

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN *IN VITRO* KOŞULLARDA
YETİŞTİRİLEN *M. OFFICINALIS* L. FİDELERİ ÜZERİNDEKİ
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nilhan Elif UZUN

EKİM 2024

TRABZON



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN *IN VITRO* KOŞULLARDA
YETİŞTİRİLEN *M. OFFICINALIS* L. FİDELERİ ÜZERİNDEKİ
BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nilhan Elif UZUN

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde
"YÜKSEK LİSANS (MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK)"
Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 06 /09 /2024

Tezin Savunma Tarihi : 04 /10 /2024

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ

Trabzon 2024

ÖNSÖZ

“Gümüş Nanopartiküllerin *in vitro* Koşullarda Yetiştirilen *M. officinalis* L. Fideleri Üzerindeki Biyokimyasal ve Moleküler Etkilerinin Araştırılması” adlı bu çalışma TÜBİTAK 121Z818 numaralı araştırma projesinden sağlanan destek ile Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübelerini aktararak bana yol gösteren, öğrencisi olmaktan büyük onur duyduğum danışmanım saygıdeğer hocam Prof. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ’a gösterdiği sabır ve emek için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın belirlenmesinde yardımcı olan, değerli bilgi ve tecrübeleri ile tezimin tamamlanmasına katkıda bulunan saygıdeğer hocam Doç. Dr. Ersan BEKTAŞ’a, eğitimim süresince değerli bilgilerinden faydalandığım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ali Osman BELDÜZ’e, Prof. Dr. Sabriye ÇANAKÇI’ya ve Doç. Dr. Halil İbrahim GÜLER’e, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Dilşat Nigar ÇOLAK’a, Dr. Öğr. Üyesi Fulya AY’a, Arş. Gör. Aleyna ŞENOCAK’a, Arş Gör. Esma CEYLAN ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, arkadaşlarım Zeynep TÜRKER, Sedefgül KOÇALİ, Duygu ŞİMŞEK ve Ece Nisa İMAMOĞLU’na teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyerek yanımda olan teyzem Birgül Yavuz’a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, hayatım boyunca her zaman en iyisini yapabileceğime inanarak beni cesaretlendiren, hayatımın her anında yanımda olarak bana güç veren, karşılaştığım her zorluğun üstesinden gelmemi sağlayan, attığım her adımda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyerek arkamda duran ve bugün olduğum noktaya gelmemi sağlayan, bu hayattaki en büyük şanslarım kardeşim Mustafa Kemal UZUN, annem Nilgün UZUN ve babam Turhan UZUN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Nilhan Elif UZUN

Trabzon 2024

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum ‘Gümüş Nanopartiküllerin *in vitro* Koşullarda Yetiştirilen *M. officinalis* L. Fideleri Üzerindeki Biyokimyasal Ve Moleküler Etkilerinin Araştırılması’ başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ’ın sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarımda yaptığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metin de ve kaynakça da eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma süresince bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 04.10.2024

Nilhan Elif UZUN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. <i>M. officinalis</i> Bitkisinin Genel Özellikleri	3
1.3. Sekonder Metabolitler	6
1.3.1. Fenolik Bileşikler	7
1.3.2. Fenolik Bileşiklerin Biyosentez Yolları.....	9
1.3.3. Fenilpropanoid Biyosentez Yolu	10
1.4. Bitki Doku Kültürü.....	11
1.5. Nanoteknoloji	12
1.5.1. Nanopartiküller	12
1.5.2. Metal Bazlı Nanopartiküller.....	14
1.5.3. Gümüş Nanopartiküller	14
1.5.4. Bitki Doku Kültüründe Nanopartiküllerin Uygulanması.....	15
1.6. HIV Virüsü	15
1.6.1. HIV-1 Yapısı.....	16
1.6.2. HIV-1 Replikasyonu	17
1.7. Revers Transkriptaz Enzimi	19
1.8. Antiretroviral Tedavi.....	19
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	22
2.1. Materyal.....	22
2.1.1. Kullanılan Cihazlar	22
2.1.2. Kullanılan Kitler	23

2.1.3.	Kullanılan Besiyerleri	24
2.1.4.	Kullanılan Mikroorganizmalar.....	25
2.2.	Metod.....	25
2.2.1.	Bitkisel Materyalin Temini ve Sterilizasyonu	25
2.2.2.	Nanopartikül (Elisitör) Uygulaması.....	26
2.2.3.	Fidelerin Hasat Edilmesi ve Saklanması.....	26
2.2.4.	Fenolik Maddelerin Ekstraksiyonu	27
2.2.5.	Fenolik Maddelerin HPLC ile Tayini	27
2.2.6.	Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini	27
2.2.7.	Bakteri Kùltürlerinin Hazırlanması.....	28
2.2.8.	Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	28
2.2.9.	HIV-1 RT İnhibisyonu Çalışmaları.....	29
2.2.10.	Bitkiden Total RNA İzolasyonu	30
2.2.11.	cDNA Sentezi	31
2.2.12.	Real-Time PCR Uygulamaları	32
3.	BULGULAR.....	34
3.1.	Fenolik Maddelerin Ekstraksiyonu	34
3.2.	Fenolik Maddelerin HPLC ile Tayini.....	34
3.3.	Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Tayini	37
3.4.	Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları.....	38
3.5.	HIV-1 RT İnhibisyonu Çalışmaları.....	41
3.6.	Gen Ekspresyonu Çalışmaları	42
4.	TARTIŞMA	45
5.	SONUÇLAR.....	57
6.	ÖNERİLER.....	58
7.	KAYNAKÇA.....	60
	ÖZGEÇMİŞ	

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN *IN VITRO* KOŞULLARDA YETİŞTİRİLEN *M. OFFICINALIS* L. FİDELERİ ÜZERİNDEKİ BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nilhan Elif UZUN

Karadeniz Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ
2024, 73 Sayfa

Bu çalışmada, *in vitro* koşullarda yetiştirilen ve farklı konsantrasyonlarda AgNP stresine maruz bırakılan *M. officinalis* L. fidelerinden elde edilen metanol ekstraktlarının Folin yöntemi ile toplam fenolik içeriği, HPLC ile fenolik profilleri, Microwell-seyreltme yöntemi ile antimikrobiyal aktiviteleri, Ters Transkriptaz Analiz Kiti (kolorimetrik) ile HIV-1 RT inhibisyon kapasiteleri ve qPCR yöntemi ile PAL gen ekspresyon düzeyindeki değişimler gibi biyokimyasal ve moleküler değişimler belirlenmiştir. Sonuç olarak AgNP uygulamalarının kontrol ile kıyaslandığında incelenen parametrelerde konsantrasyona göre farklılık gösterdiği ve çoğunlukla yüksek olduğu, en yüksek toplam fenolik madde miktarının (68.250 mg GAE/ g bitki), baskın fenolik olan rosmarinik asit miktarının (41.059 µg fenolik/mg bitki) ve HIV-1 RT inhibisyonunun (%39.65) 5 mg/L AgNP uygulamasında daha yüksek olduğu, en etkili MİK değerinin (2500 µg/mL) 5, 10 ve 20 mg/L AgNP konsantrasyonlarında olduğu, PAL geni ekspresyonunun en yüksek 42,16 kat artış ile 50 mg/L AgNP konsantrasyonunda olduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: *M. officinalis*, AgNP, Elisitör, Mikroçoğaltım, Anti-HIV-1 RT, HPLC, Antimikrobiyal, Gen Ekspresyonu

Master Thesis

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE BIOCHEMICAL AND MOLECULAR EFFECTS OF
SILVER NANOPARTICLES ON *M. OFFICINALIS* L. SEEDLINGS GROWN UNDER
IN VITRO CONDITIONS

Nilhan Elif UZUN

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Molecular Biology and Genetics Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Kadriye İNAN BEKTAŞ
2024, 73 Pages

In this study, biochemical and molecular changes such as total phenolic content by Folin method, phenolic profiles by HPLC, antimicrobial activities by Microwell-dilution method, HIV-1 RT inhibition capacities by Reverse Transcriptase Analysis Kit (colorimetric) and changes in PAL gene expression level by qPCR method were determined in methanol extracts obtained from *M. officinalis* L. seedlings grown under *in vitro* conditions and exposed to different concentrations of AgNP stress. As a result, it was observed that AgNP applications, when compared to the control, showed differences according to the concentration in the investigated parameters and were mostly high, the highest total phenolic substance amount (68.250 mg GAE/g plant), the dominant phenolic rosmarinic acid amount (41.059 µg phenolic/mg plant) and HIV-1 RT inhibition (39.65%) were higher in 5 mg/L AgNP application, the most effective MIC value (2500 µg/mL) was at 5, 10 and 20 mg/L AgNP concentrations, and the highest PAL gene expression was observed at 50 mg/L AgNP concentration with a 42.16-fold increase

Key Words: *M. officinalis*, AgNP, Elicitor, Micropropagation, Anti-HIV-1 RT, HPLC, Antimicrobial, Gene Expression

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. <i>M. officinalis</i> Bitkisinin Görünümü	5
Şekil 2. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	8
Şekil 3. Şikimik Asit Biyosentez Yolunun Basitleştirilmiş Gösterimi.....	9
Şekil 4. Fenilpropanoid Biyosentez Yolunun Basitleştirilmiş Gösterimi	10
Şekil 5. HIV-1 Genomik Organizasyonu	17
Şekil 6. HIV-1 Replikasyon Döngüsü	18
Şekil 7. Uygulamalardan Elde Edilen Fidelere Ait Ekstrakt Verimleri	34
Şekil 8. <i>M. officinalis</i> Ekstraktlarına Ait HIV RT İnhibisyon Etkileri.....	42
Şekil 9. Melting Curve (Erime Eğrisi) Analizi Sonuçları	43
Şekil 10. Ortalamaları Alınmış qPCR Analiz Sonuçları	43
Şekil 11. <i>M. officinalis</i> Fidelerine Ait Ekspresyon Profili	44

TABLÖLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. <i>M. officinalis</i> Taksonomisi.....	4
Tablo 2. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması.....	13
Tablo 3. Nanopartiküllerin Uygulama Alanları.....	13
Tablo 4. Kullanılan Cihazlar	22
Tablo 5. Kullanılan Kitler ve İçerikleri	23
Tablo 6. Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanması	24
Tablo 7. Kullanılan Mikroorganizmalar	25
Tablo 8. HIV-1 RT İnhibisyon Testi Kuyucuk İçeriği	30
Tablo 9. cDNA Sentez Bileşenleri- 1	32
Tablo 10. cDNA Sentez Bileşenleri- 2	32
Tablo 11. Dizayn Edilen Spesifik Primerler ve Özellikleri.....	33
Tablo 12. Real- Time PCR Kuyucuk İçeriği	33
Tablo 13. AgNP Stresine Maruz Bırakılan <i>M. officinalis</i> Fidelerinin Rosmarinik Asit Dışında Fenolik İçeriği	36
Tablo 14. AgNP Stresine Maruz Bırakılan <i>M. officinalis</i> Fidelerinin Rosmarinik Asit İçeriği	37
Tablo 15. Fidelerin Toplam Fenolik Madde Miktarları	37
Tablo 16. <i>M. officinalis</i> Ekstraktlarına Ait Antimikrobiyal Aktivite Değerleri	40

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
Ag	: Gümüş
AgNP	: Gümüş Nanopartikül
AIDS	: Edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromu
ART	: Antiretroviral Tedavi
BBD	: Bitki Büyüme Düzenleyicisi
cART	: Kombine Antiretroviral Tedavi
CCR5	: Kemokin Reseptörü Tip 5
CD4	: Yardımcı T Hücresi
CLSI	: Clinical And Laboratory Standards Institute
Cm	: Santimetre
Ct	: Threshold Cycle
CXCR4	: Kemokin Reseptörü Tip 4
ddH ₂ O	: Çift Distile Su
DEPC	: Diethyl Pyrocarbonate
dH ₂ O	: Distile Su
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
G	: Gram
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
Gp	: Glikoprotein
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HIV	: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IN	: İntegrin
KIN	: Kinetin
L	: Litre

L.	: Lamiaceace
LTR	: Uzun Tekrar Dizileri
Mg	: Miligram
MHB	: Müller Hinton Broth
ml	: Mililitre
MS	: Murashige & Skoog
NA	: Nutrient Agar
NaCl	: Sodyum Klorür
Nm	: Nanometre
NNRTI	: Non- Nükleozid Revers Transkriptaz İnhibitörleri
Np	: Nanopartikül
NRTI	: Nükleozid Revers Transkriptaz İnhibitörleri
<i>p</i> - INT	: <i>p</i> - Iodonitrotetrazolium
PAL	: Fenilalanin Amonyum Liyaz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PI	: Proteaz İnhibitörleri
PR	: Proteaz
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz Enzimi
RT	: Revers Transkriptaz
SDA	: Saboraud Dextrose Agar
Subsp.	: Subspecies

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

İnsanlar yüzyıllardır ilaçların ve aromatik bileşiklerin kaynağı olarak bitkileri kullanmışlardır. Tıbbi ve aromatik bitkilerin insan sağlığı üzerinde çok önemli etkileri olduğu bilinmektedir. İnsanlar tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen özütleri ilaç, tat ve koku bileşenleri, yiyecek katkı maddeleri ve pestisit gibi çeşitli amaçlarla kullanmaktadırlar (Arslan vd., 2022).

Tıbbi ve aromatik bitkilerden biri de *M. officinalis*'tir. Lamiaceae familyasının *Melissa* genusuna ait, çok yıllık, otsu bir bitki olan *M. officinalis* eski zamanlardan beri tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır (Katar & Katar, 2020). *M. officinalis* üç alt türe ayrılmakta olup, bu alt türler içerisinde sadece karakteristik limon kokusuna sahip olan *M. officinalis* subsp. *officinalis* türü tıbbi ve ticari değere sahiptir. *M. officinalis* bitki türü ile yapılan yapılan *in vivo*, *in vitro* ve klinik çalışmalarda bu bitkinin antibakteriyel, antiviral, antifungal, antidepresif, antitümoral ve antioksidatif etkiler gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (Şaşkara vd., 2010).

M. officinalis bitkisini önemli kılan etkenlerden biri içerdiği sekonder metabolitlerdir. Sekonder metabolitler, bitkiden elde edilen, bitkilerin yaşamsal fonksiyonları üzerinde doğrudan etkisi bulunmayan bileşiklerdir. Bitkinin çevresine adaptasyonunda, üremesinde, neslinin devam etmesinde, bitki savunmasında ve korunmasında önemlidirler. Bu bileşikler başta ilaç sanayisi olmak üzere tarım, gıda, kozmetik gibi birçok alanda kullanılan ekonomik açıdan oldukça önemli maddelerdir. Çok zengin bir bileşik grubunu içeren bu metabolitler başlıca terpenler, alkaloidler ve fenolik bileşikler olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Kapdan, 2023). Fenolik bileşikler sekonder metabolitlerin en büyük grubunu oluştururlar. Virüs, patojen, böcek saldırıları, UV radyasyonu, yaralanma, açlık ve metal stresi gibi baskılara tepki olarak sentezlenen bu bileşikler bitkinin savunmasında önemli rol oynarlar. Yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin insan sağlığı üzerinde antimikrobiyal ve antikanserojen gibi olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (Khalil vd., 2007; Kapdan, 2023). *M. officinalis* üzerinde yapılan çalışmalarla, terpenler ve fenolik bileşikler gibi çeşitli maddelerin varlığı ve miktarı belirlenmiştir (Allahverdiyev vd., 2004; Moradkhani vd., 2010) *M. officinalis* bitkisinin barındırdığı biyokompetentlerin çeşitliliği ve oranları bu bitkinin biyoaktif

etkinliğinin de bir göstergesidir. Etkilerinin çok yönlülüğü bilim insanlarını sekonder metabolit üretimini arttırmaya yönelik çalışmalar yapmaya yöneltmiştir. Günümüzde bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak insanlar için de oldukça önemli olan bu bileşiklerin üretimi önemli ölçüde hız kazanmıştır.

Bitki doku kültürü teknikleri sayesinde uygun çevre koşullarının sağlanması ile kısa zamanda, belirli bir alan içinde çok sayıda bitki elde edilebilmektedir (Bayhan, 2023). Günümüzde bitki ıslahı, bitki genom transformasyonu, haploid bitki elde edilmesi, çoğaltılması zor genotiplerin çoğaltılması, genetik olarak özdeş bitkilerin fazla miktarlarda üretilmesi, nesli tükenmekte olan türlerin korunması, patojenlerden ve hastalıklardan arındırılmış bitkilerin üretilmesi ve sekonder metabolitlerin elde edilmesi için bitki doku kültürü tekniklerine başvurulmaktadır (Babaoğlu vd., 2001; Korkmaz, 2013).

Bitkiler için oldukça önemli olan doku kültüründe aynı zamanda nanoteknolojik uygulamalardan da yararlanılmaktadır. Malzemelerin atom veya molekül boyutunda işlenmesi, ayrılması, birleştirilmesi ve bozulması olarak tanımlanan nanoteknoloji, pek çok alanı kapsayan bilimsel ve teknolojik çalışmalarda yenilikçi ve umut verici bir teknolojidir (Hey, 1999; Ersöz vd., 2018). Bilim insanları bitki doku kültürü çalışmalarına nanoteknolojiyi dahil ederek daha etkili ve verimli çalışmalar yapmayı hedeflemişlerdir. Nanoteknolojinin temelini oluşturan nanopartiküller, boyutu 1-100 nm aralığında olan parçacıklardır. Nanopartiküller fen bilimleri, sağlık, biyoteknoloji, tarım vb. alanlarda sıklıkla kullanılmaktadırlar. Metal bazlı nanopartiküller sahip oldukları katalitik aktivite, iletkenlik, antibakteriyel, antiviral, antifungal etki gibi özellikleri sayesinde bilim insanlarının dikkatini çekmektedirler (Genç, 2023). Metal bazlı nanopartiküller içerisinde en dikkat çeken gümüş nanopartiküldür. Nanoteknoloji uygulamalarında sıklıkla kullanılan AgNP, boyutu 1-100 nm arasında olan gümüş nanoparçacıklarından oluşmaktadır (Mody vd., 2010). AgNP'ler, mikroorganizmalara karşı gösterdiği aktivite sayesinde birçok alanda antibakteriyel uygulamalarda kullanılmaktadır (Xu vd., 2012). Yapılan çalışmalarda AgNP'lerin HIV-1 virüsü enfeksiyonu üzerinde etkisi olduğu da gözlenmiştir (Tunç, 2023).

Nanopartiküllerin, bitki doku kültüründe kullanımı ile *in vitro* şartlarda sekonder metabolit üretimine olumlu etkileri de gösterilmiştir. Bitki doku kültüründe sekonder metabolit üretimini arttırmaya yönelik kullanılan tekniklerden biri de metabolik yolları teşvik eden biyotik veya abiyotik elisitörlerin uygulanmasıdır. İstenilen bazı bileşiklerin sentezini arttırmak ve üretiminin devamlılığını sağlamak için *in vitro* elisitasyon işlemi kullanılmaktadır (Oksman-Caldentey & Inzé, 2004). Elisitörler, bitkilerde stres yanıtlarını

tetikleyen, bitki savunma sistemini harekete geçiren ve sekonder bileşiklerin biyosentezini sağlayan genlerin ekspresyonunu sağlayan sinyal molekülleridir (Zhao vd., 2005). Uygun kültür şartlarının sağlanmasıyla, elisitörlerin kültür ortamına dahil edilmesi ve kültür ortamındaki bileşenlerin optimizasyonu ile sekonder metabolit miktarının artışı sağlanabilmektedir (Kapdan, 2023). Sekonder metabolit biyosentezinde rol alan bazı önemli genler vardır. Bu genlerden biri de PAL'dir. PAL enzimi birçok bitkide sekonder metabolit üretiminin sağlandığı fenilpropanoid biyosentez yolunun ilk enzimidir ve ligninler, flavonoidler gibi birçok sekonder metabolitin üretiminden doğrudan sorumludur (Koukol & Conn, 1961; Ritter & Schulz, 2004; Şirin, 2013). Bitkisel sistemlerde kullanılan nanopartiküllerin etki mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle nanopartiküllerin bitki gelişiminde rol alan genlerin ifadeleri üzerindeki etkilerinin ortaya konulması önemlidir. Literatür taraması sonucunda; *in vitro* koşullarda AgNP uygulaması ile yetiştirilen *M. officinalis* fidelerinde antimikrobiyal aktivite, anti-HIV-1-RT enzim aktivitesi ve PAL geninin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yapılan bu tez çalışması kapsamında, farklı konsantrasyonlarda AgNP stresine maruz bırakılarak bitki doku kültürü uygulamalarıyla *in vitro* koşullarda yetiştirilen *M. officinalis* bitkisinde AgNP'lerin fenolik madde birikimi, antimikrobiyal aktivite, HIV-1 RT enzimi inhibisyon aktivitesi ve sekonder metabolit üretiminden sorumlu olan PAL geninin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkilerinin araştırılması ve bulunan sonuçlar neticesinde etkin *in vitro* çoğaltım sisteminin ve AgNP konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Planlanan bu tez çalışması ile elde edilecek bilgiler neticesinde literatüre katkı sağlanması amaçlanmıştır.

1.2. *M. officinalis* Bitkisinin Genel Özellikleri

Tıbbi ve aromatik bitkilerden biri olan ve birçok alanda faydası bulunan *Melissa officinalis* L., Lamiaceae familyasının *Melissa* genusuna ait çok yıllık, otsu bir bitkidir (Başkal, 2019; Şener, 2021; Ülgen, 2022; Kapdan, 2023).

Melissa officinalis ismini Yunanca bal arısı anlamına gelen melitto kelimesinden almıştır (Kapdan, 2023). *Melissa* ismi bilimsel anlamda incelendiğinde 'Mel' kökü Latince bal anlamına, 'Melissa' ismi ise arı yaprağı anlamına gelmektedir. 'Oğul otu' ismiyle de anılmakta olan bu bitki aynı zamanda limon otu, kovan otu ve limon nanesi olarak

da anılmaktadır (Öğüt, 2021). Ülkemizde doğal olarak yetişmekte olup Kuzey ve Batı Anadolu'dan yaygın olarak toplanmaktadır (Katar & Katar, 2020). *Melissa officinalis* bitkisi 1800 m yüksekliğe kadar ormanlık alanlar, ıssız araziler, kayalık yamaçlar ve yol kenarlarında yetişmektedir (İşman Güven, 2010).

Tablo 1. *M. officinalis* Taksonomisi

ALEM	Plantae (Bitkiler)
ALT ALEM	Tracheobionta
ŞUBE	Magnoliophyta (Kapalı Tohumlular)
SINIF	Magnoliopsida (İki Çenekliler)
ALT SINIF	Asteridae
TAKIM	Lamiales
FAMİLYA	Lamiaceae
CİNS	<i>Melissa</i>
TÜR	<i>Melissa officinalis</i> L.

Saçak köklü yapıda olan *Melissa officinalis*, rengi beyazdan açık kahverengiye kadar değişen güçlü ve çok sayıda gelişmiş yan köklere sahiptir. Bitkinin sahip olduğu bu kök yapısı farklı çevrelere adaptasyonunu kolaylaştırmaktadır (Davis, 1982; Ceylan, 1997; Katar & Katar, 2020). Gövdesi dik veya yarı dik gelişme gösteren bitkinin boyu 30-120 cm arasında değişmektedir. Gövde üzerinde dallanma özelliğine sahip, dört köşeli, boğum ve boğum aralarından oluşan çok sayıda sap bulunmakta olup, sap üzerinde bulunan boğumlardan oval/kalp şeklinde, kenarları dişli, kısa/uzun saplı, uçları sivri, damarları belirgin, üstü koyu yeşil, kısa tüylerle kaplı boyu 2-8 cm ve genişliği 1,5-5,0 cm arasında değişen yapraklar çıkmaktadır (Zargari, 1991; Ceylan, 1997; Saeb & Gholamrezaee, 2012; Katar & Katar, 2020). Genel olarak yapraklar bitkinin altından üstüne çıkıldıkça küçülmektedir (Şekil 1) (Katar & Katar, 2020).



Şekil 1. *M. officinalis* Bitkisinin Görünümü (URL-1)

M. officinalis yaprak ve gövdesinde bulunan tüylerin şekillerine göre *M. officinalis* subsp. *officinalis*, *M. officinalis* subsp. *inodora* bornm. ve *M. officinalis* subsp. *altissima arcangeli* olarak üç alt türü bulunmaktadır. *M. officinalis* subsp. *inodora* ve *M. officinalis* subsp. *altissima arcangeli* kötü kokulu olduğundan dolayı tedavi amacıyla kullanılmamaktadır. *M. officinalis* subsp. *officinalis* limon kokulu olmasından dolayı tıbbi ve ticari değere sahiptir (Katar & Katar, 2020).

Melissa officinalis'in kimyasal yapısı ile ilgili yapılan çalışmalarda; ana aktif bileşenlerinin uçucu yağlar, triterpenler ve fenolik bileşikler olduğu gözlenmiştir. *M. officinalis* üzerinde yapılan fitokimyasal araştırmalar ile bitki içeriğinde bulunan uçucu yağlar, tanenler, terpenler ve fenolik bileşikler gibi çeşitli sekonder bileşiklerin varlığı ve miktarları belirlenmiştir (İşman Güven, 2010). *M. officinalis*'ten elde edilen ekstraktlarla fenolik bileşen içeriğinin araştırıldığı bir çalışmada, bu bitkinin rosmanirik asit açısından zengin olduğu vurgulanmıştır (Sentkowska vd., 2014). Aynı çalışmada bitki içeriğinde çeşitli konsantrasyonlarda mirisetin, kuersetin, rutin, p-HBA, gallik asit, kaffeik asit, p-kumarik asit ve klorojenik asidin varlığı da tespit edilmiştir (Sentkowska vd., 2014). Karasova vd'nin (2005) yaptığı bir çalışmada HPLC analizine göre *M. officinalis* bitkisinde gallik asit, hidroksibenzoik asit, vanilik asit, şiringik asit ve protokateşik asit gibi bileşiklerin varlığı göstermiştir. Herodez vd. (2003) yaptıkları çalışmada *M. officinalis* yapraklarından özütledikleri etanolü ekstraktları kullanılmış ve HPLC analizi sonucunda karnosik asidin varlığı tespit edilmiştir. Hohmann ve ark. (1999) *M. officinalis* bitkisinin toprak üstü kısımlarından %50'lik metanol ile elde ettikleri ekstraktlarının hidroksisinnamik

asit (%12,5), rosmanirik asit (%2,21), kafeik asit (%0,196) ve flavonoid (%0,029) içerdikini tespit etmişlerdir. Lamaison ve ark. (1990) farklı familyalara ait çeşitli bitkileri kullanarak yaptıkları bir çalışmada *M. officinalis*'in %4,7 oranında rosmanirik asit ve %6,8 oranında hidroksisinnamik asit bulundurduğunu tespit etmişlerdir.

Uzun zamandır tedavi amacıyla sağlıkta ve tıpta kullanılan bu bitki ile yapılan *in vitro*, *in vivo* ve klinik çalışmalarla bitkinin terapötik etkisinin esas olarak salgı tüylerindeki uçucu yağlardan kaynaklandığı göstermektedir (Farahani vd., 2009). *M. officinalis* yapraklarında bulunan rosmanirik asit, antiviral, antimikrobiyal, antioksidan ve antiinflamatuvar etki gibi birçok biyolojik aktivite göstermektedir (Petersen & Simmonds, 2003). Ayrıca yapılan çalışmalarda bu bitkinin tedavide yatıştırıcı, sakinleştirici, gaz söktürücü, ateş düşürücü etkileri olduğu belirtilmiştir. Bu etkilerinin yanı sıra bulantı, baş ağrısı, uykusuzluk, ülser, halsizlik, epilepsi, depresyon, sinirlilik, anemi, tiroid ve psikoz üzerinde de tedavi edici etkisinin olduğu görülmüştür (Şaşkara vd., 2010; Kapdan, 2023).

1.3. Sekonder Metabolitler

Bitkiler büyümede ve gelişmede doğrudan etkisi olan veya olmayan birçok organik bileşik üretirler. Bitkilerin bu kimyasal bileşikleri, fonksiyonlarına ve sentezlendikleri metabolik yola göre primer metabolitler ve sekonder metabolitler olmak üzere ikiye ayrılır. Yaşamsal fonksiyonlarda doğrudan etkili olan primer metabolitler, tüm canlılarda bulunur (Tiring vd., 2021). Sekonder metabolitler spesifik biyosentetik enzimler tarafından bitkinin doku, organ ve gelişme kısımlarında sentezlenirler (Alaca & Arslan, 2012). Bitki organlarında yüksek konsantrasyonlarda depolanan bu bileşikler, bitkinin çevresine adaptasyonunda, üremesinde, neslinin devam etmesinde, bitki savunmasında, korunmasında bitkinin çevresi ile ilişkilerinde önemlidir (Alaca & Arslan, 2012; Topçu & Çölgeçen, 2015).

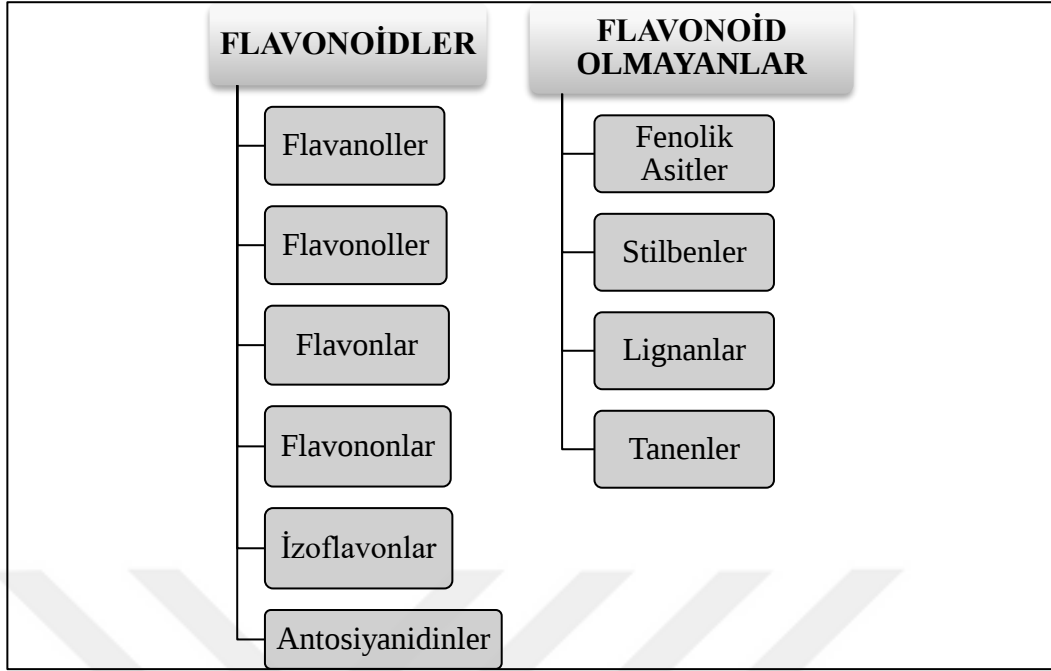
Çalışıldığı ilk zamanlarda sekonder metabolitlerin işlevsiz olduğu düşünülmüştür (Mothes, 1955). Daha sonraki zamanlarda ise birçok bilim insanı tarafından bu bileşiklerin bitki savunmasında önemli olduğu açıklanmıştır. Sekonder metabolitler bitkinin hastalıklara ve olumsuz çevre koşullarına karşı dayanıklılık sağlamasında rol oynarlar. (Tiring vd., 2021). Bitkiler için hayati öneme sahip olan bu metabolitlerin eksikliği veya yokluğu durumunda bitkiler zarar görebilir hatta yok olabilir (Topçu & Çölgeçen, 2015).

Sekonder metabolitler bitkileri biyotik ve abiyotik strese karşı korurlar. Bu yüzden sekonder metabolitler savunma açısından bitkiler için önemlidir (Alaca & Arslan, 2012).

Ekonomik değeri yüksek olan sekonder metabolitler genellikle ilaç, koku, boya gibi kimyasallar olarak kullanılırlar (Bakır, 2020). İnsan sağlığı açısından da oldukça önemli olan sekonder metabolitler gıdalarda ve çoğu hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Alaca & Arslan, 2012). Sekonder metabolitler terpenler, alkaloidler ve fenolik bileşikler olmak üzere üçe ayrılır.

1.3.1. Fenolik Bileşikler

Sekonder metabolitlerin en büyük grubunu oluşturan fenolik bileşikler, tüm bitkilerde bulunur (Topçu & Çölgeçen, 2015; Atak & Uslu, 2018). Fenilpropanoid biyosentez yolu ile sentezlenen bu bileşikler ligninler, lignanlar, flavonoidler gibi bazı bileşiklerin sentezlenmesi için gerekli öncülleri sağlamaktadırlar (Dixon & Sumner, 2003). Virüs, patojen ve böcek saldırıları, UV radyasyonu, yaralanma, açlık ve metal stresi gibi baskılara tepki olarak sentezlenen bu bileşikler bitkilerin savunma mekanizmalarında rol oynarlar (Karabulut Bay, 2008; Bohn, 2014; Topçu & Çölgeçen, 2015). Fenolik bileşikler aynı zamanda bitkilerin büyümesinde, gelişiminde ve döllenmesinde de önemli rol oynarlar. Yapılan araştırmalarda fenolik bileşiklerin antimikrobiyal, antialerjik, antiinflamatuvar, antiviral, antipatojenik ve antitrombotik gibi insan sağlığı üzerinde yararlı etkilerinin olduğu gözlenmiştir (Manach vd., 2004; Atak & Uslu, 2018). Fenolik içeriği zengin olan bitkiler, insan hücrelerindeki mutasyonların azalmasında, kanserin önlenmesinde önemli rol oynar (Karakaya, 2004; Tiring vd., 2021). Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması Şekil 2’de gösterilmiştir. (Karabulut & Yemiş, 2019).



Şekil 2. Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

Fenolik Asitler: Hidroksisinamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olarak iki gruba ayrılmaktadırlar. Bu bileşikler antikarsinogenik, antimutajenik, antialerjik etki gösterirler (Atak & Uslu, 2018).

Lignanlar: Tahıllarda, meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunurlar (Xu vd.,2017). Lignanlar çeşitli patojenlere karşı bitki savunmasında rol oynarlar (Croteau vd., 2000).

Tanenler: Yüksek yapıli bitkilerin çoğunda bulunurlar. Suda çözünebilir maddelerdir. Çok sayıda fonksiyonel grup ve hidroksil grup ihtiva ederler (Ergezer & Çam, 2008). Yoğunlaşmış tanenler ve hidrolize edilebilir tanenler olmak üzere iki gruba ayrılır. Tanenler, bazı otoburların büyümesini ve hayatta kalmasını engelleyebilirler (Oates vd., 1980). Aynı zamanda antioksidan, diüretik, hemostatik, antiseptik, antimutajenik etki de gösterirler (Okuda & Ito, 2011)

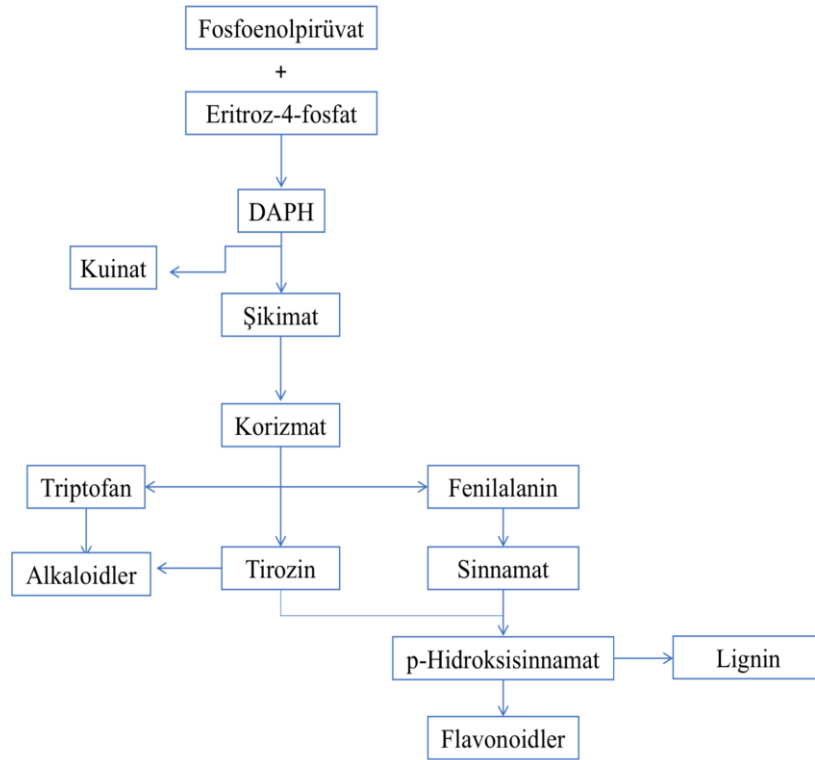
Stilbenler: En yaygın stilben resveratroldür. Birçok bitki resveratrolü yoğun stres altındayken salgılar. Resveratrol insan sağlığı üzerinde antioksidan, enfeksiyondan korunma, yaşlanmayı geciktirme ve obeziteyi azaltma gibi birçok olumlu etki gösterir (Karabulut Bay, 2008).

Flavonoidler: Fenolik bileşiklerin en büyük grubunu flavonoidler oluşturur (Atak & Uslu, 2018). Yapılarında bulunan hidroksil grupları ve reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenebilir flavonoidler bitkilerde genel olarak glikozit formunda

bulunurlar (Bilaloğlu & Harmandar, 1999; Atak & Uslu, 2018). Flavonoidler kardiyovasküler koruma, antiviral, antimikrobiyal aktivite gösterirler (Falcone Ferreyra vd., 2012; Kumar & Pandey, 2013; Negi vd., 2013; Kabera vd., 2014).

1.3.2. Fenolik Bileşiklerin Biyosentez Yolları

Fenolik bileşikler genel olarak iki yol ile sentezlenebilirler. Bunlar şikimik asit yolu ve fenilpropanoid yoludur. Şikimik asit biyosentez yolunun basitleştirilmiş gösterimi Şekil 3'te verilmiştir (Saıd, 2016). Bitki fenolik bileşiklerinin sentezi için fenilpropanoid biyosentez yolu önemlidir. Bu yolaktaki kilit nokta, bir amonyak molekülünün kaybı ile fenil alaninin sinnamik aside dönüşmesidir. Bu reaksiyon PAL enzimi tarafından katalizlenir. PAL enziminin aktivitesi, hormonlar, besin miktarı, ışık, mantar enfeksiyonu, yaralanma gibi faktörlere bağlıdır (Özeker, 1999).



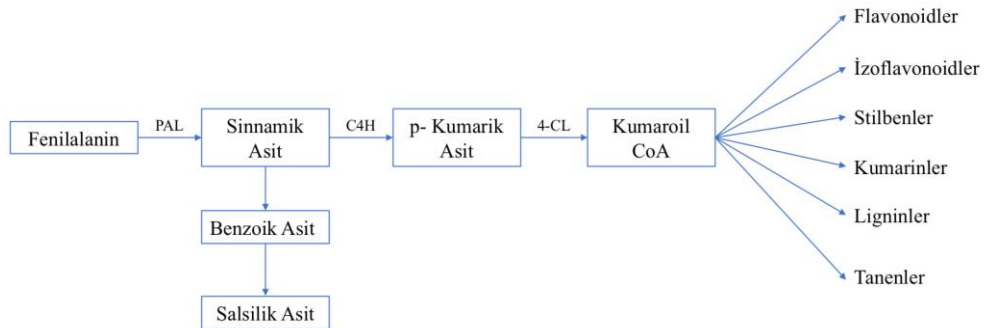
Şekil 3. Şikimik Asit Biyosentez Yolunun Basitleştirilmiş Gösterimi

1.3.3. Fenilpropanoid Biyosentez Yolu

Bitkiler açısından önemli olan fenolik bileşiklerin üretimi için fenilpropanoid yolundan yararlanılmaktadır. Bu metabolik yol sayesinde şikimat yolunun ürünü olan fenilalanin, flavonoller, flavonoidler, antosiyaninler, stilbenler, ligninler, lignanlar, izoflavonoidler, kumarinler ve fenolik asitler gibi çeşitli sekonder metabolitlere dönüştürülür (Turgut Kara, 2007; Gürsul, 2012). Bu bileşenler bitki büyümesinde, gelişmesinde, savunmasında ve insan sağlığı üzerinde önemlidirler.

Fenilpropanoid biyosentez yolunun ürünlerinin üretiminde kilit enzimi Koukol ve Conn (1961) tarafından tanımlanan fenilalanin amonyum liyazdır (PAL). PAL kofaktöre ihtiyaç duymayan oldukça güçlü bir katalizördür (Snapper vd., 1940). Sinnamik asitten türeyen bütün fenilpropanoidler PAL enziminin aktivitesi ile fenilalaninden oluşurlar (Dixon & Paiva, 1995).

Fenilpropanoid biyosentez yolu; fenilalanin amonyum liyaz (PAL), sinnamik asit 4-hidroksilaz (C4H) ve 4- hidroksisinnamol CoA ligaz (4-CL) enzimleri ile katalizlenen üç adımdan oluşmaktadır. Bu yolun ilk basamağı sinnamik asit üretimini sağlayan PAL enziminin aktivitesi ile başlamaktadır. Bu basamağın ardından C4H enzimi ile sinnamik asit hidroksilasyona uğrar ve bunun sonucunda p- kumarik asit oluşur. P- kumarat iki farklı şekilde kullanılabilir. p- kumarattan da hem 4- hidroksisinnamol CoA ligaz enzimi aracılığıyla p-kumarol koenzim A'nın üretimi; hem de p- kumarat 3- hidroksilaz enzimi aracılığıyla kaffeik asit ve ardından farklı enzimler ile diğer fenolik asitlerin üretimi gerçekleştirilir (Peterson & Simmonds, 2003). Fenilpropanoid biyosentez yolunun basitleştirilmiş şekli Şekil 4'te verilmiştir. (Schalk vd., 1998)



Şekil 4. Fenilpropanoid Biyosentez Yolunun Basitleştirilmiş Gösterimi

1.4. Bitki Doku Kültürü

Bitki doku kültürü, temel bir üretim yöntemidir (Dinçer vd., 2016; Kayın & Turan, 2023). Yeni doku, yeni bitki veya bitkisel ürünlerin elde edilmesi amacıyla, bitkinin çeşitli kısımlarının, bitki hücrelerinin veya tam bir bitkinin sterilize edildikten sonra, aseptik şartlarda ve çeşitli besin maddeleri içeren yapay bir besin ortamında *in vitro* olarak kültüre alınması işlemlerine bitki doku kültürü denilmektedir (Gürsul, 2012; Korkmaz, 2013; Kayın & Turan, 2023). Bitki doku kültürü teknikleri ile mevsimden bağımsız olarak, uygun çevre koşulları sağlanarak, kısa zamanda, belirli bir alan içerisinde, hastalıklardan arındırılmış çok sayıda bitki üretilmektedir (Özkaynak & Samancı, 2016; Bayhan, 2023). Bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılan besiyerlerinin en önemli unsuru bitki büyüme düzenleyicileridir (Gürel vd., 2013; İçigen, 2019). Bitki büyüme düzenleyicileri temel olarak hücre bölünmesi, hücre uzaması, büyüme, gelişme, üreme, kök, sürgün, yumru oluşumu gibi faaliyetlerin teşvik edilmesini ve düzenlenmesini uyarmaktadır (Kumlay & Eryiğit, 2011; Bektaş, 2014)

Bitki doku kültürü teknikleri günümüzde birçok alanda kullanılmaktadır. Özellikle bitki ıslah uygulamalarında bitki doku kültürüne sıklıkla başvurulmaktadır. Bunların arasında; bitkilerin klonal olarak çoğaltılması, haploid bitkilerin elde edilmesi, somaklonal varyasyonların oluşturulması, ıslah amaçlı yapılan çalışmalar, bitki gen kaynaklarının korunması, patojenlerden ve hastalıklardan arındırılmış bitkilerin üretilmesi, sekonder metabolitler gibi biyokimyasal ürünlerin elde edilmesi gibi uygulamalar bulunmaktadır (Korkmaz, 2013; Aktay, 2019). Bitki ıslahının dışında genetik mühendisliğinde, sentetik tohum üretiminde, ilaç ve gıda sanayi için hammadde ihtiyacının karşılanmasında, genetik iyileştirme çalışmalarında, nesli tükenme tehlikesinde olan türleri korumada ve çoğaltılması zor bitki türlerinin çoğaltılmasında da bitki doku kültürü tekniklerine başvurulmaktadır (Babaoğlu vd., 2001; Dinçer vd., 2016). Günümüzde bitki doku kültürü ile yeni bitkilerin üretilmesinde kallus, protoplast, organ, embriyo ve hücre kültürü teknikleri kullanılmaktadır (Dinçer vd., 2016).

İnsan sağlığı açısından önemli olan sekonder metabolit üretimini arttırmak için kullanılan stratejilerden biri bitki doku kültürü çalışmalarıdır. Bu amaç doğrultusunda genetik mühendisliği uygulamaları, ışık stresi, ozon stresi, ağır metal stresi, etilen ve kitoson uygulamaları gibi pek çok uygulama yapılmaktadır (Collin, 2001; Jun-Ge vd., 2006; Ahmed

& Baig, 2014). Bu uygulamalar sayesinde düşük miktarlarda üretilen sekonder metabolitlerden daha yüksek miktarda elde edilebilmektedir (Antognoni vd., 2007)

1.5. Nanoteknoloji

Nano ve teknoloji kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşan nanoteknoloji, günümüzün en popüler ve umut verici teknolojilerinin başında gelmektedir (Keiper, 2003; Kapdan, 2023). Genel anlamıyla nanoteknoloji terimi, boyutları 1-100 nm arasında olan partiküllerin üretilmesi, karakterizasyonu, geliştirilmesi ve farklı alanlarda kullanımı olarak tanımlanmaktadır (Küçükçobanoğlu, 2022; Öztolüt, 2023). Aynı zamanda nanoteknoloji, maddelerin atomik veya moleküler seviyede birleştirilmesi, işlenmesi, bozulması ve ayrılması olarak da tanımlanmaktadır (Ersöz vd., 2018). Bu teknoloji dalı sayesinde maddeler üzerinde birçok farklı değişiklikler yapılarak maddelere atomik ve moleküler seviyede yeni özellikler kazandırılabilir (Beykaya & Çağlar, 2016; Arslan, 2022)

Nanoteknoloji uygulamalarının günümüzdeki kullanım alanları incelendiğinde başta tıp olmak üzere sağlık, eczacılık, gıda, ziraat, tarım, çevre, endüstri, biyoteknoloji, fen bilimleri, mühendislik vb. daha birçok alanda önemli rol oynadığı görülmektedir.

1.5.1. Nanopartiküller

Nanoteknolojinin temelini oluşturan nanopartiküller, en az bir boyutu 1 ile 100 nanometre aralığında olan parçacıklar olarak tanımlanmaktadır (Gökçe, 2019). Nano boyuttaki materyallerin özellikleri, aynı materyallerin büyük boyutlardaki özelliklerine kıyasla önemli derece de farklılık göstermektedir (Tunç, 2023).

Nanopartiküller çekici ve farklı özelliklere sahiptirler. Bu materyaller yüksek yüzey/hacim oranları sayesinde maddelere sertlik, esneklik, biyoyumluluk, çözünabilirlik ve etkileşimin artması gibi birçok avantaj sağlayan özelliklere sahiptirler. NP'ler aynı zamanda antimikrobiyal, antiviral, antifungal ve antikanser etki gibi özelliklere de sahiptirler (Miazek vd., 2015)

Nanopartiküller özelliklerine göre farklı şekillerde sınıflandırılabilirler. En temel haliyle Nanopartiküllerin sınıflandırılması Tablo 2'de gösterilmektedir.

Tablo 2. Nanopartiküllerin Sınıflandırılması

Nanopartiküller			
Kaynağına Göre	Yüzeylerine Göre	Morfolojisine Göre	Bileşimine Göre
Doğal	Tek Boyutlu	Küresel	Metal Bazlı
Antropojenik	İki Boyutlu	Silindirik	Karbon Bazlı
	Üç Boyutlu	Çubuk	Yarı İletken Bazlı

Nanopartiküllerin kullanımı birçok alanda artış göstermektedir. NP'ler sahip oldukları özelliklerden dolayı nanoteknolojinin temelini oluşturarak ve başta fen bilimleri olmak üzere sağlık, biyoteknoloji, tarım, gıda, savunma sanayi, enerji, çevre gibi birçok alanda kullanılmaktadırlar (Gökçe, 2019; Ahmed vd., 2016).

Tablo 3. Nanopartiküllerin Uygulama Alanları

Sağlık Uygulamaları	• Biyolojik etiketler • Kanseri tanısında biyomarkırların kullanımı • İlacın hedef organa taşınması • Hastalık teşhis ve tedavisi • Tıbbi görüntüleme cihazlarının geliştirilmesi
Tarım Uygulamaları	• Zararlı mikroorganizmalar ile mücadele • Bitkisel ve hayvansal kaynakların ürünlerin nanoteknolojik yöntemler ile hazırlanması
Teknoloji Uygulamaları	• LED ekranlar ve cep telefonlarında çözünürlüğün artırılması için kuantum noktalarının kullanılması • Daha dayanıklı ve daha hafif malzemelerin üretimi • Yüksek işlevli katalizörlerin üretimi • İlaç taşıyıcıları vb. birçok teknolojik ürünün geliştirilmesi
Gıda Uygulamaları	• Paketli gıdalarda raf ömrünü arttırmak, doğal tat, koku ve besin değerlerini korumak için nanosensörlerin kullanımı • Nanoboyuttaki tozlar ile ek gıda besinlerinin alınması
İnsan ve Çevre	• Su kanallarına nanomateriyaller ekleyerek suyun saflaştırılması, • Pestisitlerin taşınmasında nanokapsüllerin kullanımı

1.5.2. Metal Bazlı Nanopartiküller

Günümüzde 1500'den fazla nanomateryal aktif olarak kullanılmaktadır. Bu nanomateryallerin yaklaşık %37'lik kısmını metal bazlı nanopartiküller oluşturmaktadır (Vance vd., 2015). Metal bazlı nanopartiküller düşük erime noktalarına, geniş yüzey alanına, farklı optik ve manyetik özelliklere sahiptir. Bu özelliklerinden dolayı metal bazlı nanopartiküller birçok alanda kullanılmaktadır (Çelik, 2022). Metal bazlı nanopartiküller aynı zamanda katalitik aktivite, iletkenlik, antibakteriyal, antifungal, antiviral vb. özellikleri ile de bilim insanlarının dikkatini çekmektedir (Genç, 2023). Metal nanopartiküllerin şekil ve boyutları, bu maddelerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini etkilemektedir. Altın, gümüş, alüminyum, çinko, demir, paladyum, selenyum, platin, bakır ve kurşun en sık kullanılan metal bazlı nanopartiküllerdir.

Metal bazlı nanopartiküller günümüzde biyoteknoloji, gen terapisi, ilaçların hedef bölgelere taşınması, tıbbi görüntüleme, kanser tedavisi, zararlı mikroorganizmalardan korunma, hastalıkların teşhisi, sensör üretimi, ziraat, tekstil, farmasötik uygulamalar vb. birçok alanda kullanılmaktadırlar (Klębowski vd., 2018; Aksoy, 2022; Genç, 2023).

1.5.3. Gümüş Nanopartiküller

Metal bazlı nanopartiküller içerisinde en dikkat çeken gümüş nanopartikülü, nanoteknoloji çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Vance vd., 2015). AgNP'ler boyutu 1 ile 100 nm arasında olan gümüş parçacıklarından oluşmaktadır (Mody vd., 2010). AgNP'ler diğer nanopartiküller ile karşılaştırıldığında daha güçlü aktivite gösterdiği görülmektedir (Kim vd., 2008; Ocsoy vd., 2013). AgNP'ler farklı fiziksel ve biyokimyasal özelliklerinden dolayı araştırmacılar tarafından dikkat çekmektedirler. AgNP'ler güçlü elektriksel iletkenlik, optik polarizasyon, kataliz ve mikrobiyal aktivite gibi kendilerine özgü özelliklere sahiptirler (Noguez, 2007). Gümüş nanopartiküllerin uygun konsantrasyonlarda bitkiler üzerinde bitki büyümesinin, tohum çimlenmesinin, fotosentetik verimin artırılması gibi pek çok alanda olumlu etkileri bildirilmiştir (Kapdan, 2023). Ayrıca yapılan çalışmalarda AgNP'lerin çeşitli mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (Beyth vd., 2015). AgNP'ler sahip oldukları bu özellikler sayesinde sağlık, tekstil, gıda, çevre, arıtma, biyoteknoloji, endüstri vb. birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadırlar.

1.5.4. Bitki Doku Kültüründe Nanopartiküllerin Uygulanması

Son zamanlarda dünya nüfusunun hızla artmasıyla beraber canlı yaşamı için bitkilere ve bitkilerden elde edilen materyallere duyulan ihtiyaç da artmaktadır. Bitkilerden elde edilen verimin artırılması, bitki hastalıklarının en aza indirgenmesi veya ortadan kaldırılması, stres faktörlerinin azaltılması, pestisitlerin önlenmesi ve bitki içeriğinde bulunan önemli bileşiklerin üretiminin artırılması için bitki biyoteknolojisine başvurulmaktadır (Coghlan, 2003; Cordell vd., 2009; Khan & Khan, 2010). Bitki biyoteknolojisinde önemli çalışma alanlarından biri bitki doku kültürü uygulamalarıdır. Nanoteknolojinin temelini oluşturan nanopartiküllerin, bitki doku kültürü uygulamalarında kullanılmasıyla beraber bitki büyümesinde ve gelişiminde olumlu etkiler elde edilmiştir (Can & Gürel, 2023). Nanopartiküller bitki büyümesini arttırmak, genetik modifikasyon sağlamak, biyoaktif bileşiklerin üretimini arttırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Wang vd., 2016; Ruttkay- Nedecky vd.,2017).

Bitki doku kültüründe nanopartiküller kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu  alışmalar sonucunda tohum çimlenmesi, genetik modifikasyon, somaklonal varyasyon, sürgün rejenarasyonu ve sekonder metabolitlerin sentezlenmesine açısından olumlu bulgular raporlanmıştır. Nanopartiküllerin bitki doku kültüründeki başarısı; nanopartikülün türü, konsantrasyonu, üzerinde uygulama yapılan bitki türü, çevresel koşullar gibi etkenlere bağlı olarak değişmektedir (Can & Gürel, 2023)

Bitki doku kültürü uygulamalarındaki en önemli amaçlardan biri de sekonder metabolit üretimini arttırmaktır (Kapdan, 2023). Sekonder metabolitler insan sağlığı açısından önemli bileşiklerdir. Bu bileşiklerin üretiminin artırılması için birçok çalışma yapılmıştır. Bitki doku kültürü çalışmaları ile bitkilere uygulanan nanopartiküllerin, insan sağlığı açısından önemli olan sekonder metabolitlerin üretiminde olumlu sonuçlar sağlayabileceği çeşitli araştırmalarla bildirilmiştir (Can & Gürel, 2023).

1.6. HIV Virüsü

HIV olarak adlandırılan insan immün yetmezlik virüsü enfeksiyonu tüm dünyada ciddi bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. AIDS'in etiyolojik ajanı olan HIV virüsü, hastalıklara karşı direnç geliştirmemizi sağlayan bağışıklık sistemini etkisiz hale getirmektedir (Piot vd., 2001). HIV virüsü kronik bir zamanda immün sisteme tutanarak immün sistemin

baskılanmasına bunun sonucunda da fırsatçı enfeksiyonların gelişerek AIDS hastalığının ortaya çıkmasına sebep olur (Fauci, 1982).

1980'li yıllarda Afrika'da bir maymun türünden insana bulaştığı düşünülen HIV virüsünün dünya genelinde 80 milyondan fazla insanı enfekte ederek etkilediği ve günümüzde 39 milyonun üzerinde insanın bu virüs ile yaşadığı düşünülmektedir (Karataş vd., 2010; Aktaş, 2024)

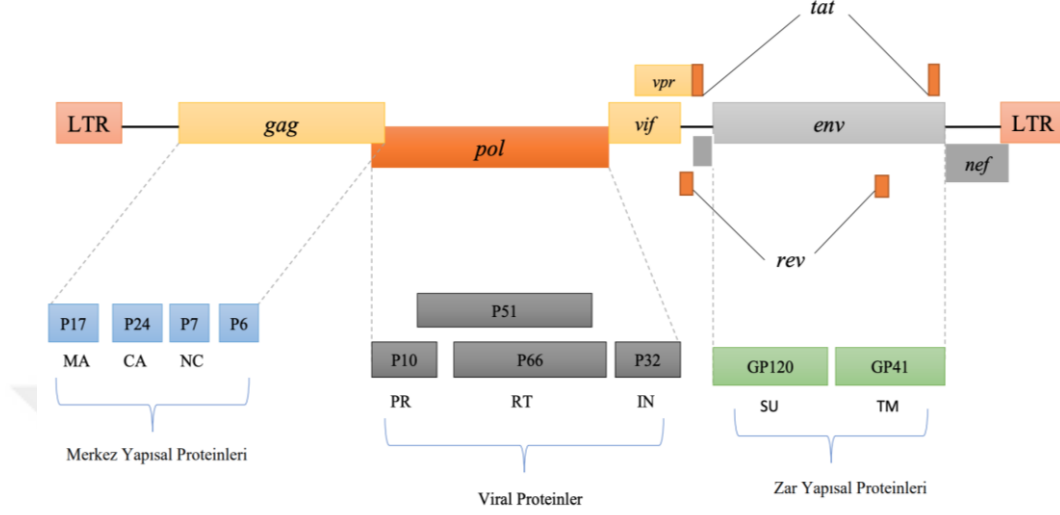
1.6.1. HIV-1 Yapısı

HIV, *Retroviridae* familyasının *Lentivirinae* alt familyasına üye *Lentivirüs* cinsine ait bir virüstür (Keşre, 2023). HIV, HIV-1 ve HIV-2 olmak üzere genetik ve serolojik özelliklerine göre ikiye ayrılır. Nükleik asitleri %40 oranında benzerlik gösteren bu iki HIV virüsü orijinlerindeki farklılıktan dolayı birbirlerinden biraz farklıdır. HIV virüsü, yakın zamanda ortaya çıkan ve en bulaşıcı hastalıklardan biri olan AIDS'e neden olan bir patojendir. HIV virüsünün her iki türü de AIDS hastalığına neden olmakla beraber HIV-1, HIV-2'ye göre daha patojeniktir. HIV-2, HIV-1'e göre daha zayıftır ve bulaşma özelliği daha azdır (Barré-Sinoussi vd., 1983; Gao vd. 1999; Sulukan vd., 2009; Sharp & Hahn, 2011; Faria vd., 2014).

HIV, 100-150 nm çapında ve sferik yapıda bir virüstür. Lipit membran ile çevrili olan koni biçimindeki nükleokapsid içerisinde iki adet RNA bulunur (Sulukan vd., 2009; Alpsar, 2011). RNA'ların her biri 9 kilobaz uzunluğunda olup virüs genlerinin kopyasını içerir (Sulukan vd., 2009; Başaran Şatır, 2013). HIV partikülünün membranında dışarıya doğru yönelen ve 'çıkıntı' olarak adlandırılan glikoproteinler bulunur. HIV partikülünde yaklaşık 72 adet bulunan bu çıkıntılar gövde ve başlık olmak üzere iki kısımdan oluşur. Gövde kısmını oluşturan Gp41 çift tabakalı lipit içerisinde yer alır ve üç transmembran proteininden oluşur. Başlık kısmını oluşturan Gp120 ise Gp41'e bağlı bir şekilde virüs yüzeyinde yer alır ve üç yüzey glikoproteininden oluşur. Gp120 ve Gp41 non-kovalent bağlarla birleşerek Gp160'ı oluşturur. Gp41 ve Gp120 hücre yüzeyindeki reseptörlerle birleşmede ve tutunmada önemli rol oynarlar (Sulukan vd., 2009; Alpsar, 2011; Başaran Şatır, 2013).

HIV partikülünde bulunan RNA genomunda 9 gen bulunur. Genomun her iki ucunda RNA işleme sinyallerini, transkripsiyonu düzenleyici sekansları, RNA paketleme ve entegrasyon bölgelerini içeren ve LTR olarak adlandırılan uzun tekrar dizileri bulunur.

(Şekil 5.) HIV virüsünün geneomik organizasyonu Şekil 5'te gösterilmiştir. (Sulukan vd., 2009)



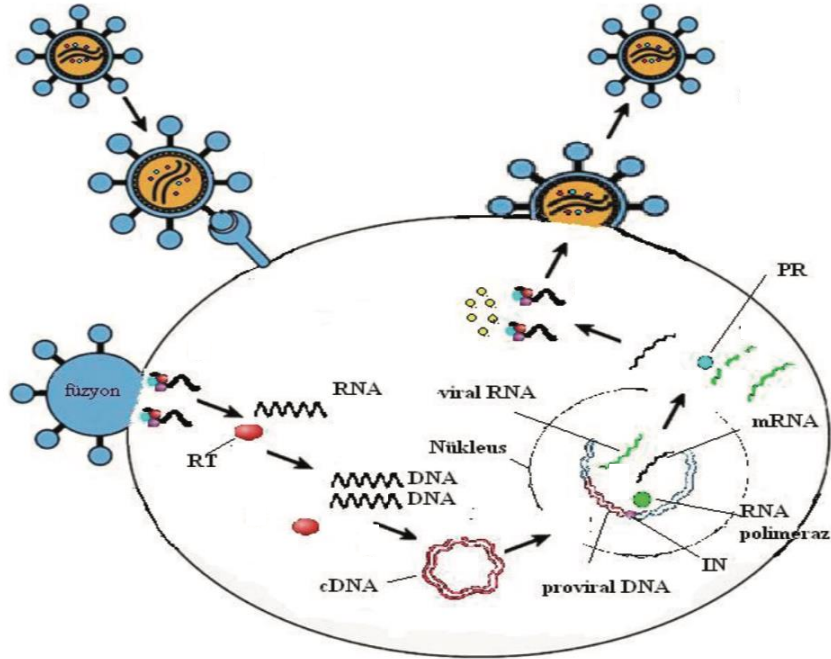
Şekil 5. HIV-1 Genomik Organizasyonu

1.6.2. HIV-1 Replikasyonu

HIV virüsünün replikasyon döngüsü, virüsün konakçı hücreye tutunmasıyla başlayıp, hücre ve viral çekirdeğin füzyonu ile devam ederek, viral çekirdeğin sitoplazmaya iletilmesi ile sona ermektedir (Wilén vd., 2012).

HIV virüsünün vücuttaki hedefi bağışıklık sisteminde görevli olan T lenfositlerini enfekte etmektir. Virüs yüzeyindeki Gp120 yüzey glikoproteininin aminoterminal bölgesi ile hedef hücre yüzeyindeki CD4 reseptörü arasında bir bağlanma olur. Bu bağlanma ile HIV virüsünün replikasyon süreci başlar. Gp120'de konformasyonel bir değişiklik oluşur. Bu değişiklik Gp120'nin CCR5 veya CXCR4 koreseptörlerinden birine bağlanmasını ve Gp41 transmembran glikoproteinini ile kompleks oluşturmasını kolaylaştırmaktadır. Fizyolojik öneme sahip olan CCR5 ve CXCR4 koreseptörleri virüs replikasyonu için önemlidir. HIV-1 virüsünün replikasyonu Gp120 ile CD4 ve CCR5/ CXCR4 koreseptörlerinin ilişkisine bağlıdır. Gp120'nin, CD4 ve kemokin reseptörlerine bağlanması ile transmembran glikoproteinini olan Gp41 füzyon peptidinin önü açılır. Birkaç Gp41 birleşerek hidrofobik uca sahip sarmak bir yapı meydana getirir. Füzyon peptidinin önünün açılması ile oluşan bu uç hedef hücre membranına temas eder ve füzyon başlar. Füzyon peptidi konak hücre

membranına girer ve HIV-1 nükleokapsidi, hücre membranında oluşan porlardan oluşan konak hücrenin sitoplazmasına geçer. Viral zarf hücre membranında kalır. Konak hücrenin sitoplazmasına geçen HIV-1 sitozolik bölgede yer alır ve nükleokapsidi soyulur. Füzyon sonucunda kapsid hedef hücrenin sitoplazmasına salınır. Kapsid yapısının içerisinde revers transkriptaz enzimi bulunur. Revers transkriptaz enzimi RNaz H aktivitesi, RNA'ya bağımlı DNA polimeraz aktivitesi ve DNA'ya bağımlı DNA polimeraz aktivitesi olmak üzere üç aktiviteye sahiptir. Revers transkriptaz enziminin RNaz H aktivitesi ile RNA ipliği degradasyona uğrar ve DNA iplikleri sentezlenir. RT enzimi, ilk olarak viral RNA'nın tek zincirli DNA kopyasını, daha sonra da bu kopyadan ikinci kopyasını sentezler ve HIV RNA genomundan cDNA oluşur. Oluşan bu cDNA p17 proteininde bulunan nükleer lokalizasyon sinyali, *vpr* ve integraz enziminin yardımı ile konak hücrenin nükleusuna taşınır. Virüs DNA'sının içine giren integraz enzimi burada bir kesme işlemi gerçekleştirir ve viral cDNA konak hücrenin DNA'sına kovalan bağlarla entegre olur. Konak hücrenin DNA'sına entegre olan viral cDNA provirüs olarak adlandırılır. Oluşan bu provirüs kendi başına replikatiftir. Virüs bu aşamaya ulaşırsa enfeksiyon kalıcı hale gelir. Bu entegrasyon işlemi gerçekleştikten sonra provirüs yıllarca sessiz kalabilir ya da aktif hale geçerek yeni virüsler üretebilir (Sulukan vd., 2009; Başaran Şatır, 2013; Öğütmen, 2022; Keşre, 2023). HIV virüsünün replikasyon döngüsü Şekil 6'da gösterilmiştir. (Sulukan vd., 2009)



Şekil 6. HIV-1 Replikasyon Döngüsü (Sulukan vd., 2009)

1.7. Revers Transkriptaz Enzimi

Revers transkriptaz (RT) enzimi ilk olarak 1970 yılında RNA tümör virüslerindeki RNA- bağımlı DNA sentezi araştırılırken keşfedilmiştir (Baltimore, 1970). Revers transkriptaz, p66 ve p51 alt birimlerinden oluşan 1000 aminoasitlik, asimetrik, heterodimer yapıda bir enzimdir. RT enzimi, HIV virüsünün replikasyon mekanizmasında kilit rol oynamaktadır.

Revers transkriptazın tek zincirli viral RNA'yı kalıp olarak kullanarak çift zincirli proviral DNA sentezlemesini sağlayan DNA polimeraz enzim aktivitesi ve RNA/DNA heterodubleksinin parçalanmasını sağlayan RNaz H enzim aktivitesi olmak üzere iki önemli fonksiyonu vardır. RT enziminin büyük alt birimi olan p66, RNaz H ve polimeraz aktiviteleri için gerekli aktif bölgeleri içerirken, küçük alt birim olan p51 ise p66'yı yapısal olarak stabilize eder. Bu iki fonksiyonel kısım beraber tek zincirli RNA'yı çift zincirli DNA'ya dönüştürmek için çalışır. Oluşan bu DNA enfekte hücre kromozomuna entegre olarak 'provirüs' adını alır (Kohlstaedt vd., 1992; Huang vd., 1998; Lever, 2009; Marchand vd., 2009; Arıcı, 2014).

RT enzimi 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi olmadığından hataya meyillidir ve bundan dolayı DNA bağımlı polimerazlardan daha düşük doğruluğa sahiptir (Rittie & Perbal, 2008).

Anti- AIDS ilaçlarının en fazla hedeflediği yapı olan RT, HIV-1 için kritik bir öneme sahiptir. RT, tüm anti-AIDS ilaçlarına direncin gelişiminden sorumludur. Moleküler seviyede RT inhibitörlerinin ve dolayısıyla genetik varyasyonların tanımlanmasında kullanılan birincil kaynaktır (Das & Arnold, 2013).

1.8. Antiretroviral Tedavi

HIV enfeksiyonunda antiretroviral tedavinin temel hedefi ölüm ve hastalık oranlarını azaltmak, yaşam kalitesini arttırmak ve yaşam süresini uzatmak, bağışıklık sisteminin fonksiyonlarını düzeltmek, HIV enfeksiyonunun yayılmasını en aza indirmek ve etkilerini azaltmaktır (Çetinkaya & Ünal, 1998). Ancak bu tedavide kullanılan ilaçlar virüsün replikasyonunu uzun süre baskılayabilmelerine rağmen tamamen yok edemezler ve tedavi sırasında dirençli mutantların ortaya çıkabilir. (Alpsar, 2011).

Günümüzde onaylanmış 30'dan fazla antiretroviral ilaç bulunmaktadır. Bu ilaçlar HIV'in replikasyon sürecinde farklı aşamalarda etkilerini gösterirler. Antiretroviral ilaçlar virüsün yaşam döngüsünde inhibe ettikleri moleküle göre nükleozid RT inhibitörleri,

nükleozid olmayan RT inhibitörleri, proteaz inhibitörleri, integraz inhibitörleri, füzyon inhibitörleri, CCR5 antagonistleri ve bağlanma sonrası inhibitörleri olmak üzere 6 sınıfta toplanır (Warnke & Barreto, 2007).

Nükleozid Revers Transkriptaz İnhibitörleri: NRTI'lerin hedefi revers transkriptaz enzimidir. RT enzimi, HIV RNA'sını DNA'ya çevirmek için kullanılır. RT enziminin inhibe edilmesi HIV virüsünün replikasyonunu bloke eder. NRTI'ler, RT enziminin aktif bölgesine bağlanırlar ve doğal deoksinükleotitlerle yarışarak oluşan yeni DNA zincirine bağlanırlar. NRTI'lerin riboz grubunda 3'-hidroksil grubu bulunmaz. Bundan dolayı uzayan zincire bağlandıklarında DNA zincirinin uzamasını engelleyerek viral replikasyonu inhibe ederler (Mayers vd., 2009; Keşre, 2023).

Non-Nükleozid Revers Transkriptaz İnhibitörleri: NNRTI'ler etkilerini NRTI'lar gibi RT enzimini bloke ederek gösterirler. Ancak NNRTI'ler RT enzimini seçici olarak inhibe ederler. HIV-2 ve SIV gibi diğer retrovirüslerin RT enzimlerine etki etmezler. NNRTI'ler genellikle RT enziminin hidrofobik olan allosterik bağlanma bölgesine bağlanırlar. RT enziminin aktif bölgesine direkt bağlanmaları ile revers transkripsiyonu engelleyerek etkilerini gösterirler (Alpsar, 2011; Erkekoğlu & Koyuncu, 2017; Wath vd., 2019).

Proteaz İnhibitörleri: Bu sınıfa dahil olan ilaçlar HIV-1 proteazı inhibe ederek etkilerini gösterirler. HIV-1 proteazına bağlanarak viral partiküllerin üretimi için gerekli protein öncüllerinin proteolitik bölünmesini engeller ve virüs çoğalmasını baskılar (Keşre, 2023).

İntegraz İnhibitörleri: HIV virüsü yapısında bulunan integraz enzimi aracılığıyla viral DNA'sını konak hücreye entegre eder. Bu sınıfa dahil olan ilaçlar integrazın aktivitesini bloke ederek HIV DNA'sının konak hücre nükleusuna girişini engeller ve HIV virüsünün çoğalmasını önler (Alpsar, 2011; Keşre, 2023).

Füzyon İnhibitörleri: Bu sınıfa dahil olan ilaçlar, HIV virüsünün CD4+ hücrelerine bağlanmasını ve füzyonunu engeller ve giriş mekanizmasını bozarak etkilerini gösterirler. Füzyon inhibitörleri, HIV virüsünde bulunan Gp41 transmembran glikoproteinine bağlanarak membran bağlanmasını bozar. Buna bağlı olarak füzyon reaksiyonu engellenir ve konak hücre HIV virüsünün enfeksiyonundan korunur (Alpsar, 2011; Keşre, 2023).

CCR5 Antagonistleri: Bu ilaç sınıfı CD4+ T hücrelerinin yüzeyinde bulunan CCR5 koreseptörünü engelleyerek etkisini gösterir. Bu sayede HIV virüsünün hücreye girişi engellenir. Bu sınıfa dahil olan ilaçlar sadece hücreye girişte CCR5 koreseptörlerini kullanan virüsler ile enfekte olan hastalar üzerinde etkilidir (Alpsar, 2011).

Bağlanma Sonrası İnhibitörleri: Bu sınıfa dahil olan ilaçlar CD4 yüzeyinde bulunan CD4 reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterirler. Bu bağlanma sonucunda HIV virüsünün CCR5 ve CXCR4 koreseptörlerine bağlanması ve konak hücreye entegrasyonu engellenir (Keşre, 2023).



2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar ve kullanım yerleri Tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan Cihazlar

Cihaz Adı	Marka/Model	Kullanıldığı Yer
+4 Buzdolabı	Arçelik	- Antimikrobiyal aktivite testi - HIV-RT inhibisyonu
Derin Dondurucu	Arçelik	- Antimikrobiyal aktivite testi - HIV-1 RT inhibisyonu - Kullanılan solüsyonların saklanması
Otoklav	Zealway- GI36TW	Sterilizasyon
Otomatik Pipet Seti	Socorex	- Antimikrobiyal aktivite testi - HIV-1 RT inhibisyonu - Gen ekspresyonu çalışmaları
Etüv	Nüve- EN500	- Antimikrobiyal aktivite testi - HIV-RT inhibisyonu deneyi
Steril Kabin	Nüve- MN090	Antimikrobiyal aktivite testi çalışmaları
Vorteks	Isolab	- Gen ekspresyonu çalışmaları - Antimikrobiyal aktivite testi
McF Ölçüm Cihazı	DensiCHEK Plus/Biomerieux	Antimikrobiyal aktivite testi
Hassas Terazi	KERN	- Antimikrobiyal aktivite testi - Bitkiden total RNA izolasyonu
Mini Santrifüj	Sigma	Bitkiden total RNA izolasyonu
Nanodrop	Thermo Scientific	Gen ekspresyonu çalışmaları
Saf Su Cihazı	Mp MINI Pure Dest Up	- Antimikrobiyal aktivite testi - HIV-RT inhibisyonu - Gen ekspresyonu çalışmaları
Mikrodalga Fırın	Awox	Gen ekspresyonu çalışmaları
qPCR Cihazı	Bio-Rad CFX Connect Real Time System	Gen ekspresyonu çalışmaları
PCR Cihazı	Bio-Rad Thermal Cycler	Gen ekspresyonu çalışmaları
Isıtıcı Blok	Mavi Lab Biotechnology	Gen ekspresyonu çalışmaları

2.1.2. Kullanılan Kitler

Kullanılan kitler ve içerikleri Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan Kitler ve İçerikleri

Kit	Kullanım Yeri	Kit İçeriği
Spectrum Plant Total RNA Kit	Bitkiden Total RNA İzolasyonu	• Liziz Solüsyonu • 2- Merkaptoetanol • Yükleme Solüsyonu • Yıkama Solüsyonu 1 • Yıkama Solüsyonu 2 • Elüsyon Çözeltisi • Filtrasyon/Yükleme Kolonu
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kiti	cDNA Sentezi	• RevertAid Rt (200 U/ µl) • 5X Reaksiyon Tamponu • 10 mM DNTP • Oligo (dT)₁₈ Primer • Ribolock RNaz İnhibitör (20 U/ µl)
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Real Time- PCR	• 2X SYBR Green Supermix
Reverse Transcriptase Assay, Colorimetric	HIV-1 İnhibisyonu	RT • HIV-1 Revers Transkriptaz • İnkübasyon Tamponu • Nükleotid Mix • Template [poly(A) x (dT)₁₅] • Liziz Tamponu • Anti-DIG-POD • Yıkama Tamponu • Seyreltme Tamponu • Substrat Tamponu • ABTS Substratı

2.1.3. Kullanılan Besiyerleri

Kullanılan besiyerleri ve hazırlama aşamaları Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanması

Besiyeri	Hazırlanması
Murashige&Skoog Including Vitamins	1 litre besiyeri hazırlamak için 4,4 gram katı besiyeri, 30 gram %3 süktroz, 6 gram plant agar tartılır. Üzerine dH ₂ O eklenerek hacmi 1000 ml olacak şekilde tamamlanır. 121 °C’de 15 dk otoklavlanır. Otoklavlandıktan sonra kültür kaplarına dökülerek soğuması beklenir.
Nutrient Agar	1 litre besiyeri hazırlamak için 23 gram katı besiyeri tartılır. Üzerine dH ₂ O eklenerek hacmi 1000 ml olacak şekilde tamamlanır. 121 °C’de 15 dk otoklavlanır. Otoklavlanan besiyeri petrilere dökülerek soğuması beklenir. İyice donduktan sonra saklanmak üzere +4’e kaldırılır.
Saboraud Dextrose Agar	1 litre besiyeri hazırlamak için 30 gram katı besiyeri tartılır. Üzerine dH ₂ O eklenerek hacmi 1000 ml olacak şekilde tamamlanır. 121 °C’de 15 dk otoklavlanır. Otoklavlanan besiyeri petrilere dökülerek soğuması beklenir. İyice donduktan sonra saklanmak üzere +4’e kaldırılır.
Müller Hinton Broth	1 litre besiyeri hazırlamak için 22 gram katı besiyeri tartılır. Üzerine dH ₂ O eklenerek hacmi 1000 ml olacak şekilde tamamlanır. 121 °C’de 15 dk otoklavlanır.

2.1.4. Kullanılan Mikroorganizmalar

Tez çalışması kapsamında yapılan antimikrobiyal aktivite deneylerinde 4 adet gram-pozitif, 4 adet gram-negatif bakteri ve 3 adet fungus olmak üzere toplam 11 adet mikroorganizma kullanılmıştır. Mikroorganizmalar Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji laboratuvarından temin edilmiştir.

Kullanılan mikroorganizmalar Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Kullanılan Mikroorganizmalar

Mikroorganizma Adı	Suş Numarası	Özelliği
<i>Bacillus subtilis</i>	RSKK 709	Gram-Pozitif
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 663	Gram-Pozitif
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Gram-Pozitif
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	Gram-Pozitif
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	ATCC 911	Gram-Negatif
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	Gram-Negatif
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Gram-Negatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	Gram-Negatif
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Fungus
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC 13803	Fungus
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	RSKK 251	Fungus

2.2. Metod

2.2.1. Bitkisel Materyalin Temini ve Sterilizasyonu

Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilen *Melissa officinalis* L. türüne ait olgun tohumlar, başlangıç eksplantı olarak kullanıldı. Temin edilen tohumlar olası dormansinin kırılması için +4 °C’de muhafaza edilerek soğuk şokuna maruz bırakıldı. Tohumların sterilizasyonu için Bektaş vd. (2013)’nin sunduğu yüzey sterilizasyonu protokolü takip edildi. Buna göre tohumlar, 1-2 damla ticari çamaşır suyu (Domestos) içeren %5’lik süktroz çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında 12 saat boyunca muhafaza edildikten

sonra 5 dk sürelerde %30'luk H_2O_2 'ye maruz bırakıldı. Ardından tohumlar H_2O_2 içerisinden süzülerek alındı ve 3 defa steril saf su ile yıkandı. Yüzey sterilizasyonu tamamlanan tohumlar vitaminli MS besi ortamı içeren kültür kaplarına çimlendirilmek üzere aktarıldı. Kültür kapları $25\pm 11^\circ C$ ve 16/8 saat fotoperyodik rejime ayarlanmış beyaz floresan aydınlatmalı ($50\mu m\ m^{-2}.s^{-1}$) iklim dolaplarında 4 hafta inkübe edildi.

2.2.2. Nanopartikül (Elisitör) Uygulaması

Belirtilen yüzey sterilizasyonu yöntemi ile sterilize edilen ve çimlendirilen tohumlardan oluşan ve sağlıklı gelişim gösteren fideler, yaklaşık 1 cm uzunluğunda ve tek bir nodal segment içeren parçalara bölünerek, bitki büyüme düzenleyicisi ve nanopartikül içermeyen MS ortamına aktararak çoğaltıldı. Bu işlemdeki maksat nanopartikül uygulamalarında kullanılacak yeterli sayıda eksplant sağlamak için fidelerin oluşturulmasıdır. Bu aşama sonrasında elde edilen fideler tekrar nodal segmentlere (yaklaşık 1 cm ve tek bir nodal segment içerecek şekilde) bölünerek farklı konsantrasyonlarda gümüş nanopartikül (AgNP) içeren ortamlara aktarıldı. Denenecek AgNP konsantrasyonları literatürdeki bilgiler ışığında, 1,0- 5,0- 10,0- 20,0 ve 50,0 mg/L olarak belirlendi (Jadczak vd., 2019). Çalışmada kullanılan AgNP'ler Nanografi Nanotechnology (Türkiye) firmasından ticari olarak satın alındı. Ayrıca besi ortamları, büyüme ve gelişmeyi daha fazla teşvik etmek amacıyla, *M. officinalis* türünün büyüme ve gelişmesinde bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisini araştırdığımız çalışmalarda en olumlu etkiyi gösterdiği belirlenen 0,1 mg/L kinetin (KIN) ile de desteklendi. Sadece 0,1 mg/L KIN ile desteklenen ve AgNP içermeyen MS ortamında gelişen fidelerden elde edilen sonuçlar kontrol grubu değerleri olarak değerlendirildi. Kültürler $25\pm 1^\circ C$ ve 16/8 saat fotoperyodik rejimde 4 hafta boyunca inkübe edildi.

2.2.3. Fidelerin Hasat Edilmesi ve Saklanması

AgNP konsantrasyonlarına tabi tutulan ve kontrol ortamında büyütülen fidelere ait toprak üstü kısımlar, 30 günlük inkübasyon süresinin sonunda kök kısımlarından kesilerek ayrıldı ve $-80^\circ C$ 'de saklandı. Fenolik madde ekstraksiyonunda kullanılacak olan bitkisel materyallerin suyu liyofilize edilerek uzaklaştırıldı. Bu işlem ile toz haline getirilen bitkisel materyal sonraki çalışmalarda kullanmak amacıyla yine $-80^\circ C$ 'lik dondurucularda

depolandı. Gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi çalışmalarında kullanılacak olan bitkisel materyaller ise kullanılıncaya kadar -80°C'lik dondurucularda muhafaza edildi.

2.2.4. Fenolik Maddelerin Ekstraksiyonu

Farklı konsantrasyonlarda AgNP stresine maruz bırakılarak büyütüldükten sonra hasat edilen ve toz haline getirilen bitkisel materyaller, yaklaşık 5 gram olacak şekilde tartıldı. Ardından metanolik (%99) ekstraksiyona tabi tutuldu. Ekstraksiyonu gerçekleştirmek için 40 °C'de ısı kontrollü magnetik karıştırıcı kullanıldı. Bu aşamada çözücü buharıyla biyoaktivite sorumlu bileşen kayıplarının önüne geçmek amacıyla ekstraksiyon kabına geri soğutucu aparatı takılarak ekstraksiyonun daha kontrollü olması sağlandı. Bu şartlar altında ekstraksiyon süresi 12 saat olarak sınırlandırıldı. Bu sürenin bitiminde hazırlanan metanolik ekstraktlar ilk olarak adi süzgeç kâğıdı ile ardından mavi bant süzgeç kâğıdı ile süzülerek filtre edildi. Son hacim en yakın değere metanol ile tamamlandı. Hazırlanan ekstraktlar çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi. Ayrıca elde edilen ekstraktlardan belirli hacimlerde alınarak çözücülerini uçuruldu ve ekstrakt çözeltisinin konsantrasyonu hesaplandı.

2.2.5. Fenolik Maddelerin HPLC ile Tayini

18 fenolik standart HPLC cihazında (Thermo Scientific Dionex Ultimate™ 3000 sistemi, Thermo Scientific, Almanya) alıkonma süreleri ve UV spektrumları dikkate alınarak kalitatif ve kantitatif olarak tanımlandı. 45 dakikada tamamlanan her bir kromatografik analiz için, %2 (v/v) asetik asit ve %0,5 (v/v) asetik asit içeren %50 (v/v) asetonitrilden oluşan ikili gradient mobil faz programı 30°C'de bir C18 kolonu (250 mm x 4.6 mm x 5 µm; Thermo Scientific™ Hypersil™ ODS C18 HPLC, Thermo Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanıldı. Denemeler 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

2.2.6. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Bitki ekstraktlarının toplam fenolik içeriği, gallik asit standardı kullanılarak Folin-Ciocalteu yöntemine göre belirlendi (Singleton & Rossi, 1965). İlk olarak 680 mL saf ddH₂O, 20 mL stok solüsyon (ekstrakt) ve 400 mL 0,5 mol/L Folin-Ciocalteu reaktifi bir tüp içerisinde karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyonun ardından üzerine 4 00 mL

Na_2CO_3 (%10) eklendi ve bu karışım oda sıcaklığında 120 dk inkübe edildi. İnkübasyondan sonra numunelerin absorbansları 760 nm'de ölçüldü. Tayinde standart olarak gallik asit (1.0-0,3125 mg/mL) kullanıldı. Gallik asit için kalibrasyon eğrisi çizildi ve ekstraktların toplam fenolik madde miktarı oluşturulan kalibrasyon eğrisi denkleminde ($y = mx+n$) hesaplandı. Denemeler 3 tekrar olacak şekilde yapıldı. Ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri “mg (GAE)/ g kuru bitki” olarak belirtildi.

2.2.7. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Antimikrobiyal aktivite testinde kullanılacak olan bakterileri büyütmek için Nutrient Agar, fungusları büyütmek için Saboraud Dextrose Agar kullanıldı. Besiyerleri Tablo 7’de belirtildiği şekilde hazırlandı. Hazırlanan besiyerlerine ekilen bakteriler 37 °C’de, funguslar ise 30 °C’de 18-24 saat inkübe edildi.

Tek koloni alınarak steril %0,9’luk NaCl çözeltisi ile yoğunluğu 0,5 McFarland olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra McFarland 0,5 yoğunluğunda ayarlanan bakteri solüsyonları tekrar %0,9’luk NaCl çözeltisi kullanılarak 1/10 oranında dilüye edildi.

2.2.8. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

AgNP uygulamalarıyla *in vitro* ortamda elde edilen *M. officinalis* L. bitki ekstraktlarının patojen mikroorganizmalar üzerindeki MİK değerlerinin belirlenmesi için CLSI standartlarına göre belirlenen mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Katyon ayarlı MHB besiyeri ile 96 kuyucuklu plaklar kullanılarak çalışma gerçekleştirildi. MİK aktivitesine bakılmak istenilen ekstraktların ana stokları %50 DMSO ile çözülerek başlangıç konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. İlk olarak 96 kuyucuklu plakların her bir kuyusuna 100 µl alınarak MHB besiyeri eklendi. Ardından 10 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan ekstrakt çözeltisinden 100 µl alınarak ilk kuyucuğa ilave edildi ve homojenize olması için pipetaj yapıldı. Daha sonra ilk kuyucuktan 100 µl alınarak. Bir sonraki kuyucuğa aktarıldı. Aynı işlem 11. kuyucuğa kadar tekrarlandı. Bu sayede kullanılan ekstraktlar 10 mg/ml- 0,019 mg/ml aralığında seyreltildi. Yapılan çalışmada bitki ekstraktı ve besiyeri içeren 11. kuyucuk pozitif kontrol, bakteri solüsyonu ve besiyeri içeren 12. kuyucuk ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Seyreltme işlemi tamamlandıktan sonra hazırlanan bakteri solüsyonu 11. kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 5 µl ilave edildi. Çalışmada bakteriler için

standart olarak ampicilin, funguslar için standart olarak flukanazol kullanıldı. Hazırlanan plakların etrafı parafilm ile etrafı sarılarak 37 °C’de 18-24 saat aralığında inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon süresinin sonunda bakteri üremesini/büyümesini gözlemlemek için 200 µg/ml *p*-INT (*p*- Iodonitrotetrazolium chloride) boyası ile boyama işlemi yapıldı. Her bir kuyucuğa 40 µl *p*-INT boyası eklendi. Ardından 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda pembe renk değişimi gözlenen kuyucuklarda mikroorganizma büyümesi pozitif, renk değişimi olmayan kuyucuklarda ise mikroorganizma üremesi negatif olarak değerlendirildi. Renk değişimi görülmeyen yani üremenin olmadığı en düşük derişim kullanılan ekstraktın MİK değeri olarak kaydedildi.

2.2.9. HIV-1 RT İnhibisyonu Çalışmaları

Bu çalışmada HIV-1 RT aktivitesinin kantitatif tayini için radyoaktif olmayan, hassas, pratik ve hızlı ELISA yöntemi kullanıldı.

AgNP uygulanarak *in vitro* koşullarda büyütülen *M. officinalis* bitki ekstratlarının HIV-1 RT inhibisyon etkilerinin belirlenmesinde ticari olarak satın alınan Reverse Transcriptase Assay, Colorimetric (Roche, Cat. No. 11 468 120 910) test kiti kullanıldı. Çalışmada kit prosedürü takip edildi. Bunun için;

Ayrı bir reaksiyon tüpüne her bir kuyu için 18 µl liziz tamponu, 20 µl nucleotide mix ve 2 µl (2 ng/µl) rekombinant HIV-1 RT enzimi eklendi. HIV-1 RT eklenmemiş liziz tamponun negatif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol için kullanılan reaksiyon tüpüne HIV-1 RT ve inhibitör madde yerine 22 µl ddH₂O, pozitif kontrol için kullanılan reaksiyon tüpüne ise inhibitör madde yerine 20 µl ddH₂O eklendi. Diğer reaksiyon tüplerine ise 20 µl etkinliği gözlenecek olan inhibitör maddelerden eklendi. Her bir reaksiyon tüpünün total hacmi 60 µl’dir (Tablo 8). Hazırlanan reaksiyon tüpleri 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.

Tablo 8. HIV-1 RT İnhibisyon Testi Kuyucuk İçeriği

	Liziz Tamponu	Nükleotid Mix	HIV-1 RT (2ng/μl)	ddH ₂ O	Nevirapin	İnhibitör Madde
Negatif Kontrol	18 μl	20 μl	-	22 μl	-	-
Pozitif Kontrol	18 μl	20 μl	2 μl	20 μl	-	-
Nevirapin	18 μl	20 μl	2 μl	20 μl	20 μl	-
Test Grubu	18 μl	20 μl	2 μl	-	-	20 μl

İnkübasyon sonrasında hazırlanan bitkisel numunelerin tamamı mikropate modüllerinin kuyularına aktarıldı. Mikropate modülleri kapak ile kapatıldı ve 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası kuyuların içerisindeki solüsyonlar dikkatli bir şekilde kuyulardan tamamen uzaklaştırıldı. Ardından 5 kez 30 saniye süre ile her seferinde 250 μl yıkama tamponu eklenerek yıkama yapıldı. Son yıkama yapıldıktan sonra yıkama tamponu dikkatli bir şekilde kuyulardan tamamen uzaklaştırıldı. Sonrasında her bir kuyuya 200 μl anti- DIG-POD (200μg/ml) çalışma solüsyonu ilave edildi. Mikropate modülleri folyo ile kaplanarak 37 °C’de 1 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında kuyuların içerisindeki solüsyonlar dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Her biri 30 saniye süre ile 250 μl yıkama tamponu eklenerek 5 kez yıkama yapıldı. Yıkama tamponu kuyulardan dikkatli bir şekilde tamamen uzaklaştırıldı. Sonrasında her bir kuyuya 200 μl ABTS substrat solüsyonu ilave edildi ve fotometrik saptama için yeterli miktarda renk değişimi (yeşil renk) olana kadar (10-30 dk) oda sıcaklığında inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında mikropate okuyucu cihazda 405 nm dalga boyunda (referans dalga boyu 490 nm) absorbans ölçümü yapıldı. 405 nm değerinde 490 nm değeri çıkarılarak okuma yapıldı. İnhibisyon yüzdesi hesaplandı.

2.2.10. Bitkiden Total RNA İzolasyonu

qPCR’da kalıp olarak cDNA örnekleri kullanıldı. Bu doğrultusunda ilk olarak bitki örneklerinden total RNA izolasyonu yapıldı. Bu çalışmada ticari olarak satın alınan Spectrum™ Plant Total RNA Kiti (Sigma, St. Louis, USA) kullanıldı. Uygulama için kit

prosedürü takip edildi. Sıvı azot yardımı ile havan içerisinde toz haline getirilen bitkisel numuneler hızlı bir şekilde reaksiyon tüplerine aktarıldı ve miktarları 90-110 mg olacak şekilde tartıldı. Ardından ~100 mg bitkisel numune üzerine 500 µl lizis karışımı eklendi ve homojenize olması için vortekslendi. 56 °C’de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 16.000 g’de 3 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonunda elde edilen süpernatant kit içeriğinde bulunan 2 mL toplama kolonuna (collection filtration column) aktarıldı. 16.000 g’de 1 dk santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant üzerine 500 µl binding solution eklendi ve pipet yardımıyla pipetaj yapılarak homojenize olması sağlandı ve kit içeriğinde bulunan bağlanma kolonuna (binding column) aktarıldı. 16.000 g’de 1 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonunda kolon temiz bir reaksiyon tüpüne aktarıldı. Üzerine 500 µl yıkama solüsyonu-1 (washing buffer-1) eklendi ve 16.000 g’de 1 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonunda alttaki reaksiyon tüpü atılarak kolon temiz bir reaksiyon tüpüne aktarıldı. Üzerine 500 µl yıkama solüsyonu-2 (washing buffer-2) tamponu eklendi ve 16.000 g’de 1 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonunda kolon yeni bir reaksiyon tüpüne aktarıldı. Üzerine tekrar 500 µl yıkama solüsyonu-2 eklendi ve 16.000 g’de 1 dk santrifüjlendi. Ardından kolon temiz bir reaksiyon tüpüne aktarıldı ve üzerine 30 µl elution tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 16.000 g’de 1 dk santrifüjlendi. İzole edilen total RNA’nın kalite seviyesi agaroz jel elektroforezi ile doğrulandı ve NanoDrop spektrofotometre ile 260/280 nm’de konsantrasyonu belirlendi. Örnekler -20 °C’de saklandı.

2.2.11. cDNA Sentezi

Her numuneden 1 µg RNA kalıp olarak kullanılarak cDNA’lar elde edildi. cDNA örneklerini elde etmek amacıyla ticari olarak satın alınan Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kitinin önerdiği şartlar kullanıldı (Tablo 9 ve Tablo 10). cDNA sentezi için kullanılacak olan RNA miktarları eşit olacak şekilde hesaplandı. Hesaplanan miktarlarda RNA örnekleri PCR tüplerine konuldu. Her bir PCR tüpüne 1 µl oligo (dT) primer eklendi. Toplam hacim 12 µl olacak şekilde ddH₂O ile tamamlandı. Hafif bir quick santrifüj yapıldıktan sonra Thermal Cycler cihazında 65 °C’de 5 dakika bekletildi. Daha sonra her bir PCR tüpü içerisine 4 µl 5X Reaksiyon Tamponu, 1 µl 10 mM DNTP mix, 2 µl Ribolock RNaz inhibitörü ve 1 µl Revart RT enzim eklenerek toplam hacim 20 µl’ye tamamlandı. PCR tüpleri cihaza yerleştirilerek ilk olarak 60 dk 42 °C’de ve ardından 5 dk

70 °C’de bekletildi. Elde edilen cDNA örnekleri qPCR reaksiyonunda kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

Tablo 9. cDNA Sentez Bileşenleri- 1

Bileşenler	Miktar (µL)	Konsantrasyon
Total RNA	2 µl	1 µg
Oligo (dT) Primer	1 µl	10 µM
ddH₂O	9 µl	
Toplam	12 µl	

Tablo 10. cDNA Sentez Bileşenleri- 2

Bileşenler	Miktar (µL)
cDNA Sentez Bileşeni-1	12 µl
5X Reaksiyon Tamponu	4 µl
10 mM dNTP Mix	1 µl
Ribolock Rnase İnhibitörü	2 µl
Revart RT Enzimi	1 µl
Toplam	20 µl

2.2.12. Real-Time PCR Uygulamaları

cDNA’lar elde edildikten sonra ilgili genlerin kantitatif tayini için Real-Time PCR çalışması gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda CFX Opus 96 Gerçek Zamanlı PCR sistemi (Bio-Rad) ve ticari olarak satın alınan ITaq™ Universal SYBR® Green One-Step Kit kullanıldı. Her bir gen bölgesi için NCBI veri tabanında BLAST araştırmaları sonucu korunmuş bölgeler belirlenerek spesifik primerler dizayn edildi. Veri analizi ilgili cihazın yazılımı kullanılarak yapıldı. Eşik döngü (Ct) değerleri Bio-Rad CFX Maestro yazılımı kullanılarak hesaplandı. Uygulama için üretici firma tarafından önerilen protokol takip edildi. Real Time PCR reaksiyonları için gene spesifik primerler SYBR Green ile

işaretlenerek gen ekspresyonu kantitatif olarak belirlendi. Referans gen olarak GAPDH geni kullanıldı. Amplifikasyonun doğruluğunu kanıtlamak için erime eğrisi analizi yapıldı.

Tablo 11. Dizayn Edilen Spesifik Primerler ve Özellikleri

Gen Adı	Primer Adı	Baz Dizisi (5'-3')
PAL	PAL-F	AGCCTGGACTACGGCTTC
	PAL-R	ACATCCTGGTTATGCTGCTC
GAPDH	GAPDH-F	GCTAAGGCTGTTGGTAAAGTGC
	GAPDH-R	TGGCCTCTTTCTCTAGCCTGAC

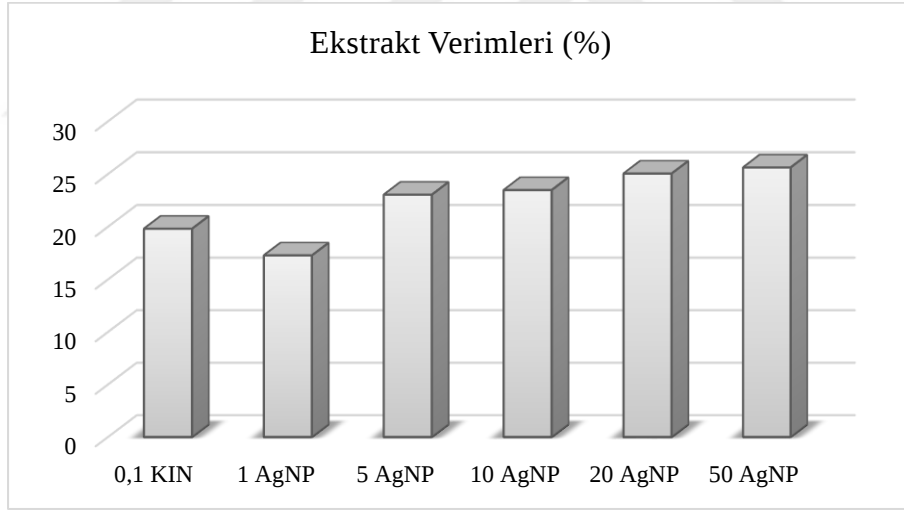
Tablo 12. Real- Time PCR Kuyucuk İçeriği

REAKSİYON	1X
2X Supermix	10 µl
ddH ₂ O	7 µl
Primer F (10 µM)	1 µl
Primer R (10 µM)	1 µl
Kalıp cDNA	1 µl
Toplam	20 µl

3. BULGULAR

3.1. Fenolik Maddelerin Ekstraksiyonu

Farklı konsantrasyonlarda AgNP içeren ortamlarda yetiştirilerek elde edilen *M. officinalis* fidelerinden elde edilen metanolik ekstrakt verimleri Şekil 7’de verilmiştir. Şekilde uygulama gruplarından elde edilen ekstrakt miktarlarının % verimlerindeki değişimler ve elde edilen değerler verilmiştir. Ekstrakt verim değerlerinin uygulama yapılan gruba göre %16,56 ile %25,62 aralığında değişiklik gösterdiği belirlendi. En düşük ekstrakt veriminin 1,0 mg/L AgNP grubunda olduğu, en yüksek ekstrakt veriminin ise 50,0 mg/L AgNP’ye maruz bırakılan fidelerde olduğu tespit edildi. Yapılan çalışmada AgNP uygulanarak yetiştirilen fidelerden elde edilen ekstrakt verimlerinin konsantrasyon arttıkça arttığı tespit edildi.



Şekil 7. Uygulamalardan Elde Edilen Fidelere Ait Ekstrakt Verimleri

3.2. Fenolik Maddelerin HPLC ile Tayini

Çalışmanın bu aşamasında 18 fenolik bileşiğin HPLC-UV ile analizi yapıldı. HPLC-UV ile analiz yapılan bu çalışmada kantitatif hesaplamalar her bir fenolik bileşen için oluşturulan altı farklı konsantrasyonun (1,563- 50 ppm) dahil edildiği standart kalibrasyon grafiği üzerinden yapıldı. Kalitatif olarak fenolik bileşenin doğru tespitinin yapılmasında

yine analiz edilen 18 fenolik bileşenin birlikte yürütüldüğü standart karışım kullanıldı. İlgili karışım çözeltisinin sabit faz olan C18 kolonun içerisinde alıkonma süreleri referans olarak kullanıldı. HPLC analizi sonucunda elde edilen değerler 3 tekrarın ortalaması olarak benzoik asit, epikateşin, ferulik asit, gallik asit, kafeik asit, kateşin, şiringaldehit, klorojenik asit, rutin, p-hidroksibenzoik asit, p-kumarik asit, protokatekuik aldehit, protokatekuik asit, şiringik asit, vanilik asit, vanilin, μg fenolik/g bitki (Tablo 13) şeklinde, rosmarinik asit ise (miktar olarak ekstraktlarda çok yüksek miktarlarda tespit edildiğinden) μg fenolik/mg bitki şeklinde ifade edildi (Tablo 14). Elde edilen sonuçlara göre genel fenolik profilin tüm numunelerde yakınlık gösterdiği tespit edildi. Genel itibari ile gallik asit, ferulik asit, protokatekuik aldehit, kafeik asit, benzoik asit, şiringik asit, p- kumarik asit ve rosmarinik asit tüm ekstraktlarda çeşitli düzeylerde tayin edildi. Kateşin ve vanilik asit, klorojenik asit, p- hidroksi benzoik asit, şiringaldehit, rutin ve kuersetin ise dedekte sınırın altında olması veya numune içerisinde bulunmamasından dolayı tayin edilemedi. Buna ek olarak; prokatekuik asit sadece 0,1 mg/L KIN (kontrol) ile desteklenen ortamdan elde edilen fidelerde dedekte edilirken, epikateşin 0,1 mg/L KIN ve 1,0 mg/L AgNP ile desteklenen ortamlardan elde edilen fidelerde düşük konsantrasyon düzeylerinde dedekte edildi. Rosmarinik asit tüm numunelerde ana bileşen olarak tespit edildi. Rosmarinik asidin denenilen tüm AgNP konsantrasyonlarında kontrolden yüksek olduğu görülürken, 5 mg/L AgNP içeren ortamdaki fidelerde en yüksek değere ulaştığı görüldü. İstatistiki olarak 5 mg/L AgNP grubu ile anlamlı farkın tespit edilmediği 10 mg/L AgNP grubunda da rosmarinik asit 41, 296 mg fenolik/g bitkibitki değeri ile temsil edildi. Nanopartikül uygulamalarında kontrol olarak kabul edilen 0,1 mg/L KIN içeren ortamlardan elde edilen fidelerin rosmarinik asit değeri ise 14,435 μg fenolik/ mg bitki olarak tespit edildi. Düşük AgNP konsantrasyonlarında bu bileşiğin varlığı da etkili bir şekilde düştüğü sonucu istatistiki olarak da doğrulandı.

Tablo 13. AgNP Stresine Maruz Bırakılan *M. officinalis* Fidelerinin Rosmanirik Asit Dışında Fenolik İçeriği

	Konsantrasyon (mg/L)	Galilik Asit	Protokatekuik Asit	Protokatekuik Aldehit	Kafeik Asit	Şiringik Asit	Epikateşin	p-Kumarik Asit	Ferulik Asit	Benzoik Asit
KIN	0,1	1.6±0.05 ^j	6.57±0.17 ^d	6.29±0.16 ⁱ	41.92±1.38 ⁱ	6.98±0.21 ^k	10.95±0.36 ^a	34.72±0.92 ^l	7.98±0.16 ^{klm}	25.49±0.72 ^g
	1,0	3.23±0.07 ^a	-	5.15±0.09 ^a	53.11±0.15 ^d	5.60±0.14 ^f	5.48±0.15 ^b	71.49±1.36 ^b	4.73±0.07 ^{de}	37.08±0.37 ^a
	5,0	2.51±0.27 ^b	-	2.38±0.13 ^a	89.11±3.76 ^b	14.48±0.32 ^d	-	95.27±1.31 ^a	19.99±0.21 ^a	37.09±0.29 ^a
AgNP	10,0	2.52±0.10 ^b	-	1.89±0.16 ^a	93.23±1.30 ^b	23.14±0.12 ^a	-	66.23±0.57 ^c	21.18±0.23 ^a	34.29±0.48 ^b
	20,0	1.75±0.19 ^c	-	3.59±0.17 ^a	109.08±1.32 ^a	20.7±0.51 ^b	-	71.80±0.37 ^b	17.22±0.43 ^{ab}	33.05±1.26 ^b
	50,0	1.67±0.08 ^c	-	2.79±0.10 ^a	65.33±1.22 ^c	19.32±0.11 ^c	-	64.8±1.17 ^{gd}	11.18±0.21 ^{bcd}	31.42±0.40 ^c

Tablo 14. AgNP Stresine Maruz Bırakılan *M. officinalis* Fidelerinin Rosmarinik Asit İçeriği

	Konsantrasyon (mg/L)	Rosmarinik Asit µg fenolik/mg bitki
KIN	0,1	14.435±0.365 ^e
AgNP	1,0	19.948±0.749 ^d
	5,0	41.059±1.407 ^a
	10,0	39.991±1.822 ^a
	20,0	31.618±1.105 ^{bc}
	50,0	29.591±0.488 ^c

3.3. Toplam Fenolik Madde Miktarlarının Tayini

M. officinalis fidelerine ait metanolik ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarlarına ait sonuçlar Tablo 15’te verildi. Elde edilen sonuçlara göre denenen AgNP konsantrasyonuna göre toplam fenolik madde miktarında farklılıkların olduğu gözlemlendi. AgNP uygulanan fidelerde, toplam fenolik madde miktarında kontrole (0,1 mg/L KIN) göre ciddi bir artışın olduğu tespit edildi. Denenen en düşük konsantrasyon olan 1,0 mg/L AgNP ile desteklenen ortamlardan elde edilen fidelerin toplam fenolik madde miktarı kontrole kısmen benzerlik gösterirken, diğer konsantrasyonların kontrole göre oldukça yüksek toplam fenolik madde birikimine neden olduğu tespit edilmiştir. AgNP konsantrasyonlarını içeren ortamlarda yetişen fidelerden elde edilen en yüksek toplam fenolik madde miktarı 5,0 mg/L konsantrasyonundadır. Yapılan korelasyon analizlerinde AgNP konsantrasyon artışı ile toplam fenolik madde miktarı arasında ilişkinin olmadığı belirlendi. ($r^2 = 0,461$).

Tablo 15. Fidelerin Toplam Fenolik Madde Miktarları

	Konsantrasyon (mg/L)	TPC (mg GAE/ g bitki)
AgNP	1,0	36.025±2.27 ^f
	5,0	68.250±3.31 ^a
	10,0	65.294±2.55 ^{ab}
	20, 0	62.290±1.36 ^{abc}
	50,0	60.188±1.29 ^{bcd}
KIN	0,1	33.771±0.32 ^l

3.4. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

Tez çalışmasının bu aşamasında farklı konsantrasyonlarda (1,0- 5,0- 10,0- 20,0 ve 50,0 mg/L) AgNP içeren ve ortamlarda ve kontrol ortamında (0,1 mg/L KIN) *in vitro* olarak yetiştirilen *M. officinalis* fidelerinden elde edilen metanol ekstraktlarının mikroorganizmalar üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda aktivitesine bakılacak olan metanol ekstraktları %50 DMSO ile çözülerek başlangıç konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan bu ekstraktların fungus, gram- pozitif ve gram- negatif bakteriler olmak üzere 11 indikatör mikroorganizmaya karşı MİK değerleri belirlendi. Çalışmada CLSI standartlarına göre belirlenen mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Başlangıç konsantrasyonu 10 mg/mL olan ekstraktların son konsantrasyonu 0,019 mg/ml'dir. 30-37 °C'de 18-24 saat inkübe edilen plakalara inkübasyon süresinin sonunda *p*-INT boyası eklenerek renk değişimi olup olmadığı gözlemlendi. Gözlem sonucunda pembe renk değişimi görülen kuyucuklarda bakteri büyümesi pozitif, renk değişimi olmayan kuyucuklarda bakteri büyümesi negatif olarak değerlendirildi. Renk değişiminin görülmediği yani bakteri büyümesinin olmadığı son kuyudaki konsantrasyon değeri aktivitesine bakılan ekstraktın MİK değeri olarak kaydedildi. Yapılan çalışmada standart antibiyotik olarak bakteriler için ampicilin, funguslar için flukonazol kullanıldı. Çalışmada 0,1 mg/L KIN ile desteklenen vitaminli MS besi ortamında yetiştirilen fidelerden elde edilen ekstraktlar kontrol grubu olarak değerlendirildi. Aktivitesine bakılan metanol ekstraktlarının gram- negatif bakterilerden *E. coli* ve *P. aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal etkileri gözlenmedi. 0,1 mg/L KIN ile desteklenen ortamda yetiştirilen fidelerden elde edilen ekstraktların ise *P. aeruginosa* hariç tüm mikroorganizmalar üzerinde aynı miktarda inhibisyon etkisi olduğu gözlemlendi. AgNP ile desteklenen ortamlarda yetiştirilen fidelerden elde edilen metanolik ekstraktların kontrol grubu ile eşit konsantrasyonda ya da daha düşük konsantrasyonda etki ettiği gözlemlendi. Uygulanan ekstraktların aktivitesi karşılaştırıldığında 5,0 mg/L AgNP ve 10,0 mg/L AgNP ortamlarında yetiştirilen fidelerden elde edilen metanol ekstraktlarının genel olarak tüm mikroorganizmalar üzerinde daha etkili antimikrobiyal aktivite gösterdiği gözlemlendi. AgNP konsantrasyonları ile desteklenen ortamlardan elde edilen metanol ekstraktlarının tamamının mikroorganizmalar içerisinde en çok *S. cerevisiae* üzerinde etkili inhibisyon aktivitesi gösterdiği gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar standart antibiyotikler ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu karşılaştırmaya göre *M. officinalis* fidelerinden elde

edilen metanol ekstraktlarının standart antibiyotiklere göre daha yüksek konsantrasyonda MİK değerine sahip olduğu yani daha düşük antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

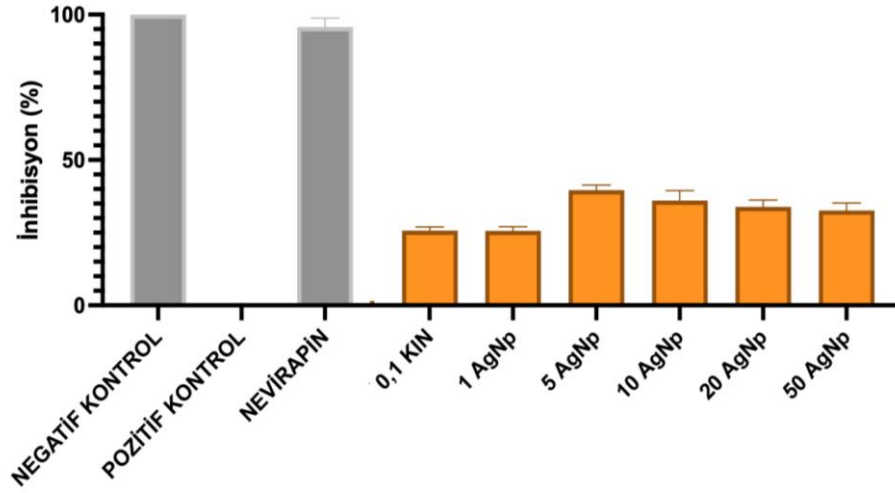


Tablo 16. *M. officinalis* Ekstraktlarına Ait Antimikrobiyal Aktivite Değerleri

Mikroorganizma Adı	Ampisilin	Flukanozol	0,1 KIN	1 AgNP	5 AgNP	10 AgNP	20 AgNP	50 AgNP
<i>B. subtilis</i> RSKK 709	10	-	5000	5000	2500	2500	5000	5000
<i>B. cereus</i> ATCC 663	15	-	5000	5000	2500	2500	5000	5000
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	35	-	5000	5000	2500	2500	5000	5000
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	10	-	5000	5000	2500	2500	5000	5000
<i>Y. pseudotuberculosis</i> ATCC 911	18	-	5000	5000	2500	2500	5000	5000
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	16	-	5000	5000	2500	2500	5000	5000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10	-	5000	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	128	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	-	8	5000	5000	2500	2500	5000	5000
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	-	8	5000	2500	2500	2500	5000	5000
<i>S. cerevisiae</i> RSKK251	-	8	5000	2500	2500	2500	2500	2500

3.5. HIV-1 RT İnhibisyonu Çalışmaları

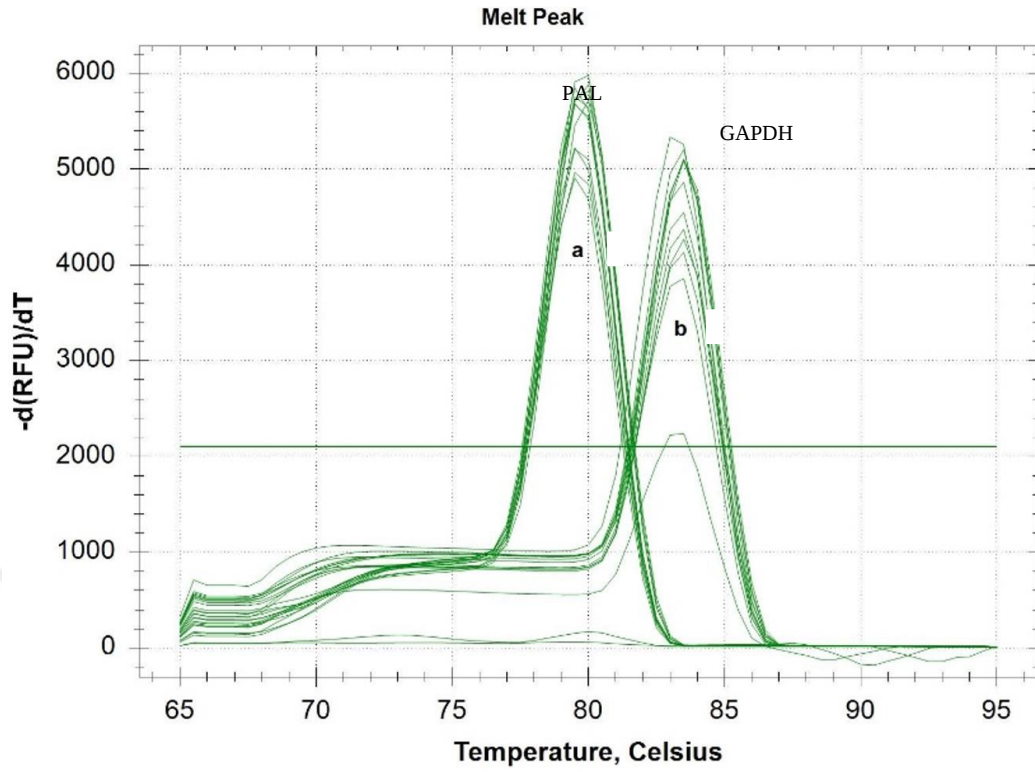
Çalışmanın bu aşamasında *M. officinalis* fidelerinden elde edilen metanol ekstraktlarının HIV-1 RT üzerindeki inhibisyon etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak fidelere ait metanolik ekstraktları DMSO ile çözülerek başlangıç konsantrasyonu 2,4 mg/ml olarak ayarlandı. Bu çalışmada ticari olarak satın alınan Reverse Transcriptase Assay, Colorimetric (Roche, Cat. No. 11 468 120 910) test kiti kullanıldı ve çalışma esnasında kit prosedürü takip edildi. Çalışmada standart antiviral olarak nevirapin kullanıldı. Pozitif ve negatif kontroller de eklenen çalışma 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 8’de gösterilmiştir. 1,0- 5,0- 10,0- 20,0 ve 50,0 mg/L AgNP ile desteklenen ortamlarda yetiştirilen fidelerden elde edilen metanol ekstraktlarına ait inhibisyon yüzdeleri sırasıyla %25,65, %39,65, %36,06, %33,88, %32,60 olarak belirlendi. Çalışmada standart antiviral olarak kullanılan nevirapinin inhibisyon yüzdesi ise %95,67 olarak belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda AgNP ile desteklenen ortamlarda yetiştirilen *M. officinalis* fidelerinden elde edilen metanol ekstraktlarının inhibisyon yüzdeleri birbiri ile karşılaştırıldığında en düşük inhibisyon etkisinin 1,0 mg/L AgNP ile desteklenen ortamdan elde edilen ekstrakt da görüldüğü belirlendi. İnhibisyon etkisi en yüksek 5,0 mg/L AgNP ekstraktında görülürken 10,-0- 20,0- 50,0 mg/L AgNP ekstraktlarında ise inhibisyon etkisinin konsantrasyon arttıkça azaldığı belirlendi. 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilen çalışmada elde edilen değerlerin ortalaması alınarak grafik oluşturuldu. Standart antiviral ile karşılaştırıldığında ise çalışmada etkisine bakılan bitki metanol ekstraktlarının nevirapine göre daha düşük oranda inhibisyon etkisine sahip olduğu belirlendi.



Şekil 8. *M. officinalis* Ekstraktlarına Ait HIV RT İnhibisyon Etkileri

3.6. Gen Ekspresyonu Çalışmaları

Tez çalışmasının bu aşamasında besi ortamına 1,0- 5,0- 10,0- 20,0- 50,0 mg/L konsantrasyonlarında AgNP'ler uygulanarak *in vitro* ortamda yetiştirilen *M. officinalis* bitkisinin, fenilpropanoid biyosentez yolunun başlangıç enzimi olan fenilalanin amonyum liyazın gen ekspresyon seviyesine etkisinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak q-PCR'da kullanılacak olan kalıp cDNA'ları elde etmek amacıyla RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Yapılan izolasyon sonucunda elde edilen RNA'ların konsantrasyonu 1 µg olacak şekilde hesaplanarak cDNA sentez reaksiyonu kuruldu. Çalışmada referans gen olarak GAPDH geni kullanıldı. Yapılan qPCR çalışmasının son aşamasında amplifikasyonun doğruluğunu kanıtlamak amacıyla melting curve (erime eğrisi) analizi yapıldı (Şekil 9). Elde edilen sonuçlar GAPDH ve PAL gen bölgeleri için kullanılan primer setlerinin kendi hedeflerine özgü olduğunu, çalışmada kontaminasyon olmadığını, tek ürün elde edildiğini ve non-spesifik bant oluşmadığını doğruladı.



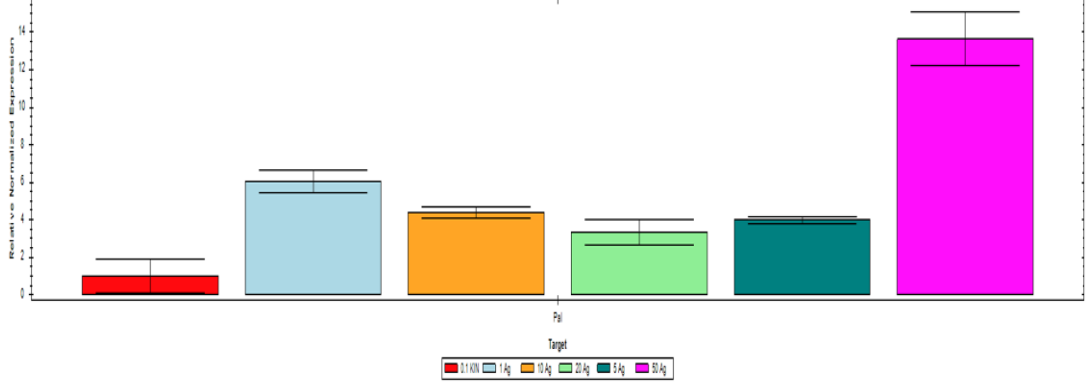
Şekil 9. Melting Curve (Erime Eğrisi) Analizi Sonuçları

Farklı konsantrasyonlarda AgNP stresine maruz bırakılarak yetiştirilen *M. officinalis* bitkisel numunelerinden elde edilen cDNA'lar ile yapılan qPCR çalışmasının sonuçlarının değerlendirilmesinde ilgili cihazın yazılımı kullanılarak C_t değerleri hesaplandı. qPCR analizinde elde edilen C_t değerleri Şekil 10'da verilmektedir.

Target	Sample	Control	Expression	Expression SEM	Corrected Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM	P-Value
GAPDH	0.1 KIN	C	N/A	N/A	N/A	20.11	0.06796	N/A
GAPDH	1 Ag		N/A	N/A	N/A	19.55	0.14464	N/A
GAPDH	10 Ag		N/A	N/A	N/A	17.33	0.00513	N/A
GAPDH	20 Ag		N/A	N/A	N/A	18.40	0.28357	N/A
GAPDH	5 Ag		N/A	N/A	N/A	19.42	0.00012	N/A
GAPDH	50 Ag		N/A	N/A	N/A	18.49	0.13092	N/A
Pal	0.1 KIN	C	1.00000	0.91514	0.91514	24.60	1.31852	N/A
Pal	1 Ag		6.01313	0.60950	0.60950	21.46	0.02154	N/A
Pal	10 Ag		4.38804	0.27134	0.27134	19.69	0.08906	N/A
Pal	20 Ag		3.34061	0.66694	0.66694	21.15	0.05046	N/A
Pal	5 Ag		3.98135	0.16496	0.16496	21.92	0.05978	N/A
Pal	50 Ag		13.63743	1.42773	1.42773	19.22	0.07532	N/A

Şekil 10. Ortalamaları Alınmış qPCR Analiz Sonuçları

Elde edilen C_t değerleri kullanılarak bitkisel numunelere ait ekspresyon profiline ait grafik ilgili cihazın yazılımı kullanılarak oluşturuldu (Şekil 11).



Şekil 11. *M. officinalis* Fidelerine Ait Ekspresyon Profili

Yapılan bu çalışmanın sonucunda 0,1mg/L KIN (kontrol) örneği ile 1,0- 5,0- 10,0- 20,0 ve 50,0 mg/L konsantrasyonlarında AgNP stresine maruz bırakılarak yetiştirilen *M. officinalis* bitkisinin PAL gen ekspresyon profilleri karşılaştırıldı. Kontrol örneği ile karşılaştırıldığında AgNP stresine maruz kalarak yetiştirilen *M. officinalis* bitkisinde PAL genine ait ekspresyon seviyesinin arttığı gözlemlendi. Tablo 17 incelendiğinde en yüksek ekspresyon seviyesinin 50,0 mg/L AgNP konsantrasyonuna sahip örnekte olduğu, en düşük ekspresyon seviyesinin ise 20,0 mg/L AgNP konsantrasyonuna sahip örnekte olduğu gözlemlendi. AgNP uygulanan bitki örneklerinin kontrol örneğine göre ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında her iki örnekten elde edilen C_t değerlerinin logaritmik farkları alındı.

4. TARTIŞMA

M. officinalis subsp. *officinalis* bitkisi, eski zamanlardan beri şifa kaynağı olarak tıbbi amaçla kullanılmaktadır. Bu bitki türü üzerinde yapılan birçok araştırmada *M. officinalis*'in antiviral, antimikrobiyal, antidepresif, antioksidatif, antiinflamatuvar ve antidiyabetik etki gibi birçok etkisi olduğu görülmüştür. Ayrıca *M. officinalis*'in içeriğinde bulunan fenolik bileşikler, alkanoidler ve terpenler gibi çeşitli fitokimyasal maddelerin varlığı ve miktarı da yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir.

Son zamanlarda bitkilerin ürettiği sekonder metabolitlerin öneminin anlaşılmasıyla birlikte bu metabolitlerin üretimini arttırmaya yönelik yapılan çalışmalarda giderek hız kazanmıştır. Elisitörlerin *in vitro* ortamlarda stres faktörü olarak kullanılması ile sekonder metabolitlere duyulan ihtiyacın karşılanması sağlanabilmektedir (Mulabagal & Tsay, 2004; Shilpa vd., 2010). Sekonder metabolitlerin üretimini arttırmak amacıyla bitki doku kültürü uygulamalarında nanoelisitörlerin kullanılması oldukça umut verici bir yaklaşımdır (Tiwari & Rana, 2015). Bitki doku kültüründe nanoteknolojinin temelini oluşturan nanopartiküllerin kullanılmasıyla kallus uyarımı, kontaminantların yok edilmesi ve sekonder metabolit üretiminin artırılması gibi olumlu etkiler olduğu gözlenmiştir (Singh & Ahamad, 2022).

Bu tez çalışmasında *in vitro* ortamda olgun tohumların çimlendirilmesi neticesinde yetiştirilen *M. officinalis* fidelerinden elde edilen nodal segmentler eksplant olarak kullanılmış ve bu eksplantlar farklı AgNP konsantrasyonlarına maruz bırakılarak oluşan yeni sürgünlerdeki biyokimyasal ve moleküler değişiklikler incelenmiştir. Belirtilen bu amaç doğrultusunda yüzey sterilizasyonu yapılan olgun tohumlar *in vitro* ortamda çimlendirildi ve gelişen fidelerden kesilerek elde edilen nodal segment parçaları ile fidelerin çoğaltımı gerçekleştirildi. Daha sonra *in vitro* ortamda üretilen bu fidelerden tekrar kesilen nodal segmentler alınarak 1,0-5,0-10,0-20,0 ve 50,0 mg/L konsantrasyonlarında AgNP ihtiva eden MS besiyerlerinde 30 gün inkübe edildi. Belirtilen inkübasyon süreci sonunda hasat edilen fidelerin metanolik ekstraktlarındaki toplam fenolik madde miktarları ve fenolik bileşen kompozisyonları ile sekonder metabolitlerin üretiminde doğrudan sorumlu anahtar genlerden biri olan PAL geninin ekspresyon seviyesindeki değişimler araştırıldı. Ayrıca bu fidelerden elde edilen metanol ekstraktlarının mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri ve HIV enfeksiyonundan sorumlu olan HIV-1 RT üzerindeki inhibisyon etkisi belirlendi.

Sekonder metabolitler, bitkilerde hücre metabolizmasının yan ürünü olarak sentezlenen ancak bitkinin büyüme ve gelişme için ihtiyaç duymadığı bileşiklerdir (Bakır, 2020). Bitkiler tarafından üretilen bu metabolitler bitki savunmasında, metabolizmasında, korunmasında ve çimlenmede önemli rol oynamaktadırlar (Kapdan, 2023). Bu bileşikler bitkilerden özütlenerek elde edilmektedir ve tarım kimyasalları, pestisit, gıda katkı maddesi, tat ve koku bileşeni olarak kullanılmaktadırlar (Vijaya vd., 2010). Ayrıca bu bileşikler hastalıkların tedavisinde ve ilaçların yapımında da kullanılmaktadırlar. İnsanlar için sağlık açısından oldukça önemli olan sekonder metabolitlerin son zamanlarda ticari ve tıbbi değerinin anlaşılmasıyla birlikte bilim insanları bu metabolitlerin sentezini ve üretimini arttırmaya yönelik stratejiler geliştirmeye çalışılmıştır. Bu amaç doğrultusunda bitki doku kültürü uygulamalarını kullanarak sekonder metabolit üretimini arttırmaya yönelik yapılan çalışmalarda giderek hız kazanmıştır. İnsanlar açısından da oldukça önemli olan bu bileşiklerin sentezini arttırmak için kullanılan stratejilerden biri de *in vitro* ortamda bitkilere elisitör stresinin uygulanmasıdır (Kapdan, 2023). Nanopartiküllerin nano-elisitör olarak bitki doku kültürü uygulamalarında kullanılmasının bitkilerde sekonder metabolit üretimini arttırdığı, mikrobiyal kontaminantların gelişimini engellediği, antimikrobiyal ve antiviral aktiviteyi arttırdığı, genetik transformasyonda, somatik embriyogenezde ve organogenezde olumlu yönde etki gösterdiği yapılan çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (Singh & Ahamad, 2022). AgNP'ler çalışmalarda kullanılan en yaygın metal nanopartiküllerdendir. AgNP'lerin yapılan çalışmalarla farklı bitkiler üzerinde farklı moleküler ve fizyolojik etki gösterdiği bildirilmiştir. AgNP'ler bitkilerde farklı metabolik yollar üzerinde etkilidirler. Elisitör olarak kullanılan AgNP'ler sekonder metabolit içeriği için, membran proteinleri ile etkileşime girerek sinyal iletimini başlatabilirler (Gopinath vd., 2010; Kaveh vd., 2013)

M. officinalis üzerinde yapılan fitokimyasal araştırmalarda terpenler ve fenolik bileşikler gibi çeşitli sekonder metabolitlerin varlığı ve miktarları bildirilmiştir (Allahverdiyev vd., 2004). Sentkowska vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada çeşitli demleme işlemleri ile *M. officinalis*'ten elde edilen ekstraktlarla fenolik bileşenler araştırılmıştır. Bu çalışmada *M. officinalis*'in rosmarinik asit açısından zengin bir kaynak olduğu vurgulanmıştır. Aynı çalışmada, rosmarinik asidin dışında çeşitli konsantrasyon aralığında mirisetin, kuersetin, rutin, p-HBA, gallik asit, kafeik asit, p- kumarik asit ve klorojenik asidin de varlığı tespit edilmiştir (Sentkowska vd., 2015). 26 tıbbi bitkinin fenolik bileşenlerinin araştırıldığı bir çalışmada *M. officinalis* bitkisinin içeriğinde farklı miktarlarda

vanilik asit, klorojenik asit, şiringik asit, o- ve p- kumarik asit, ferulik asit, p- anisik asit, salsilik asit, sinnamik asit ve metoksi-sinnamik asit varlığı tespit edilmiştir (Syta vd., 2018)

Yapılan bu tez çalışmasında farklı konsantrasyonlardaki AgNP'lerin *in vitro* koşullarda yetiştirilen *M. officinalis* bitkisinin metanolik ekstraktlarındaki toplam fenolik madde miktarı ve 18 farklı fenolik bileşen üzerindeki etkileri incelendi. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgulara göre *in vitro* ortamda farklı konsantrasyonlardaki AgNP'lerin *M. officinalis* bitkisinde sekonder metabolit birikimini ve toplam fenolik miktarını konsantrasyona bağlı olarak önemli derecede arttırdığı gözlemlendi. Çalışmada yapılan *in vitro* AgNP uygulanan *M. officinalis* fidelerinde gallik asit, ferulik asit, protokatekuik aldehit, kafeik asit, şiringik asit, p- kumarik asit, benzoik asit ve rosmarinik asit gibi fenolik bileşenler tüm ekstraktlarda farklı düzeyde tayin edildi. Farklı konsantrasyonlardaki AgNP uygulamalarında bu bileşenlerin miktarının kontrol (0,1 mg/L KIN) grubuna göre önemli derece arttığı görüldü. Sonuçlara göre; gallik asit miktarı grubunda 1,6 µg fenolik /g bitki iken AgNP uygulamalarında en yüksek birikimin 3,23 µg fenolik /g bitki ile 1 mg/L AgNP konsantrasyonunda olduğu tespit edildi. Kafeik asit miktarına bakıldığında kontrol grubunda 41,92 µg fenolik /g bitki iken en yüksek miktarın 109,08 µg fenolik /g bitki ile 20 mg/L AgNP konsantrasyonunda olduğu tespit edildi. Yine kontrol grubu ile kıyaslandığında şiringik asit ve ferulik asit miktarlarının en yüksek 10 mg/L AgNP konsantrasyonunda sırasıyla 23,14 µg fenolik /g bitki ve 21,18 µg fenolik /g bitki olduğu gözlemlendi. Epikateşin miktarının 1mg/L AgNP konsantrasyonunda kontrol grubuna göre daha düşük olduğu ve uygulanan diğer AgNP konsantrasyonlarında ise tespit edilmediği gözlemlendi. Çalışmada tespit edilen bir diğer madde olan p- kumarik asit miktarı ise kontrol grubunda 34, 72 µg fenolik /g bitki iken 5 mg/L AgNP konsantrasyonunda 95,27 µg fenolik /g bitki olarak en yüksek miktarda tespit edildi. Benzoik asit miktarına bakıldığında kontrol grubunda 25,49 µg fenolik /g bitki iken en yüksek 1 mg/L AgNP (37,08 µg fenolik /g bitki) ve 5 mg/L AgNP (37,09 µg fenolik /g bitki) konsantrasyonlarında olduğu tespit edildi. Son olarak rosmarinik asit miktarı kontrol grubunda 14.435 µg fenolik/ mg bitki olarak tespit edilirken en yüksek 41,059 µg fenolik/ mg bitki ile 5 mg/L AgNP ve 39,991 fenolik/ mg bitki ile 10 mg/L konsantrasyonlarında olduğu gözlemlendi. Rosmarinik asit tüm numunelerde ana bileşen olarak tespit edildi. Bu bileşenin analiz edilen tüm bileşenler arasında yaklaşık %98-99 oranında en yüksek değer ile tayin edilmesi, olası biyoaktivitenin asıl nedeninin olabileceği şeklinde yorumlandı. Ancak tespit edilen ve edilemeyen diğer fenolik bileşenlerin de sergilenen

biyolojik aktivitelere katkıları söz konusudur. Literatürdeki kaynaklarda da *M. officinalis* türünden elde edilen ana fenolik bileşenin bizim çalışmamızda olduğu gibi rosmarinik asit olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur (Sentkowska vd. 2015). Ayrıca yaptığımız çalışmada toplam fenolik madde miktarının uygulanan AgNP konsantrasyonlarına göre değişiklik gösterdiği gözlemlendi. 1 mg/L AgNP uygulanan ortamdan elde edilen verilerin kontrol ile benzerlik gösterdiği gözlenirken 5 mg/L AgNP uygulanan ortamda en yüksek toplam fenolik madde miktarının olduğu gözlemlendi. 10,0- 20,0 ve 50,0 mg/L AgNP uygulamalarında ise konsantrasyon arttıkça toplam fenolik madde miktarının azaldığı ancak kontrole göre yüksek toplam fenolik madde miktarları hesaplandı.

Literatürdeki raporlar incelendiğinde elisitör olarak nanopartikül uygulamasının bitkilerdeki fenolik bileşen ve toplam fenolik madde miktarını olumlu yönde etkilediği bilgileri görülmektedir. Khattab vd. (2022) yaptıkları çalışmada AgNP ve SiNP içeren ortamlarda yetiştirilen *Lavandula officinalis*'ten elde ettikleri etanolik ekstraktları GC-MS ile analiz etmişler ve SiNP ve AgNP'lerin beta-linaool, kafur ve kumarin bileşimi üzerindeki etkisini göstermişler. SiNP'lerin ve AgNP'lerin kumarin ve beta-linaool üzerindeki artırıcı etkisinin büyüme ortamındaki nanopartiküllerin konsantrasyonu ile ters orantılı olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada AgNP'lerin *Calendula officinalis* L. bitkisindeki sekonder metabolit birikimi üzerindeki etkisi araştırılmış ve düşük AgNP konsantrasyonunun (0,4 mM) kontrol ile kıyaslandığında en yüksek oranda artış gösterdiği gözlemlenmiştir. AgNP uygulamasının *C. officinalis*'te saponin ve toplam fenolik bileşiklerin miktarını arttırdığı rapor edilmiştir (Ghanati & Bakhtiarian, 2014). *Vanilla planifolia* ile yapılan bir çalışmada MS ortamına 0,25,50,100 ve 200 mg/L AgNP uygulaması yapılmış ve farklı AgNP uygulamaları ile elde edilen *V. planifolia* eksplantlarında TPC içeriğinde farklılıklar olduğu ve saponin üretiminin arttığını bildirmişlerdir. TPC içeriğindeki en yüksek artışın sırasıyla 50 ve 25 mg/L AgNP konsantrasyonlarında, en düşük artışın ise sırasıyla 200 ve 100 mg/L AgNP konsantrasyonlarında yetiştirilen *V. planifolia* sürgünlerinde görüldüğü rapor edilmiştir (Spinoso-Castillo vd., 2017). Homae ve Ehsanpour (2015), *Solanum tuberosum* bitkisinin *in vitro* kültürlerine AgNP ve AgNO₃ uygulamasının flavonoid, antosiyanin ve diğer fenoliklerin seviyesinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Li vd. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada kereviz yaprakları üzerine uygulanan Selenyum NP'lerin toplam fenol miktarını ve apigenin, rutin, p-kumarik asit, ferulik asit, luteolin, kaempferol gibi flavonoidlerin biyosentezini arttırdığı rapor edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, 50 ve 100 mg/L konsantrasyonunda AgNP'lerin

Carum carvi üzerinde sekonder metabolit üretimi üzerine olan etkisi araştırılmış ve sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 50 mg/L AgNP'lerin karvon ve p-simen bileşiklerinin içeriğini arttırdığı, 100 mg/L AgNP'lerin ise karvakrol ve timol bileşiklerinin sentezini etkilediği rapor edilmiştir (Dehghani-Aghchekohal vd., 2022). Chung vd. (2018) *Cucumis anguria* bitkisi üzerinde yaptıkları bir çalışmada bitkinin saçak köklerine AgNP uygulamışlar ve bu çalışmanın sonucunda AgNP uygulanan bitkilerde fenolik bileşiklerin ve flavonoidlerin birikiminde artış meydana geldiğini ve kontrole kıyasla yüksek oranda flavonol sentezlendiğini rapor etmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise *Brassica rapa* bitkisinin saçak kök kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (50, 100 ve 150 mg/L) AgNP uygulamalarının sekonder metabolitlerin sentezinde artışa neden olduğunu gözlemlemişler. Ayrıca aynı çalışmada 100 mg/L AgNP konsantrasyonunun toplam fenolik ve flavonoid içeriğini arttırdığını, 150 mg/L AgNP konsantrasyonunun ise azalttığını bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada 9 farklı bileşiğin miktarının AgNP uygulamaları ile arttığı da gözlenmiştir (Chung vd., 2018). Karakaş (2020) tarafından yapılan bir çalışmada ise 0, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/L AgNP konsantrasyonlarının *in vitro* ortamda büyütülen *Isatis constricta* yapraklarındaki indigo, indirubin ve triptantrin sentezindeki etkisini gözlemlenmiş ve bu çalışmanın sonucunda indigo ve triptantrin sentezinin miktarının olumlu yönde arttığı rapor edilmiştir. Yaptığımız çalışmaya benzer bir çalışmada AgNP uygulamasının *in vitro* koşullarda yetiştirilen *M. officinalis* üzerinde kallus oluşumu ve sekonder metabolit üretimi üzerine olan etkileri araştırılmış ve AgNP'lerin farklı konsantrasyonlarının *M. officinalis* bitkisindeki sekonder metabolit miktarını, kallus oluşumunu, kallus çapını ve kallus ağırlığını önemli derecede etkilediği gözlenmiştir. Aynı çalışmada *in vitro* koşullarda *M. officinalis*'in rosmarinik asit, kafeik asit, klorojenik asit, protokateşik asit, hesperidin ve p-kumarik asit olmak üzere 6 farklı fenolik bileşik saptanmıştır. Farklı AgNP konsantrasyonlarında bu bileşiklerdeki miktarların kontrole kıyasla önemli derece arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmaya göre en yüksek rosmarinik asit miktarının 50 µg/l konsantrasyonunda olduğu gözlenirken; en yüksek kafeik asit, klorojenik asit, protokateşik asit ve p-kumarik asit miktarı ise 75 µl/g konsantrasyonunda olduğu, hesperidin miktarının ise hem 50 µg/l hem de 75 µg/l konsantrasyonlarında olduğu rapor edilmiştir (Kapdan, 2023). Ali vd. (2019)'nin yaptığı çalışmada AgNP'lerin *Caralluma tubertuculata* bitkisinde antioksidan sekonder metabolit sentezi üzerindeki etkisi incelemişler. Bu amaç doğrultusunda biyokütle ve antioksidan sekonder metabolitlerin sentezi için *in vitro* ortamda farklı konsantrasyonlarda AgNP'ler ve bitki büyüme düzenleyicileri eklemişler. Bu

çalışmada kallus kültürlerinin fitokimyasal analizi sonucunda 90 µg/L AgNP uygulaması ile MS besiyerinde oluşturulan kallus kültürlerindeki fenoliklerin, flavonoidlerin ve PAL'in yüksek üretimini rapor etmişlerdir. Chamani vd. (2015) *in vitro* koşullarda *Lilium ledebouti* bitkisinin sürgün kültürlerinde (0, 10, 25, 50, 75 ve 100 mg/L⁻¹) ZnONP'lerin etkilerini incelemişler ve ZnONP uygulamasının toplam fenolik madde içeriğini arttırdığını, en yüksek artışın ise 75 mg/L⁻¹ konsantrasyonunda ZnONP içeren kültürlerden elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bahsedilen literatür çalışmalarından alınan sonuçlar ile yaptığımız tez çalışmasında elde ettiğimiz sonuçlar karşılaştırıldığında elde ettiğimiz bulguların literatürdeki diğer çalışmalar ile paralellik gösterdiği görülmektedir. Yapılan bu çalışmada AgNP uygulanmayan kontrol grubundan elde edilen *M. officinalis* fideleri ile kıyaslandığında AgNP uygulaması yapılan fidelerde fenolik bileşik içeriği ve toplam fenolik madde miktarının artış gösterdiği tespit edildi.

Tıbbi ve aromatik bitkilerin barındırdığı sekonder metabolitler bitkilerdeki antimikrobiyal aktivite üzerinde oldukça etkilidir. Bu sebepten dolayı bitkilerin içeriğindeki sekonder mtabolit oranının artmasının bitkilerdeki antimikrobiyal aktiviteyi de arttıracığı düşünülmektedir. Antimikrobiyal maddeler bakteri, fungus gibi mikroorganizmaların üremesini ve gelişmesini durduran veya bu mikroorganizmaları öldürücü etkiye sahip olan ajanlardır (Baytop; Abbasoğlu, 1996). Antibiyotik kullanımının yaygınlaşmasıyla beraber ilaca dirençli bakteri suşlarının da sayısı artmış olup bu durum antibiyotik etkinliğinin azalmasına sebep olmuştur (Çelik, 2022). Mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç mekanizmaları araştırmacıların ilgisini farklı doğal kaynaklardan yeni antimikrobiyal madde arayışına çekmiştir. Antibiyotik kullanımına bağlı olarak oluşan sorunlar, antimikrobiyal aktivitesi olan bitkilere olan ilgiyi arttırmıştır (Saraç, 2005). *In vitro* yöntemler kullanılarak yapılan birçok çalışmada bitkilerden elde edilen özütlerin ve uçucu yağların bakteriyel gelişimi inhibe ettiği ve bu sayede dirençli mikrobiyal suşların oluşumunun önlenmesinde önemli rol oynadığı görülmüştür (Eloff, 1998). Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal özellikleri hakkında birçok çalışma rapor edilmiştir (Saraç, 2005). Bitki sekonder metabolitlerinin önemli bir kısmını oluşturan flavonoidlerin antimikrobiyal etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Saraç, 2005). Ayrıca günümüzde nanoteknoloji sayesinde oluşturulan nanopartiküllerin, kullanılan birçok antimikrobiyal maddeye oranla daha üstün antimikrobiyal aktiviteye sahip olması ortaya çıkan direnç sorununu çözmek için yeni fırsatlar ortaya çıkarmıştır (Çelik, 2022).

Çalışmamızda AgNP stresine maruz bırakılarak *in vitro* ortamda yetiştirilen *M. officinalis* bitki ekstraktlarının 11 indikatör mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal aktivitesine bakıldı. *M. officinalis* methanol ekstraktlarının gram (+) bakteriler, gram (-) bakteriler ve funguslar üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonlarının belirlenmesi amaçlandı. Çalışma kapsamında elde edilen veriler incelendiğinde (Tablo 18), 5 mg/L AgNP ve 10 mg/L AgNP ile desteklenen ortamlardan özütlenen bitki ekstraktlarının *E. coli* ve *P. aeruginosa* dışında test edilen diğer mikroorganizmalar üzerinde kontrol ile kıyaslandığında antimikrobiyal aktivite gösterdiği ancak bu aktivitenin standart olarak uygulanan ampicilin ve flukonazolden daha düşük olduğu gözlemlendi.

M. officinalis bitkisinden farklı teknikler ve farklı polaritedeki çözücüler kullanılarak elde edilen ekstraktların farklı mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkisi literatürde mevcuttur. Saraç (2005) tarafından yapılan çalışmada Muğla yöresindeki bazı Lamiaceae türlerinin antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. *M. officinalis*'in etanolik ekstraktının *S. aureus* ve *S. epidermis*'e karşı etkili olduğu ve en etkili aktivitenin *S. epidermis*'e karşı olduğu gözlemlenmiştir. Mabrouki vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada *M. officinalis* bitkisinden elde edilen etanol, hekzan ve aseton ekstraktlarının disk difüzyon yöntemi ile mikroorganizmalar üzerindeki etkisi araştırılmış ve en yüksek inhibisyon etkisinin tüm mikroorganizmalar üzerinde etanol ekstraktının gösterdiği rapor edilmiştir. Alvaro de Jesus Ruiz- Baltazar vd. (2017) yaptıkları çalışmada *M. officinalis* bitkisinden AgNO₃ kullanılarak AgNP sentezlemiş ve agar difüzyon yöntemi ile AgNP'lerin *E. coli* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiğini tespit etmişler. Aynı çalışmada (1, 5, 9, 15, 20 mM) tüm AgNP çözeltilerinin inhibisyon etkisi olduğu gösterilmiştir. Wissam Zam vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, *M. officinalis* bitkisinden ekstrakte edilen uçucu yağların, disk difüzyon agar ve mikro dilüsyon yöntemlerine göre *S. Typhimorium*, *E.coli*, *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a karşı güçlü antimikrobiyal aktivitesi olduğu bulunmuştur. Ayrıca sonuçlar *S. aureus*'un en duyarlı bakteri olduğunu ve en düşük MİK değerine sahip olduğunu göstermiştir. (0,12 mg/ml). WA Abdel- Naime vd. (2019) tarafından yapılan çalışmada *M. officinalis* bitkisinin etanol ekstraktının çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitelerine bakılmıştır. Test edilen numunelerin *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı 1.65 ile 191,4 µg/ml arasında değişen MİK değerlerine sahip olduğu, *E. coli* ve *K. Pneumonia*'ya karşı ise aktivitesinin olmadığı gözlemlenmiştir. Ayrıca *C. albicans*'a karşı antifungal aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. Ertürk (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, *M. officinalis* bitkisinin de içinde bulunduğu 11 farklı bitkinin etanol ekstraktının

in vitro antibakteriyel ve antifungal aktivitesi (3 gram-pozitif, 2 gram- negatif ve 2 fungusa karşı) agar difüzyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve bu çalışma sonucunda *M. officinalis* ekstresinin antimikrobiyal ve antifungal aktivite gösterdiği görülmüştür. Khattap vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada yaptıkları çalışmada AgNP ve SiNP içeren ortamlarda yetiştirilen *Lavandula officinalis*'ten elde ettikleri etanolik akstraktlarının disk difüzyon yöntemi ile *E. coli*, *S. Aerus* ve *S. pneumoniae*'ye karşı farklı antimikrobiyal aktiviteler gösterdiği bildirilmiştir. *E. coli* ve *S. aerus* için en yüksek antimikrobiyal aktivitenin 100 mg/L SiNP'lerin varlığında yetiştirilen *L. officinalis* özütlerinde görüldüğünü, *S. pneumoniae* için ise en yüksek antimikrobiyal aktivitenin nanopartikül uygulaması olmadan yetiştirilen bitki özütlerinde görüldüğünü gözlemlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda bitkilerin büyüme ortamına eklenen SiNP ve AgNP'lerin *L. officinalis* etanolik özütlerindeki fitokimyasal değişimin bu bitkinin antimikrobiyal aktivitesini de değiştirdiğini rapor etmişlerdir. Eren ve Baran (2019) yaptıkları çalışmada yeşil sentez yöntemini kullanarak *P. vera* bitkisinin ekstraktında AgNP sentezlemişler ve bu AgNP'nin *S. Aerus*, *C. albicans* ve *E. coli* mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkisini MİK metodunu kullanarak incelemişler ve sonuç olarak *P. vera* bitkisinden sentezledikleri AgNP'lerin güçlü bir antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Yel (2021) yaptığı çalışmada *P. lentiscus* L. bitkisinin sürgün kültürlerine 1, 4 ve 20 mg/L konsantrasyonlarında AgNP uygulamış ve elde edilen ekstrelerin *E. coli*, *B. cereus* ve *C. albicans* mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerini incelemiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda 1 mg/L konsantrasyonundaki AgNP uygulamasından elde edilen ekstrenin *C. albicans* üzerinde en etkili aktiviteyi gösterdiğini gözlemiş ve düşük AgNP konsantrasyonunun antimikrobiyal aktiviteyi arttırdığını yüksek konsantrasyonların ise aktiviteyi azalttığını rapor etmiştir. *M. officinalis* bitkisinin ve AgNP'lerin antimikrobiyal etkisinin gösterildiği birçok çalışma mevcuttur. Ancak *in vitro* ortamda AgNP stresine maruz bırakılarak yetiştirilen *M. officinalis* bitkisinden elde edilen ekstraktların mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Verilen benzer literatür bilgileri ışığında önceki çalışmalardan elde edilen veriler ile bu tez çalışmasından elde ettiğimiz veriler kıyaslandığında AgNP uygulamalarının *M. officinalis*'in antimikrobiyal aktivitesi üzerinde olumlu bir etkisinin olduğu ve bu etkinin nanopartikül konsantrasyonuna bağlı olarak değiştiği bilgileri paralellik göstermektedir. Yaptığımız çalışmada ekstraktların mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal aktivitesinin AgNP konsantrasyonunun artış ya da azalışıyla ilişkili olmadığı, ancak deneme gruplarının sahip

olduğu toplam fenolik madde miktarları ve kısmen rosmarinik asit miktarlarındaki değişimlerle paralel olarak değiştiği gözlemlendi. Elde ettiğimiz bu sonuçlar fenolik maddelerin bitkilerin sergiledikleri biyolojik aktivitelerden sorumlu olabilecekleri düşüncesini destekler niteliktedir.

M. officinalis bitkisinde bulunan sekonder metabolit içeriğinin aynı zamanda antiviral etkisinin olduğu da bilinmektedir (Ercan Oğuztürk vd., 2021; İnce Köse & Gençler Özkan, 2022). Günümüzde pek çok antiviral ilaç HIV tedavisinde kullanılmakta olup en sık rastlanılan yaklaşım revers transkriptaz inhibisyonudur. HIV enfeksiyonunun tedavisinde uygulanan mevcut strateji, revers transkriptaz inhibitörlerinin ve proteaz inhibitörlerinin beraber kullanılması ile oluşan kombine antiretroviral tedavidir. Kombine antiretroviral tedavide en az iki farklı ilaç grubundan en az üç ilaç birleştirilerek kullanılmaktadır (Chinsembu, 2019). Ancak cART’de kullanılan yöntemler pahalı olmakla beraber, ilaçların uzun süreli kullanımı sonucunda çoklu ilaç direnci (Cortez & Maldarelli, 2011; Palshetkar, vd., 2020), ilaç-ilac etkileşimleri ve birçok ciddi yan etki ortaya çıkabilmektedir (Rege vd., 2015; Hawkins, 2010). Bahsedilen bu nedenlerden dolayı mevcut ilaçların tedavi edici etkileri sınırlanmaktadır. Bu nedenler göz önüne alındığında, kullanılan ilaç tedavilerinde toksisiteyi ve oluşabilecek yan etkileri ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için yeni, güvenilir ve ucuz HIV-RT ajanlarının keşfedilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Harvey, 2000; Salehi vd., 2018). Viral enfeksiyonların önlenmesinde kullanılan standart tedavilerin yetersizliği bilim insanlarını doğal bitkisel kaynakları yeni antiviraller araştırmaya yöneltmiştir. Günümüzde birçok bitki antiviral ajan olarak kullanılmaktadır (Ege & Elmastaş, 2020). Bitkiler çeşitli özelliklere sahip metabolitleri bünyesinde barındırır. Birkillerin içerdiği alkaloidler, terpenidler ve fenolikler gibi bileşiklerin çoğu virüsün çoğalmasını baskılayan antiviral etki mekanizmalarına sahiptir (Oğuztürk Ercan vd., 2021). Bu nedenle bitkiler ve içerdiği fitokimyasal maddeler yeni antiviral ajanlar için doğal bir kaynak olarak önemlidir (Ünlü, 2024). Bitkilerden elde edilen ve HIV-1 RT’yi inhibe edebilen fenolik bileşikler, flavonoidler ve terpenler düşük inhibisyon ve yüksek sitotoksik etkilere sahiptirler.

HIV tedavisinde kullanılabilecek olan bitkilerden biri *M. officinalis*’tir. Yapılan birçok çalışmada *M. officinalis* bitkisinin HIV-1 RT üzerinde antiviral etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Yamasaki vd., 1998; Bekut vd., 2018). Yamasaki vd. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada *M. officinalis* sulu ekstrelerinin HIV üzerinde antiviral etki gösterdiği ve bu etkinin suda çözünen polar maddelerden kaynaklandığı bildirilmiştir. Geuenich vd. (2008)

yaptıkları bir çalışmada *M. officinalis*'ten elde edilen sulu özütlerin, HIV-1 virionlarına karşı konsantrasyona bağlı olarak yüksek bir aktivite gösterdiği rapor etmişlerdir. Ancak *in vitro* koşullarda AgNP stresine maruz bırakılarak yetiştirilen fidelerden elde edilen ekstraktların HIV-1 RT inhibisyonu üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma AgNP stresine maruz bırakılarak yetiştirilen *M. officinalis* fidelerinden elde edilen ekstraktların HIV-1 RT inhibisyonu üzerine antiviral etkilerinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

Çalışmamızda besi ortamına 1,0 mg/L, 5,0 mg/L, 10,0 mg/L, 20,0 mg/L ve 50,0 mg/L konsantrasyonlarında AgNP'ler eklenerek yetiştirilen *M. officinalis* ekstraktlarının HIV-1 RT inhibisyon etkileri belirlendi. Yapılan çalışma sonucunda AgNP uygulaması ile *in vitro* ortamlardan elde edilen *M. officinalis* fidelerinin metanolik ekstraktlarının inhibisyon etkilerinin kontrol grubundan daha yüksek olduğu, standart antiviral olarak değerlendirilen Nevirapin'den ise daha düşük oranda inhibisyon etkisi gösterdiği gözlemlendi. Ekstraktların inhibisyon etkisine bakıldığında 1,0 mg/L AgNP ile desteklenen ortamdan elde edilen ekstraktların daha düşük oranda antiviral etki gösterdiği, en yüksek antiviral etkiyi ise 5,0 mg/L ile desteklenen ortamdan elde edilen ekstraktların gösterdiği gözlemlendi. Diğer ekstraktların inhibisyon etkisinin (10,0 mg/L, 20,0 mg/L, 50 mg/L) konsantrasyon arttıkça azaldığı ancak kontrole kıyasla daha yüksek olduğu belirlendi. Elde edilen sonuçlar *M. officinalis*'in HIV-1 RT üzerinde inhibisyon etkisi olduğu bilgisini desteklemektedir. *In vitro* koşullarda AgNP uygulamalarının *M. officinalis* fidelerinden elde edilen ekstraktların HIV RT inhibisyonu üzerinde olumlu yönde etkisi olduğu düşünülmektedir. AgNP uygulaması ile miktarında artış görülen rosmarinik asit miktarının aynı zamanda fidelerden elde edilen ekstraktların HIV-1 RT inhibisyonu üzerinde etkisinin olduğu düşünülmektedir.

Tıbbi bitkilerde sekonder metabolitlerin üretiminden sorumlu anahtar genler vardır. Bu genlerden biri de PAL genidir. PAL geni, bitkilerde fenilpropanoid biyosentez yolunda rol alan ilk enzimdir. Bu enzim, antosiyanin, kafeik asit, flavonoid, lignin, rosmarinik asit ve fenilpropanoidler gibi çeşitli bileşiklerin üretiminde önemli bir rol oynar (Bharati vd., 2023)

Tez çalışmamızın bu kısmında *in vitro* ortamda yetiştirilen *M. officinalis* fidelerinde farklı konsantrasyonlarda AgNP uygulamalarının sekonder metabolit üretiminden sorumlu anahtar genlerden biri olan PAL geninin ekspresyon seviyesindeki değişimler incelendi. Yaptığımız tez çalışmasının sonucunda AgNP konsantrasyonlarının PAL geni ekspresyon seviyesine farklı oranlarda etki ettiği gözlemlendi. Elde edilen sonuçlara göre PAL geni ekspresyon seviyesinin konsantrasyona bağlı değişiklik gösterdiği görüldü. AgNP

uygulamalarından ve kontrol grubundan elde edilen bulgular kıyaslandığında PAL geninin ekspresyon seviyesindeki en yüksek değişimin 42,16 kat artış ile 50 mg/L ve ardından 30,39 kat artış ile 10 mg/L AgNP uygulanan fidelerde olduğu görüldü. Ardından bu artış oranlarını sırası ile 20 mg/L (10,89) ve 1 mg/L (8,16) konsantrasyonlarında AgNP uygulanan fidelerin takip ettiği gözlemlendi. Ekspresyon seviyesindeki en düşük artış ise 5 mg/L (6,63) AgNP uygulamasından elde edilen fidelerde olduğu gözlemlendi. Yapılan çalışmada ekspresyon seviyesindeki artış miktarlarının konsantrasyona bağlı olmadığı gözlemlendi. PAL geninin ekspresyon seviyeleri ile elde edilen toplam fenolik madde miktarı ve tayin edilen fenolik bileşenlerin miktarı arasında herhangi bir bağlantının olmadığı da gözlemlendi. Bunun durum sekonder metabolitlerin ve ilgili fenolik bileşiklerin sentezinden sorumlu farklı genlerin de olabileceği düşüncesini ortaya koymaktadır. Öyle ki sunulan geçmiş raporlarda sekonder bileşiklerin sentezinden sorumlu birden fazla genin olduğu bildirilmiştir (Riahi vd., 2018; Babajani vd., 2019; Moradbeygi vd., 2020). Bu nedenle çalışmamızdan elde ettiğimiz fenolik madde miktarları ile PAL geninin ekspresyon seviyeleri arasında düzenli bir ilişki tespit edilememiştir.

Literatür incelendiğinde; Babajani vd. (2019) yaptıkları bir çalışmada saksıda yetiştirdikleri *M. officinalis* fidelerine ZnO nanopartiküllerinin 0,100 ve 300 mg/L⁻¹ konsantrasyonlarını uygulamışlar ve bu nanopartikülün 100 ve 300 mg/L⁻¹ konsantrasyonlarının sekonder metabolit üretiminde rol alan genlerden biri olan RAS geninin ekspresyon seviyesinde artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir. Moradbeygi vd. (2020) *Dracocephalum moldavica* L. bitkisinde rosmarinik asit üretimi üzerine (0,30, 60 ve 90 ppm) Fe₂O₃ nanopartikülünün ve tuz stresinin etkisini araştırdıkları bir çalışmada hem tuz hem de püskürtme yoluyla uyguladıkları Fe₂O₃ nanopartiküllerinin sekonder metabolit üretiminden sorumlu olan önemli genlerden PAL, TAT ve RAS'ın ekspresyonunu arttırdığı ve buna bağlı olarak rosmarinik asit miktarında da artışın olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca yaptıkları çalışmada HPLC sonuçlarına göre 50 mM NaCl ve 90 ppm NP'nin eş zamanlı uygulanmasının yapraklardaki rosmarinik asit içeriğinin kontrole kıyasla %81,15 oranında arttırdığını bildirmişlerdir. Literatürde yer alan başka bir çalışmada Riahi vd. (2018) 30 gün büyüttükleri *M. officinalis* fidelerine 8 saat uyguladıkları farklı CuO nanopartikül konsantrasyonlarının TAT geninin ekspresyonunu etkilediğini belirtmişlerdir. Ghasemian vd. (2021), (0, 50 ve 100 mg/L) SeNP'lerin ve (0,50, 100 ve 150 mM NaCl) tuz stresinin *M. officinalis*'in büyümesi, fizyolojisi ve gen ifadesi üzerine etkilerini incelemişler ve bu çalışmanın sonucunda kontrol ile kıyaslandığında 50 mM NaCl ve 100 mg/L SeNP

uygulamasının PAL ve RAS genlerinin ekspresyonunda artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir. Verilen bu benzer çalışmalar haricinde yapılan literatür taramalarında, *in vitro* koşullarda yetiştirilen *M. officinalis* türüne uyguladığımız AgNP'lerin PAL geni ekspresyon seviyesine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan benzer literatür çalışmaları ile yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz bulgular arasında AgNP'nin yüksek konsantrasyonda PAL geninin ekspresyon seviyesini arttırması bakımından paralellik bulunmaktadır.



5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, *in vitro* koşullarda farklı konsantrasyonlarda AgNP stresine maruz bırakılarak yetiştirilen *M. officinalis* bitki türünün fenolik madde birikimi, antimikrobiyal etki, HIV-RT inhibisyonu ve sekonder metabolit üretiminden sorumlu genlerden biri olan PAL geninin ekspresyon seviyesi üzerindeki değişim etkisi araştırıldı. Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışmada şu sonuçlar elde edildi:

1. *M. officinalis* bitkisinden elde edilen ekstraktlarda gallik asit, ferulik asit, protokatekuik asit, kafeik asit, şiringik asit, p-kumarik asit, benzoik asit ve rosmarinik asit bileşenlerinin miktarı kontrol (0,1 mg/L KIN) grubuna kıyasla tüm AgNP konsantrasyonlarında arttığı görüldü. Rosmarinik asit en yüksek değer ile tayin edildi.
2. *M. officinalis* bitkisinden elde edilen ekstraktlarda toplam fenolik madde birikiminin kontrol grubu ile kıyaslandığı 1,0 mg/L AgNP uygulanan fidelerde kontrol ile benzerlik gösterdiği gözlenirken, 5,0-10,0-20,0 ve 50,0 mg/L AgNP uygulanan fidelerde kontrole göre artış gösterdiği gözlemlendi.
3. *B. cereus*, *B. subtilis*, *Y. pseudotuberculosis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* ve *S. cerevisiae* mikroorganizmaları üzerinde en etkili antimikrobiyal aktivite 5,0 mg/L ve 10,0 mg/L AgNP stresine maruz bırakılarak yetiştirilen *M. officinalis* ekstraktlarında görüldü. Ekstraktların *E. coli* ve *P. aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal aktivitesi gözlenmedi.
4. *M. officinalis* bitki ekstraktlarının HIV-1 RT üzerinde inhibisyon etkisi olduğu tespit edilmiştir. İnhibisyon etkisi en yüksek 5,0 mg/L AgNP konsantrasyonunda gözlemlendi. AgNP konsantrasyonu arttıkça HIV-1 RT inhibisyon etkisinin azaldığı tespit edildi.
5. Sekonder metabolit üretiminden sorumlu genlerden biri olan PAL geninin ekspresyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre kontrol ile kıyaslandığında AgNP uygulamalarının PAL geni ekspresyon seviyesini arttırdığı ve en yüksek ekspresyon seviyesinin 50,0 mg/L AgNP konsantrasyonunda olduğu gözlemlendi.

6. ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında *M. officinalis* bitkisine farklı konsantrasyonlarda gümüş nanopartikül uygulaması ile bitkiden elde edilen ekstraktların fenolik bileşen içeriğini ve toplam fenolik miktarını arttırdığı, HIV-1 RT inhibisyonu üzerine olumlu yönde etkisinin olduğu, antimikrobiyal aktivite çalışmalarında çoğu mikroorganizma üzerinde etkili olduğu ancak bu etkinin standart antibiyotiklere göre düşük olduğu ve sekonder metabolit üretiminden sorumlu anahtar genlerden biri olan PAL geninin ekspresyonunda artışa neden olduğu gözlemlendi. AgNP uygulamalarının *M. officinalis* ile yapılan çalışmalarda olumlu yönde etki etmesinden dolayı bu çalışmanın bitki doku kültüründe nanopartikül uygulamalarına yönelik yapılacak olan başka çalışmalara temel oluşturacağı düşünülmektedir.

1. Değerli bitki sekonder metabolitlerinin üretiminde gümüş nanopartiküllerin kullanılması, istenilen kalite ve daha yüksek miktarlarda üretime yönelik çalışmaların yapılması ihtiyacını ortaya koymuştur. Bunun için optimizasyon çalışmaları yapılarak ve biyoreaktör gibi sistemler kullanılarak yüksek miktarlarda üretim gerçekleştirilebilir.
2. Kullanılan nanopartikülün boyutu, sentez yöntemi ve şekli gibi unsurlar bitki gelişimi ve sonrasında bitkisel ürünlerin eldesinde önem arz ettiğinden, farklı tip ve boyuttaki gümüş nanopartiküllerin hem *M. officinalis* türünde hem de farklı bitki türlerinde denenerek, sonuçların ortaya konması ve uygulanabilirliğinin belirlenmesi sağlanabilir.
3. *In vitro* koşullarda nanopartikül uygulamalarına yönelik yapılan çalışmaların sınırlı olması nedeniyle farklı nanopartiküllerin farklı bitki türleri üzerindeki sekonder metabolit üretimi üzerine ve toplam fenolik miktarı üzerine etkilerinin, antimikrobiyal aktivitelerinin ve antiviral aktivitelerinin üzerine etkilerinin araştırılması önerilmektedir.
4. AgNP uygulanmış *M. officinalis* fidelerinden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal aktivitelerinin standart antimikrobiyallere göre düşük olmasından dolayı, daha etkili aktivite gösterecek uygun AgNP konsantrasyonunun veya farklı nanopartikül konsantrasyonlarının etkisi üzerinde çalışılması önerilmektedir.
5. HIV-1 RT inhibisyonunda daha etkili sonuçların elde edilmesi için farklı nanopartikül ve konsantrasyonlarının çalışılması önerilmektedir.

6. Bitkilere uygulanacak olan nanopartiküller ile ilgili yapılacak olan çalışmalarda uygulanan nanopartiküllerin ve konsantrasyonlarının toksisitesinin araştırılması önerilmektedir.
7. Gümüş nanopartiküllerin tarla koşullarında uygulanabilmesi için öncelikle insan sağlığı ve ekolojik çevre üzerindeki etkilerinin araştırılması gerekmektedir.
8. Bitkilerde uygulanan nanopartiküllerin etkilerinin moleküler mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bundan dolayı nanopartiküllerin bitki gelişiminde ve sekonder metabolit üretiminde rol alan genler üzerindeki etkilerinin araştırılması önerilmektedir.



7. KAYNAKÇA

- Abbasoğlu, U. (1996). Antimikrobiyal Aktivite Araştırma Yöntemleri. *FABAD J. Pharm. Science*, 22, 111-118.
- Abdel-Naime, W. A., Fahim, J. R., Fouad, M. A., & Kamel, M. S. (2019). Antibacterial, Antifungal, and GC-MS Studies of *Melissa officinalis*. *South African Journal of Botany*, 124, 228-234.
- Ahmed, S. A., & Baig, M. V. (2014). Biotic Elicitor Enhanced Production of Psoralen in Suspension Cultures of *Psoralea corylifolia* L. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5), 499-504.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). A Review on Plants Extract Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles for Antimicrobial Applications: A Green Expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), 17-28.
- Ahmed, T. (2023). *Gümüş Nanopartiküllerin Termofilik Geobacillus vulcani 2CX ve Enzimleri Üzerindeki Etkileri*. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Diyarbakır.
- Aksoy, B. (2022). *Titanyum Dioksit (TiO₂), Çinko Oksit (ZnO) ve Gümüş (Ag) Nanopartiküllerinin Tk-6 Lenfoblast Hücrelerindeki Toksik Etkilerinin Belirlenmesi*. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Aktaş, K. (2024). *HIV ile Yaşayan Bireylerin Sağlık Hizmetlerine Erişim Hakkı*. Medipol Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Aktay, A. (2019). *Bitki Doku Kültürü Uygulamalarındaki Sterilizasyon Prosedürlerinde Nanopartiküllerin Kullanımı*. Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kütahya.
- Alaca, F., & Arslan, N. (2012). Sekonder Metabolitlerin Bitkiler Açısından Önemi. *Ziraat Mühendisliği*(358), 48-55.
- Ali, A., Mohammad, S., Khan, M. A., Raja, N. I., Arif, M., Kamil, A., & Mashwani, Z.-U. R. (2019). Silver Nanoparticles Elicited *In vitro* Callus Cultures for Accumulation of Biomass and Secondary Metabolites in *Caralluma tuberculata*. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 47(1), 715-724.
- Allahverdiyev, A., Duran, N., Ozguven, M., & Koltas, S. (2004). Antiviral Activity of The Volatile Oils of *Melissa officinalis* L. Against Herpes Simplex Virus Type-2. *Phytomedicine*, 11(7-8), 657-661.
- Alpsar, D. (2011). *HIV-1 Pozitif Eşcinsellerde Virüs Tiplendirmesi ve Direnç Belirlenmesi*. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

- Alvaro de J Ruiz- Baltazar, A. D., Reyes-Lopez, S. Y., Larranaga, D., & Estevez, M. (2017). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using a *Melissa officinalis* Leaf Extract with Antibacterial Properties. *Results in Physics*, 7, 2639-2643.
- Antognoni, F., Zheng, S., Pagnucco, C., Baraldi, R., Poli, F., & Biondi, S. (2007). Induction of Flavonoid Production by UV-B Radiation in *Passiflora quadrangularis* Callus Cultures. *Fitoterapia*, 78(5), 345-352.
- Arıcı, Ö. F. (2014). *HIV-1 Transaktivasyonunun Antisens Oligonükleotid Teknolojisi Kullanılarak İnhibe Edilmesi*. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Kayseri.
- Arslan, E. (2022). *Gümüş Nanopartiküllerin Salvia sclarea'da Sürgün Rejenerasyonu ve Sekonder Metabolit İçeriklerine Etkisi*. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Arslan, N., Gürbüz, B., & Gümüşçü, A. (2022). *Tıbbi Bitkiler İsim Kılavuzu*. Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Atak, E., & Uslu, M. E. (2018). Fenolik Bileşikler, Ekstraksiyon Metotları ve Analiz Yöntemleri. *M.C.B.Ü. Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi*, 3(27), 39-48.
- Babajani, A., Iranbakhsh, A., Ardebili, Z., & Eslami, B. (2019). Differential Growth, Nutrition, Physiology and Gene Expression in *Melissa officinalis* Mediated by Zinc Oxide and Elemental Selenium Nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research International*, 26(24), 24430-24444.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., & Özcan, S. (2001). *Bitki Biyoteknolojisi 1: Doku Kültürü ve Uygulamaları*. Konya: Selçuk Üniversitesi Basımevi.
- Bakır, Ö. (2020). Sekonder Metabolitler ve Roller. *UAZİMDER*, 2(4), 39-45.
- Baltimore, D. (1970). Viral RNA-Dependent DNA Polymerase: RNA-Dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature*, 226(5252), 1209-1211.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., & Montagnier, L. (1983). Isolation of A T-Lymphotropic Retrovirus from A Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868-871.
- Başaran Şatır, G. (2013). *HIV-1 Replikasyonunu Kontrol Altında Tutabilmek İçin HIV-1 Transaktivatör Protein (TAT) Aktivitesini Durduracak İnhibitörlerin Araştırılması*. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri.
- Başkal, G. (2019). *Antiradikal Etkili Standardize Melissa officinalis L. Ekstresi Hazırlanması*. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri.

- Bayhan, N. (2023). *Bitki Doku Kültürü Sistemlerinde Vitrifikasyon Sorununun Aronya'da (Aronia melanocarpa) Modellemesi ve Çözüm Önerileri*. Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, Bolu.
- Baytop, T. (1984). *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi Geçmişte ve Bugün*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Bektaş, E. (2014). *Orchis sancta L. ve Serapias. Vomeracea (Burm. F.) Brıq. Türlerinin Bitki Doku Kültürü Yöntemiyle Üretimi*. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Trabzon.
- Bekut, M., Brkic, S., Kladar, N., Dragovic, G., Gavaric, N., & Bozin, B. (2018). Potential of Selected Lamiaceae Plants in Anti(retro)viral Therapy. *Pharmacological Research*, 133, 301-314.
- Berk, S., & Akkurt, İ. (2012). Nanopartikül: Geleceğin Korkulu Rüyası. *Tuberk Toraks*, 60(2), 180-184.
- Beykaya, M., & Çağlar, A. (2016). Bitkisel Özütler Kullanılarak Gümüş-Nanopartikül (AgNP) Sentezlenmesi ve Antimikrobiyal Etkinlikleri Üzerine Bir Araştırma. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 16(3), 631-641.
- Beyth, N., Hourı-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W., & Hazan, R. (2015). Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 246012.
- Bharati, R., Sen, M. K., Kumar, R., Gupta, A., Ziarovska, J., Fernandez-Cusimamani, E., & Leuner, O. (2023). Systematic Identification of Suitable Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR Analysis in *Melissa officinalis* L. *Plants*, 12, 470.
- Bilaloğlu, G. V., & Harmandar, M. (1999). *Flavonoidler*. İstanbul: Aktif Yayınevi.
- Bohn, T. (2014). Dietary Factors Affecting Polyphenol Bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72(7), 429-452.
- Can, B., & Gürel, A. (2023). Nanopartiküllerin Bitki Sistemlerinde Bitki Doku Kültürü Uygulamalarına Yönelik Genel Bir Bakış. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 6(3), 335-370.
- Ceylan, A. (1997). *Tıbbi Bitkiler-2 (Uçucu Yağ Bitkileri)*. İzmir: Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları.
- Chamani, E., Ghalehtaki, S. K., Mohebodini, M., & Ghanbari, A. (2015). The Effect of Zinc Oxide Nanoparticles and Humic Acid on Morphological Characters and Secondary Metabolite Production in *Lilium ledebourii* Bioss. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 4(2), 11-19.
- Chinsembu, K. C. (2019). Chemical Diversity and Activity Profiles of HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors from Plants. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29, 504-528.

- Chung, I.-M., Rajakumar, G., & Thiruvengadam, M. (2018). Effect of Silver Nanoparticles on Phenolic Compounds Production and Biological Activities in Hairy Root Cultures of *Cucumis anguria*. *Acta Biologica Hungarica*, 69(1), 97-109.
- Chung, I.-M., Rekha, K., Rajakumar, G., & Thiruvengadam, M. (2018). Influence of Silver Nanoparticles on The Enhancement and Transcriptional Changes of Glucosinolates and Phenolic Compounds in Genetically Transformed Root Cultures of *Brassica rapa* ssp. *rapa*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(11), 1665-1677.
- Coghlan, A. (2003). 'Protato' to Feed India's Poor. *New Scientist*, 177(2376), 7.
- Collin, H. A. (2001). Secondary Product Formation in Plant Tissue Cultures. *Plant Growth Regulation*, 34, 119-134.
- Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. B. (2009). The Story of Phosphorus: Global Food Security and Food for Thought. *Global Environmental Change*, 19(2), 292-305.
- Cortez, K. J., & Maldarelli, F. (2011). Clinical Management of HIV Drug Resistance. *Viruses*, 3(4), 347-378.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Cilt 1250-1319).
- Çelik, T. (2022). *Gümüş Nanopartiküllerinin Kribbella turkmenica 16K104 ile Ekstraselüler Sentezi, Karakterizasyonu, Antimikrobiyal Aktivitesi ve Genotoksitesinin Araştırılması*. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Samsun.
- Çetinkaya, Y., & Ünal, S. (1998). *HIV Enfeksiyonunda Antiretroviral Tedavi*. Ankara: Türk Eczacılar Birliği.
- Çokişlerel, A. (2019). *Gümüş Nanopartikül Uygulaması ile Pamukta Solgunluk Etmeni Verticillium Dahliae Kleb Kontrolü*. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
- Das, K., & Arnold, E. (2013). HIV-1 Reverse Transcriptase And Antiviral Drug Resistance. *Current Opinion in Virology*, 3(2), 111-118.
- Davis, P. H. (1982). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University Press.
- Dehghani-Aghchekohal, Z., Omid, M., Azizinezhad, R., & Etminan, A. (2022). Stimulation of Secondary Metabolites and γ -Terpinene Synthase by Silver Nanoparticles in Callus Cultures of *Carum carvi*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(7), 3228-3241.
- Dinçer, D., Bekçi, B., & Bekiryazıcı, F. (2016). Türkiye'deki Doğal Bitki Türlerinin Üretiminde Doku Kültürü Tekniklerinin Kullanımı. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(TARGID Özel Sayı), 295-302.

- Dixon, R. A., & Paiva, N. L. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *Plant Cell*, 7(7), 1085-1097.
- Dixon, R. A., & Sumner, L. W. (2003). Legume Natural Products: Understanding and Manipulating Complex Pathways for Human and Animal Health. *Plant Physiology*, 131(3), 878-885.
- Ege, M., & Elmastaş, M. (2020). Antiviral Etkili Fitoterapötikler: Tıbbi Bitkiler ve Fitokimyasallar. *Journal of Integrative and Anatolian Medicine*, 1(2), 5-20.
- Eloff, J. N. (1998). Which Extractant Should Be Used for The Screening and Isolation of Antimicrobial Components From Plants?. *J Ethnopharmacol*, 60(1), 1-8.
- Ercan Oğuztürk, G., Turna, T., Yüksek, T., & Kaval, U. (2021). Bazı Bitki Ekstraktlarının Antiviral Etkileri Üzerine Bir Derleme. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri dergisi*, 4(2), 156-163.
- Eren, A., & Baran, M. F. (2019). Fıstık (*Pistacia vera* L.) Yaprğından Gümüş Nanopartikül (AgNP)'lerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 6(2), 165-173.
- Ergezer, H., & Çam, M. (2008). Tanenler: Sınıflandırma, Yapıları ve Sağlık Üzerine. *Türkiye 10. Gıda Kongresi Kitabı*. Ankara: Gıda Teknolojisi Derneğı.
- Erkekoğlu, P., & Koyuncu, N. (2017). İnsan İmmünoyetmezlik Virüsü-1 HIV-1 İntegraz İnhibitörleri. *HUJPHARM*(1), 29-51.
- Ersöz, M., Işıtan, A., & Balaban, M. (2018). *Nanoteknoloji 1: Nanoteknolojinin Temelleri*. Denizli.
- Ertürk, Ö. (2006). Antibacterial and Antifungal Activity of Ethanolic Extracts from Eleven Spice Plants. *Section Cellular and Molecular Biology*, 61(3), 275-278.
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., & Casati, P. (2012). Flavonoids: Biosynthesis, Biological Functions, and Biotechnological Applications. *Frontiers in plant science*, 3, 222.
- Farahani, H. A., Valadabadi, S. A., Daneshian, J., & Khalvati, M. A. (2009). Evaluation Changing of Essential Oil of balm (*Melissa officinalis* L.) Under Water Deficit Stress Conditions. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(5), 329-333.
- Faria, N. R., Rambaut, A., Suchard, M. A., Baele, G., Bedford, T., Ward, M. J., & Lemey, P. (2014). The Early Spread and Epidemic Ignition of HIV-1 in Human Populations. *Science*, 346(6205), 56-61.
- Fauci, A. S. (1982). The syndrome of Kaposi's Sarcoma and Opportunistic Infections: An Epidemiologically Restricted Disorder of Immunoregulation. *Annals of Internal Medicine*, 96(6 Pt 1), 777-779.

- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Micheal, S. F., & Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in The Chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 397(6718), 436-441.
- Genç, S. (2023). *Tarçın Kabuğu (Cinnamomum verum) Sulu Özütü Kullanılarak Yeşil Sentez ile Gümüş Nanopartiküllerin Üretimi Karakterizasyonu ve Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi*. Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kilis.
- Geuenich, S., Goffinet, C., Venzke, S., Nolkemper, S., Baumann, I., Plinkert, P., & Keppler, O. T. (2008). Aqueous Extracts from Peppermint, Sage and Lemon Balm Leaves Display Potent Anti-HIV-1 Activity by Increasing the Virion Density. *Retrovirology*, 5, 27.
- Ghanati, F., & Bakhtiarian, S. (2014). Effect of Methyl Jasmonate and Silver Nanoparticles on Production of Secondary Metabolites by *Calendula officinalis* L (Asteraceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(11), 1783-1789.
- Ghasemian, S., Masoudian, N., Nematpour, F. S., & Afshar, A. S. (2021). Selenium Nanoparticles Stimulate Growth, Physiology, and Gene Expression to Alleviate Salt Stress in *Melissa officinalis*. *Biologia*, 76, 2879-2888.
- Gopinath, P., Gogoi, S. K., Sanpui, P., Paul, A., Chattopadhyay, A., & Ghosh, S. S. (2010). Signaling Gene Cascade In Silver Nanoparticle Induced Apoptosis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(2), 240-245.
- Gökçe, Z. Z. (2019). *Gümüş Nanopartiküllerinin Domates (Lycopersicon esculentum Mill.) Tohumları Üzerindeki Fizyolojik ve Biyokimyasal Etkilerinin Araştırılması*. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Gürel, A., Hayta, Ş., Nartop, P., Bayraktar, M., & Fedakar, S. (2013). *Bitki Hücre, Doku ve Organ Kültürü Uygulamaları*. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi.
- Gürsul, I. (2012). *Vurgulu Elektrik Alan Uygulamalarının Domates Hücre Kültüründeki Biyoaktif Bileşenler Üzerine Etkisi*. Tunceli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Tunceli.
- Harvey, A. (2000). Strategies for Discovering Drugs from Previously Unexplored Natural Products. *Drug Discovery Today*, 5(7), 294-300.
- Hawkins, T. (2010). Understanding and Managing The Adverse Effects of Antiretroviral Therapy. *Antiviral Research*, 85(1), 201-209.
- Herodez, S. S., Hadolin, M., Škerget, M., & Knez, Ž. (2003). Solvent Extraction Study of Antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) Leaves. *Food Chemistry*, 80(2), 275-282.
- Hey, T. (1999). Richard Feynman and Computation. *Contemporary Physics*, 40(4), 257-265.

- Hohmann, J., Zupkó, I., Rédei, D., Csányi, M., Falkay, G., Máthé, I., & Janicsák, G. (1999). Protective Effects of The Aerial Parts of *Salvia officinalis*, *Melissa Officinalis* and *Lavandula angustifolia* and Their Constituents Against Enzyme-Dependent and Enzyme-Independent Lipid Peroxidation. *Planta Med.*, 65(6), 576-578.
- Homaee, M. B., & Ehsanpour, A. A. (2015). Physiological and Biochemical Responses of Potato (*Solanum tuberosum*) to Silver Nanoparticles and Silver Nitrate Treatments under *In Vitro* Conditions. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20, 353-359.
- Huang, H., Chopra, R., Verdine, G. L., & Harrison, S. C. (1998). Structure of A Covalently Trapped Catalytic Complex of HIV-1 Reverse Transcriptase: Implications for Drug Resistance. *Science*, 282(5394), 1669-1675.
- İçigen, H. Ö. (2019). *Bitki Doku Kültürü Yöntemi ile Elde Edilen Bazı Bitki Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi*. Kütahya Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kütahya.
- İnce Köse, T., & Gençler Özkan, A. M. (2022). Antiviral Etkili Bitkiler. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 46(2), 505-522.
- İşman Güven, Ö. (2010). *Melissa officinalis L. Subsp. officinalis Bitkisi Üzerinde Farmakognozik Çalışmalar*. Yeditepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Jadczak, P., Kulpa, D., Bihun, M., & Przewodowski, W. (2019). Positive Effect of AgNPs and AuNPs *In Vitro* Culture of *Lavandula angustifolia* Mill. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 139(191-197).
- Jun-Ge, Q. U., Wei, Z., Wei-Fang, J., & Xing-Ju, Y. U. (2006). Effect of Homogeneity on Cell Growth and Anthocyanin Biosynthesis in Suspension Cultures of *Vitis vinifera*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22(5), 805-810.
- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 377-392.
- Kapdan, G. (2023). *Gümüş Nanopartikül (AgNP) Uygulamalarının Oğulotu (Melissa officinalis L.) Bitkisinde Doku Kültürü ve Sekonder Metabolit Birikimi Üzerine Etkileri*. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Isparta.
- Karabulut Bay, A. (2008). Resveratrol ve Etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 28(6), 166-169.
- Karabulut, G., & Yemiş, O. (2019). Fenolik Bileşiklerin Bağlı Formları ve Biyoyararlılığı. *Akademik Gıda*, 17(4), 526-537.
- Karakaş, Ö. (2020). Effect of Silver Nanoparticles on Production of Indole Alkaloids in *Isatis constricta*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 44(3), 621-627.

- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of Phenolic Compounds. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(6), 453-464.
- Karasová, G., & Lehotay, J. (2005). Chromatographic Determination of Derivatives of p-Hydroxybenzoic Acid in *Melissa officinalis* by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28(15), 2421-2431.
- Karataş, M., Ataç, A., Uçar, M., & Kantarcı, M. (2010). HIV Pozitif Kişilerin Eşlerine Hastalığı Bildirme(me)nin Yasal ve Etik Açıdan Değerlendirilmesi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(3), 215-222.
- Katar, N., & Katar, D. (2020). *Tıbbi ve Aromatik Bitkiler*. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Yayınları.
- Kaveh, R., Li, Y. S., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C. L., & Van Aken, B. (2013). Changes in *Arabidopsis thaliana* Gene Expression in Response to Silver Nanoparticles and Silver Ions. *Environmental Science & Technology*, 47(18), 10637-10644.
- Kayın, N., & Turan, F. (2023). Bitki Doku Kültürünün Biyoteknolojik Olarak Kullanımı. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 4(1), 1-10.
- Keiper, A. (2003). The Nanotechnology Revolution. *The New Atlantis*, 2, 17-34.
- Keşre, G. (2023).). *HIV Hastalarında Antiretroviral Tedavinin Lenfosit Alt Grup ve CD38 ile Hladr Üzerine Etkisi*. Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Hatay.
- Khalil, M. Y., Moustafa, A. A., & Naguib, N. (2007). Growth, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Some Medicinal Plants Grown under Farming Condition. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(4), 451-457.
- Khan, S., & Khan, J. (2010). Drought Tolerant Wheat Cultivar (Raj) for Rainfed Areas of KPK, Pakistan. *Pakistan Journal of Agriculture Sciences*, 47(4), 355-359.
- Khattab, S., El Sherif, F., AlDayel, M. F., Yap, Y. K., Meligy, A., & Islam, V. H. (2022). Silicon Dioxide and Silver Nanoparticles Elicit Antimicrobial Secondary Metabolites while Enhancing Growth and Multiplication of *Lavandula officinalis* in vitro Plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 149(1-2), 411-421.
- Kim, K. J., Sung, W. S., Moon, S. K., Choi, J. S., Kim, J. G., & Lee, D. G. (2008). Antifungal Effect of Silver nNanoparticles on Dermatophytes. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(8), 1482-1484.
- Klębowski, B., Depciuch, J., Parlińska-Wojtan, M., & Baran, J. (2018). Applications of Noble Metal-Based Nanoparticles in Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 4031.
- Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A., & Steitz, T. A. (1992). Crystal Structure at 3.5 Å Resolution of HIV-1 Reverse Transcriptase Complexed with An Inhibitor. *Science*, 256(5065), 1783-1790.

- Korkmaz, Y. (2013). *Bitki Doku Kültürü Teknikleri ile Üretilen Doğal Tetraploid Trifolium pratense L. Rejenerantları Arasındaki Somaklonal Varyasyonun Belirlenmesi*. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak.
- Koukol, J., & Conn, E. E. (1961). The Metabolism of Aromatic Compounds in Higher Plants. IV. Purification and Properties of The Phenylalanine Deaminase of *Hordeum vulgare*. *The Journal of Biological Chemistry*, 236, 2692-2698.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 162750.
- Kumlay, A. M., & Eryiğit, T. (2011). Bitkilerde Büyüme ve Gelişmeyi Düzenleyici Maddeler: Bitki Hormonları. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 1(2), 47-56.
- Küçükçobanoğlu, Y. (2022). *Domates Bitkisinin Metal Bazlı Nanopartikül Uygulamalarına Fizyolojik ve Proteomik Yanıtlarının Belirlenmesi*. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir.
- Lamaison, J., Petitjen-Freytet, C., & Carnat, A. (1990). Teneurs en Acide Rosmarinique, en Dérivés Hydroxycinnamiques Totaux et Activité Antioxydante Chez Les Apiacées, Les Borraginacées et Les Laminacées Médicinales. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 48(2), 103-108.
- Lever, A. (2009). HIV: The Virus. *Medicine*, 37, 313-316.
- Li, D., An, Q., Wu, Y., Li, J. Q., & Pan, C. (2020). Foliar Application of Selenium Nanoparticles on Celery Stimulates Several Nutrient Component Levels by Regulating The A-Linolenic Acid Pathway. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(28), 10502-10510.
- Lopez- Serrano, A., Munoz- Olivas, R., Sans- Landaluze, J., & Camara, C. (2014). Nanoparticles: A Global Vision. Characterization, Separation, and Quantification Methods: Potential Environmental and Health Impact. *Analytical Methods*, 6(1), 38.
- Mabrouki, H., Duarte, C. M., & Akretche, D. E. (2018). Estimation of Total Phenolic Contents and *In Vitro* Antioxidant and Antimicrobial Activities of Various Solvent Extracts of *Melissa officinalis* L. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43(7), 3349-3357.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
- Marchand, B., Sarafianos, S. G., Das, K., Arnold, E., Himmel, D., Parniak, M. A., & Hughes, S. H. (2009). Structure and Function of HIV-1 Reverse Transcriptase: Molecular Mechanisms of Polymerization and Inhibition. *J Mol Biol*, 385(3), 693-713.
- Matthew, G., König, G. M., & Wright, A. D. (1999). HIV Reverse Transcriptase Inhibitors of Natural Origin. *Planta Medica*, 65(6), 493-506.

- Mayers, D. L., Lerner, S. A., Ouellette, M., & Sobel, J. D. (2009). *Antimicrobial Drug Resistance*: Humana Press.
- Miazeck, K., Iwanek, W., Remacle, C., Richel, A., & Goffin Dorothe. (2015). Effect of Metals, Metalloids and Metallic Nanoparticles on Microalgae Growth and Industrial Product Biosynthesis: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 23929-23969.
- Mody, V. V., Siwale, R., Singh, A., & Mody, H. R. (2010). Introduction to Metallic Nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2(4), 282-289.
- Moradbeygi, H., Jamei, R., Hiedari, R., & Darvishzadeh, R. (2020). Fe₂O₃ Nanoparticles Induced Biochemical Responses and Expression of Genes Involved in Rosmarinic Acid Biosynthesis Pathway in Moldavian balm under salinity stress. *Physiologia Plantarum*, 169(4), 555-570.
- Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat- Hosseini, M., Fayazi- Barjin, A., & Meftahizade, H. (2010). *Melissa officinalis* L., A Valuable Medicine Plant: A Review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(25), 2753-2759.
- Mothes, K. (1955). Physiology of Alkaloids. *Annual Review of Plant Physiology*, 6, 393-432.
- Mulabagal, V., & Tsay, H. S. (2004). Plant Cell Cultures an Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. 2(1), 29-48.
- Negi, J. S., Bisht, V. K., Singh, P., Rawat, M., & Joshi, G. P. (2013). Naturally Occuring Xanthones: Chemistry and Biology. *Journal of Applied Chemistry*, 2013(1), 1-19.
- Noguez, C. (2007). Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(10), 3806-3819.
- Oates, J. F., Waterman, P. G., & Choo, G. M. (1980). Food Selection by The South Indian Leaf-Monkey, *Presbytis johnii* in Relation to Leaf Chemistry. *Oecologia*, 45, 45-56.
- Ocsoy, İ., Paret, M. L., Ocsoy, M. A., Kunwar, S., Chen, T., You, M., & Tan, W. (2013). Nanotechnology in Plant Disease Management: DNA-Directed Silver Nanoparticles on Graphene Oxide as An Antibacterial Against *Xanthomonas perforans*. *ACS Nano*, 7(10), 8972-8980.
- Oğuztürk Ercan, G., Turna, T., Yüksek, T., & Kaval, U. (2021). Bazı Bitki Ekstraktlarının Antiviral Etkileri Üzerine Bir Derleme. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 4(2), 156-163.
- Oksman-Caldentey, K. M., & Inzé, D. (2004). Plant Cell Factories in The Post-Genomic Era: New Ways to Produce Designer Secondary Metabolites. *Trends in Plant Science*, 9(9), 433-440.
- Okuda, T., & Ito, H. (2011). Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants-Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, 16(3), 2191-2217.

- Öğüt, S. (2021). *Meme Kanseri Hücre Dizisi Üzerinde (Mcf-7), Avokado (Persea Americana) ve Oğulotu (Melissa Officinalis) Bitki Ekstrelerinin Antiproliferatif, Apoptotik Ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması*. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Doktora Tezi, Aydın.
- Öğütmen, Y. (2022). *İstanbul Tıp Fakültesi'nde Takip ve Tedavisi Yapılan HIV-Pozitif Hastaların HIV'le İlişkili Nörokognitif Hastalık Alanlarının Araştırılması*. İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul.
- Özeker, E. (1999). Phenolic Compounds and Their Importance. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 9(2), 114-124.
- Özkaynak, E., & Samancı, B. (2016). Mikroçoğaltımda Çevresel Kontrol Faktörleri. *Derim*, 20(1), 7-18.
- Öztolüt, F. (2023). *Astragalus membranaceus'dan Yeşil Sentez ile Hazırlanan Gümüş Nanopartiküllerin Antimikrobiyal ve Antikanser Etkinliğinin İncelenmesi*. Hitit Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Çorum.
- Palshetkar, A., Pathare, N., Jadhav, N., Pawar, M., Wadhwani, A., Kulkarni, S., & Singh, K. K. (2020). *In vitro* Anti-HIV Activity of Some Indian Medicinal Plant Extracts. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 20(1), 69.
- Peterson, M., & Simmonds, M. S. (2003). Rosmarinic Acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121-125.
- Piot, P., Bartos, M., Ghys, P. D., & Schwartländer, B. (2001). The Global Impact of HIV/AIDS. *Nature*, 410(6831), 968-973.
- Rege, A., Dahake, R., Roy, S., & Chowdhary, A. (2015). Screening of Natural Products for Anti- HIV Potential: An *In vitro* Approach. *Journal of Immuno Virology*, 1(1), 1-7.
- Riahi, M. A., Nasırı, B. M., Rezaee, F., & Baghizadeh, A. (2018). Rosmarinic Acid Accumulation and Expression of Tyrosine Aminotransferase Gene in *Melissa officinalis* Seedlings in Response to CuO Nanoparticles. *Iranian Journal of Biology*, 31, 106-116.
- Ritter, H., & Schulz, G. E. (2004). Structural Basis for The Entrance into The Phenylpropanoid Metabolism Catalyzed by Phenylalanine Ammonia-Lyase. *The Plant Cell*, 16(12), 3426-3436.
- Rittie, L., & Perbal, B. (2008). Enzymes Used in Molecular Biology: A Useful Guide. *J Cell Commun Signal*, 2(1-2), 25-45.
- Ruttkay- Nedecky, B., Krystofova, O., Nejd, L., & Adam, V. (2017). Nanoparticles Based on Essential Metals and Their Phytotoxicity. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 33.
- Saeb, K., & Gholamrezaee, S. (2012). Variation of Essential Oil Composition of *Melissa officinalis* L. Leaves During Different Stages of Plant Growth. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 547-549.

- Said, O. (2016). *Bazı Bitki Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitesi ve Rozmarinik Asit İçeriği Üzerine Çalışmalar*. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Salehi, B., Anil Kumar, N. V., Şener, B., Sharifi-Rad, M., Kılıç, M., Mahady, G. B., & Sharifi-Rad, J. (2018). Medicinal Plants Used in The Treatment of Human Immunodeficiency Virus. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5).
- Saraç, N. (2005). *Muğla Yöresinde Doğal Olarak Yayılış Gösteren Bazı Lamiaceae Türlerinin Antimikrobiyal Etkisinin Belirlenmesi*. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Muğla.
- Schalk, M., Cabello-Hurtado, F., Pierrel, M., Atanossova, R., Saindrenan, P., & Werck-Reichhart, D. (1998). Piperonylic Acid, a Selective, Mechanism-Cased Inactivator of The Trans-Cinnamate 4-Hydroxylase: A New Tool to Control The Flux of Metabolites in The Phenylpropanoid Pathway. *Plant Physiology*, 118(1), 209-218.
- Sentkowska, A., Biesaga, M., & Pyrzynska, K. (2015). Polyphenolic Composition and Antioxidative Properties of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Extract Affected by Different Brewing Processes. *International Journal of Food Properties*, 18(9), 2009-2014.
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and The AIDS Pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Medicine*, 1(1).
- Shen, L., Shen, J., Luo, X., Cheng, F., Xu, Y., Chen, K., & Jiang, H. (2003). Steered Molecular Dynamics Simulation on The Binding of NNRTI to HIV-1 RT. *Biophys J*, 84(6), 3547-3563.
- Shilpa, K., Varun, K., & Lakshami, B. S. (2010). An Alternate Method of Natural Drug Production: Eliciting Secondary Metabolite Production using Plant Cell Culture. *Journal of Plant Sciences*, 5(3), 222-247.
- Singh, R., & Ahamad, S. (2022). Integration of Nanotechnology in Plant Tissue Culture. *Current Nanoscience*, 18(5), 604-610.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Snapper, I., Yü, T. F., & Chiang, Y. (1940). Cinnamic Acid Metabolism in Man. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, 44, 30-34.
- Spinoso-Castillo, J. L., Chavez-Santoscoy, R. A., Bogdanchikova, N., Perez-Sato, J. A., Morales-Ramos, V., & Bello-Bello, J. J. (2017). Antimicrobial and Hormetic Effects of Silver Nanoparticles on *In vitro* Regeneration of Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) Using A Temporary Immersion System. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 129, 195-207.
- Sulukan, E. E., Küçüköğlu, K., & Gül, H. İ. (2009). AIDS Tedavisinde Kullanılan İlaçlar. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 38(1), 47-78.

- Sürengil, G., & Kılınç, B. (2011). Gıda ve Ambalaj Sektöründe Nanoteknolojik Uygulamalar ve Su Ürünleri Açısından Önemi. *Journal of Fisheries Sciences*, 5(4), 317-325.
- Sytar, O., Hemmerich, I., Zivvak, M., Rauh, C., & Brestic, M. (2018). Comparative Analysis of Bioactive Phenolic Compounds Composition from 26 Medicinal Plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(4), 631-641.
- Şaşkara, C., Hürkul, M. M., & Güvenç, A. (2010). Aktarlarda Satılan *Melissa officinalis* L. (Oğulotu, Melisa) Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Çalışmalar. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 39(2), 123-143.
- Şener, K. (2021). *Lamiaceae Familyasına Ait Lavandula Officinalis* Mill., *Melissa officinalis* L., *Mentha piperita* L., *Salvia officinalis* L. Ve *Scutellaria orientalis* L. Türlerinin Anti- İnflamatuar Yolak Enzimleri Lipoksijenaz (Lox) ve Siklooksijenaz (Cox) Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Şirin, S. (2013). *Stres Altındaki Bazı Bitkilerde Biyoteknolojik Önemi Olan Fenilalanin Amonyum Liyaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi Optimizasyonu ve Karakterizasyonu*. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Tiring, G., Satar, S., & Özkaya, O. (2021). Sekonder Metabolitler. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1), 203-215.
- Tiwari, R., & Rana, C. S. (2015). Plant Secondary Metabolites: A Review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(5), 661-670.
- Topçu, Ş., & Çölgeçen, H. (2015). Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(2), 9-29.
- Tunç, A. (2023). *Gümüş Nanopartiküllerin Termofilik Geobacillus vulcani 2CX ve Enzimleri Üzerindeki Etkileri*. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Diyarbakır.
- Turgut Kara, N. (2007). *Astragalus chrysochlorus'da Fenilpropanoid Metabolik Yoluna İlişkin Genomik Analizler*. İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul.
- URL-1. (02 Eylül 2024). <https://bio-norm.com/product/lemon-balm-extract-2/> adresinden alınmıştır.
- Ülgen, C. (2022). *Effects Of Magnetic Field On Tissue Culture, Biological Activity, Phenolic Content And Defense Enzyme Activities (Sod, Cat And Pal) Of Melissa Officinalis L. (Lemon Balm), a Medicinal Plant, Institute of Graduate Studies*. Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Institute of Graduate Studies, Doktora Tezi, Bolu.
- Ünlü, Ü. (2024). *Teucrium Seksiyonunun Bazı Türlerinin Antiviral ve Biyolojik Aktivitelerinin Araştırılması*. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya.

- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella Jr, M. F., Rejeski, D., & Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in The Real World: Redeveloping The Nanomaterial Consumer Products Inventor. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6(1769-1780).
- Vijaya, S. N., Udayasri, P., Aswani, K. Y., Ravi, B., B, Phani, K. Y., & Vijay, V. M. (2010). Advancements in the Production of Secondary Metabolites. *Journal of Natural Products*, 3, 112-123.
- Wang, P., Lombi, E., Zhao, F. J., & Kopittke, P. M. (2016). Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. *Trends in Plant Science*, 21(8), 669-712.
- Warnke, D., & Barreto, J. (2007). Antiretroviral Drugs. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 47(12), 1570-1579.
- Wath, D., Banpiny, P., Öksüz Zehra, & Algül , Ö. (2019). Antiviral İlaçlardaki Gelişmeler ve Değerlendirilmesi. *Lokman Hekim Dergisi*, 9(2), 160-170.
- Wilén, C. B., Tilton, J. C., & Doms, R. W. (2012). HIV: Cell Binding and Entry. *Cold Spring Harbor Perspect in Medicine*, 2(8).
- Xu, C.-C., Wang, B., Pu, Y.-Q., Tao, J.-S., & Zhang, T. (2017). Advances in Extraction and Analysis of Phenolic Compounds from Plant Materials. *Chinese journal of natural medicines*, 15(101), 721-731.
- Xu, H., Qu, F., Xu, H., Lai, W., Wang, Y. A., Aguilar, Z. P., & Wei, H. (2012). Role of Reactive Oxygen Species in The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles on *Escherichia coli* O157:H7. *Biometals*, 25(1), 45-53.
- Yamasaki, K., Nakano, M., Kawahata, T., Mori, H., Otake, T., Ueba, N., & Nakanishi, T. (1998). Anti-HIV-1 Activity of Herbs in Labiatae. *Biological&pharmaceutical bulletin*, 21(8), 829-833.
- Yel, O. (2021). *Gümüş Nanopartikül (AgNP) Uygulamalarının Pistacia lentiscus L. Sürgün Kültürlerinde Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivite Üzerine Etkileri*. Batman Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Batman.
- Zam, W., Quispe, C., Sharifi-Rad, J., Lopez, M. D., Schoebitz, M., Martorell, M., & Pezzani, R. (2022). An Updated Review on The Properties of *Melissa officinalis* L.: Not Exclusively Anti-anxiety. *Frontiers in Bioscience Scholar*, 14(2), 16.
- Zargari, A. (1991). *Medicinal Plants*. Tehran University Publications.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor Signal Transduction Leading to Production of Plant Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.

ÖZGEÇMİŞ

İlk, orta, lise ve üniversite eğitimini Zonguldak'ta tamamladı. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden 2019 yılında onur öğrencisi olarak mezun oldu. 2021 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü Gen Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Kadriye İnan Bektaş danışmanlığında yüksek lisans eğitimine başladı. 2024 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladı.

