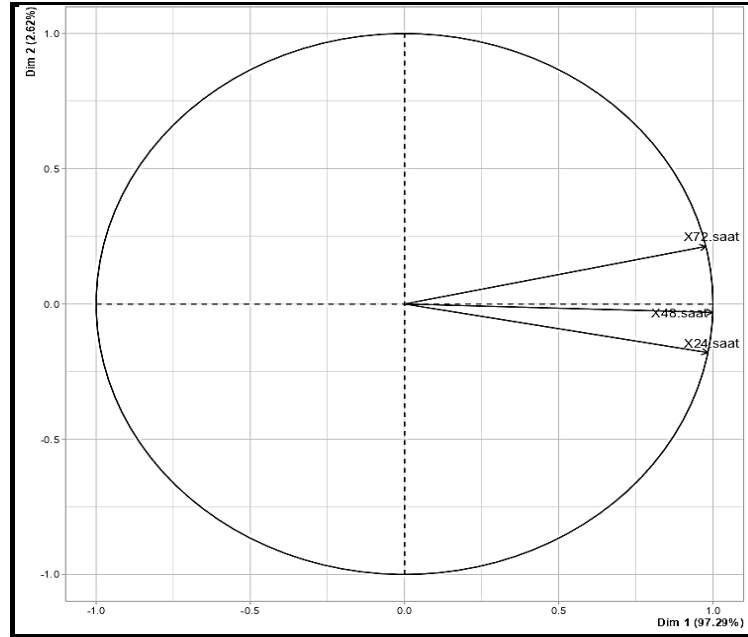
Şekil 4.14 farklı konsantrasyonların farklı saatlerdeki değerlerinin PCA biplotunu göstermektedir. Hem birinci (F1, %97.29) hem de ikinci (F2, %2.62) temel bileşenler toplu olarak veri setindeki en büyük varyasyona (%99.91) katkıda bulunmuştur.





**Şekil 4.14** Farklı konsantrasyonlardaki Laurik Asit'in PCA ile gösterimi

Şekil 4.14 incelendiğinde açıklama oranı (%99.91) olan eksenin sağ ve sol tarafını ayırdığımızda 1, 0.8, 0.6 ve 0.4mM/ml'deki dozlar ile kontrol ve 0.2mM/ml dozu arasında negatif korelasyon göstermektedir. Şekil 4.15'te farklı konsantrasyonlardaki Laurik Asit'in % canlılık üzerine etkisinin farklı doz ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi sunulmuştur.



**Şekil 4.15** Laurik Asit'in farklı doz ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi

Şekil 4.15 incelendiğinde Laurik Asit'in tüm uygulanan dozların 24 saatlik dilimindeki % hücre canlılığı değerleri, 72 saatteki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir, ( $p < 0.05$ ). 48. saat hücre canlılığı verileri eksenin ortasında yer alıp, bu zamandan sonraki zaman periyodunda hücre canlılığının

azaldığı gözlenmiştir. Bu bağlamda 48. saat tüm dozlar için eşik değer kabul edilebilir. Çizelge 4.19'da Laurik Asit'in özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi verilmiştir.

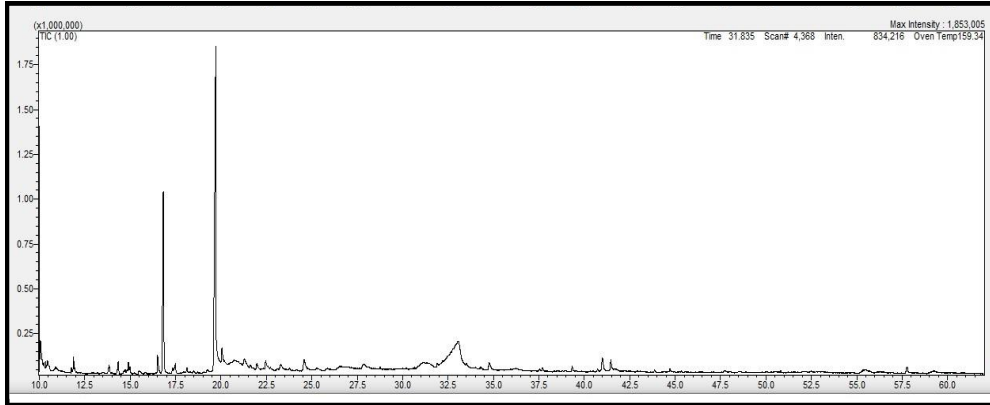
**Çizelge 4.19** Laurik Asit'in özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi

	Özdeğer	Varyans Yüzdesi	Kümülatif %
Dim. 1	2.91870	97.2898	97.3
Dim. 2	0.07860	2.6199	99.9

Çizelge 4.19 incelendiğinde tüm eksenler varyansların %99.9'unu açıklamaktadır.

#### 4.4 *E. umbellata* Meyve Özütünün GC MS ile Kimyasal Kompozisyonun Belirlenmesi

Şekil 4.16'da *E. umbellata* meyve özütünün GC MS analiz grafiği sunulmuştur. Kapsamlı literatür taraması sonucunda bu kimyasal bileşiklerin bazılarının (2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-one, Dimethylsulfoxonium formylmethylide, 1,2,3-Propanetriol monoacetate ve Laurik (Dodecanoic) Asit) antimikrobiyal etkilerinin tespit edildiği çalışmalara rastlanmıştır.



**Şekil 4.16** *E. umbellata* meyve özütünün GC MS analiz grafiği

Çizelge 4.20'de *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün GC MS analiz ile belirlenen kimyasal kompozisyonu verilmiştir.

**Çizelge 4.20** *E. umbellata* meyve özütünün kimyasal kompozisyonu

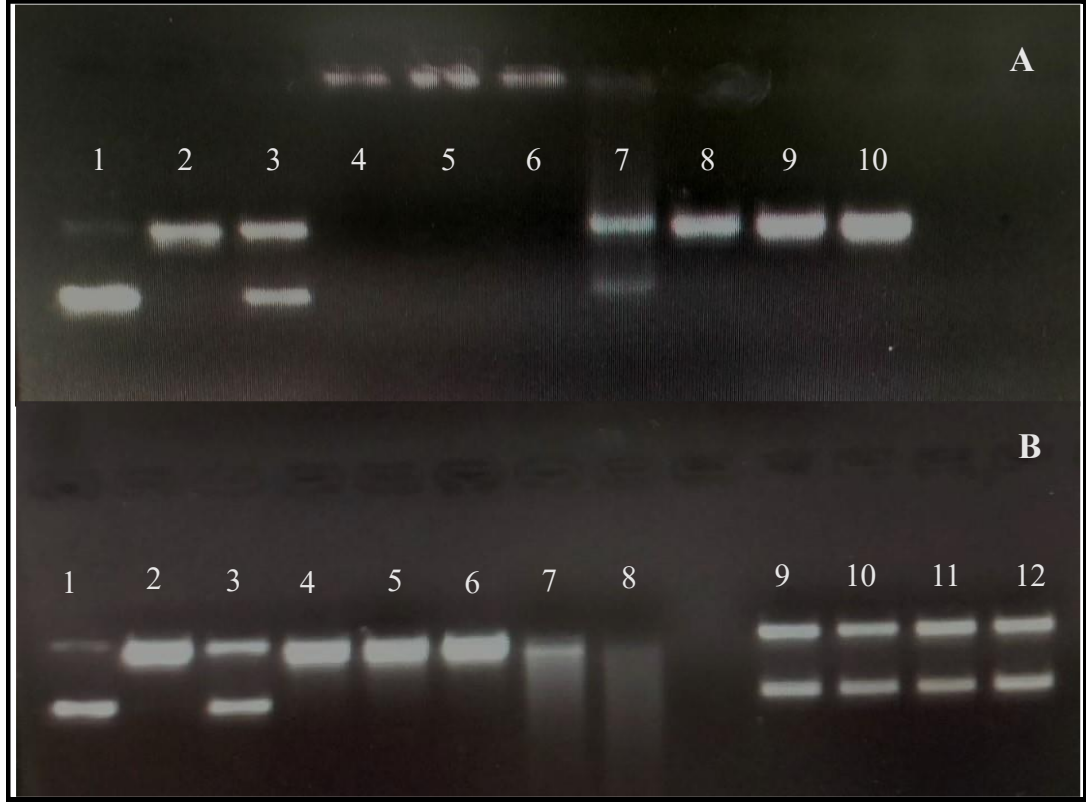
Pik	Tutulma Süresi	Alan %	Kimyasalın Adı	CAS NO	Formül	Molekül Ağırlığı (MW)	Kütüphane (Library)
1	10.061	3.35	Dimethylsulfoxonium formylmethylide	31043-74-0	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> S	120	NIST11
2	10.442	1.41	Methanesulfonyl chloride	124-63-0	CH <sub>3</sub> C <sub>1</sub> O <sub>2</sub> S	114	NIST11
3	11.883	1.02	3-Octanol, 2-methyl-	26533-34-6	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> O	144	NIST11
4	16.509	1.56	1,4-Butanediol, diacetate	628-67-1	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	174	NIST11
5	16.823	14.25	2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-one	10230-62-3	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	144	NIST11
6	19.712	34.02	2(5H)-Furanone, 4-methyl-5-(2-methyl-2-propenyl)-	89902-24-9	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	152	NIST11
7	20.05	1.3	1,1,2-Triacetoxymethane	2983-35-9	C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	204	NIST11
8	21.287	1.06	Malic Acid	6915-15-7	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O	134	NIST11
9	22.469	1.11	N-Nitroso-2-ethyl-1,3-tetrahydrooxazine	24033-81-6	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	144	NIST11
10	24.592	1.91	2-Tetrahydrofurfuryl isothiocyanate	36810-87-4	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> NOS	143	NIST11
11	27.89	1.34	1,2,3,5-Cyclohexanetetrol, (1.alpha.,2.beta.,3.alpha.,5.beta.)-	53585-08-3	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	148	NIST11
12	31.194	4.61	.beta.-D-Glucosyloxymethane	14901-08-7	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O	252	NIST11
13	33.066	16.86	.alpha.-d-Mannofuranoside, methyl	4097-91-0	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	194	NIST11
14	34.766	1.02	1,3,2-Oxathiaborole, 2-cyclooctyl-	0-00-0	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> BO	198	NIST11
15	40.999	1.28	Phosphonic acid, methyl-, dioctyl ester	1832-68-4	C <sub>17</sub> H <sub>37</sub> O <sub>3</sub> P	320	NIST11
16	10.061	3.35	Methane, sulfinylbis- (CAS) Dimethyl sulfoxide	67-68-5	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O S	78	WILEY
17	10.442	1.41	Methane, sulfonylbis- (CAS) Dimethyl sulfone	67-71-0	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S	94	WILEY
18	11.883	1.02	(E) Ethyl Undec-2-enoate	0-00-0	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	212	WILEY
19	16.509	1.56	2-acetyl-2-hydroxy-. gamma.-butyrolactone	135366-64-2	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	144	WILEY
20	16.823	14.25	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	0-00-0	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	144	WILEY
21	19.712	34.02	2-Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)- (CAS) HMF	67-47-0	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	126	WILEY
22	20.05	1.3	1,2,3-Propanetriol, monoacetate	26446-35-5	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	134	WILEY
23	21.287	1.06	Butanedioic acid, hydroxy- (CAS) Pomalutic acid	6915-15-7	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	134	WILEY
24	22.469	1.11	cis-dimethyl morpholine	0-00-0	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N O	115	WILEY
25	24.592	1.91	Butane, 1,1'-[Methylenebis(Oxy)]Bis[3-Methyl-	22418-64-0	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	188	WILEY
26	27.89	1.34	1,6-Anhydro-Beta-D-Glucopyranose (Levogluconan)	498-07-7	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	162	WILEY
27	31.194	4.61	.beta.-D-Glucopyranose, 4-O-.beta.-D-galactopyranosyl-	5965-66-2	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>	342	WILEY
28	33.066	16.86	Mome Inositol	0-00-0	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	194	WILEY
29	34.766	1.02	(R)-2-tert-Butyl-N-((methylthio)methyl)-4-methylidene-5-oxazolidinone	86046-41-5	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N O <sub>2</sub> S	215	WILEY
30	40.999	1.28	Cyclohexanol, 4-(1-methylethyl)- (CAS) 4-Isopropylcyclohexanol	9.04.4621	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O	142	WILEY
31	10.061	3.35	Sclerosol	67-68-5	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O S	78	FFNSC 3
32	10.442	1.41	Norborneol <exo-2->	497-37-0	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> O	112	FFNSC 3
33	11.883	1.02	Acetate <2,4-dimethyl-, ethyl-, 1,3-dioxolane>	6290-17-1	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	188	FFNSC 3
34	16.509	1.56	Isobutyrate <hexyl->	7.07.2349	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	172	FFNSC 3
35	19.712	34.02	Hydroxy methyl furfural	67-47-0	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	126	FFNSC 3
36	20.05	1.3	Phenethyl acetate <2->	103-45-7	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	164	FFNSC 3
37	21.287	1.06	Malate <diethyl->	3.12.7554	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	190	FFNSC 3
38	22.469	1.11	Nonanoate <ethyl->	123-29-5	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	186	FFNSC 3
39	24.592	1.91	Decyl tiglate	84284-37-7	C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	240	FFNSC 3
40	27.89	1.34	n-Undecanoic acid	112-37-8	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	186	FFNSC 3
41	31.194	4.61	Dodecanoic acid	143-07-7	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	200	FFNSC 3
42	33.066	16.86	Nonanoic acid <4-methyl->	45019-28-1	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	172	FFNSC 3
43	34.766	1.02	Decanoic acid	334-48-5	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	172	FFNSC 3
44	40.999	1.28	Gossyplure	50933-33-0	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280	FFNSC 3

#### 4.5 *E. umbellata* Meyve Özütünün, Laurik Asit'in ve AgNP'lerin Hidroksil Radikali Tarafından Oluşturulan DNA Hasarına Karşı Koruyucu aktivitesi Üzerine Etkileri

Çalışmada, *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün, Laurik Asit'in ve *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütü ile sentezlenen AgNP'lerin -OH ile oluşturulan DNA hasarına karşı koruyucu etkisini araştırmak amacıyla pBR322 plazmid DNA'sı kullanılmıştır. Plazmid DNA'sında serbest radikalle oluşturulan kırıkların onarımı, farklı dozlardaki *E. umbellata* özütünün, Laurik Asit'in ve AgNP'lerin koruyucu aktivitesi agaroz jel elektroforezi yöntemiyle araştırılmıştır.

Şekil 4.17'de hidroksil radikalinin neden olduğu pBR322 plazmid DNA hasarı üzerinde *E. umbellata*, AgNP ve Laurik Asit örneklerinin DNA koruyucu aktivitesini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüleri sunulmuştur.

Şekil 4.17 incelendiğinde *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün 5mg/ml konsantrasyonu ile Laurik Asit'in tüm konsantrasyonlarının (1, 0.8, 0.6, 0.4mM/ml). -OH ile oluşturulan DNA hasarına karşı koruyucu etkilerinin varlığı tespit edilmiştir. *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün diğer konsantrasyonları (40, 20, 10, 2.5, 1.25 ve 0.625mg/ml) ile *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin tüm konsantrasyonlarının (20, 10, 5, 1, 0.5mM/ml) DNA hasarına karşı koruyucu etkilerinin bulunmadığı tespit edilmiştir.



**Şekil 4.17** Hidroksil radikalinin neden olduğu pBR322 plazmid DNA hasarı üzerinde *E. umbellata*, AgNP ve Laurik Asit örneklerinin DNA koruyucu aktivitesini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüleri

A-

1: DNA

2: DNA+Na<sub>2</sub>EDTA+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

3: DNA+Na<sub>2</sub>EDTA+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+Trolox

4-10: Trolox yerine *E. umbellata* özütünün farklı konsantrasyonları (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0,625 mg/ml).

B-

1: DNA

2: DNA+Na<sub>2</sub>EDTA+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

3: DNA+Na<sub>2</sub>EDTA+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+Trolox

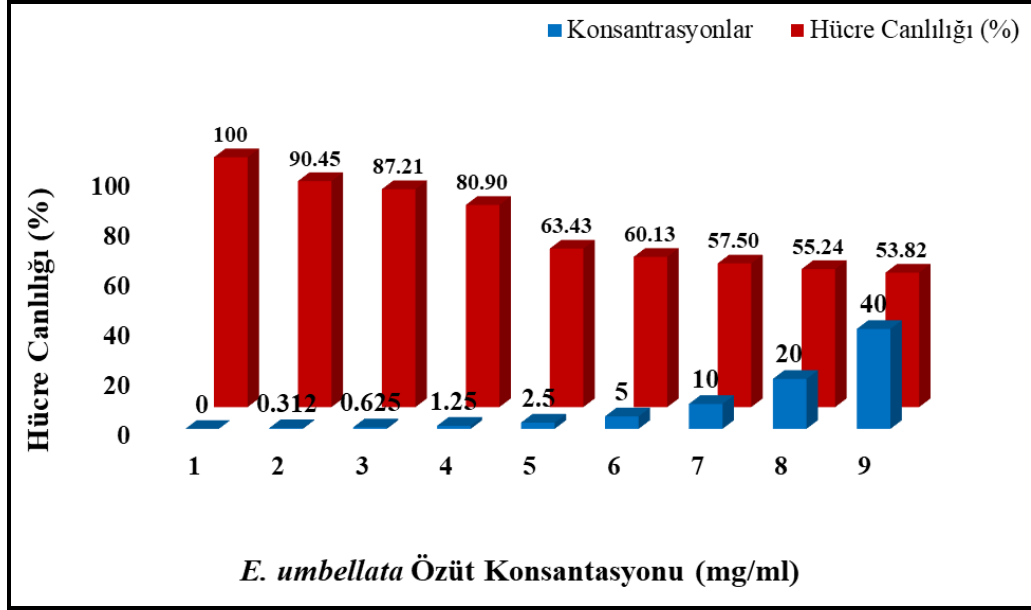
4-8: Trolox yerine, farklı AgNO<sub>3</sub> konsantrasyonları (20, 10, 5, 1, 0.5 mM)

9-12: Trolox yerine, farklı Laurik Asit konsantrasyonları (1, 0.8, 0.6, 0.4 mM).

#### **4.6 *E. umbellata*'nın Etanolik Meyve Özütünün HeLa Hücrelerinde Doza Bağlı Sitotoksik Aktivitesi**

Yapılan çalışmada *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün farklı konsantrasyonlarda (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312mg/ml) memeli hücreleri üzerine sitotoksik etkisi, HeLa hücre hattı kullanılarak MTT testi ile değerlendirilmiştir. HeLa hücreleri farklı konsantrasyonda hazırlanan *E. umbellata* özütüyle 72 saat inkübe edilmiştir.

Şekil 4.18 incelendiğinde, *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün hücre canlılığı üzerinde doza bağlı azalma gözlenmiştir. Ancak 72 saat sonra 40mg/ml'de dahi hücrelerin yarıdan fazlası (%53.82) için sitotoksik olmadığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla IC<sub>50</sub> değerinin ancak 40mg/ml'den daha yüksek dozlarda bulunabileceği düşünülmektedir.

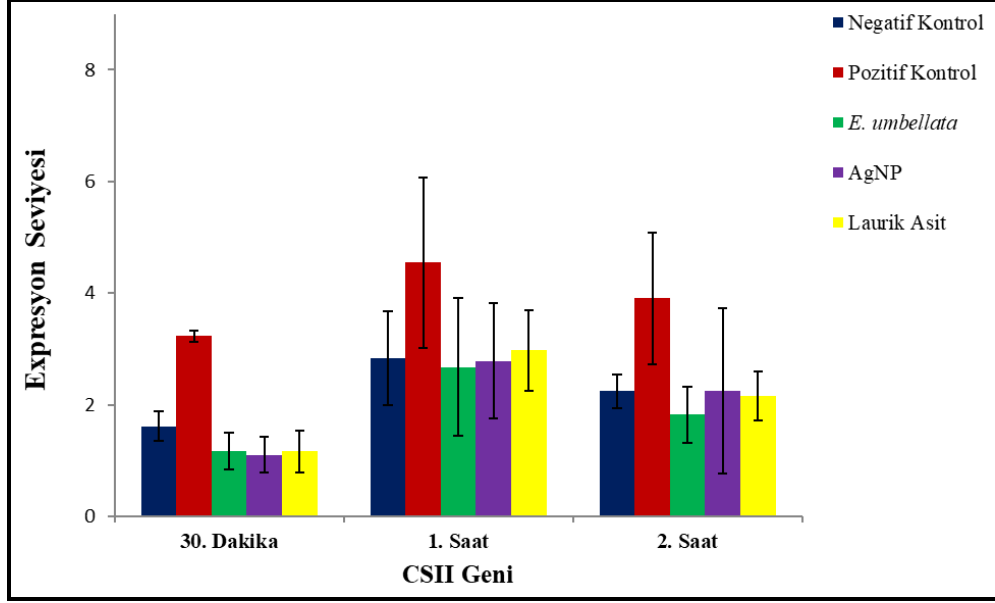


Şekil 4.18 Farklı konsantrasyonlardaki *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün 72. saatte HeLa hücreleri üzerindeki sitotoksikite grafiği

#### 4.7 *E. umbellata*'nın Etanolik Meyve Özütünün, *E. umbellata* Meyve Özütüyle Sentezlenen AgNP'lerin ve *E. umbellata* Özütünün Kimyasal Bir Bileşiği Olan Laurik Asit'in *A. castellanii* Trofozoitlerinin Stres Altında Antioksidan Enzimlerinden (CAT ve SOD) Sorumlu Genler ile Pseudokistleşme (CSII) ve Asıl Kistleşme (CSP21) Süreçlerinden Sorumlu Genlerin İfadesi Üzerine Etkileri

##### 4.7.1 *E. umbellata*'nın Etanolik Meyve Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in *A. castellanii* Trofozoitlerindeki Pseudokistleşmeden (CSII) Sorumlu Genin İfadesi Üzerine Etkileri

Metanol ile strese maruz bırakılan *A. castellanii* trofozoitlerinin *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütü, AgNP'ler ve Laurik Asit ile muamele edilmesi sonucunda psödokistleşmeden sorumlu gen olan ve stres durumunda ilk 2 saat içerisinde ifade edilen CSII geninin ifade analizi Şekil 4.19'da sunulmuştur.



**Şekil 4.19** Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ifadesi üzerinde inhibitör etkisini gösteren grafik

Şekil 4.19 incelendiğinde; metanol ile strese maruz bırakılmayan kontrol (K) ve metanolla strese maruz bırakılan pozitif kontrol (PK) ile *E. umbellata* özütü (EU), AgNP (AgNP's) ve Laurik Asit (LA) karşılaştırıldığında; 30. Dakikada; AgNP's, CSII geninin ifadesi üzerinde EU ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. Aynı sürede LA ve EU aynı oranlarda inhibitör etki göstermiştir. 1. saatte ise; EU, CSII geninin ifadesi üzerinde AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Aynı sürede AgNP's de LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. 2. saatte ise; EU CSII geninin ifadesi üzerinde, AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki gösterirken, aynı sürede LA ise AgNP's e oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir.

Farklı grupların *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi (Mean±SD) Çizelge 4.21'de sunulmuştur.

**Çizelge 4.21** Farklı grupların *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

Gruplar	Mean±SD
Kontrol	2.23±0.70 <sup>a</sup>
Pozitif Kontrol	3.89±1.12 <sup>b</sup>
<i>E. umbellata</i>	1.88±0.94 <sup>c</sup>
AgNP	2.04±1.18 <sup>d</sup>
Laurik Asit	2.09±0.90 <sup>e</sup>
p	<0.01

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi (Mean±SD) Çizelge 4.22’de sunulmuştur.

**Çizelge 4.22** Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

Süre (Saat)	Mean±SD
0.5	1.65±0.87 <sup>a</sup>
1	3.16±1.18 <sup>b</sup>
2	2.47±1.07 <sup>c</sup>
p	<0.01

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.21 ve 4.22 incelendiğinde *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde istatistiksel olarak farklı grupların farklı sürelerde inhibitör etkisinin ( $p<0.01$ ) anlamlı olduğu bulunmuştur. En fazla inhibitör etkiyi gruplar içinde,  $1.88\pm 0.94$  ile *E. umbellata* özütü gösterirken en fazla inhibisyon 30. dakikada  $1.65\pm 0.87$  olarak ölçülmüştür.

Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi Çizelge 4.23’te sunulmuştur.



**Çizelge 4.23** Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

Süre (Saat)	Gruplar	Mean±SD
0.5	Kontrol	1.61±0.26 <sup>c</sup>
	Pozitif Kontrol	3.22±0.09 <sup>abc</sup>
	<i>E. umbellata</i>	1.16±0.32 <sup>c</sup>
	AgNP	1.10±0.31 <sup>c</sup>
	Laurik Asit	1.16±0.37 <sup>c</sup>
1	Kontrol	2.83±0.84 <sup>abc</sup>
	Pozitif Kontrol	4.54±1.53 <sup>a</sup>
	<i>E. umbellata</i>	2.67±1.23 <sup>abc</sup>
	AgNP	2.78±1.03 <sup>abc</sup>
	Laurik Asit	2.97±0.71 <sup>abc</sup>
2	Kontrol	2.24±0.30 <sup>bc</sup>
	Pozitif Kontrol	3.90±1.17 <sup>ab</sup>
	<i>E. umbellata</i>	1.82±0.49 <sup>bc</sup>
	AgNP	2.24±1.48 <sup>bc</sup>
	Laurik Asit	2.15±0.42 <sup>bc</sup>
p	<0.01	

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.23 incelendiğinde; farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde etkisinin tüm süreler ve gruplar arasında istatistiksel olarak farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir, ( $p<0.01$ ).

*A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde farklı grupların ve farklı sürelerin inhibitör etkisinin özet tablo olarak gösterimi Çizelge 4.24'te sunulmuştur.

**Çizelge 4.24** Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

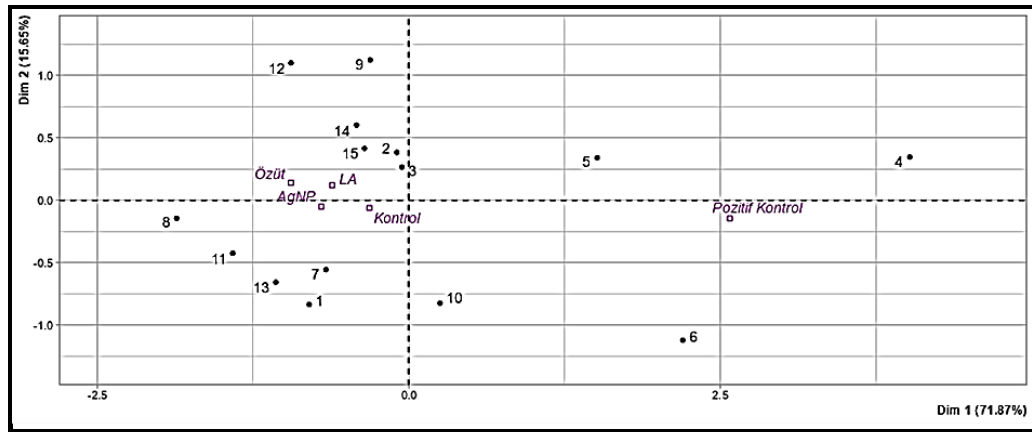
Gruplar/Süre	0.5.Saat	1.Saat	2.Saat	Σ
Kontrol	1.61±0.26 <sup>c</sup>	2.83±0.84 <sup>abc</sup>	2.24±0.30 <sup>bc</sup>	2.23±0.70 <sup>a</sup>
Pozitif Kontrol	3.22±0.09 <sup>abc</sup>	4.54±1.53 <sup>a</sup>	3.90±1.17 <sup>ab</sup>	3.89±1.12 <sup>b</sup>
<i>E. umbellata</i>	1.16±0.32 <sup>c</sup>	2.67±1.23 <sup>abc</sup>	1.82±0.49 <sup>bc</sup>	1.88±0.94 <sup>c</sup>
AgNP	1.10±0.31 <sup>c</sup>	2.78±1.03 <sup>abc</sup>	2.24±1.48 <sup>bc</sup>	2.04±1.18 <sup>d</sup>
Laurik Asit	1.16±0.37 <sup>c</sup>	2.97±0.71 <sup>abc</sup>	2.15±0.42 <sup>bc</sup>	2.09±0.90 <sup>e</sup>
Σ	1.65±0.87 <sup>a</sup>	3.16±1.18 <sup>b</sup>	2.47±1.07 <sup>c</sup>	

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.24 incelendiğinde *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde istatistiksel olarak farklı grupların ve farklı sürelerin inhibitör etkisinin önemli olduğu ( $p<0.01$ ) belirlenmiştir. Metanol ile strese maruz bırakılmayan kontrol ve metanol ile strese maruz bırakılan pozitif kontrol ile *E. umbellata* özütü, AgNP ve Laurik Asit karşılaştırıldığında; gruplar ve süreler arasında anlamlı istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

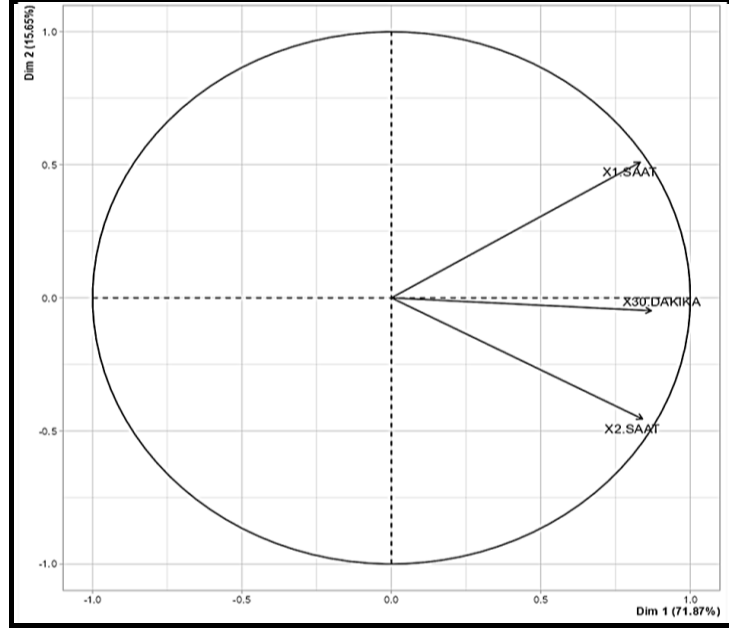
Tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde inhibisyon sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler PCA ile görselleştirilmiştir.

Şekil 4.20, farklı grupların farklı sürelerdeki değerlerinin PCA biplotunu göstermektedir. Hem birinci (F1, %71.87) hem de ikinci (F2, %15.65) temel bileşenler toplu olarak veri setindeki en büyük varyasyona (%87.52) katkıda bulunmuştur.



Şekil 4.20 Farklı grupların CSII gen ekspresyonunun PCA ile gösterimi

Şekil 4.20 incelendiğinde açıklama oranı (%87.52) olan eksenin sağ ve sol tarafını ayırdığımızda Kontrol, *E. umbellata* özütü, AgNP, Laurik Asit ile Pozitif kontrol arasında negatif korelasyon göstermektedir. Şekil 4.21’de CSII geninin ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi sunulmuştur.



**Şekil 4.21** CSII gen ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi

Şekil 4.21 incelendiğinde, tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde 1. saat dilimdeki değerler ile 2. saatteki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir, ( $p < 0.05$ ). 30. dakika ekspresyon verileri eksenin ortasında yer alıp, bu zamandan sonraki zaman periyodunda ekspresyonun arttığı gözlenmiştir. Bu bağlamda 30. dakika tüm gruplar için eşik değer kabul edilebilir. Çizelge 4.25’de grupların özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi verilmiştir.

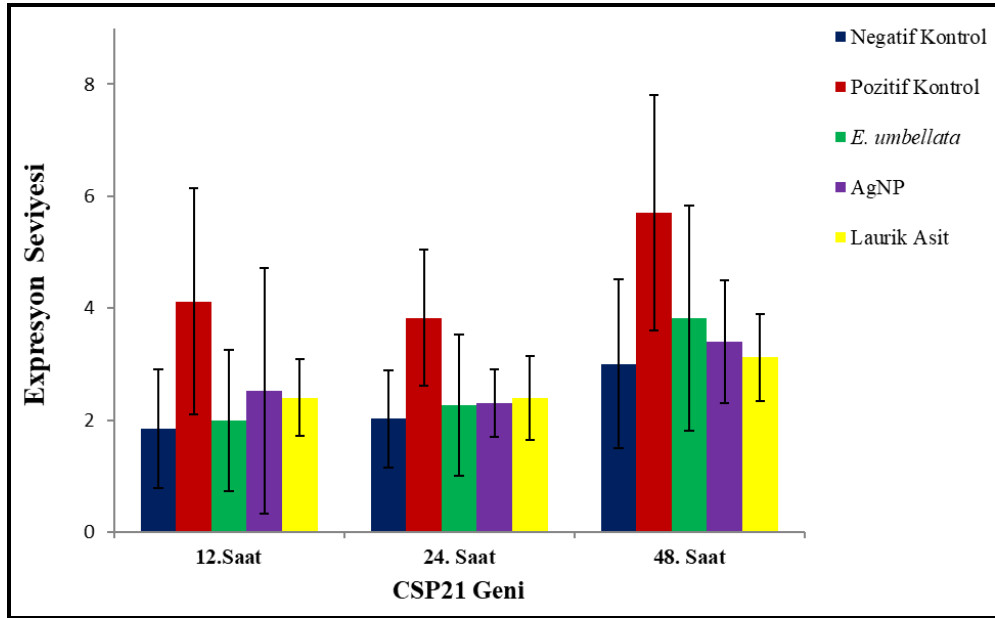
**Çizelge 4.25** Grupların özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi

	Özdeğer	Varyans Yüzdesi	Kümülatif %
Dim. 1	2.156	71.9	71.9
Dim. 2	0.470	15.7	87.5

Çizelge 4.25 incelendiğinde tüm eksenler varyansların %87.5’ini açıklamaktadır.

#### 4.7.2 *E. umbellata*'nın Etanolik Meyve Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in *A. castellanii* Trofozoitlerindeki Asıl Kistleşmeden (CSP21) Sorumlu Genin İfadesi Üzerine Etkileri

Metanol ile strese maruz bırakılan *A. castellanii* trofozoitlerinin *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütü (EU), AgNP'ler (AgNP's) ve Laurik Asit (LA) ile muamele edilmesi sonucunda asıl kistleşmeden sorumlu gen olan ve 12. saatten sonra eksprese edilmeye başlanan CSP21 geninin ifade analizi Şekil 4.22'de sunulmuştur. Şekil 4.22 incelendiğinde, gruplar metanol ile strese maruz bırakılmayan kontrol (K) ve metanol ile strese maruz bırakılan pozitif kontrol (PK) ile karşılaştırıldığında 12. saatte; EU, CSP21 geninin ifadesi üzerinde AgNP's ve LA'ya göre daha fazla inhibitör etki sergilemektedir. Aynı sürede, LA'da AgNP's e oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. 24. saatte EU, CSP21 geninin ifadesi üzerinde AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki gösterirken, AgNP's ise LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. 48. saatte ise; LA, CSP21 geninin ifadesi üzerinde EU ve AgNP's e oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Aynı saatte AgNP's, LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Şekil 4.22'de farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geni üzerinde inhibisyon grafiği sunulmuştur.



Şekil 4.22 Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geni üzerinde inhibisyon grafiği

Farklı grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi (Mean±SD) Çizelge 4.26’da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.26** Farklı grupların *A. castellanii* trofozoitlerinin asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

Gruplar	Mean±SD
Kontrol	2.29±1.15 <sup>a</sup>
Pozitif Kontrol	4.54±2.07 <sup>b</sup>
<i>E. umbellata</i>	2.69±1.94 <sup>c</sup>
AgNP	2.73±1.44 <sup>d</sup>
Laurik Asit	2.64±0.73 <sup>e</sup>
p	<0.01

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.27’de grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi sunulmuştur.

**Çizelge 4.27** Grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

Süre (Saat)	Mean±SD
12	2.57±1.65 <sup>a</sup>
24	2.56±1.05 <sup>b</sup>
48	3.80±1.99 <sup>c</sup>
p	<0.01

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Farklı grupların (Çizelge 4.26) farklı sürelerde (Çizelge 4.27) *A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi (Mean±SD) gösterilmiştir. Çizelge 4.26 ve 4.27 incelendiğinde *A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde istatistiksel olarak farklı grupların farklı sürelerde inhibitör etkisinin anlamlı olduğu bulunmuştur, ( $p<0.01$ ). Gruplar içinde en fazla inhibitör etkiyi 2.64±0.73 ile Laurik Asit gösterirken en fazla inhibisyon 24. saatte 2.56±1.05 olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.28’de farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi sunulmuştur (Mean±SD).

**Çizelge 4.28** Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

Süre (Saat)	Gruplar	Mean±SD
12	Kontrol	1.84±1.05
	Pozitif Kontrol	4.11±2.32
	<i>E. umbellata</i>	1.99±1.25
	AgNP	2.51±2.39
	Laurik Asit	2.40±0.69
24	Kontrol	2.02±0.87
	Pozitif Kontrol	3.82±1.21
	<i>E. umbellata</i>	2.27±1.25
	AgNP	2.30±0.60
	Laurik Asit	2.39±0.75
48	Kontrol	3.00±1.50
	Pozitif Kontrol	5.70±2.69
	<i>E. umbellata</i>	3.81±3.01
	AgNP	3.39±1.09
	Laurik Asit	3.12±0.78
p	<0.01	

Çizelge 4.28 incelendiğinde; *A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde tüm süreler ve gruplar arasında etkisinin istatistiksel olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir, (p<0.01).

*A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde farklı grupların ve farklı sürelerin inhibitör etkisi özet tablo olarak gösterimi Çizelge 4.29’da sunulmuştur.

**Çizelge 4.29** Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinin asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

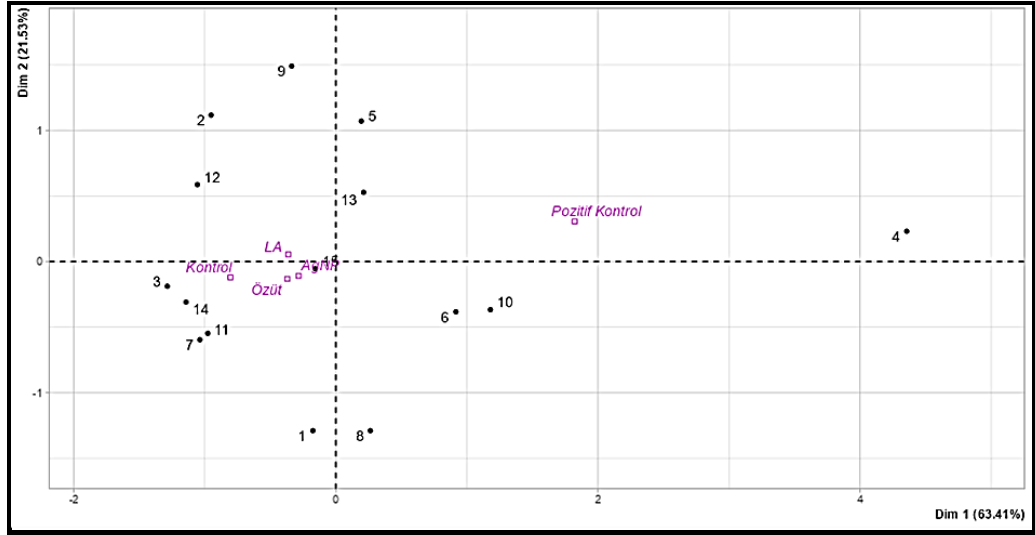
Gruplar/Süre	12.Saat	24.Saat	48.Saat	Σ
Kontrol	1.84±1.05	2.02±0.87	3.00±1.50	2.29±1.15 <sup>a</sup>
Pozitif Kontrol	4.11±2.32	3.82±1.21	5.70±2.69	4.54±2.07 <sup>b</sup>
<i>E. umbellata</i>	1.99±1.25	2.27±1.25	3.81±3.01	2.69±1.94 <sup>c</sup>
AgNP	2.51±2.39	2.30±0.60	3.39±1.09	2.73±1.44 <sup>d</sup>
Laurik Asit	2.40±0.69	2.39±0.75	3.12±0.78	2.64±0.73 <sup>c</sup>
Σ	2.57±1.65 <sup>a</sup>	2.56±1.05 <sup>b</sup>	3.80±1.99 <sup>c</sup>	

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.29 incelendiğinde *A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde istatistiksel olarak farklı grupların ve farklı sürelerin inhibitör etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir, ( $p<0.01$ ). Metanol ile strese maruz bırakılmayan kontrol ve metanol ile strese maruz bırakılan pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında; gruplar ve süreler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinin asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibisyon sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile görselleştirilmiştir.

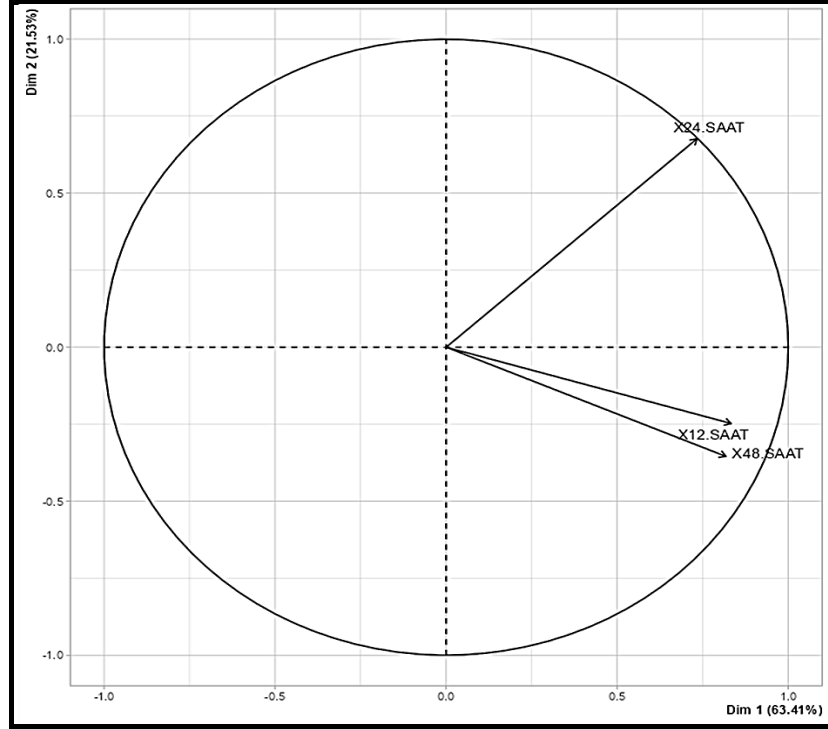
Şekil 4.23 farklı grupların farklı sürelerdeki değerlerinin PCA biplotunu göstermektedir. Hem birinci (F1, %63.41) hem de ikinci (F2, %21.53) temel bileşenler toplu olarak veri setindeki en büyük varyasyona (%84.94) katkıda bulunmuştur.



**Şekil 4.23** Farklı grupların CSP21 gen ekspresyonunun PCA ile gösterimi

Şekil 4.23 incelendiğinde açıklama oranı (%84.94) olan eksenin sağ ve sol tarafını ayırdığımızda Kontrol, *E. umbellata* özütü, AgNP, Laurik Asit ile Pozitif kontrol arasında negatif korelasyon göstermektedir.

Şekil 4.24’de CSP21 ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi sunulmuştur.



Şekil 4.24 CSP21 gen ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi

Şekil 4.24 incelendiğinde tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde 24 saatlik dilimdeki değerler, 12. ve 48. saatteki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir, ( $p < 0.05$ ). Grupların özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi Çizelge 4.30’da verilmiştir.

Çizelge 4.30 CSP21’in özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi

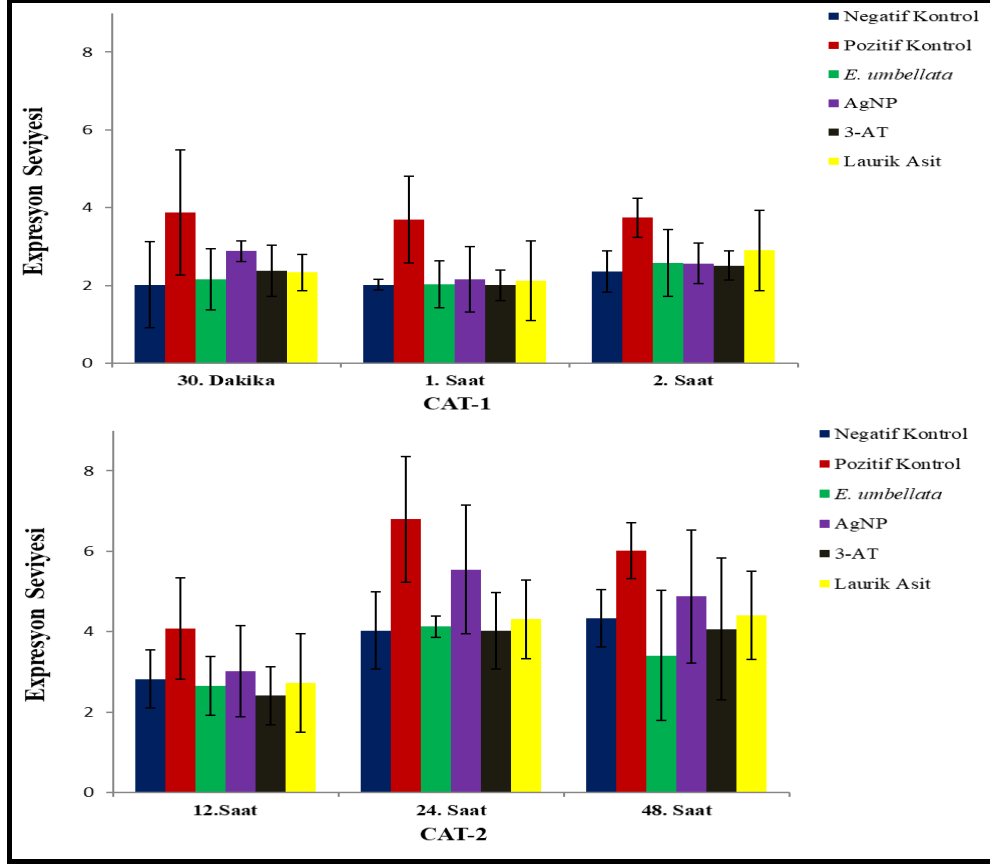
	Özdeğer	Varyans Yüzdesi	Kümülatif %
Dim. 1	1.902	63.4	63.4
Dim. 2	0.646	21.5	84.9

Çizelge 4.30 incelendiğinde tüm eksenler varyansların %84.9’unu açıklamaktadır.



#### 4.7.3 *E. umbellata*'nın Meyve Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in *A. castellanii* Trofozoitlerindeki CAT Geninin İfadesi Üzerine Etkileri

Şekil 4.25 farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan etkiden sorumlu CAT geni üzerinde inhibisyon grafiği



Şekil 4.25 Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan etkiden sorumlu CAT geni üzerinde inhibisyon grafiği

Şekil 4.25 incelendiğinde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu enzimi olan CAT geni metanol ile strese maruz bırakılmayan kontrol (K), metanol ile strese maruz bırakılan pozitif kontrol (PK) ile CAT'ın spesifik inhibitörü olan 3-AT ve diğer gruplar karşılaştırıldığında 30. dakikada; EU, CAT geni üzerinde AgNP's, 3-AT ve LA'ya göre daha fazla inhibitör etki sergilemektedir. Aynı sürede LA ve 3-AT, AgNP's e oranla daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. 1. saatte ise; EU ve 3-AT, CAT geni üzerinde aynı oranda inhibitör etki sergilemektedir. Aynı sürede, AgNP's de LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. 2. saatte ise; 3-AT, CAT geni üzerinde LA, AgNP's ve EU'ya göre daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Aynı sürede AgNP's, CAT geni üzerinde EU ve LA'ya oranla daha fazla

inhibitör etki göstermiştir. 12. saatte; 3-AT, CAT geni üzerinde EU, AgNP's ve LA'ya göre daha fazla inhibitör etki sergilemektedir. Aynı sürede LA, CAT geni üzerinde AgNP's ve EU'ya oranla daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. 24. saatte ise; 3-AT, CAT geni üzerinde EU, AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. Aynı sürede EU, CAT geni üzerinde AgNP's ve LA'ya göre daha çok inhibitör etki göstermiştir. 48. saatte EU, CAT geni üzerinde 3-AT, AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Aynı sürede 3-AT, CAT geni üzerinde AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Yine aynı sürede LA da AgNP's e oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir.

Farklı grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi (Mean±SD) Çizelge 4.31'de verilmiştir.

**Çizelge 4.31** Farklı grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

Gruplar	Mean±SD
Kontrol	2.92±1.14 <sup>a</sup>
Pozitif Kontrol	4.69±1.89 <sup>b</sup>
<i>E. umbellata</i>	2.82±1.07 <sup>c</sup>
AgNP	3.50±1.59 <sup>d</sup>
3-AT	2.89±1.15 <sup>e</sup>
Laurik Asit	3.13±1.59 <sup>f</sup>
p	<0.01

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Farklı grupların (Çizelge 4.31) farklı sürelerde (Çizelge 4.32) *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi (Mean±SD) gösterilmiştir. Çizelge 4.31 ve 4.32 incelendiğinde, *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde farklı grupların farklı sürelerde istatistiksel olarak inhibitör etkisinin anlamlı olduğu belirlenmiştir, (p<0.01). Gruplar içinde en fazla inhibitör etkiyi 2.82±1.07 ile *E. umbellata* özütü gösterirken en fazla inhibisyon 1. saatte 2.33±0.90 olarak ölçülmüştür. Çizelge 4.32'de grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi sunulmuştur.

**Çizelge 4.32** Grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

Süre (Saat)	Mean±SD
0.5	2.60±1.01 <sup>a</sup>
1	2.33±0.90 <sup>b</sup>
2	2.77±0.74 <sup>c</sup>
12	2.94±1.00 <sup>d</sup>
24	4.80±1.73 <sup>e</sup>
48	4.51±1.70 <sup>f</sup>
p	<0.01

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

*A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde farklı grupların ve farklı sürelerin inhibitör etkisi Çizelge 4.33'te verilmiştir.

**Çizelge 4.33** Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

Süre (Saat)	Gruplar	Mean±SD
0.5	Kontrol	2.02±1.10 <sup>d</sup>
	Pozitif Kontrol	3.87±1.60 <sup>abcd</sup>
	<i>E. umbellata</i>	2.15±0.79 <sup>d</sup>
	AgNP	2.88±0.26 <sup>bcd</sup>
	3-AT	2.38±0.65 <sup>cd</sup>
	Laurik Asit	2.33±0.46 <sup>d</sup>
1	Kontrol	2.01±0.14 <sup>d</sup>
	Pozitif Kontrol	3.69±1.11 <sup>bcd</sup>
	<i>E. umbellata</i>	2.02±0.61 <sup>d</sup>
	AgNP	2.15±0.84 <sup>d</sup>
	3-AT	2.00±0.39 <sup>d</sup>
	Laurik Asit	2.12±1.01 <sup>d</sup>
2	Kontrol	2.35±0.52 <sup>d</sup>
	Pozitif Kontrol	3.74±0.50 <sup>abcd</sup>
	<i>E. umbellata</i>	2.57±0.86 <sup>cd</sup>
	AgNP	2.56±0.52 <sup>cd</sup>
	3-AT	2.51±0.37 <sup>cd</sup>
	Laurik Asit	2.90±1.03 <sup>bcd</sup>
12	Kontrol	2.81±0.72 <sup>bcd</sup>
	Pozitif Kontrol	4.08±1.26 <sup>abcd</sup>
	<i>E. umbellata</i>	2.65±0.73 <sup>bcd</sup>
	AgNP	3.01±1.13 <sup>abcd</sup>
	3-AT	2.41±0.72 <sup>bcd</sup>
	Laurik Asit	2.72±1.21 <sup>bcd</sup>

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

**Çizelge 4.33** Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi (**devamı**)

Süre (Saat)	Gruplar	Mean±SD
24	Kontrol	4.02±0.96 <sup>abcd</sup>
	Pozitif Kontrol	6.79±3.26 <sup>a</sup>
	<i>E. umbellata</i>	4.12±0.26 <sup>abcd</sup>
	AgNP	5.54±1.59 <sup>abc</sup>
	3-AT	4.02±0.94 <sup>abcd</sup>
	Laurik Asit	4.30±0.98 <sup>abcd</sup>
48	Kontrol	4.32±0.71 <sup>abcd</sup>
	Pozitif Kontrol	6.00±0.69 <sup>ab</sup>
	<i>E. umbellata</i>	3.40±1.61 <sup>abcd</sup>
	AgNP	4.87±1.65 <sup>abcd</sup>
	3-AT	4.06±1.75 <sup>abcd</sup>
	Laurik Asit	4.40±3.09 <sup>abcd</sup>
p	<0.01	

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.33 incelendiğinde; *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisinin istatistiksel olarak farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Tüm süreler ve gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur, ( $p<0.01$ ).

*A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde farklı grupların ve farklı sürelerin inhibitör etkisinin özet tablo olarak gösterimi Çizelge 4.34’te sunulmuştur.

**Çizelge 4.34** Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

Gruplar/Süre	0.5.Saat	1.Saat	2.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat	Σ
Kontrol	2.02±1.10 <sup>d</sup>	2.01±0.14 <sup>d</sup>	2.35±0.52 <sup>d</sup>	2.81±0.72 <sup>bcd</sup>	4.02±0.96 <sup>abcd</sup>	4.32±0.71 <sup>abcd</sup>	2.92±1.14 <sup>a</sup>
Pozitif Kontrol	3.87±1.60 <sup>abcd</sup>	3.69±1.11 <sup>b</sup>	3.74±0.50 <sup>abcd</sup>	4.08±1.26 <sup>abcd</sup>	6.79±3.26 <sup>a</sup>	6.00±0.69 <sup>ab</sup>	4.69±1.89 <sup>b</sup>
<i>E. umbellata</i>	2.15±0.79 <sup>d</sup>	2.02±0.61 <sup>d</sup>	2.57±0.86 <sup>cd</sup>	2.65±0.73 <sup>bcd</sup>	4.12±0.26 <sup>abcd</sup>	3.40±1.61 <sup>abcd</sup>	2.82±1.07 <sup>c</sup>
AgNP	2.88±0.26 <sup>bcd</sup>	2.15±0.84 <sup>d</sup>	2.56±0.52 <sup>cd</sup>	3.01±1.13 <sup>abcd</sup>	5.54±1.59 <sup>abc</sup>	4.87±1.65 <sup>abcd</sup>	3.50±1.59 <sup>d</sup>
3-AT	2.38±0.65 <sup>cd</sup>	2.00±0.39 <sup>d</sup>	2.51±0.37 <sup>cd</sup>	2.41±0.72 <sup>bcd</sup>	4.02±0.94 <sup>abcd</sup>	4.06±1.75 <sup>abcd</sup>	2.89±1.15 <sup>c</sup>
Laurik Asit	2.33±0.46 <sup>d</sup>	2.12±1.01 <sup>d</sup>	2.90±1.03 <sup>bcd</sup>	2.72±1.21 <sup>bcd</sup>	4.30±0.98 <sup>abcd</sup>	4.40±3.09 <sup>abcd</sup>	3.13±1.59 <sup>f</sup>
Σ	2.60±1.01 <sup>a</sup>	2.33±0.90 <sup>b</sup>	2.77±0.74 <sup>c</sup>	2.94±1.00 <sup>d</sup>	4.80±1.73 <sup>e</sup>	4.51±1.70 <sup>f</sup>	

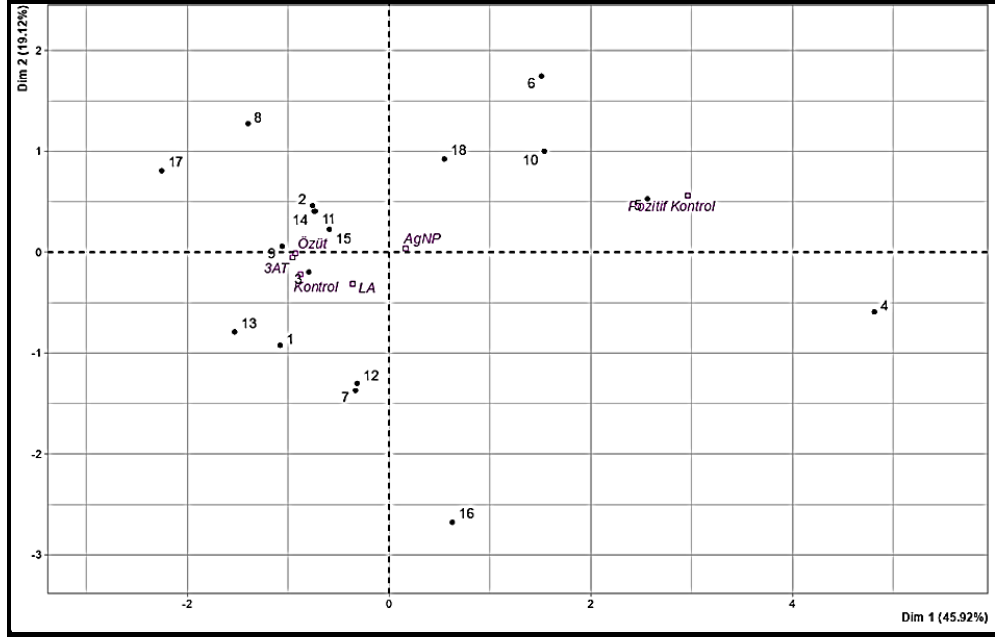
Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.34 incelendiğinde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde farklı grupların ve farklı

sürelerin istatistiksel olarak inhibitör etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir, ( $p < 0.01$ ). Metanol ile strese maruz bırakılmayan kontrol ve metanolla strese maruz bırakılan pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, diğer gruplar ve süreler arasında anlamlı istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibisyon sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile görselleştirilmiştir.

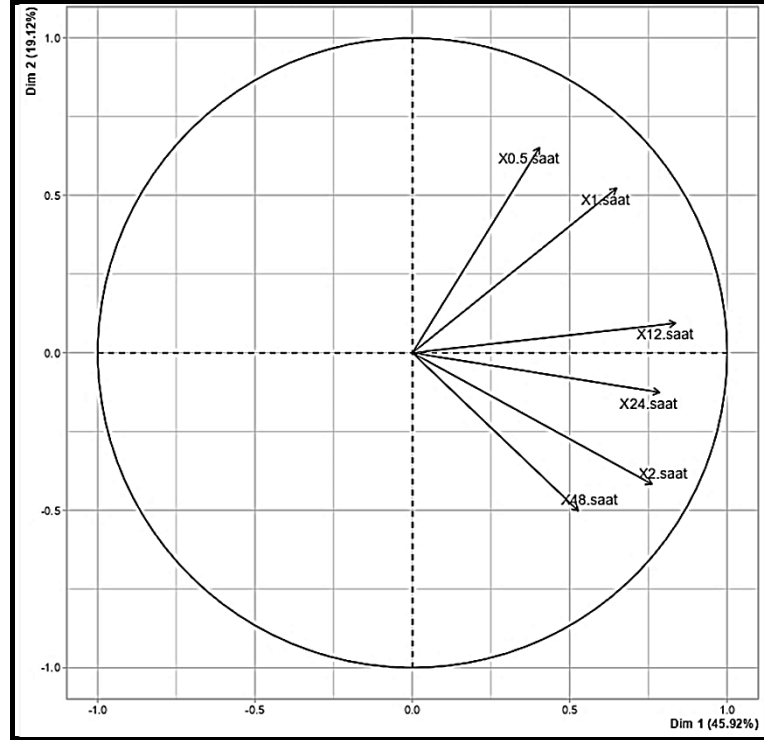
Şekil 4.26'da farklı grupların farklı sürelerdeki değerlerinin PCA biplotunu göstermektedir. CAT için hem birinci (F1, %45.92) hem de ikinci (F2, %19.12) temel bileşenler toplu olarak veri setindeki en büyük varyasyona (%65.04) katkıda bulunmuştur.



**Şekil 4.26** Farklı grupların CAT gen ekspresyonunun PCA ile gösterimi

Şekil 4.26 incelendiğinde açıklama oranı (%65.04) olan eksenin sağ ve sol tarafını ayırdığımızda Kontrol, *E. umbellata* özütü, Laurik Asit, 3-AT ile Pozitif kontrol, AgNP arasında negatif korelasyon göstermektedir.

Şekil 4.27’de CAT gen ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi sunulmuştur.



Şekil 4.27 CAT gen ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi

Şekil 4.27 incelendiğinde, tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde 30. Dakika, 1. ve 12. saat dilimindeki değerler ile 2., 24. ve 48.saatlerdeki değerler ile negatif korelasyon göstermektedir, ( $p < 0.05$ ). Grupların özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi Çizelge 4.35’te verilmiştir.

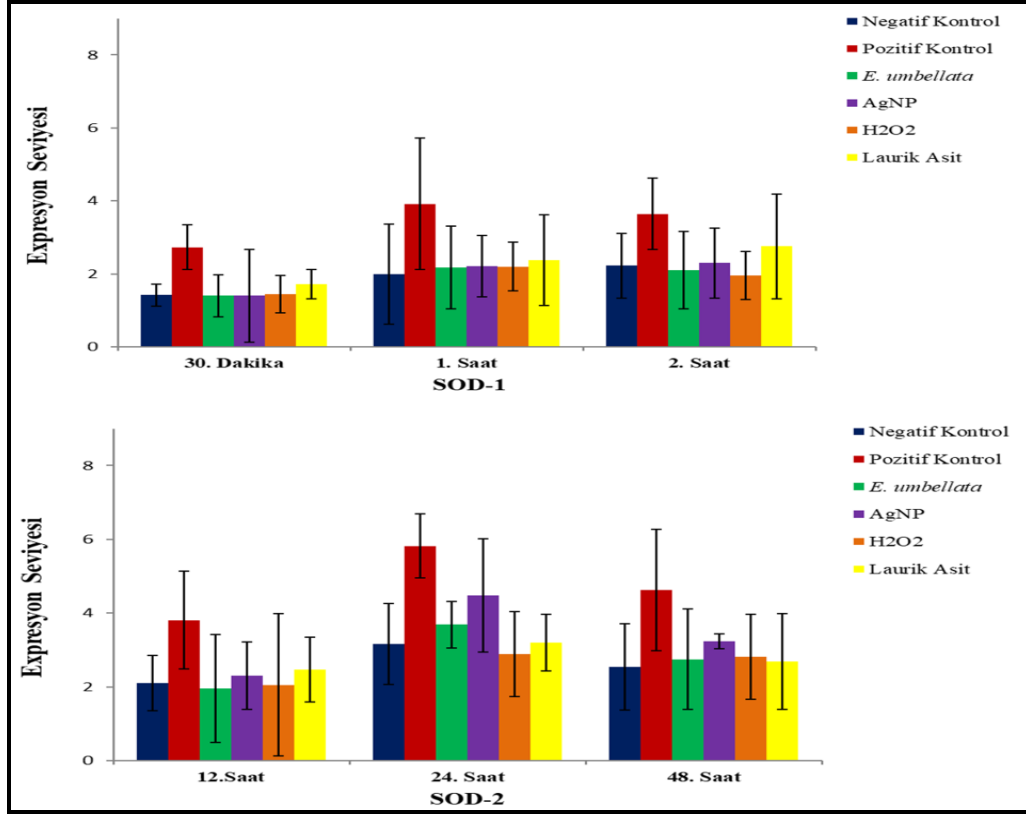
Çizelge 4.35 CAT’ın özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi

CAT	Özdeğer	Varyans Yüzdesi	Kümülatif %
Dim. 1	2.755	45.92	45.9
Dim. 2	1.147	19.12	65.0
Dim. 3	0.866	14.43	79.5

Çizelge 4.35 incelendiğinde, tüm eksenler varyansların %79.5’ini açıklamaktadır.

#### 4.7.4 *E. umbellata*'nın Meyve Özütünün, AgNP'lerin ve Laurik Asit'in *A. castellanii* Trofozoitlerindeki SOD Geninin İfadesi Üzerinde Etkileri

Şekil 4.28'de farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan etkiden sorumlu SOD geni üzerinde inhibisyon grafiği verilmiştir.



Şekil 4.28 Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan etkiden sorumlu SOD geni üzerinde inhibisyon grafiği

Metanol ile strese maruz bırakılan *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu enzimi olan SOD geni Şekil 4.28 incelendiğinde, metanol ile strese maruz bırakılmayan kontrol (K), metanol ile strese maruz bırakılan pozitif kontrol (PK) ve SOD'un spesifik inhibitörü olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile karşılaştırıldığında 30. dakikada; EU ve AgNP's, SOD geni üzerinde aynı inhibitör etkiye sahip olup, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve LA'ya göre daha fazla inhibitör etki sergilemektedir. Aynı sürede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, LA'ya göre daha fazla inhibitör etki sergilemektedir. 1. saatte ise; EU, SOD geni üzerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Aynı saatte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. 2. saatte ise; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SOD geni üzerinde LA, AgNP's ve EU'ya göre daha fazla inhibisyon göstermiştir. Aynı sürede EU, AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. 12.

saatte; EU, SOD geni üzerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AgNP's ve LA'ya göre daha fazla inhibitör etki sergilemektedir. Aynı sürede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. 24. saatte ise; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SOD geni üzerinde LA, AgNP's ve EU'ya göre daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. Aynı sürede LA, AgNP's ve EU'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. 48. saatte ise; LA, SOD geni üzerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AgNP's ve EU'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Aynı sürede EU, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve AgNP's e oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Farklı grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi (Mean±SD) Çizelge 4.36'da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.36** Farklı grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

Gruplar	Mean±SD
Kontrol	2.24±0.99 <sup>a</sup>
Pozitif Kontrol	4.09±1.51 <sup>b</sup>
<i>E. umbellata</i>	2.34±1.22 <sup>c</sup>
AgNP	2.65±1.32 <sup>d</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.22±1.07 <sup>e</sup>
Laurik Asit	2.53±1.00 <sup>f</sup>
p	<0.01

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Farklı grupların (Çizelge 4.36) farklı sürelerde (Çizelge 4.37) *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu enzim olan SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi (Mean±SD) sunulmuştur. Çizelge 4.36 ve 4.37 incelendiğinde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu enzim olan SOD geninin ekspresyonu üzerinde farklı grupların farklı sürelerde istatistiksel olarak inhibitör etkisinin anlamlı olduğu belirlenmiştir, (p<0.01). Gruplar içinde en fazla inhibitör etkiyi 2.22±1.07 ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gösterirken en fazla inhibisyon 30. dakikada 1.68±0.76 olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.37'de grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu enzim olan SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi sunulmuştur.



**Çizelge 4.37** Grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

Süre (Saat)	Mean±SD
0.5	1.68±0.76 <sup>a</sup>
1	2.47±1.28 <sup>b</sup>
2	2.49±1.03 <sup>c</sup>
12	2.44±1.25 <sup>d</sup>
24	3.87±1.36 <sup>e</sup>
48	3.10±1.32 <sup>f</sup>
p	<0.01

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu enzim olan SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisinin Çizelge 4.38’de sunulmuştur.

**Çizelge 4.38** Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

Süre (Saat)	Gruplar	Mean±SD
0.5	Kontrol	1.42±0.29 <sup>c</sup>
	Pozitif Kontrol	2.73±0.60 <sup>bc</sup>
	<i>E. umbellata</i>	1.40±0.57 <sup>c</sup>
	AgNP	1.40±1.27 <sup>c</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.44±0.51 <sup>c</sup>
	Laurik Asit	1.72±0.40 <sup>bc</sup>
1	Kontrol	1.99±1.36 <sup>bc</sup>
	Pozitif Kontrol	3.91±1.80 <sup>abc</sup>
	<i>E. umbellata</i>	2.17±1.53 <sup>bc</sup>
	AgNP	2.20±0.84 <sup>bc</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.19±0.67 <sup>bc</sup>
	Laurik Asit	2.37±1.24 <sup>bc</sup>
2	Kontrol	2.22±0.88 <sup>bc</sup>
	Pozitif Kontrol	3.64±0.97 <sup>abc</sup>
	<i>E. umbellata</i>	2.10±1.05 <sup>bc</sup>
	AgNP	2.29±0.95 <sup>bc</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.95±0.66 <sup>bc</sup>
	Laurik Asit	2.75±1.42 <sup>bc</sup>
12	Kontrol	2.10±0.74 <sup>bc</sup>
	Pozitif Kontrol	3.81±1.32 <sup>abc</sup>
	<i>E. umbellata</i>	1.95±1.46 <sup>bc</sup>
	AgNP	2.30±0.91 <sup>bc</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.05±1.92 <sup>c</sup>
	Laurik Asit	2.46±0.88 <sup>bc</sup>

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

**Çizelge 4.38** Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi (devamı)

24	Kontrol	3.17±1.09 <sup>abc</sup>
	Pozitif Kontrol	5.82±0.86 <sup>a</sup>
	<i>E. umbellata</i>	3.69±0.63 <sup>abc</sup>
	AgNP	4.48±1.53 <sup>ab</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.88±1.14 <sup>bc</sup>
	Laurik Asit	3.20±0.76 <sup>abc</sup>
48	Kontrol	2.53±1.17 <sup>bc</sup>
	Pozitif Kontrol	4.62±2.05 <sup>ab</sup>
	<i>E. umbellata</i>	2.74±1.35 <sup>bc</sup>
	AgNP	3.23±0.20 <sup>abc</sup>
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2.81±1.14 <sup>bc</sup>
	Laurik Asit	2.68±1.30 <sup>bc</sup>
p	<0.01	

Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.38 incelendiğinde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu enzim olan SOD geninin ekspresyonu üzerinde farklı grupların ve farklı sürelerin inhibitör etkisi istatistiksel olarak farklılık göstermektedir. Tüm süreler arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur, ( $p<0.01$ ).

*A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu enzim olan SOD geninin ekspresyonu üzerinde farklı grupların ve farklı sürelerin inhibitör etkisinin özet tablo olarak gösterimi Çizelge 4.39'da sunulmuştur.

**Çizelge 4.39** Farklı grupların farklı sürelerde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibitör etkisi

Gruplar/Süre	0.5.Saat	1.Saat	2.Saat	12.Saat	24.Saat	48.Saat	Σ
Kontrol	1.42±0.29 <sup>c</sup>	1.99±1.36 <sup>bc</sup>	2.22±0.88 <sup>bc</sup>	2.10±0.74 <sup>bc</sup>	3.17±1.09 <sup>abc</sup>	2.53±1.17 <sup>bc</sup>	2.24±0.99 <sup>a</sup>
Pozitif Kontrol	2.73±0.60 <sup>bc</sup>	3.91±1.80 <sup>abc</sup>	3.64±0.97 <sup>abc</sup>	3.81±1.32 <sup>abc</sup>	5.82±0.86 <sup>a</sup>	4.62±2.05 <sup>ab</sup>	4.09±1.51 <sup>b</sup>
<i>E. umbellata</i>	1.40±0.57 <sup>c</sup>	2.17±1.53 <sup>bc</sup>	2.10±1.05 <sup>bc</sup>	1.95±1.46 <sup>bc</sup>	3.69±0.63 <sup>abc</sup>	2.74±1.35 <sup>bc</sup>	2.34±1.22 <sup>c</sup>
AgNP	1.40±1.27 <sup>c</sup>	2.20±0.84 <sup>bc</sup>	2.29±0.95 <sup>bc</sup>	2.30±0.91 <sup>bc</sup>	4.48±1.53 <sup>ab</sup>	3.23±0.20 <sup>abc</sup>	2.65±1.32 <sup>d</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1.44±0.51 <sup>c</sup>	2.19±0.67 <sup>bc</sup>	1.95±0.66 <sup>bc</sup>	2.05±1.92 <sup>c</sup>	2.88±1.14 <sup>bc</sup>	2.81±1.14 <sup>bc</sup>	2.22±1.07 <sup>c</sup>
Laurik Asit	1.72±0.40 <sup>bc</sup>	2.37±1.24 <sup>bc</sup>	2.75±1.42 <sup>bc</sup>	2.46±0.88 <sup>bc</sup>	3.20±0.76 <sup>abc</sup>	2.68±1.30 <sup>bc</sup>	2.53±1.00 <sup>f</sup>
Σ	1.68±0.76 <sup>a</sup>	2.47±1.28 <sup>b</sup>	2.49±1.03 <sup>c</sup>	2.44±1.25 <sup>d</sup>	3.87±1.36 <sup>e</sup>	3.10±1.32 <sup>f</sup>	

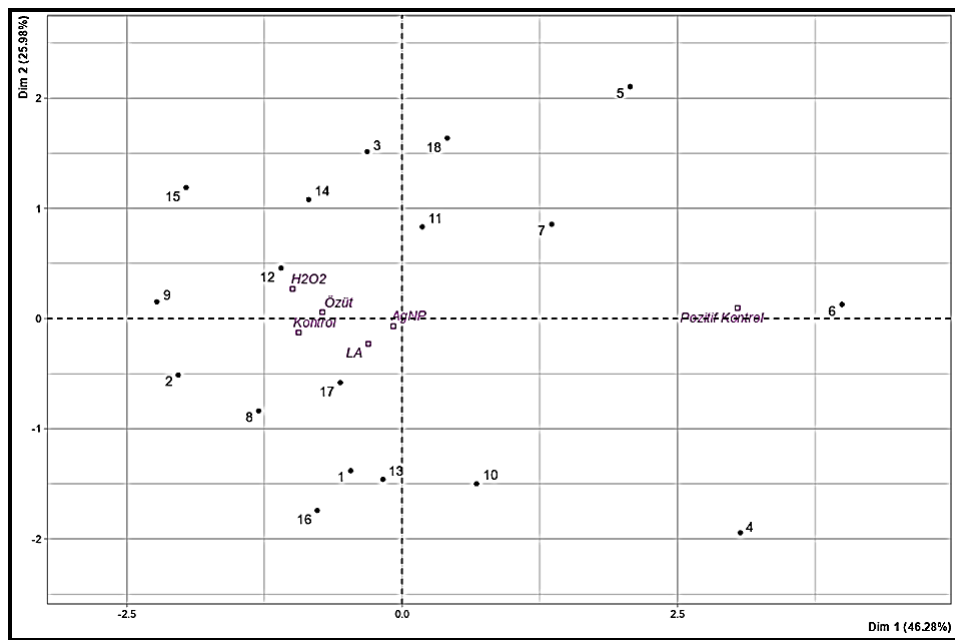
Üst simge olarak verilen ve farklı harfle gösterilen değerler arasında istatistiksel farklılıklar bulunmaktadır.

Çizelge 4.39 incelendiğinde *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu enzim olan SOD geninin ekspresyonu üzerinde istatistiksel olarak farklı grupların ve farklı sürelerin inhibitör etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir, ( $p<0.01$ ). Metanolle strese maruz bırakılmayan kontrol, metanolle strese maruz bırakılan pozitif kontrol ve SOD'un spesifik inhibitörü olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile

karşılaştırıldığında gruplar ve süreler arasında anlamlı istatistiksel farklılık bulunmaktadır.

Tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibisyon sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile görselleştirilmiştir.

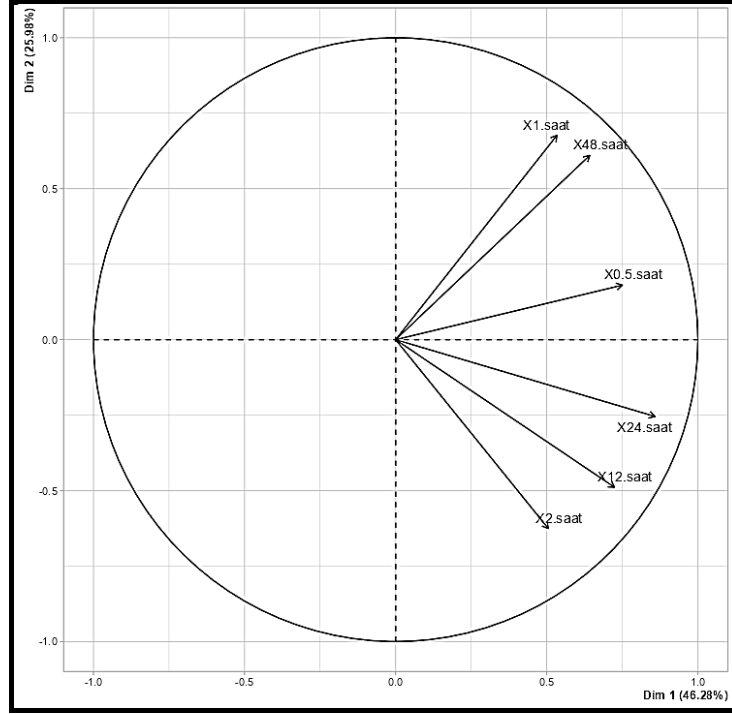
Şekil 4.29 farklı grupların farklı sürelerdeki değerlerinin PCA biplotunu göstermektedir. Hem birinci (F1, %46.28) hem de ikinci (F2, %25.98) temel bileşenler toplu olarak veri setindeki en büyük varyasyona (%72.26) katkıda bulunmuştur.



Şekil 4.29 Farklı grupların SOD gen ekspresyonunun PCA ile gösterimi

Şekil 4.29 incelendiğinde açıklama oranı (%72.26) olan eksenin sağ ve sol tarafını ayırdığımızda Kontrol, *E. umbellata* özütü, AgNP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Laurik Asit ile Pozitif kontrol arasında negatif korelasyon göstermektedir.

Şekil 4.30'da SOD ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi sunulmuştur.



Şekil 4.30 SOD gen ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi

Şekil 4.30 incelendiğinde tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu enzim olan SOD geninin ekspresyonu üzerinde 30. Dakika, 1. ve 48. saat ile 2., 12. ve 24. saat dilimindeki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir, ( $p < 0.05$ ). Çizelge 4.40'da grupların özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi verilmiştir.

Çizelge 4.40 SOD'un özdeğer ve kümülatif varyans yüzdesi

SOD1	Özdeğer	Varyans Yüzdesi	Kümülatif %
Dim. 1	2.777	46.28	46.3
Dim. 2	1.559	59.98	72.3
Dim. 3	0.565	9.41	81.7

Çizelge 4.40 incelendiğinde tüm eksenler varyansların %81.7'sini açıklamaktadır.

Paraziter enfeksiyonlar, Dünya'daki önemli sağlık sorunlarından olmalarına rağmen genellikle geri plana atılmıştır. Ancak ülkelere verdiği ekonomik zararlar ciddi boyutlara ulaşmaktadır. Paraziter enfeksiyonların elimine edilmesi etkin bir tedavi ile mümkün olmaktadır. Ancak günümüzde bu enfeksiyonlara karşı tedavide kullanılan ilaçlar sınırlı sayıdadır. Ayrıca zamanla mikroorganizmalar tarafından bu ilaçlara karşı da direnç gelişmektedir. Bununla beraber tedavide uzun süre kullanılan antiparaziter ilaçlar hastalarca iyi tolere edilememekte ve ciddi yan etkiler sergilemektedir. Öte yandan antiparazitik ilaçlar, bazı anatomik bölgelerde (göz, MSS, vb.) etkili olamamakta bazıları ise sadece statik etki göstermektedir. Parazitlerin ökaryotik yapıda oluşu etkin ilaç geliştirilmesini de zora sokmaktadır. Ayrıca antiparaziter aşılar da geliştirilememiş ve geliştirilen birçok ilacın da etki mekanizması halen bilinmemektedir (Ergüven, 2012; Kaynak ve ark., 2019).

*A. castellanii*, serbest yaşayan amiplerden olan ve doğada yaygın biçimde toprakta ve suda yaşayan ökaryotik protozoondur (Kaynak ve ark., 2018; Gülsen ve ark., 2022; Aykur ve Dağcı, 2023). *Acanthamoeba* cinsine ait bazı türler insanlarda önemli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu enfeksiyonların başında; genellikle kontakt lens kullanıcılarında görülen ağırlı, bulaşıcı ve körlüğe kadar ilerleyebilen *Acanthamoeba keratiti* (AK), ender olarak görülen ancak MSS'yi de etkileyerek ölümcül seyreden Granülomatöz Amibik Ensefalit (GAE) ve bağışıklık sistemi baskılanmış, (AIDS vb.) MSS tutulumu olan/olmayan kişilerde görülebilen cilt lezyonlarıyla karakterize Kutanoz Acanthamoebiasis gelmektedir (Ergüden, 2015; Kaynak ve ark., 2019).

*Acanthamoeba* türlerinden kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antiparaziter ilaçların; bazı anatomik bölgelerde (MSS, göz, vb.) etkin olamaması, uzun süre kullanıldıklarında hastaların ilaca toleransının düşük oluşu, ilaçların ciddi yan etkilerin olması, parazitlerin bir süre sonra bu ilaçlara karşı direncini arttırması ve parazitin kist formuna karşı ilaçların etkisiz kalması, bununla birlikte GAE'nin *Acanthamoeba keratiti*'ne göre daha nadir görülüp henüz tedavi standardının olmayışı, bazı ilaçların etkisinin yalnızca amoebastatik olması gibi problemlerin giderilmesi için alternatif ve etkin tedavi metodlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bağlamda özellikle doğal bitkisel kaynaklı tedaviye olan yönelim günümüzde daha da önem kazanmaktadır (Saygı ve Polat, 2003; Ergüden, 2015; Kaynak ve ark.,2018).

Bitkisel biyoçeşitlilik ve endemizm oranı yüksek ve bitkisel kaynak bakımından oldukça zengin olan Türkiye, bitki orijinli ilaç geliştirme potansiyeli açısından elverişli bir ülke konumundadır. Bu doğrultuda da *E. umbellata*'nın meyvelerinden elde edilen özütün ve bu özüt kullanılarak yeşil sentezle elde edilen AgNP'lerin *A. castellanii*'ye karşı amoebisidal etkisinin araştırılması bu çalışmada gerçekleştirilmiştir.

Son yıllarda bitki özütlerinin ve bu özütlerden elde edilen AgNP'lerin antiparazitik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda artış gözlenmektedir. *Acanthamoeba* türlerine yönelik araştırmalar da halen sürmektedir. Ancak yapılan araştırmalarda etkili bulunan bitkisel özütlerin anti-parazitik aktivitesinden sorumlu fitobileşiklerin etki mekanizmaları hakkındaki bilgiler de sınırlıdır.

Birçok araştırmacı *E. umbellata*'nın çeşitli bölümlerini (yaprak, çiçek, meyve vb.) kullanarak elde ettikleri özütlerin antibakteriyel, (Sabir ve ark., 2007; Minhas ve ark., 2013a; Aziz ve ark., 2015; Ali ve ark., 2020; Nazir ve ark., 2021; Zafar ve Mehmood, 2023) antifungal (Minhas ve ark., 2013; Aziz ve ark., 2015) ve antimalaryal (Minhas ve ark., 2013b) etkilerini araştırmışlardır.

Bizim çalışmamızda da *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün amoebisidal aktivitesi araştırılmıştır. Araştırmada 24. saatin sonunda *E. umbellata* özütünün 40mg/ml konsantrasyonunda trofozoitlerin büyük bir bölümünde önemli oranda letal etki gösterdiği, aynı konsantrasyonda 48. saatten sonra canlı trofozoite rastlanmadığı, 20mg/ml konsantrasyonda ise 24. ve 48. saatlerde dikkate alınacak düzeyde letal etki gösterdiği ve aynı konsantrasyonlarda 72. saattten sonra canlı trofozoite rastlanmadığı, 10mg/ml konsantrasyonda ise 72. saatte önemli oranda letal etki gösterdiği gözlenmiştir. Bununla beraber *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *E. umbellata* özütünün 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0.9, 1.09 ve 1.15mg/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca özüt dozlarının hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, özüt dozu arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık en düşük dozda (0.625mg/ml) olurken en düşük canlılık ise en yüksek dozda (40mg/ml) ölçülmüştür. Uygulama sürelerinin hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, bekleme süresi arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 24. saat sonunda olurken en düşük canlılık

72. saatin sonunda ölçülmüştür. Bununla beraber tüm özüt konsantrasyonlarının *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki % canlılık sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile görselleştirilmiştir. Buna göre 40, 20, 10, 5 ve 2.5mg/ml'deki dozlar ile kontrol ve 1.25 ve 0.625mg/ml dozlar arasında negatif korelasyon göstermektedir. *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün uygulanan tüm dozların 24 saatlik dilimindeki % hücre canlılığı değerleri, 72 saatteki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir. 48. saat hücre canlılığı verileri eksenin ortasında yer alıp, bu zamandan sonraki zaman periyodunda hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Bu bağlamda 48. saat tüm dozlar için eşik değer kabul edilebilir.

Bazı araştırmacılar; çeşitli bitkilerin *Carica papaya* (Jain ve ark., 2009), *Embllica officinalis* (Ramesh ve ark., 2015), *Momordica cymbalaria* (Swamy ve ark., 2015), *Momordica charantia* (Rashid ve ark., 2017), *Cleome viscosa* (Lakshmanan ve ark., 2018), *Prosopis farcta* (Salari ve ark., 2019), *Phyllanthus emblica* (Renuka ve ark., 2020) meyve özütlerini, kimileri ise *Elaeagnus*'un bazı türlerini, *E. angustifolia* (Mortazavi-Derazkola ve ark., 2021), *E. indica* (Natarajan ve ark., 2013), *E. latifolia* (Phanjom ve ark., 2012) kullanarak yeşil (green) sentez ile gümüş nanopartikül (AgNP) sentezlemişler ve sentezlenen AgNP'leri karakterizasyon testleri ile doğrulamışlardır.

Bizim çalışmamızda ise, *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütü kullanılarak yeşil sentez ile gümüş nanopartikül sentezlenmiştir. Sentezlenen AgNP'ler karakterizasyon testleri ile doğrulanmıştır. AgNP'lerin UV-Vis spektroskopisinde 300-700nm dalga boyu aralığında 436nm dalga boyunda absorbans alınmıştır. EDX analiz sonucu sentezlenen AgNP'lerin içeriğinin büyük oranda gümüş (%72.03), karbon (%14.87) ve oksijen (%13.1) elementlerinin oluşturduğu gözlenmiştir. FTIR'da ise 3819, 3741, 3564, 3232 ve 3124cm<sup>-1</sup> bantları alkol ve fenol bileşiklerinin, O-H bağlarını, 2924, 2854 ve 2738cm<sup>-1</sup> bantları ise, C-H alken bağlarını, 2669, 2584 ve 2468cm<sup>-1</sup> H-bağlı karboksilik asit bantlarını, 2337 ve 2266cm<sup>-1</sup> C≡N Nitril bantlarını, 2160cm<sup>-1</sup> C≡C Alkin bandını, 1651cm<sup>-1</sup> C=C Alken bandını, 1519cm<sup>-1</sup> C=C Aromatik halka bandını, 1288 ve 1219cm<sup>-1</sup> C-N Amin ve Amid bantlarını, 1072cm<sup>-1</sup> eter, karboksilik asit, C-O Alkol, ve ester bantlarını, 671 ve 609cm<sup>-1</sup> C-H ve -OH gruplarının titreşimlerini göstermektedir. SEM'de 10nm boyutunda ve yuvarlak şekilli olan AgNP görüntüleri alınmıştır.

*E. umbellata*'nın yaprak (Ali ve ark., 2020) ve meyve (Zulfiqar ve ark., 2022) özütlerinden yeşil sentez ile gümüş nanopartikül (AgNP) sentezlendiği, karakterizasyon testleri ile doğrulandığı ve antibakteriyel etkilerini araştırıldığı çalışmalar da yapılmıştır.

Yaptığımız çalışmada da *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütü kullanılarak yeşil sentez ile gümüş nanopartikül sentezlenmiştir. Sentezlenen AgNP'ler karakterizasyon testleri ile doğrulanmıştır. Sentezlenen AgNP'lerin *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde amoebisidal aktivitesi incelenmiştir. *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütü kullanılarak yeşil sentezle elde edilen gümüş nanoartiküllerin 20mM/ml konsantrasyonda 24. saatin sonunda trofozoitlerin büyük bir bölümünde letal etki gösterdiği, aynı konsantrasyonda 48. saatten sonra canlı trofozoite rastlanmadığı ve 10mM/ml konsantrasyonda ise 24. ve 48. saatlerde önemli oranda letal etki gösterdiği aynı konsantrasyonda 72. saat sonrasında canlı trofozoite rastlanmadığı görülmüştür. Gümüş nanoartiküllerin *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 0.65, 0.8 ve 1mM/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca AgNP dozlarının hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, AgNP dozu arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık en düşük doz olan 0.5mM/ml'de olurken en düşük canlılık ise en yüksek dozda (20mM/ml) ölçülmüştür. Uygulama sürelerinin hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, bekleme süresi arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 24. saat sonunda olurken en düşük canlılık 72. saatin sonunda ölçülmüştür. Tüm AgNP konsantrasyonlarının *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki % canlılık sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA analizi görselleştirilmiştir. Sonuç olarak, 20, 10, 5 ve 1mM/ml'deki dozları ile kontrol ve 0.5mM/ml dozu arasında negatif korelasyon göstermektedir. Farklı konsantrasyonlardaki AgNP'lerin % canlılık üzerine etkisinin farklı doz ve sürelerdeki aktif bileşenleri incelendiğinde AgNP'lerin tüm uygulanan dozların 24 saatlik dilimindeki % hücre canlılığı değerleri, 72 saatteki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir. 48. saat hücre canlılığı verileri eksenin ortasında yer alıp, bu zamandan sonraki diğer zaman aralıklarında hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Bu bağlamda 48. saat tüm dozlar için eşik değer kabul edilebilir.



Bitkilerde GC MS analizi ile tespit edilen bazı fitokimyasal bileşiklerin, antimikrobiyal aktivitelerinin incelendiği araştırmalara da rastlanmıştır. Bu fitobileşiklerden Dimethylsulfoxonium formylmethylide'in antibakteriyel ve insektisidal (Suganya ve ark., 2019), 1,2,3-propanetriol; monoacetate'ın antifungal (Francis ve ark., 2021), 2,4-Dihidroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-one'in antibakteriyel (Abu Bakar ve ark., 2016; Tailulu ve ark., 2021; Qanash ve ark., 2022), antifungal (Tailulu ve ark., 2021; Qanash ve ark., 2022) ve antiviral (Qanash ve ark., 2022), Dodekanoik (Laurik) Asit'in ise anti-giardial (Rayan ve ark., 2005), antitrypanosomal (De Souza ve ark., 2017), antihelmintik (Tessema ve ark., 2018) ve antimalaryal (Anjuwon ve ark., 2023) aktivitelerinin incelendiği çalışmalar yapılmıştır.

Bizim çalışmamızda ise, GC MS analizi sonucunda *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünde 44 fitobileşik tespit edilmiştir. Dimethylsulfoxonium formylmethylide, 1,2,3-propanetriol monoacetate, 2,4-Dihidroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-one ve Laurik Asit (Dodekanoik asit, C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>) en fazla orana sahip fitokimyasallar olarak bulunmuştur. Bu fitokimyasallardan aynı zamanda doymuş bir yağ asiti olan Laurik Asit'in antibakteriyel (Nitbeani ve ark., 2016; Anzaku ve ark., 2017), antifungal (Řiháková ve ark., 2001; Akula ve ark., 2021), anti-giardial (Rayan ve ark., 2005; Rayan ve McDonnell, 2014), Antileşmanyal (Zahedifard ve ark., 2019), antitümoral (Ahn ve ark., 2021) etkilerinin araştırıldığı çalışmalar da mevcuttur.

Ayrıca, Laurik asit, trigliseritlerin bir bileşeni olup, insan anne sütünde %6.2, inek sütünde %2.9 ve keçi sütünde %3.1 oranında bulunmaktadır. Ucuz, uzun raf ömürlü, non-toksik ve işlenmesi güvenlidir. Esasen sabun ve kozmetik üretiminde kullanılan Laurik asit, çoğunlukla yüksek yoğunluklu lipoproteini (HDL) artırarak ateroskleroz insidansını azalttığı belirlenmiştir (Anonim, 2021h).

Laurik Asit'in bu özellikleri dikkate alınarak çalışmamızda amoebisidal aktivitesi araştırılmıştır. Laurik Asit'in 1mM/ml konsantrasyonda 24. saatin sonunda trofozoitlerin büyük bir bölümünde letal etki gösterdiği, aynı konsantrasyonda 48. saatten sonra canlı trofozoite rastlanmadığı ve 0.8mM/ml konsantrasyonda ise 48. saatte önemli oranda letal etki gösterdiği aynı konsantrasyonda 72. saatte canlı

trofozoite rastlanmadığı, Laurik Asit'in 0.6mM/ml konsantrasyonda 72. saatte önemli oranda letal etki gösterdiği tespit edilmiştir. Laurik Asit'in *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 0.19, 0.25 ve 0.34mM/ml olarak bulunmuştur. Laurik Asit dozlarının hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, Laurik Asit dozu arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık en düşük doz olan 0.2mM/ml'de olurken en düşük canlılık ise en yüksek doz olan 1mM/ml'de ölçülmüştür. Uygulama sürelerinin hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, bekleme süresi arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 24. saat sonunda olurken en düşük canlılık 72. saatin sonunda ölçülmüştür. Tüm Laurik Asit konsantrasyonlarının *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki % canlılık sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile görselleştirilmiştir. Buna göre 1, 0.8, 0.6 ve 0.4mM/ml'deki dozlar ile kontrol ve 0.2mM/ml dozu arasında negatif korelasyon göstermektedir. Farklı konsantrasyonlardaki Laurik Asit'ler % canlılık üzerine etkisinin farklı doz ve sürelerdeki aktif bileşenleri incelendiğinde Laurik Asit'lerin tüm uygulanan dozların 24 saatlik dilimindeki % hücre canlılığı değerleri, 72 saatteki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir. 48. saat hücre canlılığı verileri eksenin ortasında yer alıp, bu zamandan sonraki zaman periyodunda hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Bu bağlamda 48. saat tüm dozlar için eşik değer kabul edilebilir.

Bazı bitkilerin meyve özütlerinin pBR322 plazmid DNA'sı üzerinde in vitro DNA koruyucu aktivitelerinin *Embllica officinalis* (Bhattacharya ve ark., 2006), *Litchi chinensis* (Saxena ve ark., 2011), *Garcinia xanthochymus* (Meng ve ark., 2012), *Morus nigra* (Issa ve Abd-Aljabar, 2017), *Crataegus microphylla* (Renda ve ark., 2018), farklı üzüm türlerinin (Singha ve ark., 2020) incelendiği çalışmalara da rastlanılmıştır.

Bizim çalışmamızda da *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün, Laurik Asit'in ve *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünden yeşil yolla sentezlenen AgNP'lerin -OH ile indüklenen DNA hasarını engelleme aktivitesi, serbest radikal ile indüklenmiş kırıkların oluşturulduğu pBR322 plazmid DNA'sı üzerinde araştırılmıştır. Çalışma neticesinde *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün 5 mg/ml konsantrasyonu ile Laurik Asit'in tüm konsantrasyonlarının (1, 0.8, 0.6, 0.4mM/ml) -OH tarafından oluşturulan DNA hasarını engelleme üzerine etkilerinin varlığı tespit edilmiştir. Öte yandan *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün diğer

konsantrasyonları (40, 20, 10, 2.5, 1.25 ve 0.625mg/ml) ile *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünden yeşil yolla sentezlenen AgNP'lerin tüm konsantrasyonlarının (20, 10, 5, 1, 0.5mM/ml) DNA hasarını engelleme üzerine etkilerinin bulunmadığı tespit edilmiştir.

Araştırmacılar bazı bitkilerin meyve özütlerini; *Solanum nigrum* (Patel ve ark., 2009), *Pyracantha coccinea* (Vahabi ve ark., 2014), *Physalis peruviana* (Mier-Giraldo ve ark., 2017), *Pandanus tectorius* (Musa ve ark., 2017), *Momordica dioica* (Ahirrao, 2019), *Medinilla speciosa* (Artanti ve ark., 2020), *Mangifera kemanga* (Catrawardhana ve ark., 2022) ve *E. multiflora* (Oh ve Lee, 2008) ile *E. angustifolia* (Ya ve ark., 2014) gibi bazı *Elaeagnus* türlerinin meyve özütlerinin memeli hücreleri üzerine sitotoksik etkisini HeLa hücre hattı kullanarak MTT Sitotoksikite Testi ile test etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda ise, *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün farklı konsantrasyonlarda (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312mg/ml) memeli hücreleri üzerine sitotoksik etkisi HeLa hücre hattı kullanılarak MTT analizi ile değerlendirilmiştir. *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Ancak 72. saatin sonunda en yüksek konsantrasyonda (40mg/ml) dahi hücrelerin yarıdan fazlası (%53.82) için sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiş ve IC<sub>50</sub> değerinin 40mg/ml'den daha yüksek dozlarda bulunabileceği düşünülmektedir. Bu durumda çalışmada kullanılan özütün en yüksek dozda (40mg/ml) dahi parazit üzerinde amoebisidal aktivite gösterirken memeli hücrelerinde sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir.

*Acanthamoeba*'nın vücutta makrofajlar tarafından fagositozu sırasında ve ROS'a maruz kaldığı sürede oksidatif strese karşı koyabildiği ve konakçının bağışıklık sisteminden kaçtığı bilinmektedir. *Acanthamoeba*'nın oksidatif stres durumunda en önemli savunma mekanizmasının, antioksidan enzimlerinin miktarını artırmak veya mevcut kistleşme mekanizmalarını aktive etmek şeklinde olduğu varsayılmaktadır (Motavallihaghi ve ark., 2022). *Acanthamoeba* oksidatif stres koşullarında CAT ve SOD gibi enzimleri aktive ederek savunma mekanizmasını başlatmaktadır. Stresin devam etmesi durumunda ise tepki olarak pseudokist oluşturmaktadır. Bu sırada CSII geninin ifadesi baskın olmaktadır. Stresin uzun süre daha devam ettiği durumlarda ise

parazit asıl kistleşme sürecini başlatmakta buna bağlı olarak CSP21 geninin ifadesi baskın olmaktadır (Motavallihaghi ve ark., 2022).

Yapılan literatür araştırmasında, *Acanthamoeba* türlerinin oksidatif strese karşı savunma enzimlerinin (CAT, SOD, vb.) ve kistleşme enzimlerinin (CSII ve CSP21) baskılandığı çalışmaların çok az sayıda olduğu belirlenmiştir. Kliescikova ve ark., (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, *Acanthamoeba*'nın (T4 genotipi) farklı konsantrasyonlardaki (%1, %10, %25, %50) organik çözücülere (metanol, aseton ve DMSO) karşı zamana bağlı stres tepkisini ve psödokistlerin hidrasyon, pH (3-12) ve ısıya (40-65°C) karşı dirençlerini araştırmışlardır. Psödokistlerin 25°C'de susuz 1 haftaya kadar yaşayabildiğini, 6-11 arası pH ve maksimum 55°C sıcaklığa kadar dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca *Acanthamoeba*'nın belirli zamanda (0, 30, 60, 90 dakika ve 2, 6, 8, 12, 24, 48, 72 saat) ve farklı konsantrasyonlarda (%1, %10, %25, %50) organik çözücülere maruz bırakıldıktan sonra CSP21, CSI ve CSII, GP ve 18S rDNA genlerinin ekspresyon seviyelerini incelemişlerdir. *Acanthamoeba*'nın dört izolatinin %1 ile %10 arasındaki konsantrasyonlarda (metanol, aseton veya DMSO) 30 dakika içinde canlı trofozoitlerinin bölünmesinin inhibe edildiğini ve çözücülerin daha yüksek konsantrasyonlarında (%25; %50) letal etkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. CSP21'in yalnızca asıl kistleşme sırasında ifade edildiğini ve en yüksek ifadenin 24. saatte görüldüğünü tespit etmişlerdir. CSI ve CSII'nin hem kist hem de psödokist olarak farklılaşma sırasında ifade edildiğini ve psödokiste farklılaşma sırasında ekspresyonun 30 ila 60 dakika arasında görüldüğünü belirtmişlerdir. GP'nin büyüyen ve bölünen hücrelerin yanı sıra her iki farklılaşma işlemi sırasında da ifade edildiğini vurgulamışlardır. Huang ve ark., (2017) tarafından Tayvan'da yapılan bir araştırmada ise; 1 saat PHMB'ye maruz bırakılan *A. castellanii* standart suşunu (ATCC 30010), PHMB ile tedavi gören hastalardan izole edilen izolat B'yi ve tedavi gören ve PHMB'ye yüksek dirence sahip hastalardan alınan izolat D'yi karşılaştırmışlardır. PHMB tedavisinin etkinliğini aydınlatmak ve *Acanthamoeba* türlerinin PHMB'ye duyarlılıklarını belirlemek için uyguladıkları in vitro ilaç testi sonucunda, 100µg/ml'de her iki klinik izolatin (B ve D) PHMB'ye toleransının ATCC30010'dan fazla olduğunu ve en yüksek toleransı izolat D'nin gösterdiğini belirtmişlerdir. PHMB tedavisi boyunca, izolat B ve izolat D'nin bazı popülasyonlarının psödokistlere dönüşerek hayatta kaldığını gözlemlemişlerdir. Bu

davranışın, ATCC30010 suşunda gözlenmediğini belirtmişlerdir. İzolatların, esas kistik enzim olan CSP21 geninin ekspresyonunun tespit edilmediğini gözlemlemişlerdir. PHMB tedavisinin ilerlemesi sırasında, psödokist dönüşümünde anahtar enzim olan CSII'nin gen ekspresyon seviyesinin, izolat B'nin ATCC 30010'dan daha yüksek olduğunu ancak izolat D oranının önemli ölçüde değişmediğini belirtmişlerdir. Motavallihaghi ve ark., (2022) tarafından yapılan başka bir çalışmada, *A. castellanii* trofozoitlerinin oksidatif strese karşı direnç mekanizmalarını incelemişlerdir. Trofozoitleri farklı konsantrasyonlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele ederek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin yarı maksimum inhibitör konsantrasyonunu (IC<sub>50</sub>), MTT analizi ile belirlemişlerdir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edilen trofozoitlerin SOD, CAT, GPx ve GR gen ifade analizleri ile CAT ve SOD antioksidan enzimlerinin gen ekspresyon seviyelerini RT-qPCR yöntemi ile analiz etmişlerdir. SOD, CAT, GR ve GPx aktivitelerinin oksidatif strese artış gösterdiğini vurgulamışlardır. Ancak CAT ve SOD'un spesifik inhibisyonundan sonra önemli ölçüde enzim aktivitelerinin azaldığını belirtmişlerdir. Sonuç olarak parazitin SOD ve CAT gibi antioksidan enzimlerinin aktivitesinin azaltılması veya engellenmesi yoluyla *A. castellanii* ile baş etmenin mümkün olabileceğini vurgulamışlardır.

Yaptığımız çalışmada ise, metanol ile strese maruz bırakılan *A. castellanii* trofozoitlerinin *E. umbellata*'nın etanolik özütü (EU), *E. umbellata*'nın etanolik özütüyle sentezlenen gümüş nanopartiküller (AgNP's) ve *E. umbellata*'nın etanolik özütünde GC MS analiziyle tespit edilen Laurik asit (LA) kullanılarak oksidatif stres enzimleri CAT ve SOD'un ifade analizleri RT-qPCR yöntemi ile araştırılmıştır. CAT ve SOD'un spesifik inhibitörleri olan sırasıyla 3-AT ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi inhibitörler kullanılarak gen ekspresyon seviyelerinde azalma olup olmadığı incelenmiştir. Ayrıca metanol ile strese maruz bırakılan *A. castellanii* trofozoitlerinin psödokist sürecini başlatan CSII enzimi ile asıl kistleşmeyi başlatan CSP21 geninin ekspresyon seviyelerinde azalma olup olmadığı, sadece metanol ile strese maruz bırakılan pozitif kontrol (PK) ve hiçbir maddeye maruz bırakılmayan kontrol (K) ile karşılaştırma yapılarak araştırılmıştır. *A. castellanii* trofozoitlerinin psödokistleşmeden sorumlu gen olan ve stres durumunda ilk 2 saat içerisinde eksprese olan CSII geninin ifadesi bakımından incelendiğinde (Şekil 4.19); PK, K, EU, AgNP's ve LA karşılaştırıldığında; 30. dakikada; AgNP's, CSII geninin ifadesi üzerinde EU ve LA'ya

oranla daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. Aynı sürede LA ve EU aynı oranlarda inhibitör etki göstermiştir. 1. saatte ise; EU, CSII geninin ifadesi üzerinde AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Aynı sürede AgNP's de LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. 2. saatte ise; EU CSII geninin ifadesi üzerinde, AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki gösterirken, aynı sürede LA ise AgNP's e oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Gruplar içinde en fazla inhibitör etkiyi  $1.88\pm 0.94$  ile EU gösterirken en fazla inhibisyon 30. dakikada  $1.65\pm 0.87$  olarak ölçülmüştür. Tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ifadesi üzerindeki etkilerini özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile görselleştirilmiştir (Şekil 4.20). Buna göre Kontrol, EU, AgNP's, LA ile PK arasında negatif korelasyon görülmektedir. CSII geninin ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi incelendiğinde tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde 1. saatteki değerler, 2. saatteki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir. 30. dakika ekspresyon verileri eksenin ortasında yer alıp, bu zamandan sonraki zaman periyodunda ekspresyonun arttığı gözlenmiştir. Bu bağlamda 30. Dakika tüm gruplar için eşik değer kabul edilebilir (Şekil 4.21).

*A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu gen olan ve 12. saatten sonra eksprese olmaya başlayan CSP21 geninin ifadesi incelendiğinde (Şekil 4.22); PK, K, EU, AgNP's ve LA karşılaştırıldığında; 12. saatte; EU, CSP21 geninin ifadesi üzerinde AgNP's ve LA'ya göre daha fazla inhibitör etki sergilemektedir. Aynı sürede, LA'da AgNP's e oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. 24. saatte EU, CSP21 geninin ifadesi üzerinde AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki gösterirken, AgNP's ise LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. 48. saatte ise; LA, CSP21 geninin ifadesi üzerinde EU ve AgNP's e oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Aynı saatte AgNP's, LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Gruplar içinde en fazla inhibitör etkiyi  $2.64\pm 0.73$  ile LA gösterirken en fazla inhibisyon 24. saatte  $2.56\pm 1.05$  olarak ölçülmüştür. Tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinin asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibisyon sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler PCA ile görselleştirilmiştir (Şekil 4.23). Buna göre Kontrol, EU, AgNP, LA ile PK arasında

negatif korelasyon göstermektedir. Tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde 24. saatlik dilimindeki değerler ile 12. ve 48. saatteki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.24).

*A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu gen olan CAT'ın ifadesi bakımından incelendiğinde (Şekil 4.25); PK, K ve CAT'ın spesifik inhibitörü olan 3-AT ile karşılaştırıldığında 30. dakikada; EU, CAT geni üzerinde AgNP's, 3-AT ve LA'ya göre daha fazla inhibitör etki sergilemektedir. Aynı sürede LA ve 3-AT, AgNP's e oranla daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. 1. saatte ise; EU ve 3-AT, CAT geni üzerinde aynı oranda inhibitör etki sergilemektedir. Aynı sürede, AgNP's de LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. 2. saatte ise; 3-AT, CAT geni üzerinde LA, AgNP's ve EU'ya göre daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Aynı sürede AgNP's, CAT geni üzerinde EU ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. 12. saatte; 3-AT, CAT geni üzerinde EU, AgNP's ve LA'ya göre daha fazla inhibitör etki sergilemektedir. Aynı sürede LA, CAT geni üzerinde AgNP's ve EU'ya oranla daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. 24. saatte ise; 3-AT, CAT geni üzerinde EU, AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. Aynı sürede EU, CAT geni üzerinde AgNP's ve LA'ya göre daha çok inhibitör etki göstermiştir. 48. saatte EU, CAT geni üzerinde 3-AT, AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Aynı sürede 3-AT, CAT geni üzerinde AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Yine aynı sürede LA da AgNP's e oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Gruplar içinde en fazla inhibitör etkiyi  $2.82 \pm 1.07$  ile EU gösterirken en fazla inhibisyon 1. saatte  $2.33 \pm 0.90$  olarak ölçülmüştür. Tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibisyon sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler PCA ile görselleştirilmiştir (Şekil 4.26). Buna göre K, E.U, LA, 3-AT ile PK, AgNP's arasında negatif korelasyon göstermektedir. CAT ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi incelendiğinde (Şekil 4.27); tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu CAT geninin ekspresyonu üzerinde 30. dakika, 1. ve 12. saat dilimindeki değerler ile 2., 24. ve 48. saatlerdeki değerler ile negatif korelasyon göstermektedir.

*A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu gen olan SOD'un ifadesi bakımından incelendiğinde (Şekil 4.28); PK, K ve SOD'un spesifik inhibitörü olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile karşılaştırıldığında; 30. dakikada; EU ve AgNP's, SOD geni üzerinde aynı inhibitör etkide olup, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve LA'ya göre daha fazla inhibitör etki sergilemektedir. Aynı sürede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, LA'ya göre daha fazla inhibitör etki sergilemektedir. 1. saatte ise; EU, SOD geni üzerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Aynı saatte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. 2. saatte ise; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SOD geni üzerinde LA, AgNP's ve EU'ya göre daha fazla inhibisyon göstermiştir. Aynı sürede EU, AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. 12. saatte; EU, SOD geni üzerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AgNP's ve LA'ya göre daha fazla inhibitör etki sergilemektedir. Aynı sürede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AgNP's ve LA'ya oranla daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. 24. saatte ise; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SOD geni üzerinde LA, AgNP's ve EU'ya göre daha fazla inhibitör etki sergilemiştir. Aynı sürede LA, AgNP's ve EU'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. 48. saatte ise; LA, SOD geni üzerinde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, AgNP's ve EU'ya oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Aynı sürede EU, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve AgNP's e oranla daha fazla inhibitör etki göstermiştir. Gruplar içinde en fazla inhibitör etkiyi 2.22±1.07 ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gösterirken en fazla inhibisyon 30. dakikada 1.68±0.76 olarak ölçülmüştür. Tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibisyon sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler PCA (Şekil 4.29); ile görselleştirilmiştir. K, EU, AgNP's, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, LA ile Pozitif kontrol arasında negatif korelasyon göstermektedir. SOD ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi incelendiğinde (Şekil 4.30); tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde 30. dakika, 1. ve 48. saat ile 2., 12. ve 24. saat dilimindeki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir.



## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

*E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde 40mg/ml konsantrasyonda 24. saatin sonunda trofozoitlerin büyük bir bölümünde letal etki göstermiş, aynı konsantrasyonda 48. saatten sonra canlı trofozoite rastlanmamıştır. *E. umbellata* özütünün 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0.9, 1.09 ve 1.15mg/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca özüt dozu arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 0.625mg/ml'de olurken en düşük canlılık ise 40mg/ml'de ölçülmüştür. Uygulama sürelerinin hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, bekleme süresi arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 24. saatin sonunda olurken en düşük canlılık 72. saatin sonunda ölçülmüştür. Bununla beraber tüm özüt konsantrasyonlarının *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki % canlılık sonuçları, PCA'ya göre; 40, 20, 10, 5 ve 2.5mg/ml'deki dozlar ile kontrol, 1.25 ve 0.625mg/ml dozlar arasında negatif korelasyon göstermektedir. *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün uygulanan tüm dozların 24 saatlik dilimindeki % hücre canlılığı değerleri, 72 saatteki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir. 48. saat hücre canlılığı verileri eksenin ortasında yer alıp, bu zamandan sonraki zaman periyodunda hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Bu bağlamda 48. saat tüm dozlar için eşik değer kabul edilebilir.

Yapılan çalışmada; *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütü kullanılarak sentezlenen AgNP'ler karakterizasyon testleri ile doğrulanmıştır. AgNP'lerin UV-Vis'de 436nm dalga boyunda absorbans alınmıştır. EDX Analiziyle AgNP'lerin içeriğini büyük oranda gümüş (%72.03), karbon (%14.87) ve oksijen (%13.1) elementlerinin oluşturduğu gözlenmiştir. FTIR'da ise 3819, 3741, 3564, 3232 ve 3124cm<sup>-1</sup> bantları alkol ve fenol bileşiklerinin, O-H bağlarını, 2924, 2854 ve 2738cm<sup>-1</sup> bantları ise, C-H alken bağlarını, 2669, 2584 ve 2468cm<sup>-1</sup> H-bağlı karboksilik asit bantlarını, 2337 ve 2266cm<sup>-1</sup> C≡N Nitril bantlarını, 2160cm<sup>-1</sup> C≡C Alkin bandını, 1651cm<sup>-1</sup> C=C Alken bandını, 1519cm<sup>-1</sup> C=C Aromatik halka bandını, 1288 ve 1219cm<sup>-1</sup> C-N Amin ve Amid bantlarını, 1072cm<sup>-1</sup> C-O Alkol, eter, karboksilik asit ve ester bantlarını, 671 ve 609cm<sup>-1</sup> C-H ve -OH gruplarının titreşimleri tespit edilmiştir. SEM'de 10nm boyutunda ve yuvarlak şekilli olan AgNP görüntüleri alınmıştır.

Sentezlenen AgNP'ler, karakterizasyon testleri ile doğrulandıktan sonra *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde amoebisidal aktivitesi incelenmiştir. AgNP'lerin 20mM/ml konsantrasyonda 24. saatin sonunda trofozoitlerin büyük bir bölümünde letal etki gösterdiği, aynı konsantrasyonda 48. saatten sonra canlı trofozoite rastlanmadığı ve *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 0.65, 0.8 ve 1mM/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca AgNP dozu arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 0.5mM/ml'de olurken en düşük canlılık ise 20mM/ml'de ölçülmüştür. Uygulama sürelerinin hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, bekleme süresi arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 24. saatin sonunda olurken en düşük canlılık 72. saatin sonunda ölçülmüştür. Tüm AgNP konsantrasyonlarının *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki % canlılık sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile görselleştirilmiştir. Buna göre 20, 10, 5 ve 1mM/ml'deki dozlar ile kontrol ve 0.5mM/ml dozu, negatif korelasyon göstermektedir. Farklı konsantrasyonlardaki AgNP'lerin % canlılık üzerine etkisinin farklı doz ve sürelerdeki aktif bileşenleri incelendiğinde AgNP'lerin tüm uygulanan dozların 24 saatlik dilimindeki % hücre canlılığı değerleri, 72 saatteki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir. 48. saat hücre canlılığı verileri eksenin ortasında yer alıp, bu zamandan sonraki zaman periyodunda hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Bu bağlamda 48. saat tüm dozlar için eşik değer kabul edilebilir.

Çalışmada, *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünde GC MS analizi ile tespit edilen Dodekanoik (Laurik) Asit'in *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde amoebisidal aktivitesi incelenmiştir. Laurik Asit'in 1mM/ml konsantrasyonda 24. saatin sonunda trofozoitlerin büyük bir bölümünde letal etki gösterdiği, aynı konsantrasyonda 48. saatten sonra canlı trofozoite rastlanmadığı ve *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki 72., 48. ve 24. saatlerde yaklaşık IC<sub>50</sub> değeri sırasıyla 0.19, 0.25 ve 0.34mM/ml olarak tespit edilmiştir. Laurik Asit dozlarının hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, Laurik Asit dozu arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 0.2mM/ml'de, olurken en düşük canlılık ise 1mM/ml'de ölçülmüştür. Uygulama sürelerinin hücre canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde, bekleme süresi arttıkça canlılık oranlarının azaldığı belirlenmiştir. En yüksek canlılık 24. saat sonunda

olurken en düşük canlılık 72. saatin sonunda ölçülmüştür. Tüm Laurik Asit konsantrasyonlarının *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki % canlılık sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile görselleştirilmiştir. Buna göre 1, 0.8, 0.6 ve 0.4mM/ml'deki dozlar ile kontrol ve 0.2mM/ml dozu arasında negatif korelasyon göstermektedir. Farklı konsantrasyonlardaki Laurik Asit'ler % canlılık üzerine etkisinin farklı doz ve sürelerdeki aktif bileşenleri incelendiğinde Laurik Asit'lerin tüm uygulanan dozların 24 saatlik dilimindeki % hücre canlılığı değerleri, 72 saatteki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir. 48. saat hücre canlılığı verileri eksenin ortasında yer alıp, bu zamandan sonraki zaman periyodunda hücre canlılığının azaldığı gözlenmiştir. Bu bağlamda 48. saat tüm dozlar için eşik değer kabul edilebilir.

Çalışmada *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün, Laurik Asit'in ve *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin -OH ile indüklenen DNA hasarını engelleme üzerine etkisi pBR322 plazmid DNA'sı ile incelenmiştir. *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün 5mg/ml konsantrasyonu ile Laurik Asit'in tüm konsantrasyonlarının (1, 0.8, 0.6, 0.4mM/ml). Hidroksil radikali tarafından oluşturulan DNA hasarını engelleme üzerine etkilerinin varlığı tespit edilmiştir. Öte yandan *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün diğer konsantrasyonları (40, 20, 10, 2.5, 1.25 ve 0.625mg/ml) ile *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütüyle sentezlenen AgNP'lerin tüm konsantrasyonlarının (20, 10, 5, 1, 0.5mM/ml) DNA hasarını engelleme üzerine etkilerinin bulunmadığı tespit edilmiştir.

Çalışmada *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün farklı konsantrasyonlarda (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312mg/ml) memeli hücreleri üzerine sitotoksik etkisi HeLa hücre hattı kullanılarak MTT analizi ile değerlendirilmiştir. *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütünün doza bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir. Ancak 72. saatin sonunda en yüksek konsantrasyonda (40mg/ml) dahi hücrelerin yarıdan fazlası (%53.82) için sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiş ve IC<sub>50</sub> değerinin 40mg/ml'den daha yüksek dozlarda bulanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada metanol ile strese maruz bırakılan *A. castellanii* trofozoitlerinin *E. umbellata*'nın etanolik meyve özütü (EU), *E. umbellata*'nın etanolik özütüyle

sentezlenen gümüş nanopartiküller (AgNP's) ve *E. umbellata*'nın etanolik özütünde GC MS ile tespit edilen Laurik Asit (LA) kullanılarak oksidatif stres enzimleri olan CAT ve SOD'un gen ekspresyon seviyelerinde azalma olup olmadığı, ayrıca psödokist sürecini başlatan CSII enzimi ile asıl kistleşmeyi başlatan enzim olan CSP21 genlerinin ekspresyon seviyelerinde azalma olup olmadığı, sadece metanol ile strese maruz bırakılan pozitif kontrol (PK) ve hiçbir maddeye maruz bırakılmayan kontrol (K) ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır.

*A. castellanii* trofozoitlerinin psödokistleşmeden sorumlu CSII geninin ifadesi bakımından incelendiğinde; PK, K, EU, AgNP's ve LA karşılaştırıldığında, gruplar içinde CSII geninin ekspresyonunda en fazla inhibitör etkiyi  $1.88 \pm 0.94$  ile EU gösterirken en fazla inhibisyon 30. dakikada  $1.65 \pm 0.87$  olarak ölçülmüştür. Tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde inhibisyon sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile görselleştirilmiştir. Buna göre K, EU, AgNP's, LA ile PK arasında negatif korelasyon göstermektedir. CSII geninin ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi incelendiğinde tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinin pseudokistleşmesinden sorumlu CSII geninin ekspresyonu üzerinde 1. saat dilimdeki değerler, 2. saatteki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir. 30. dakika ekspresyon verileri eksenin ortasında yer alıp, bu zamandan sonraki zaman periyodunda ekspresyonun arttığı gözlenmiştir. Bu bağlamda 30. dakika tüm gruplar için eşik değer kabul edilebilir.

*A. castellanii* trofozoitlerinde asıl kistleşmeden sorumlu gen olan CSP21 ifadesi bakımından incelendiğinde; PK, K, EU, AgNP's ve LA karşılaştırıldığında, gruplar içinde CSP21 geninin ekspresyonunda en fazla inhibitör etkiyi  $2.64 \pm 0.73$  ile LA gösterirken en fazla inhibisyon 24. saatte  $2.56 \pm 1.05$  olarak ölçülmüştür. Tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde CSP21 geninin ekspresyonu üzerinde inhibisyon sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlarına göre; K, EU, AgNP's, LA ile PK arasında negatif korelasyon göstermektedir. CSP21 gen ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi incelendiğinde, tüm gruplarda bu geninin ekspresyonu sırasında 24. saatteki değerler, 12. ve 48. saatteki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir.

*A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu gen olan CAT'ın ifadesi bakımından incelendiğinde PK, K ve CAT'ın spesifik inhibitörü olan 3-AT ile karşılaştırıldığında, gruplar içinde en fazla inhibitör etkiyi  $2.25 \pm 0.83$  ile EU gösterirken en fazla inhibisyon 1. saatte  $2.33 \pm 0.90$  olarak ölçülmüştür. Tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde CAT geninin ekspresyonu üzerinde inhibisyon sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile görselleştirilmiştir. Buna göre K, EU, LA, 3-AT ile PK, AgNP's arasında negatif korelasyon göstermektedir. CAT ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi incelendiğinde tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde CAT geninin ekspresyonu üzerinde 30. dakika, 1. ve 12. saat dilimindeki değerler ile 2., 24. ve 48. saatlerdeki değerler arasında negatif korelasyon göstermektedir.

*A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu gen olan SOD'un ifadesi bakımından incelendiğinde PK, K ve SOD'un spesifik inhibitörü olan  $H_2O_2$  ile karşılaştırıldığında, gruplar içinde en fazla inhibitör etkiyi  $1.86 \pm 0.63$  ile  $H_2O_2$  gösterirken en fazla inhibisyon 30. dakikada  $1.68 \pm 0.76$  olarak ölçülmüştür. Tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde inhibisyon sonuçlarını özetlemek için açıklayıcı değişkenler, PCA ile görselleştirilmiştir. K, EU, AgNP's,  $H_2O_2$ , LA ile PK arasında negatif korelasyon göstermektedir. SOD ekspresyonunun farklı grup ve sürelerdeki aktif bileşenlerinin gösterimi incelendiğinde tüm grupların *A. castellanii* trofozoitlerinde antioksidan aktiviteden sorumlu SOD geninin ekspresyonu üzerinde 30. dakika, 1. ve 48. saat ile 2., 12. ve 24. saat dilimindeki değerler bakımından önemli düzeyde negatif korelasyon göstermektedir.

Çalışmadan elde edilen bulgular neticesinde;

➤ *E. umbellata*'nın meyve özütünün ve bu özüt ile sentezlenen AgNP'lerin *Acanthamoeba* kaynaklı hastalıkların tedavisinde alternatif ya da kombine tedavi yöntemleri için aday olarak kullanılabilmesi kanısına varılmıştır.

➤ Günümüzde *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı mikroorganizmalarca gelişen direnç, uzun süren tedaviler ve istenmeyen yan etkilerin gibi mevcut problemlerin eliminasyonu bakımından çalışmadan elde edilen verilerin, nanopartikül temelli bitkisel kaynaklı ilaçlar ile alternatif tedavi

yöntemleri oluşturulmasında öncü olacağı düşünülmektedir. *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının semptom ve komplikasyonlarının, nanopartikül temelli bitkisel orijinli ilaçlarla hızlı ve etkin bir şekilde tedavisinin mümkün olabileceği ve böylece hastanın yaşam kalitesinde iyileşme sağlayacağı düşünülmektedir.

➤ Araştırma sonucunda elde edilen verilerin, farmakolojik endüstri için temel oluşturacağı düşünülmektedir. Ayrıca bitki temelli yeşil sentez yoluyla elde edilebilecek ilaçlarla hızlı ve etkin bir tedavi imkanı varolacak ve mevcut tedavilere harcanan maliyet ile zaman kaybı da elimine edilecek ve dolayısıyla da ülke ekonomisine de katkı sağlayacağı varsayılmaktadır.

➤ Çalışma sonucunda elde edilen veriler kullanılarak nanoteknoloji ve bitki orijinli biyosentez yoluyla elde edilecek yerli ilaçlar sayesinde, günümüzde *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ve çoğu yabancı menşeli ilaçların yerine, yerli sermayeyle üretilen bitki kaynaklı ilaçların kullanımının teşvik edilmesinde öncü çalışma olacağı düşünülmektedir.

➤ Çalışmanın neticesinde, farmakoloji endüstrisi için bu bitkiye olan talebin artmasıyla özellikle Doğu Karadeniz Bölgesi'nde uygun yetiştirme koşullarına sahip olan bitkinin yetiştiriciliği konusunda da üretim sahalarının ve buna bağlı olarak iş istihdamının da artabileceği öngörülmektedir.

➤ Nanoteknolojik metotlarla elde edilen bitki orijinli biyosentez uygulamaları *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının tedavisinde de uygulanarak, Dünya'da hızla artan nanoteknolojik çalışmalara Türkiye'nin de mevcut bitkisel kaynaklarıyla katılımını sağlayacağı düşünülmektedir.

➤ Son zamanlarda tıbbi cihaz kaplamalarında ve hatta yara bakımında da antimikrobiyal ajan olarak kullanılan AgNP'lerin biyosentezinde bitki özütlerinin kullanımı oldukça hızlı, temiz, non-toksik ve çevre dostu bir teknoloji olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu durum dikkate alındığında, çalışmada yeşil sentezle elde edilen AgNP'lerin kullanımının çevre dostu bir çalışmayı temsil ettiği, tıp ve farmakolojik endüstri alanlarına da katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abamor, E.Ş. (2020). Metalik nanopartiküllerin genel etki mekanizmaları. <https://avesis.yildiz.edu.tr/resume/downloadfile/eabamor?key=643216d7-baac-49d5-8f37940ac2e117c> (Erişim tarihi 01.03.2021).
- Abay, E. (2006). Bazı bitki ekstraktlarının antibakteriyal etkilerinin disk difüzyon yöntemiyle araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Kars.
- Abu Bakar, M. F., Ismail, N. A., Isha, A., Mei Ling, A. L. (2016). Phytochemical composition and biological activities of selected wild berries (*Rubus moluccanus L.*, *R. fraxinifolius Poir.*, and *R. alpestris Blume*). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, (1), 2482930.
- Ahirrao, R. A. (2019). Anticancer activity of fruits of *Momordica Dioica* by using MTT assay. Madridge J. Immunol, 3(2), 89-92.
- Ahmad, S. D., Sabir, M. S., Juma, M., Asad, H. S. (2005). Morphological and biochemical variations in *Elaeagnus umbellata* Thunb. from mountains of Pakistan. Acta Botanica Croatica, 64(1), 121-128.
- Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. J Adv Res 7:17–28
- Ahmed, U., Sivasothy, Y., Khan, K. M., Khan, N. A., Wahab, S. M. A., Awang, K., ... & Anwar, A. (2023). Malabaricones from the fruit of *Myristica cinnamomea King* as potential agents against *Acanthamoeba castellanii*. Acta tropica, 248, 107033.
- Ahn, G. Y., Choi, I., Yun, T. H., & Choi, S. W. (2021). Fabrication of Starch-Lauric Acid Nanoparticles for Potential Tumor Therapy. *플라즈마*, 45(1), 62-67.
- Akdoğan, H. ve Akpolat, N. (2023). Ekstraintestinal Patojenik *Escherichia coli*: Virülans Faktörleri. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg: 53(2):61-74
- Akula, S. T., Nagaraja, A., Ravikanth, M., Kumar, N. G. R., Kalyan, Y., & Divya, D. (2021). Antifungal efficacy of lauric acid and caprylic acid–Derivatives of virgin coconut oil against *Candida albicans*. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 5(2), 229-234.
- Ali, S., Perveen, S., Ali, M., Jiao, T., Sharma, A. S., Hassan, H., Chen, Q. (2020). Bioinspired morphology-controlled silver nanoparticles for antimicrobial application. Materials Science and Engineering: C, 108, 110421.
- Anjuwon, T. M., Ehinmidu, J. O., Anigo, K. M., James, D. B. (2023). In Vitro Antimalarial Susceptibility of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* Isolates to Selected Antimalarial Agents, Column Chromatographic Subfractions of *Glyphaea brevis* Leaves Extract and FTIR and GCMS of SF8. Tropical life sciences research, 34(2), 279.
- Anonim, (2021a). *Elaeagnus umbellata* Thunb. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Japoniğdesi>. (Erişim Tarihi:20.02.2021).

- Anonim. (2021b). *E. umbellata*'nın sistematığı. <https://acir.aphis.usda.gov/s/cird/taxon/a0u3d000000CqavAAC/elaegnus-umbellata>. (Erişim Tarihi: 24/02/2021).
- Anonim, (2021c). Metalik nanopartiküllerin genel etki mekanizmaları. <https://avesis.yildiz.edu.tr/resume/downloadfile/eabamor>. (Erişim Tarihi:01.03.2021).
- Anonim, (2021d). “Güz zeytininin Türkiye’deki yetiştirme alanları. “<https://www.tarimtv.gov.tr/> (Erişim Tarihi:14.03.2021).
- Anonim, (2021e). *E. umbellata*'nın genel görünüşü. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Japoniğdesi>. (Erişim Tarihi:20.02.2021).
- Anonim, (2021f). *E. coli*'nin sistematığı. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/Escherichia-coli#section=NCBI Taxonomy](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/Escherichia-coli#section=NCBI_Taxonomy). (Erişim Tarihi:20.02.2021).
- Anonim, (2021g). *E. umbellata*'nın Türkiye’de yayılış alanları haritası. [https://identify.plantnet.org/tr/k-world flora/species/Elaegnus%20umbellata%20Thunb./data](https://identify.plantnet.org/tr/k-world/flora/species/Elaegnus%20umbellata%20Thunb./data). (Erişim Tarihi:14.03.2021).
- Anonim, (2021h). Laurik asit. [https://en.wikipedia.org/wiki/Lauric\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Lauric_acid). (Erişim Tarihi:24.03.2021).
- Anonim, (2021ı). Işık mikroskopunda (1000X) *E. coli*'nin gram boyalı görüntüsü. [https://www.researchgate.net/figure/Microscopic-View-1000X-of-Escherichia-coli\\_fig4\\_274080438](https://www.researchgate.net/figure/Microscopic-View-1000X-of-Escherichia-coli_fig4_274080438) (Erişim Tarihi:14.04.2021).
- Antony, JJ., Nivedheetha, M., Siva, D., Pradeepha, G., Kokilavani, P., Kalaiselvi, S., Sankarganesh, A., Balasundaram, A., Masilamani, V. and Achiraman, S. (2013). Antimicrobial activity of *Leucas aspera* engineered silver nanoparticles against *Aeromonas hydrophila* in infected Catla catla. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 109: 20-24.
- Anwar, A., Siddiqui, R., Shah, M., Khan, N. (2019a). Gold Nanoparticles Conjugation Enhances Antiacanthamoebic Properties of Nystatin, Fluconazole and Amphotericin B. *J. Microbiol. Biotechnol.* 29:171-177.
- Anwar, A., Abdalla, S. A. O., Aslam, Z., Shah, M. R., Siddiqui, R., Khan, N. A. (2019b). Oleic acid–conjugated silver nanoparticles as efficient antiamoebic agent against *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitology research*, 118(7), 2295-2304.
- Anwar, A., Khan, N. A., Siddiqui, R. (2018). Combating *Acanthamoeba* spp. cysts: what are the options? *Parasites & vectors*, 11(1), 1-6.
- Anwar, A., Ting, E. L. S., Anwar, A., ul Ain, N., Faizi, S., Shah, M. R., Siddiqui, R. (2020). Antiamoebic activity of plant-based natural products and their conjugated silver nanoparticles against *Acanthamoeba castellanii*. *AMB Express*, 10(1): 1-10
- Anzaku, A. A., Akyala, J. I., Juliet, A., Obianuju, E. C. (2017). Antibacterial activity of lauric acid on some selected clinical isolates. *Ann. Clin. Lab. Res.*, 5(2), 1-5.



- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Yılmaz, B. (2019). The role of antioxidant enzymes in oxidative stress-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). *Med J SDU*, 26(3), 362-369.
- Aslan Öz, M.N. (2017). Balıkesir yöresinde doğal olarak yetişen biberiye ve fesleğen bitkilerine ait uçucu yağların antioksidan ve antimikotik özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ.
- Artanti, A. N., Pujiastuti, U. H., Prihapsara, F., Rakhmawati, R. (2020). Synergistic Cytotoxicity Effect by Combination of Methanol Extract of Parijoto Fruit (*Medinilla speciosa* Reinw. ex. Bl) and Cisplatin against HeLa Cell Line. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*, 11(1), 16-21.
- Aydın, E. (2008). Bazı *Salvia* genusu üyelerinin *Acanthamoeba castellanii* tedavisindeki kullanım potansiyelleri ve sitotoksik aktivitelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı. Sivas.
- Aykur, M., ve Dagci, H. (2021). Evaluation of molecular characterization and phylogeny for quantification of *Acanthamoeba* and *Naegleria fowleri* in various water sources, Turkey. *PloS one*, 16(8), e0256659.
- Aykur, M., ve Dagci, H. (2023). Molecular identification of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris* and *Naegleria fowleri* in soil samples using quantitative real-time PCR assay in Turkey; Hidden danger in the soil. *Acta Tropica*, 244, 106956.
- Aziz, S., Aziz, S., Andleeb, S. (2015). Biological screening of *Elaeagnus umbellata* Thunb. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28(1), 65-71.
- Bayraktar, A., Yıldırım, N., Fahrettin, Atar, F., Turna, İ. (2018). Effects of some auxins on propagation by hardwood cutting of Autumn Olive (*Elaeagnus umbellata* Thunb.). *Ormançılık Araştırma Dergisi*, 5(2), 112-116.
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, İ., (2010). Tıbbi ve aromatik bitkiler üretiminin artırılması olanakları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, 11– 15 Ocak 2010, Ankara.
- Berber, İ., Avşar, C., Çine, N., Bozkurt, N., Elmas, E. (2013). Sinop'ta yetişen bazı bitkilerin metanolik ekstraktlarının antibakteriyal ve antifungal aktivitelerinin belirlenmesi. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi / Karaelmas Science and Engineering Journal*, 3(1): 10-16.
- Bhattacharya, S., Subramanian, M., Kamat, J. P., Bandyopadhyay, S. K., Chattopadhyay, S. (2006). Radioprotective property of *Emblica officinalis*. Fruit ethanol extract. *Pharmaceutical biology*, 44(9), 682-690.
- Buzea, C., Pacheco, I. I. ve Robbie, K., (2007). Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity, *Biointerphases*, 2 (4), 17-71.
- Carnt, N., ve Stapleton, F. (2016). Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: a review. *Ophthalmic and physiological optics*, 36(2), 77-92.

- Catrawardhana, P., Saharso, E. R., Mushlih, Y., Hapsari, Y., Fadilah, F. (2022). Phytochemistry and cytotoxicity analysis of kemang (*Mangifera kemanga*) fruit extract on hela cervical cancer cell line. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 15(4), 1721-1726.
- Chandra, H., Kumari, P., Bontempi, E., Yadav, S. (2020). Medicinal plants: Treasure trove for green synthesis of metallic nanoparticles and their biomedical applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101518.
- Chegeni, T. N., Ghaffarifa, F., Khoshzaban, F., Asl, A. D. D., Mirzaian, H., Jameie, F. (2019). Effects of aqueous and ethanolic extracts of *Myrtus communis* leaves on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba*: an in vitro study. *International Journal of Medical Laboratory*, 6(3):219-225
- Chopra, RN., Nayar, SL., Chopra, LC. (1986). Glossary of Indian medicinal plants. New Delhi; Council of Scientific and Industrial Research. 238-240
- Corsaro, D., Kohsler, M., Montalbano Di Filippo, M., Venditti, D., Monno, R., Di Cave, D., ve ark. (2017). Update on *Acanthamoeba jacobsi* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. *Parasitol Res*, 116(4), 1273-1284.
- Cox, P.A. (1990). Ethnopharmacology and the search for new drugs. In *Bioactive Compounds from Plants*, CIBA Foundation Symposium 154., pp. 40-55. Chichester, New York Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons.
- Çopuroğlu, Ö. (2013). Niğde yöresindeki bazı endemik bitki türlerinin antimikrobiyal aktiviteleri. Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Niğde.
- Dağcı, E.K., İzmirli, M. ve Dığrak, M. (2002). Kahramanmaraş ilinde yetişen bazı ağaç türlerinin antimikrobiyal aktivitelerinin araştırılması. *KSÜ Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5: 38-46.
- Dağcı, H., Gül, S., Emre, S., Türk, M., Sönmez, G., Tünger, A., Yağcı, A. (2001). Planlı değişimli yumuşak kontakt lenslerin *Acanthamoeba* ve bakteriyel kontaminasyon yönünden değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi*, 15: 357-362.
- Dağlıoğlu, Y., Kabakcı, D., Akdeniz, G. (2016). Nanokteknoloji/Nanopartikül, çevre ve bal arıları arasındaki ilişki. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 8(1), 22-27.
- De Obeso Fernandez del Valle, A., Scheckhuber, C. Q. (2022). Superoxide dismutases in eukaryotic microorganisms: four case studies. *Antioxidants*, 11(2), 188.
- De Lacerda, A. G., Lira, M. (2021). *Acanthamoeba* keratitis: a review of biology, pathophysiology and epidemiology. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 41(1), 116-135.
- DeRoy C, Roberts E, Fratamico PM. (2011). Detection of O antigens in *Escherichia coli*. *Anim Health Res Rev.*,12(2):169-85.
- Delafont, V., Rodier, M. H., Maisonneuve, E., Cateau, E. (2018). *Vermamoeba vermiformis*: a free-living amoeba of interest. *Microbial ecology*, 76(4), 991-1001
- De Souza, L. I. O., Bezzera-Silva, P. C., Navarro, D. M. D. A. F., da Silva, A. G., dos Santos Correia, M. T., da Silva, M. V., de Figueiredo, R. C. B. Q. (2017). The

- chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, 1055-1064.
- Doğan, A., ve Darcan, C. (2022). The Antagonistic and Synergistic Comparison of the Antimicrobial Characteristics of extracts of some Herbs. *Black Sea Journal of Agriculture*, 5(3), 248-254.
- Dülger, B., Uğurlu, E. ve Gücin F. (2002). *Vitex agnus-castus* L. (Hayıt) 'un antimikrobiyal aktivitesi, *Ekoloji Çevre Dergisi*, 11(45): 1-5.
- Dykova, I., Lom, J., Schroeder-Diedrich, J.M., Booton, G.C., Byers, T.J. (1999). *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *Journal of Parasitology*, 85: 1106-1113.
- Eckardt, S. (1987). The nature conservancy element stewardship abstract for *E. umbellata* practice. Prelim. Report 111. Department. of Conservation:pp. 1-4
- Efe, Şeyma. (2023). Çevresel su örneklerinde *Acanthamoeba* spp.'nin kültür ve moleküler yöntemler ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. İstanbul.
- Ergüden, C. (2015). Uçucu yağların *Acanthamoeba* spp. kist ve trofozoitleri üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.
- Ergün, S., Güneş, S., Büyükpelli, R., Aydın, O. (2019a). Glutamate Transporter SLC1A1 is Associated with Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 49(2):531-537.
- Ergün, S., Us Altay, D., Güneş, S., Büyükpelli, R., Karahan, SC., Tomak, L., Abur, Ü. (2019b). Tr-KIT/c-KIT ratio in renal cell carcinoma. *Molecular Biology Reports*. 46(5):5287-5294.
- Ergün, S., Güneş, S., Büyükpelli, R., Aydın, O. (2020). Association of ABL Interactor 2, ABI2, with platelet/lymphocyte ratio in patients in renal cell carcinoma: a pilot study. *International Journal of Experimental Pathology*.101:87–95.
- Ergün, S., Güney, S., Temiz, E., Petrovic, N., Güneş, S. (2018). Significance of miR-15a-5p and CNKSR3 as Novel Prognostic Biomarkers in Non-Small Cell Lung Cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*.18(12):1695-1701.
- Ertabaklar, H., Dayanır, V., Apaydın, P., Ertuğ, S., Walochnik, J. (2009). Olgu Sunumu: *Acanthamoeba Keratiti*. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33 (4): 283-285.
- Faydaoğlu, E., Sürücüoğlu, M.S. (2011). Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi*, 11 (1): 52 – 67.
- Fiori, P.L., Mattana, A., Dessì, D., Conti, S. (2006). In vitro acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide. *J Antimicrob Chemother*, 57(5):891–898.
- Fordham, IM., Clevidence, BA., Wiley, ER., Zimmerman, RH. (2001). Fruit of autumn olive, a rich source of lycopene. *Hort. Sci.* 36:1136-1137.
- Francis, M., Chacha, M., Ndakidemi, P., Mbega, E. (2021). Antifungal effects against *Phaeoisariopsis personata* under greenhouse conditions and phytochemical

- analysis of *Jatropha curcas* leaf extracts. International Journal Of Agriculture & Biology, 26(2) 231–240.
- Galarza, C., Ramos, W., Gutierrez, E. L., Ronceros, G., Teran, M., Uribe, M., Ortega-Loayza, A. G. (2009). Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients. International Journal of Dermatology, 48, 1324-1329.
- Gopinath, V., MubarakAli, D., Priyadarshini, S., Priyadharsshini, N. M., Thajuddin, N., Velusamy, P. (2012). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: a novel biological approach. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 96, 69-74.
- Gül, V. ve Seçkin Dinler, S.B. (2016). Kumru (Ordu) yöresinde doğal olarak yetişen bazı tıbbi ve aromatik bitkiler. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 11 (1):146-156.
- Habib, H. M., El-Fakharany, E. M., El-Gendi, H., El-Ziney, M. G., El-Yazbi, A. F., Ibrahim, W. H. (2023). Palm Fruit (*Phoenix dactylifera* L.) Pollen Extract Inhibits Cancer Cell and Enzyme Activities and DNA and Protein Damage. Nutrients, 15(11), 2614.
- Huang, F. C., Shih, M. H., Chang, K. F., Huang, J. M., Shin, J. W., Lin, W. C. (2017). Characterizing clinical isolates of *Acanthamoeba castellanii* with high resistance to polyhexamethylene biguanide in Taiwan. Journal of microbiology, immunology and infection, 50(5), 570-577.
- Hulkoti, N.I., Taranath, T.C. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes—a review. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 121, 474–483.
- Inbaneson, S.J., Ravikumar, S., Suganthi, P. (2012). In vitro antiplasmodial effect of ethanolic extracts of traditional medicinal plant *Ocimum* species against *Plasmodium falciparum*. Asian Pac J Trop Med., 5(2):103–106.
- Issa, N. K., Abd-Aljabar, R. S. (2017). Phytochemical analysis, antioxidant (DNA Nicking Assay) and antibacterial activities of *Morus nigra* L. fruits secondary metabolites. Science Journal of University of Zakho, 5(2), 198-204.
- Jain, D., Daima, H. K., Kachhwaha, S., Kothari, S. L. (2009). Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using *Carica papaya* fruit extract and evaluation of their anti microbial activities. Digest journal of nanomaterials and biostructures, 4(3), 557-563.
- Janovská, D., Kubíková, K., Kokoška, L. (2003). Screening for Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants Species of Traditional Chinese Medicine. Czech J. Food Sci., 21:107-110.
- Jarczак, J., Kaba, J., Bagnicka, E. (2014). The validation of hou-sekeeping genes as a reference in quantitative Real Time PCR analysis: application in the milk somatic cells and frozen whole blood of goats in-fected with caprine arthritis encephalitis virus. Gene, 549(2): 280-5.
- Jercic, M. I., Aguayo, C., Saldarriaga-Córdoba, M., Muiño, L., Chenet, S. M., Lagos, J., ve ark. (2019). Genotypic diversity of *Acanthamoeba* strains isolated from Chilean patients with *Acanthamoeba* keratitis. Parasites & vectors, 12(1), 1-7

- Jha, V., Risbud, A., Matharoo, D. K., Preman, G., Thube, S., Bhosale, A., Aslam, F. (2022). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil obtained from *Jasminum Sambac*. J. Plant Biol. Crop. Res, 5, 1065.
- John, D.T., Howard, M.J. (1996). Techniques for isolating thermotolerant and pathogenic free-living amebae. Folia Parasitology, 43: 267-271.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol, 2(2):123-40.
- Karakurt, S. (2019). *Halopteris scoparia* (Phaeophyta) Ekstraktı ile Gümüş Nanopartikül Sentezlenmesi-Karakterizasyonu ve Patojenik. In V. International Congress on Natural and Health Sciences (ICNHS-2019).
- Karnani RL, Chowdhary A. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticle by eco-friendly method. Ind J NanoSci, 1(2): 25-31.
- Kaynak, B. (2017). *Ornithogalum sigmaideum* ve *Trachystemon orientalis*' in *Acanthamoeba castellanii* kistleri ve trofozoitleri üzerine in vitro amoebisidal aktivitelerinin araştırılması. Yüksek lisans tezi, Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ordu.
- Kaynak, B., Koloren, Z., Karaman, U. (2018). Investigation of in vitro amoebicidal activities of *Ornithogalum sigmaideum* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. Annals of Medical Research, 25(4): 709-15.
- Kaynak, B., Koloren, Z., Karaman, U. (2019). Investigation of In Vitro Amoebicidal Activities of *Trachystemon orientalis* on *Acanthamoeba castellanii* Cysts and Trophozoites. Van Medical Journal, 26 (4):483-490.
- Keane, N. A., Lane, L. M., Canniff, E., Hare, D., Doran, S., Wallace, E., Vandenberghe, E. (2020). A surviving case of *Acanthamoeba* granulomatous amebic encephalitis in a hematopoietic stem cell transplant recipient. The American Journal of Case Reports, 21, e923219-1.
- Kendir, G. ve Güvenç, A. (2010). Etnobotanik ve Türkiye’de yapılmış Etnobotanik çalışmalara genel bir bakış. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 30 (1):49–80.
- Khan, N. A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS microbiology reviews, 30(4), 564-595.
- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomed Nanotechnol Biol Med 3:95–101
- Kim, S., Choi, JE., Choi, J., Chung, KH., Park, K., Yi, J. and Ryu, DY. (2009). Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. Toxicology in Vitro, 23 (6): 1076-1084.
- Kirbag, S., Erecevit, P., Zengin, F., Guvenc, A. N. (2013). Antimicrobial activities of some *Euphorbia* species. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 10(5), 305-309

- Kliescikova, J., Kulda, J., Nohynkova, E. (2011). Stress-induced pseudocyst formation- a newly identified mechanism of protection against organic solvents in *Acanthamoebae* of the T4 genotype. *Protist*, 162(1), 58-69.
- Kohlmeier, L., Kark, J.D., Gomez, G.E., Martin, B.C., Steck, S.E. (1997). Lycopene and myocardial infarction risk in the Euramc study. *Am J Epidemiol* 146; 618-626.
- Kolören, Z. (2007). *Cryptosporidium parvum*'da Transient Transformasyon. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana.
- Kong, H.H., Kim, T.H., Chung, D.I. (2000). Purification and characterization of a secretory serine proteinase of *Acanthamoeba healyii* solated from GAE. *Journal of Parasitology*, 86: 12-17
- Kopar, N., Rencüzoğulları, E. (2012). *Salvia fruticosa* yaprak ekstraktının insan periferel lenfositlerinde sitotoksik etkisi. Çukurova Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 28(4):21-31
- Korkmaz Ağaoğlu, Ö., Sidekli, Ö. (2020). Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Çalışmalarında Uygun Housekeeping Genlerin (HKGs) Seçimi ve Validasyonu. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine, Erciyes University/Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17(1).
- Korkmaz, N. (2019). *Saintpaulia* sulu yaprak özütü kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküllerin antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9(4), 2225-2234.
- Kuppusamy P, Yusoff MM, Maniam GP, Govindan N. (2016). Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications an updated report. *Saudi Pharm J* 24:473–484
- Lakshmanan, G., Sathiyaseelan, A., Kalaichelvan, P. T., Murugesan, K. (2018). Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles using fruit extract of *Cleome viscosa* L. assessment of their antibacterial and anticancer activity. *Karbala International Journal of Modern Science*, 4(1), 61-68.
- Lee, HY., Park, HK., Lee, M., Kim, K., Park, S.B. (2007). A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. *Chemical Communications*, 28: 2959- 2961.
- Lewin, R. (2000). Modern insanın kökeni, TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları, Çeviri: N. Özüaydın, 7. basım, TÜBİTAK, Ankara.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.*, 4(8): 118–126.
- Lopez-Alarcona C, Denicola A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta*, 763: 1e10.
- Ma, X. H., Zheng, C. J., Han, L. Y., Xie, B., Jia, J., Cao, Z. W. Chen, Y. Z. (2009). Synergistic therapeutic actions of herbal ingredients and their mechanisms from molecular interaction and network perspectives. *Drug discovery today*, 14(11-12), 579-588.

- Madencioğlu, D. (2014). Endemik *Dorystoechas hastata* boiss. & heldr. ex bentham uçucu yağının bazı *Acanthamoeba* türleri üzerine amebisid etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, İzmir.
- Maghsood, A.H., Sissons, J., Rezaian, M., Nolder, D. (2005). *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *J Med Microbiol*, 54(8):755-759.
- Malatyali, E., Tepe, B., Degerli, S., Berk, S., Akpulat, H.A. (2011). In vitro amoebicidal activity of four *Peucedanum* species on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Parasitol Research*, 110:167–174.
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2): 273-307.
- Maregesi, S.M., Pieters, L., Ngassapa, O.D., Apers, S., Vingerhoets, R., Cos, P., Berghe, D.A., Vlietinck, A.J. (2008). Screening of Some Tanzanian Medicinal Plants from Bunda District for Antibacterial, Antifungal and Antiviral Activities. *J. Ethnopharmacol.*, 119:58-66.
- Mathur, A., Kushwaha, A., Dalakoti, V., Dalakoti, G. and Singh, DS. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plant and its characterization. *Der Pharmacia Lettre*, 5: 118–122.
- Mattana, A., Biancu, G., Alberti, L., Accardo, A. (2004). In vitro evaluation of the effectiveness of the macrolide rokitamycin and chlorpromazine against *Acanthamoeba castellanii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(12):4520–4527.
- Matthews, V. (1994). Chemical composition of *Elaeagnus umbellata*. The new plantsman. London Royal Horticultural Society. 1352-4186.
- Meng, F. U., Hui-Jin, F. E. N. G., Yu, C. H. E. N., De-Bin, W. A. N. G., Guang-Zhong, Y. A. N. G. (2012). Antioxidant activity of *Garcinia xanthochymus* leaf, root and fruit extracts in vitro. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 10(2), 129-134.
- Mier-Giraldo, H., Díaz-Barrera, L. E., Delgado-Murcia, L. G., Valero-Valdivieso, M. F., Cáez-Ramírez, G. (2017). Cytotoxic and immunomodulatory potential activity of *Physalis peruviana* fruit extracts on cervical cancer (HeLa) and fibroblast (L929) cells. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 22(4), 777-787.
- Mindell, E. (2003). Mucize Bitkiler. Prestij yayınları, İstanbul, Türkiye, 336s.
- Minhas, F. A., Rehaman, H. U., Yasin, A., Awan, Z. I., Ahmed, N. (2013). Antimicrobial activities of the leaves and roots of *Elaeagnus umbellata* Thunb. *African Journal of Biotechnology*, 12(48), 6754-6760.
- Miranda, N. C., Araujo, E. C. B., Justino, A. B., Cariaco, Y., Mota, C. M., Costa-Nascimento, L. A., Silva, N. M. (2021). Anti-parasitic activity of *Annona muricata* L. leaf ethanolic extract and its fractions against *Toxoplasma gondii* in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 273, 114019.
- Mittal, J., Singh, A., Batra, A., & Sharma, M. M. (2017). Synthesis and characterization of silver nanoparticles and their antimicrobial efficacy. *Particulate Science and Technology*, 35(3), 338-345.

- Moon, E. K., Hong, Y., Chung, D. I., Goo, Y. K., Kong, H. H. (2014). Down-regulation of cellulose synthase inhibits the formation of endocysts in *Acanthamoeba*. *The Korean journal of parasitology*, 52(2), 131.
- Moon, E. K., Kong, H. H. (2012). Short-cut pathway to synthesize cellulose of encysting *Acanthamoeba*. *The Korean journal of parasitology*, 50(4), 361.
- Motavallihaghi, S., Khodadadi, I., Goudarzi, F., Afshar, S., Shahbazi, A. E., Maghsood, A. H. (2022). The role of *Acanthamoeba castellanii* (T4 genotype) antioxidant enzymes in parasite survival under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. *Parasitology International*, 87, 102523.
- Mortazavi-Derazkola, S., Yousefinia, A., Naghizadeh, A., Lashkari, S., & Hosseinzadeh, M. (2021). Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using *Elaeagnus angustifolia* Bark Extract and Study of Its Antibacterial Effect. *Journal of Polymers and the Environment*, 1-9.
- Muchesa, P., Mwamba, O., Barnard, T. G., & Bartie, C. (2014). Detection of Free-Living Amoebae Using Amoebal Enrichment in a Wastewater Treatment Plant of Gauteng Province, South Africa. *BioMed research international*, 2014(1), 575297.
- Musa, N. S., Ramli, N. M., Saidin, J., Andriani, Y. (2017). Antioxidant And Cytotoxicity Properties Of Ethyl Acetate Fractions Of *Pandanus tectorius* Fruit Against HeLa Cell Lines. *Alotrop Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia*, 1(2):106–112.
- Nartop, P. (2017). Biyosentetik gümüş nanopartiküllerinin *Pyracantha coccinea* bitkisinin gövde eksplantlarının yüzey sterilizasyonunda kullanımı. *Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 23(6), 759-761.
- Nartop, P. (2019). Yeşil sentez yolu ile gümüş nanopartiküllerin elde edilmesinde bitkisel ekstraktlerin indirgeyici ajan olarak kullanılması. *Eskişehir Teknik Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji*, 8(1), 50-60.
- Natarajan, R. K., Nayagam, A. A. J., Gurunagarajan, S., Muthukumar, N. E., Manimaran, A. (2013). *Elaeagnus indica* mediated green synthesis of silver nanoparticles and its potent toxicity against human pathogens. *World Applied Sciences Journal*, 23(10), 1314-1321.
- Nazir, N., Zahoor, M., Nisar, M., Khan, I., Ullah, R., Alotaibi, A. (2021). Antioxidants isolated from *Elaeagnus umbellata* (Thunb.) protect against bacterial infections and diabetes in streptozotocin-induced diabetic rat model. *Molecules*, 26(15), 4464.
- Nitbani, F. O., Siswanta, D., & Solikhah, E. N. (2016). Isolation and antibacterial activity test of lauric acid from crude coconut oil (*Cocos nucifera* L.). *Procedia Chemistry*, 18, 132-140.
- Oh, S. I., Lee, M. S. (2008). Antioxidative and cytotoxic effects of ethanol extracts from *Elaeagnus multiflora*. *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 21(4), 403-409.



- Öztürk, B. Y., Öztürk, D. (2020). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticle using *Tilia rubra* DC. extract and antifungal activity.
- Pai, A., Shenoy, C. (2020). Physicochemical, phytochemical, and GC–MS analysis of leaf and fruit of *Pouteria campechiana* (Kunth) Baehni. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 8(4), 90-97.
- Patel, S., Gheewala, N., Suthar, A., Shah, A. (2009). In-vitro cytotoxicity activity of *Solanum nigrum* extract against Hela cell line and Vero cell line. *Int J Pharm Pharm Sci*, 1(1), 38-46.
- Phanjom, P., Sultana, A., Sarma, H., Ramchiary, J., Goswami, K., Baishya, P. (2012). Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles using *Elaeagnus latifolia* leaf extract. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(3), 1117-1123.
- Potter, T.L. (1995). Floral volatiles of *Elaeagnus umbellata* Thunb. *J. Essent. Oil Res.*7(4):347-354.
- Putaporntip, C., Kuamsab, N., Nuprasert, W., Rojrung, R., Pattanawong, U., Tia, T., Jongwutiwes, S. (2021). Analysis of *Acanthamoeba* genotypes from public freshwater sources in Thailand reveals a new genotype, T23 *Acanthamoeba bangkokensis* sp. nov. *Scientific reports*, 11(1), 17290.
- Qanash, H., Yahya, R., Bakri, M. M., Bazaid, A. S., Qanash, S., Shater, A. F., TM, A. (2022). Anticancer, antioxidant, antiviral and antimicrobial activities of Kei Apple (*Dovyalis caffra*) fruit. *Scientific Reports*, 12(1), 5914.
- Ramesh, P. S., Kokila, T., & Geetha, D. (2015). Plant mediated green synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles using *Emblica officinalis* fruit extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 142, 339-343.
- Rashid, M. M. O., Akhter, K. N., Chowdhury, J. A., Hossen, F., Hussain, M. S., Hossain, M. T. (2017). Characterization of phytoconstituents and evaluation of antimicrobial activity of silver-extract nanoparticles synthesized from *Momordica charantia* fruit extract. *BMC complementary and alternative medicine*, 17:336.
- Rayan, P., Stenzel, D., McDonnell, P. A. (2005). The effects of saturated fatty acids on *Giardia duodenalis* trophozoites in vitro. *Parasitology research*, 97, 191-200.
- Rayan, P., & McDonnell, P. A. (2014). Dietary Supplementation of Dodecanoic Acid in Maternal Mice Enhances Resistance to *Giardia duodenalis* Infection in Suckling Neonatal Pups. *Pharmacognosy Communications*, 4(4).
- Renda, G., Arzu, Ö. Z. E. L., Barut, B., Korkmaz, B., Yayli, N. (2018). In vitro protection by *Crataegus microphylla* extracts against oxidative damage and enzyme inhibition effects. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 77.
- Renuka, R., Devi, K. R., Sivakami, M., Thilagavathi, T., Uthrakumar, R., Kaviyarasu, K. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Phyllanthus emblica* fruit extract for antimicrobial application. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 24, 101567.

- Řiháková, Z., Plocková, M., Filip, V., & Šmidrkal, J. (2001). Antifungal activity of lauric acid derivatives against *Aspergillus niger*. *European Food Research and Technology*, 213, 488-490.
- Sabir, M. S., Ahmad, D. S., Imtiaz, H., Tahir, K. M. (2007). Antibacterial activity of *Elaeagnus umbellata* (Thunb.) a medicinal plant from Pakistan. *Saudi medical journal*, 28(2), 259.
- Salari, S., Bahabadi, S. E., Samzadeh-Kermani, A., Yosefzaei, F. (2019). In-vitro evaluation of antioxidant and antibacterial potential of greensynthesized silver nanoparticles using *Prosopis farcta* fruit extract. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 18(1), 430.
- Salehi, S., Shandiz, S. A. S., Ghanbar, F., Darvish, M. R., Ardestani, M. S., Mirzaie, A., Jafari, M. (2016). Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Artemisia marschalliana* Sprengel aerial part extract and assessment of their antioxidant, anticancer, and antibacterial properties. *International journal of nanomedicine*, 11, 1835.
- Saxena, S., Hajare, S. N., More, V., Kumar, S., Wadhawan, S., Mishra, B. B., Sharma, A. (2011). Antioxidant and radioprotective properties of commercially grown litchi (*Litchi chinensis*) from India. *Food Chemistry*, 126(1), 39-45.
- Saygı, G., Polat, Z. (2003). Özgür yaşayan amipler ve neden oldukları parazitözler (Primer Amibik Meningoensefalit -Granülomatöz Amibik Ensefalit – Keratit), *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 25 (3):140 – 149.
- Sekar, S., Kandavel, D. (2010). Interaction of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Endophytes with Medicinal Plants New Avenues for Phytochemicals. *J. Phytology*, 2: 91-100.
- Sengani, M., Grumezescu, A.M., Rajeswari, V. D., (2017). Recent trends and methodologies in gold nanoparticle synthesis a prospective review on drug delivery aspect. *Open Nano*, 2, 37–46
- Shamaila, S., Sajjad, A.K.L., Ryma, N., Farooqi, S.A.F., Jabeen, N., Sania Majeed, Farooq, I., (2016). Advancements in nanoparticle fabrication by hazard free eco-friendly green routes. *Applied Materials Today*, 5, 150–199. 40-549.
- Shankar, P. D., Shobana, S., Karuppusamy, I., Pugazhendhi, A., Ramkumar, V. S., Arvindnarayan, S., Kumar, G. (2016). “A review on the biosynthesis of metallic nanoparticles (gold and silver) using bio-components of microalgae: Formation mechanism and applications “, *Enzyme and Microbial Technology*, 95, 28–44.
- Sharma, VK., Yngard, RA., Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci.* 145(1–2):83–96.
- Siddiqui, R., Khan, N.A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*, 5: 6.
- Sifaoui, I., Zeouk, I., Reyes-Batlle, M., Lopez-Arencibia, A., Piñero, J. E., Lorenzo-Morales, J. (2022). Inhibition of *Acanthamoeba polyphaga* by chlorhexidine-mediated oxidative stress response. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 30, 468-473.

- Singha, I., Saxena, S., Gautam, S., Saha, A., Das, S. K. (2020). Grape extract protect against ionizing radiation-induced DNA damage. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 57(4), 219-227.
- Shibula, K., Velavan, S. (2015). Determination of phytochemicals in methanolic extract of *Annona muricata* leaf using GC-MS technique. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(6), 1251-1255.
- Singh, B., Dutt, N., Kumar, D., Singh, S., Mahajan, R. (2011). Taxonomy, Ethnobotany and Antimicrobial Activity of *Croton bonplandianum*, *Euphorbia hirta* and *Phyllanthus fraternus*. *J. Adv. Develop. Res.*, 2:21-29.
- Srinivasan, R., Aruna, A., Manigandan, K., Pugazhendhi, A., Kim, M., Shivakumar, M.S., Natarajan, D. (2019). Phytochemical, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative potential of *Elaeagnus indica*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 20 (2019) 101265.
- Stetkevich, S. A., Le, S. T., Ford, A. R., Brassard, A., Kiuru, M., Fung, M. A., Tartar, D. M. (2022). Isolated cutaneous acanthamoebiasis under prophylactic 55 anticytotoxic treatment in an immunocompromised patient. *JAAD Case Reports*, 28, 77-79.
- Suganya, S., Ishwarya, R., Jayakumar, R., Govindarajan, M., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Vaseeharan, B. (2019). New insecticides and antimicrobials derived from *Sargassum wightii* and *Halimeda gracillis* seaweeds: Toxicity against mosquito vectors and antibiofilm activity against microbial pathogens. *South African Journal of Botany*, 125, 466-480.
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., Mohanty, S. K., Sinniah, U. R. (2015). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using fruit extract of *Momordica cymbalaria* and assessment of their in vitro antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity activities. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 151, 939-944.
- Tailulu, A., Li, M., Zheng, Q., Zhu, Z., Wang, H., Jiang, Q., Shi, P. (2021). Identification of antimicrobial active components from dry Hainan *Morinda citrifolia* Linn (Noni) fruit using GC-MS. *Int. J. Food Sci. Nutr*, 6(4), 65-71.
- Tessema, E. N., Neubert, R., Fobofou, S. A. T., Gebre-Mariam, T., Schmidt, J., Franke, K., Arnold, N. (2018). Anthelmintic activity-guided fractionation and GC-MS analysis of extracts from *Embelia schimperi* fruits. *Int J Appl Res Nat Prod*, 11, 11-16.
- Tilli, TM., Castro, CS., Tuszynski, JA., Carels, N. (2016). A strategy to identify housekeeping genes suitable for analysis in breast cancer diseases. *BMC Genomics*, 17(1): 639.
- Trocha, L., Stobienia, O. (2007). Response of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria to oxidative stress. *Acta Biochimica Polonica*, 54(4), 797-803.
- Vahabi, L., Monajemi, R., Shahanipou, K., Moridnia, A., Mortazavifar, F. (2014). Studying the cytotoxic effect of methanolic extract of *Pyracantha coccinea* M. Roemer fruit on HeLa cell line and antioxidant capacities and total phenol

contents of methanolic and aquatic extract of this fruit. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 8.

- VanGuilder, HD., Vrana, KE., Freeman, WM. (2008). Twentyfive years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44(5): 619-26.
- Vanlalveni, C., Lallianrawna, S., Biswas, A., Selvaraj, M., Changmai, B., Rokhum, S. L. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their antimicrobial activities: a review of recent literature. *RSC Advances*, 11(5), 2804-2837.
- Visvesvara, G. S., Moura, H., Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 50(1), 1-26.
- Wang, Y., O'Connor, D., Shen, Z., Lo, I.M.C., Tsang, D.C.W., Pehkonen, S., Pu, S., Hou, D., (2019). Green synthesis of nanoparticles for the remediation of contaminated waters and soils: constituents, synthesizing methods, and influencing factors. *Journal of Cleaner Production*, 226, 5
- Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z. S., Chen, G. (2015). Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug discovery today*, 20(5), 595-601.
- Winck, M.A.T., Caumo, K., Rott, M.B. (2011). Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in rio grande do Sul, Brazil. *Curr Microbiol*, 63(5):464–469.
- Ya, W., Shang-Zhen, Z., Chun-Meng, Z., Tao, G., Jian-Ping, M., Ping, Z., Qiu-xiu, R. (2014). Research Article Antioxidant and Antitumor Effect of Different Fractions of Ethyl Acetate Part from *Elaeagnus angustifolia* L. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 6(5), 707-710.
- Yazar, S., Gürbüz, E., Sönmez, M. F., Çetinkaya, Ü., Kuk, S. (2019). Türkiye'deki Sularda Serbest Yaşayan Potansiyel Patojen Amipler ve Patojenitelerinin in Vivo Olarak Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 50(3), 449-459.
- Yer, M. (2012). Gümüş Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye.
- Zafar, M., Mehmood, A. (2023). Antioxidant and Antibacterial Activity of *Elaeagnus umbellata* from Rawalakot, Azad Kashmir. *Planta Animalia*, 2(2), 63-67.
- Zahedifard, F., Lee, H., No, J. H., Salimi, M., Seyed, N., Asoodeh, A., & Rafati, S. (2019). Anti-leishmanial activity of Brevinin 2R and its Lauric acid conjugate type against L. major: In vitro mechanism of actions and in vivo treatment potentials. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(2), e0007217.
- Zhang, Y., Xu, X., Wei, Z., Cao, K., Zhang, Z., Liang, Q. (2023). The global epidemiology and clinical diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Journal of Infection and Public Health*. 16, 841–852.
- Zulfiqar, H., Amjad, M. S., Mehmood, A., Mustafa, G., Binish, Z., Khan, S., Pérez de la Lastra, J. M. (2022). Antibacterial, antioxidant, and phytotoxic potential of Phytosynthesized silver nanoparticles using *Elaeagnus umbellata* fruit extract. *Molecules*, 27(18), 5847.

## ÖZGEÇMİŞ

<b>Kişisel Bilgiler</b>	
Adı Soyadı	Bülent Kaynak
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
<b>Eğitim Bilgileri</b>	
<b>Önlisans</b>	
Üniversite	Kocaeli Üniversitesi
Fakülte	Kocaeli Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu
Bölümü	Tıbbi Laboratuvar
Mezuniyet Yılı	09.07.2010
<b>Önlisans</b>	
Üniversite	Anadolu Üniversitesi
Fakülte	Açıköğretim Fakültesi
Bölümü	Adalet
Mezuniyet Yılı	03.06.2013
<b>Lisans</b>	
Üniversite	Kocaeli Üniversitesi
Fakülte	Kocaeli Sağlık Yüksekokulu
Bölümü	Sağlık Memurluğu
Mezuniyet Yılı	18.07.2003
<b>Lisans</b>	
Üniversite	Anadolu Üniversitesi
Fakülte	Açıköğretim Fakültesi
Bölümü	Kamu Yönetimi
Mezuniyet Yılı	25.05.2015
<b>Lisans</b>	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	16.06.2013
<b>Yüksek Lisans</b>	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Tezli Yüksek Lisans
Mezuniyet Tarihi	27.12.2017

<b>Doktora</b>	
Üniversite	Ordu Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Doktora
Mezuniyet Tarihi	29.08.2024
<b>Yayınlar</b>	
<p>Kaynak, B., Koloren, Z. and Karaman, Ü., “Investigation of in vitro amoebicidal activities of <i>Ornithogalum sigmoideum</i> on <i>Acanthamoeba castellanii</i> cysts and trophozoites”, <i>Annals of Medical Research</i>, 25(4) 709-715, (2018).</p> <p>Kaynak, B., Kolören, Z. and Karaman, Ü., “Investigation of in vitro amoebicidal activities of <i>Trachystemon orientalis</i> on <i>Acanthamoeba castellanii</i> cysts and trophozoites.” <i>Van Medical Journal</i>, 26(4) 483-490, (2019).</p>	