

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Paeonia daurica Andrews subsp. *macrophylla* BİTKİ ÖZÜTÜ
FRAKSİYONLARININ BAKTERİYEL REPLİKATİF DNA
POLİMERAZ İNHİBİTÖRLERİNİN VE ANTIOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Adem DEMİR

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY

JÜRİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Ufuk ÖZGEN

Prof. Dr. Vagif ATAMOV

Prof. Dr. Hakkı Türker AKÇAY

Dr. Öğr. Üyesi Fatma YAYLACI KARAHALİL

RİZE-2019


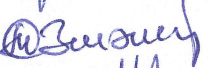



Her Hakkı Saklıdır

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Paeonia daurica Andrews subsp. *macrophylla* BİTKİ ÖZÜTÜ
FRAKSİYONLARININ BAKTERİYEL REPLİKATİF DNA POLİMERAZ
İNHİBİTÖRLERİNİN VE ANTİOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY danışmanlığında, Adem DEMİR tarafından hazırlanan bu çalışma Enstitü Yönetim Kurulu kararı ile oluşturulan jüri tarafından 16/12/2019 tarihinde Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA** tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

	Unvanı, Adı Soyadı	İmza
Başkan	: Prof. Dr. Ufuk ÖZGEN	
Üye	: Prof. Dr. Vagif ATAMOV	
Üye	: Prof. Dr. Hakkı Türker AKÇAY	
Üye	: Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Fatma YAYLACI KARAHALİL	


Doç. Dr. Ferhat KALAYCI
ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

ÖNSÖZ

“*Paeonia daurica* Andrews subsp. *macrophylla* Bitki Özütü Fraksiyonlarının Bakteriyel Replikatif DNA Polimeraz İnhibitörlerinin ve Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması” adlı bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda “Doktora Tezi” olarak hazırlanmıştır.

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında, bana öncülük eden, ilgi ve desteğiyle her konuda yanımda olan, değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY’a teşekkür ederim. Ayrıca tezimin değişik safhalarındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Vagıf ATAMOV’a, Prof. Dr. Ufuk ÖZGEN ve ekibine, Doç. Dr. Cemal SANDALLI’ya, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa EMİRİK’e, Dr. Öğr. Üyesi Kaan KARAOĞLU’na, Dr. Öğr. Üyesi Halbay TURUMTAY’a, Öğr. Gör. Esra DEMİR’e, Öğr. Gör. Tuğba BAYAZIT’a ve Kimyager Havva ER’e teşekkür ederim.

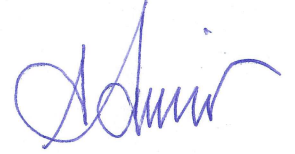
Hayatımın her alanında bana inanarak yalnız bırakmayan, maddi ve manevi desteğiyle yanımda olan çok kıymetli eşime ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Bu Doktora Tezi TÜBİTAK tarafından 113Z054 nolu proje ile desteklenmiştir.

Adem DEMİR

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Tarafımdan hazırlanan “*Paeonia daurica* Andrews subsp. *macrophylla* Bitki Özütü Fraksiyonlarının Bakteriyel Replikatif DNA Polimeraz İnhibitörlerinin ve Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması” başlıklı bu tezi, Yükseköğretim Kurulu Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesindeki hususlara uygun olarak hazırladığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal işlemi kabul ettiğimi beyan ederim. 16/12/2019



Adem DEMİR

Uyarı: Bu tezde kullanılan özgün ve/veya başka kaynaklardan sunulan içeriğin kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

***Paeonia daurica* Andrews subsp. *macrophylla* BİTKİ ÖZÜTÜ FRAKSİYONLARININ BAKTERİYEL REPLİKATİF DNA POLİMERAZ İNHİBİTÖRLERİNİN VE ANTIÖKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Adem DEMİR

**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

Danışmanı: Doç. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY

Paeonia daurica subsp. *macrophylla*'nın meyve, yaprak, gövde ve köklerinden elde edilen metanolik özütlerin primer uzatma deneyi ile bakteriyel ve viral replikatif DNA polimerazları üzerinde inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Bitkinin bütün kısımları bakteriyel ve viral DNA polimerazları üzerinde inhibisyon etkisi gösterse de, köklerindeki inhibitör bileşikler saflaştırmaya odaklanılmıştır. Bileşiklerin kimyasal yapıları, NMR, MS ve FT-IR analizleriyle tamamen aydınlatılmıştır. Paeoniflorin, paeoniflorigenon, benzoil paeoniflorin ile benzoik asit ve türevi olan 2,4,6 trihidroksi-1-metil benzoat isimli beş molekül saflaştırılıp tanımlanmıştır. MMLV-RT'nin hem DNA-bağımlı hem de RNA-bağımlı polimeraz aktivitesi, bu beş molekül tarafından kuvvetle inhibe edilmiştir. Öte yandan, bakteriyel polimerazlar PolC ve DnaE sadece paeoniflorigenon tarafından kuvvetle inhibe edilmiştir. Moleküler modelleme sonuçları deney sonuçlarıyla uyumlu olarak paeoniflorigenonun üç polimerazın aktif bölgeleri ile etkileşime girdiğini göstermiştir. *Paeonia daurica*'nın taze kök, gövde, meyve ve meyve kabuğunun SPME ve hidrodistilasyon ile elde edilmiş uçucu yağları GC-MS kullanılarak incelenmiş ve ana bileşenlerin salisilaldehit, mirital, palmitik asit, metil salisilat ve mirital olduğu görülmüştür. Ayrıca, *P. daurica*'nın tüm uçucu yağları MMLV-RT üzerinde güçlü inhibisyon etkisi göstermiştir. Kök kısmının etil asetat fraksiyonu DPPH ve ABTS radikallerine karşı en düşük SC₅₀ değerine sahip olup yüksek toplam fenolik içeriğinden dolayı kuersetin, troloks ve askorbik asitten daha yüksek temizleme aktivitesi göstermiştir. *P. daurica*'nın kısımlarının yeni antimikrobiyal ajanların ve destekleyici gıdaların üretiminde kullanılabileceği öne sürülmüştür.

2019, 66 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Paeonia daurica*, DNA Polimeraz İnhibisyonu, Uçucu Yağ, Moleküler Modelleme

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BACTERIAL REPLICATIVE DNA POLYMERASE INHIBITORS AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF *Paeonia daurica* Andrews subsp. *macrophylla* PLANT EXTRACT FRACTIONS

Adem DEMİR

Recep Tayyip Erdogan University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Ph. D. Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emine AKYÜZ TURUMTAY

The methanolic extracts from fruit, leaf, stem and roots of *Paeonia daurica* subsp. *macrophylla* were investigated for inhibitory effects on replicative bacterial and viral DNA polymerases by primer extension assay. While all plant parts showed inhibition effect on bacterial and viral DNA polymerases, roots of the plant was focused to purify inhibitory compounds. The chemical structures of compounds were completely elucidated using a combination of NMR, MS and FT-IR analyses. Five molecules with paeoniflorin, paeoniflorigenone, benzoyl paeoniflorin, and benzoic acid with its derivate 2,4,6 trihydroxy-1-methyl benzoate were purified and identified. Both DNA-dependent and RNA-dependent polymerase activity of MMLV-RT was strongly inhibited by these five molecules. On the other hand, bacterial polymerases PolC and DnaE were strongly inhibited by only paeoniflorigenone. Molecular modeling result suggested that paeoniflorigenone interacts with the important residues at active site of three polymerases which support our experimental result. SPME and hydrodistilled essential oil of the fresh root, scape, fruit and fruit bark of *Paeonia daurica* was investigated by using GC-MS and the major constituents of the essential oil were salicylaldehyde, myrtanal, palmitic acid, methyl salicylate and myrtenal. Furthermore, the essential oils of *P. daurica* were evaluated for their inhibition on MMLV-RT. All essential oil extracts have shown strong inhibition effect on viral transcriptase. Ethyl acetate fraction of root had smallest SC₅₀ value against DPPH and ABTS radicals. It showed also higher scavenging activity than quercetin, trolox and ascorbic acid since its quite high total phenolic content. We proposed that the parts of *P. daurica* might be used to find new antimicrobial agents and generate supplementary material for foods.

2019, 66 pages

Keywords: *Paeonia daurica*, DNA Polymerase Inhibition, Essential Oil, Molecular Docking

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	II
ÖZET.....	III
ABSTRACT.....	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ.....	VIII
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Paeoniaceae (Ayıgülügiller) Familyası.....	2
1.3. <i>Paeonia</i> L. (Ayıgülü) Cinsi.....	2
1.4. DNA Polimerazlar.....	4
1.5. C Familyası DNA Polimerazlar (PolIII α).....	4
1.6. Ters Transkriptazlar	4
1.7. DNA İle İlgili Enzimlerin İnhibitörleri.....	5
1.8. Bitkisel Bileşenlerin Ekstraksiyonu ve İzolasyonu.....	8
1.8.1. Bitkisel Bileşiklerin Ekstraksiyonu.....	9
1.8.2. Bitkisel Bileşiklerin İzolasyonu	10
1.9. Bitki Bileşenlerinin Spektroskopik Yöntemlerle Tanımlanması	11
1.9.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi	11
1.9.2. Kütle Spektrometresi.....	12
1.9.3. Nükleer Manyetik Rezonans	12
1.9.4. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi	13
1.10. Bitkisel Uçucu Yağlar.....	13
1.11. Antioksidan Aktivite Tayinleri	14
1.11.1. Toplam Polifenol Tayini	15
1.11.2. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi.....	15
1.11.3. ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi.....	15
1.12. Moleküler Modelleme.....	16
1.13. Literatür Özeti	16
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	19

2.1.	Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar	19
2.2.	<i>Paeonia daurica</i> subsp. <i>macrophylla</i> Bitkisinin Toplanması.....	19
2.3.	Bitkiden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu ve İzolasyonu.....	20
2.4.	Hidrodistilasyon ve Katı Faz Mikroekstraksiyon ile Uçucu Yağ Eldesi	21
2.5.	Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi	21
2.6.	DPPH Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi.....	22
2.7.	ABTS Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi.....	22
2.8.	Uçucu Yağ Analizleri.....	22
2.9.	DNA Polimerazlar ve Substratların Hazırlanması	23
2.10.	<i>Paeonia daurica</i> 'nın Farklı Kısımlarında DNA Polimeraz İnhibisyonunun İncelenmesi	24
2.11.	Moleküler Modelleme Çalışmaları	24
3.	BULGULAR.....	26
3.1.	İzole Edilen Moleküllerin Tanımlanması	26
3.2.	Bitki Dokularının ve İzole Moleküllerin Polimeraz İnhibisyon Etkileri	39
3.3.	Uçucu Yağların Polimeraz İnhibisyon Etkileri	39
3.4.	Bitkinin Farklı Kısımlarının Uçucu Yağ Analizi	40
3.4.1.	SPME Yöntemiyle Uçucu Yağ Analizi	40
3.4.2.	Hidrodistilasyon Yöntemiyle Elde Edilen Uçucu Yağ Analizleri	41
3.5.	Bitkinin Farklı Dokularının ve Kök Fraksiyonlarının Antioksidan Etkileri	43
3.6.	Moleküler Modelleme Denemeleri	44
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	46
5.	ÖNERİLER.....	54
	KAYNAKLAR	55
	ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Bazı <i>Paeonia</i> türüne ait çiçekler.	3
Şekil 2.	<i>Paeonia daurica</i> subsp. <i>macrophylla</i> bitkisinin resimleri.	20
Şekil 3.	İzole edilen bileşiklerin moleküler yapıları	26
Şekil 4.	2,4,6-Trihidroksi 1-metil benzoat (PD-1)'in IR spektrumu.....	27
Şekil 5.	2,4,6-Trihidroksi 1-metil benzoat (PD-1)'in ¹ H-NMR spektrumu	27
Şekil 6.	2,4,6-Trihidroksi 1-metil benzoat (PD-1)'in ¹³ C-NMR spektrumu	28
Şekil 7.	2,4,6-Trihidroksi 1-metil benzoat (PD-1)'in ESI-MS spektrumu.....	28
Şekil 8.	Paeoniflorin (PD-2)'in IR spektrumu	29
Şekil 9.	Paeoniflorin (PD-2)'in ¹ H-NMR spektrumu.....	30
Şekil 10.	Paeoniflorin (PD-2)'in ¹³ C-NMR spektrumu.....	30
Şekil 11.	Paeoniflorin (PD-2)'in ESI-MS spektrumu	31
Şekil 12.	Benzoik Asit (PD-3)'in IR spektrumu	32
Şekil 13.	Benzoik Asit (PD-3)'in ¹ H-NMR spektrumu	32
Şekil 14.	Benzoik Asit (PD-3)'in ¹³ C-NMR spektrumu	33
Şekil 15.	Benzoik Asit (PD-3)'in ESI-MS spektrumu	33
Şekil 16.	Paeoniflorigenon (PD-4)'un IR spektrumu.....	34
Şekil 17.	Paeoniflorigenon (PD-4)'un ¹ H-NMR spektrumu	35
Şekil 18.	Paeoniflorigenon (PD-4)'un ¹³ C-NMR spektrumu	35
Şekil 19.	Paeoniflorigenon (PD-4)'un ESI-MS spektrumu.....	36
Şekil 20.	Benzoilpaeoniflorin (PD-5)'in IR spektrumu	37
Şekil 21.	Benzoilpaeoniflorin (PD-5)'in ¹ H-NMR spektrumu	37
Şekil 22.	Benzoilpaeoniflorin (PD-5)'in ¹³ C-NMR spektrumu	38
Şekil 23.	Benzoilpaeoniflorin (PD-5)'in ESI-MS spektrumu	38
Şekil 24.	İzole Moleküllerin Primer uzatma deneyi ile İnhibisyon Etkileri.	39
Şekil 25.	Bitkinin farklı dokularına ait uçucu yağların M-MLV-RT üzerinde etkileri.	39
Şekil 26.	Paeoniflorigenon'un enzim-ligant kompleks yapılarındaki konformasyonları ve etkileşimleri	45

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.	DNA polimeraz inhibisyonu gösteren bileşikler.....	7
Tablo 2.	Ters transkriptaz inhibisyonu gösteren bileşiklerin kimyasal grupları ve IC ₅₀ değerleri.....	8
Tablo 3.	Primer Uzatma Deneplerinde kullanılan DNA substratları	23
Tablo 4.	SPME yöntemiyle Uçucu Yağ Analizi	40
Tablo 5.	Hidrodistilasyon Yöntemiyle Elde Edilen Uçucu Yağ Analizleri	42
Tablo 6.	Bitki Özülerinin Antioksidan Kapasiteleri	43
Tablo 7.	İzole edilen bileşiklerin Docking skorları, IFD skorları ve bağlanma enerjileri	44

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

μL	Mikrolitre
ΔG	Gibbs Serbest Enerji
ABTS	2,2'-Azino-Bis(3-Etilbenzotiazolin-6-Sülfonik Asit)
AI	Alıkonma İndeksi
ARG	Arjinin
ASN	Asparagin
AZ	Alıkonma Zamanı
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
C	Karbon
DAD	Diyot Sıralı Dedektör
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Nükleozit Trifosfat
DPPH	2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
EN	Erime Noktası
EC	Enzim Konsantrasyonu
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
ESI	Elektron Sprey İyonlaştırma
F	Flor
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi
g	Gram
GAE	Gallik Asit Eşdeğer
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
H	Hidrojen
HIS	Histidin
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Hz	Hertz
IC	İnhibisyon Konsantrasyonu
IFD	Induced Fit Docking
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	Potasyum Persülfat

KE	Kuersetin Eşdeğer
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MM-GBSA	Moleküler Mekanik /Genelleştirilmiş Yüzey Alanı
MMLV-RT	Fare Lösemi Virüs-Ters Transkriptaz
MS	Kütle Spektrometresi
<i>m/z</i>	Kütle/Yük
N	Azot
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
nm	Nanometre
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NNRTIs	Nükleozit Olmayan Ters Transkriptaz İnhibitörleri
NRTIs	Nükleozit Ters Transkriptaz İnhibitörleri
P	Fosfor
PAB	Polimeraz Aktivite Tamponu
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PD	<i>Paeonia daurica</i>
RDDP	RNA Bağımlı DNA Polimeraz
Rf	Refraktif İndis
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
RSA	Radikal Süpürücü Aktivite
SC	Süpürme Kapasitesi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SER	Serin
SPME	Katı Faz Mikroekstraksiyon
TFİ	Toplam Fenolik İçerik
Tr	İz Miktar
TRY	Tirozin
UV-Vis	Ultraviyole Görünür Bölge

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Günümüzde bitkiler ve bitkisel kaynaklı gıdalar çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Halk arasında değişik amaçlarla kullanılan bitkilerin bilimsel yöntemlerle incelenerek tıbbi amaçla kullanılabilir olanların tespiti ve bunlardan insan sağlığı açısından önem taşıyacak ilaçların geliştirilmesi çalışmaları sürdürülmektedir.

Bitkiler tarafından ikincil metabolit olarak triterpenler, flavonoidler, kromonlar, lipitler, iridoitler, fitosteroller, kumarinler, antrasiklinler, kinonlar, tanenler, protoberberinler, benzimidazoller gibi kimyasal açıdan çok kapsamlı bileşikler sentezlenmektedir. Bu bileşikleri içeren doğal ürünlerin kanser araştırmaları için önemli moleküler hedeflerin ortaya çıkmasına izin veren DNA metabolizmasıyla ilgili enzimlere karşı inhibisyon etkilerine sahip oldukları bilimsel olarak ortaya konmaktadır [1, 2].

Tıbbi bitkilerden *Paeonia* L. (Ayıgülü) cinsi *Paeoniaceae* (Ayıgülügiller) familyasına ait olan bir cinsi olup yeryüzünde 35 kadar tür ile temsil edilmektedir [3]. Türkiye bitki örtüsünde ise ikisi endemik olmak üzere 5 türü bulunmaktadır. *Paeonia* cinsi üzerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde; bitkinin köklerinin Uzakdoğu ülkelerinde özellikle Çin ve Japonya'da analjezik, antiinflamatuvar, antiepileptik ve antispazmodik amaçlarla yararlanılan çeşitli halk ilaçlarının hazırlanmasında kullanıldığı görülmektedir [4-6]. Çin'de çiçeklerin kralı olarak adlandırılan Türkiye'de 'Şakayık' adı ile bilinen, halk arasında yörelere göre Yörük gülü, Ayı gülü, Orman gülü, Dağ gülü ve Bocur gülü gibi değişik isimler alan *Paeonia* türlerinin köklerinden hazırlanan özütlerin eski çağlardan beri ilaç olarak kullanıldığı bildirilmektedir [7, 8]. *Paeonia* kökleri üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında *Paeonia* türlerinden elde edilen özütlerde yapılan analjezik, antiinflamatuvar, antiepileptik, antispazmodik araştırmaların ağırlıkta olduğu gözlenmektedir [9-11]. Fakat, literatürde *Paeonia daurica* subsp *macrophylla* bitkisinin bakteriyel replikatif DNA polimeraz III ve viral ters transkriptaz (RT)'lar inhibisyonu üzerinde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında Türkiye'de bulunan *Paeonia daurica* subsp. *macrophylla* bitki özütü fraksiyonlarından bakteriyel replikatif DNA polimeraz ve viral MML-V-RT için inhibisyon etkinin araştırılması, etkili inhibitörlerin yapılarının aydınlatılması ve antioksidan özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda bitkinin kök, gövde,

meyve ve yaprak kısımlarının metanol özütlerindeki toplam bileşenlerinin *E. coli* gram (-) ve *B. subtilis* gram (+) bakterilerine ait olan ve rekombinant olarak üretilen DnaE ve PolC DNA polimerazları (DNA pol III) ile MMLV-RT DNA polimeraz enzimlerini inhibe edip etmedikleri araştırılmıştır. Kök örneklerinden inhibitör moleküller saflaştırılmış ve izole edilen moleküllerin yapıları NMR, ESI-MS ve IR teknikleriyle aydınlatılmıştır. Bunun yanında bitkinin kök, gövde, meyve ve meyve kabuğu kısımlarının metanol özütlerindeki toplam fenolik içerikleri, ABTS ve DPPH radikal temizleme aktiviteleri de incelenmiştir.

1.2. Paeoniaceae (Ayıgülügiller) Familyası

Stearn ve Davis “Peonies of Greece” adlı kitaplarında Kuzey Yarı Küreye ait olan *Paeonia* cinsini 3 seksiyona ayırmışlardır; *Paeonia officinalis* lektotipi ile *Paeonia* seksiyonu, *Paeonia suffruticosa* tip örneği ile *Moutan* seksiyonu ve *Paeonia brownii* tip örneği ile *Onaepia* seksiyonu. *Onaepia* seksiyonu Kuzey Amerika’nın batısında yayılış gösteren 2 tür içermektedir. *Moutan* seksiyonu Doğu Asya’ya aittir ve ağaçsı formları içerir. *Paeonia* seksiyonu ise bütün Balkan *Paeonia* türlerini içerir. İspanya’dan Çin ve Japonya’nın doğusuna kadar yayılıp Kuzey batı Afrika’ya iner ve Kola Yarımadası’ndaki arktik bölgelere de ulaşır [12].

Bir cins ve 35 civarında tür ile temsil edilen bu familya üyeleri kuzey yarımkürenin ılıman iklim bölgelerinden Güney Avrupa, Çin ve Amerika Birleşik Devletleri’nin kuzey batısına kadar yayılış gösterir. *Paeoniaceae* familyasında 15-100 cm yüksekliğinde, çok yıllık ve rizomlu bitkiler bulunmaktadır. Yapraklar alternat dişli, bileşik ve stipulasızdır. Büyük olan çiçekler genellikle tek, hermafrodit, aktinomorf ve hipogin olup brakte taşımaktadır. Sepaller kalıcı, 5 ya da daha fazla sayıdadır. Petaller ise 5-10 adettir. Çiçekler merkezden çevreye doğru sıralanan çok sayıda stamen taşımaktadır [13, 14].

1.3. *Paeonia* L. (Ayıgülü) Cinsi

Çok yıllık, otsu, her zaman yeşil dik, taban kısmı yumrulu ve rizomlu bitkilerdir. Yapraklar biternat veya daha da bölünmüştür. Çiçekler 7-14 cm çapında, petaller beyaz veya kırmızıdır. Stamenler çok sayıdadır ve önce iç stamenler sonra dış stamenler

olgunlaşır [15, 16].

Petal rengi beyaz, sarı ve kırmızının değişik tonlarında olabilen *Paeonia* türleri arasında *P. daurica* Türkiye florasında çiçek rengi sarı olan tek türdür [16, 17]. Şekil 1’de bazı *Paeonia* türlerine ait çiçekler verilmiştir (a) *P. peregrine*, b) *P. mascula* subsp. *arietina*, c) *P. daurica*, d) *P. kesrouanensis*).



a



b



c



d

Şekil 1. Bazı *Paeonia* türlerine ait çiçekler.

Türkiye florasında, türler arası farklılık ve ekolojik şartlara bağlı olarak çiçek açma zamanları değişmekte, Şubat ayından Temmuz ayına kadar çiçekli bitkiye rastlanmaktadır. Ülkemizde yetişen *Paeonia* türlerinin yıllarca doğal formu toplanmış ve ihraç edilmiştir. Bazı türlerin endemik olması ve bitkinin doğal şartlarda çoğalmasının çok zor olması, florada giderek azalmasına sebep olmuştur [17]. Güner [18], *Paeonia* cinsine ait taksonların en son taksonomik durumunu netleştirmiş ve araştırılan taksonun *P. daurica* subsp. *macrophylla* olduğunu ve Rize il sınırları içerisinde yayılış gösterdiğini kaydetmiştir.

1. *P. arietina* G. Anderson (Şakayık)
2. *P. daurica* Andrews subsp. *daurica* (Yörükgülü)
3. *P. daurica* Andrews subsp. *macrophylla* (Albow) D.Y Hong (Gagaç)

4. *P. kesrouanensis* (J.Thiebaut) J.Thiebaut (Yörükgülü)
5. *P. mascula* (L.) Miller subsp. *mascula*
6. *P. mascula* subsp. *bodurii* N. Özhatay (Beyaztombak)
7. *P. peregrine* Mill. (Gocur)
8. *P. teunifolia* L. (Savul)

1.4. DNA Polimerazlar

DNA polimerazlar, DNA sentezinde görev alan enzimlerdir. Hücresel organizmaların her bir çeşidi farklı DNA polimeraz tiplerine sahiptir. Replikatif DNA polimerazlar genom replikasyonunun esas kısmının sentezini gerçekleştirirler. Bununla beraber çeşitli özelleşmiş polimerazlar, zarar görmüş DNA'yı tamir ederler. Polimerazlar canlı organizmalardaki önemli hücresel fonksiyonlarını yerine getirmek için üst düzeyde korunurlar. DNA polimerazlar amino asit dizilişlerine göre A, B, C, D, X ve Y olmak üzere 6 ana gruba ayrılırlar [19, 20]. Hem Gram (-) hem de Gram (+) bakterilerin replikasyonundan sorumlu olan DNA polimeraz III enzimleri C grubu içerisinde yer almaktadırlar.

1.5. C Familyası DNA Polimerazlar (PolIII α)

C familyasından olan DNA polimeraz III, α alt birimiyle (polIII α) bakteri hücrelerinin çoğalmasından sorumlu olan replikasyon enzimleridir. Bakterilerde yapılarına göre 2 farklı tip DNA polimeraz bulunmaktadır. Gram (-)'lerde bulunan replikatif DnaE polimeraz *polE* geni tarafından kodlanırken, spesifik olarak Gram (+)'lerde bulunan polC polimeraz ise *polC* geni tarafından kodlanmaktadır [21, 22]. Gram (-) olan *E. coli*'den izole edilen DnaE ve Gram (+) olan *B. subtilis*'ten izole edilen PolC, PolIII α enziminin en bilinen formlarıdır [23, 24].

1.6. Ters Transkriptazlar

Viral enzim ters transkriptaz bir DNA/RNA hibridi elde etmek için RNA genomunun DNA'ya dönüştürülmesini sentezler. Bu enzim hem RNA hem de DNA

bağımlı polimerazdır. Bir DNA kalıbından olduğu gibi RNA kalıbından da DNA zinciri sentezleyebilir [25]. DNA-RNA hibritindeki RNA zincirinin ayrılması RNaz H aktivitesiyle olur. RT tek sarmallı DNA'dan çift sarmallı DNA oluşumunu katalizler. çift sarmallı DNA viral enzim integras sayesinde konak hücre çekirdeğine girer. Konak hücredeki kromozal DNA ile birleştiğinde provirüs olarak adlandırılan hücre viral genomik RNA ve mRNA transkripsiyonu gerçekleşir [26].

1.7. DNA İle İlgili Enzimlerin İnhibitörleri

DNA replikasyonu, transkripsiyonu, ters transkripsiyonu, rekombinasyonu ve mitoz bölünme boyunca kromozomların ayrılması gibi durumlarda hayati rol oynayan enzimleri inhibe edebilen birçok doğal, sentetik ya da nükleosit olmayan bileşik bulunmaktadır [27]. Literatürün çoğunda DNA polimerazların, topoizomerazların ve ters transkriptazların inhibisyonu üzerine odaklanılmıştır. Farklı organizmalar tarafından üretilen triterpenler, flavonoidler, kromonlar, lipitler, iridoitler, fitosteroller, kumarinler, antrasiklinler, kinonlar, tanenler, protoberberinler, benzimidazoller gibi bileşikler, kanser araştırmaları için önemli moleküler hedeflerin ortaya çıkmasına izin veren DNA metabolizmasıyla ilgili enzimlere karşı inhibisyon etkilerine sahiptir [28].

Doğal ürünlerin, ilaç keşfi ve geliştirilmesi süreçlerinde önemli rol oynadıkları çok iyi bilinmektedir. Özellikle kemoterapide kullanılan ilaçlarının % 60'ı doğal kökenlidir [1]. Yeni öncü moleküllerin keşfi ve geliştirilmesi, insan hastalıklarının teşhisi, önlenmesi ve tedavisi için yeni araçların keşfi için uygulanabilir moleküler hedeflerin gelişmesindeki hızlı büyümenin bir sonucudur. DNA polimerazlar (DNA pols), topoizomerazlar (Topos) ve ters transkriptazlar (RT) replikasyon, transkripsiyon, rekombinasyon ve mitoz boyunca kromozomların ayrılması durumlarında çok önemli rol oynadıkları için son zamanlarda antikanser ve antiviral maddelerin gelişimi için önemli moleküler hedef olarak ortaya çıkmaktadırlar [29].

Yağ asitleri, flavonoidler, dideoksi-nükleotitler, fosfolipitler, iridoitler, triterpenoidler, kateşinler, antasiklinler, aminoakridinler ve eliptisinler dâhil olmak üzere bu inhibitörlerin birkaçı klinik çalışmalarda kullanılmıştır. Ancak daha etkili maddelere hala ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, inhibitörlerin yapısal özelliklerinin araştırılması antikanser ilaçların dizaynı için değerli bilgiler sunabilir ve DNA replikasyon ve

tamirindeki spesifik enzimlerin rollerini daha iyi anlamak için yardımcı olabilir [30].

RT, viral replikasyonda oynadığı önemli rolü nedeniyle, anti-virüs ilaçları için önemli hedef haline gelmiştir [29]. Nükleozit (NRTIs) ve non-nükleozit (NNRTIs) olmak üzere farklı konumda inhibe eden 2 sınıf RT inhibitörü vardır. NRTIs, deoksiribozun 3' karbonunda hidroksil bulunmayan deoksiribonükleosit türevidir. NNRTIs, aktif formuna çevrilen konak hücre metabolizmasına bağlı olmayan kimyasal olarak farklı moleküllerdir. Ayrıca bu hidrofobik moleküller HIV-1 RT'nin allosterik bölgesiyle etkileşerek enzimin katalitik aktivitesini inhibe eder [31]. Bu etkileşim nükleotitlerin birleşme oranını azaltır ve böylece DNA sentezinin duraksamasına önemli derecede etki eder [32]. Dünya Sağlık Örgüt'ü tarafından onay verilen nevirapin, delavirdin, efavirenz, etravirin, rilpivirinin dahil olduğu 5 NNRTIs ve çok daha fazlası klinik çalışmalara girmiştir. Nevirapin ve delavirdin "birinci nesil" NNRTs olarak kabul edilir ve virüsler hatta tek amino asit RT mutasyonları bile kolayca ilaç direnci geliştirebilir [33]. En son onaylanan etravirin ve rilpivirin önemli bir direnç gözlenmeden önce NNRTI bölgesinde en az 3 amino asit mutasyonu gerektirdiğine inanılmaktadır [34]. Bu moleküllerin uyumlu olabileceği çok sayıda konformasyondan dolayı direnç gelişimine engel olabileceği daha fazla düşünülür; bu olgu RT'nin allosterik bölgesine farklı bağlanma modelleri sağlar [32].

Kimyasal yapılarına göre doğal ürünlerin, sentetik bileşiklerin ve türevlerinin DNA polimerazları ve ters transkriptazları inhibe kapasiteleri sınıflandırılmıştır [30]. Doğal ürünler ve sentetik bileşikler DNA replikasyonu üzerinde etkisi olan antikanser ilaçların keşfedilmesinde önemli rol oynarlar. DNA polimeraz inhibisyonu gösteren bileşikler Tablo 1'de verilmiştir. Bu bileşiklerin kimyasal grupları ve IC₅₀ değerleri de bu tabloda verilmiştir.

Tablo 1. DNA polimeraz inhibisyonu gösteren bileşikler

Sıra	Bileşik	Kaynağı	Kimyasal yapısı	İnhibitör aktivitesi, Polimerazlar	Referans
1	Betulinik asit	<i>Couepia polyandra</i> <i>Edgeworthia gardneri</i>	Triterpenoit	β liyaz ve pol, IC ₅₀ : 33,7 ve 46,25 μ M	[35]
2	Penta-1,2,3,4,6-O-gallol- β -D-glukoz	<i>Punica granatum</i> <i>Rhus typhina</i>	Fenol türevleri	α , δ , ϵ , η , ι , κ ve β , IC ₅₀ :13-160 μ M	[36]
3	Epikateşin türevi	<i>Vitis vinifera</i> ve birçok bitki	Proantosiyandinler	α , β , IC ₅₀ :0,18, 31,20 μ M	[37]
4	Glukozil seramid	<i>Glycine max</i> L.	Lipitler	λ , IC ₅₀ :12,20 μ M	[38]
5	Sülfobasin B	<i>Chryseobacterium</i> sp.	Lipitler	Pol I, IC ₅₀ :1,60 μ M	[39]
6	İridoid aglikon	Sentetik türevler	İridoit	Taq, IC ₅₀ : 13,47 μ M	[23]
7	Edgeworin	<i>Edgeworthia gardneri</i>	Kumarinler	β liyaz ve pol, IC ₅₀ : 38,88 ve 31,43 μ M Memeli DNA pol,	[35]
8	5-açıl-juglon	<i>Juglans nigra</i>	Kinonlar	IC ₅₀ : 0,68-11,90 μ M Memeli DNA pol,	[19]
9	Sorandiol	<i>Morinda citrifolia</i>	Antrakınonlar	IC ₅₀ : 29,70-35,90 μ M	[41]
10	Kohamaik asit	Deniz süngeri, <i>Ircinia sp.</i>	Terpenik asit	α , β , IC ₅₀ :7,60, 8,40 μ M	[42]
11	heptadekanoik asit türevi	Sentetik türevler	Yağ asidi konjugatları	Memeli DNA pol, IC ₅₀ : 3,22-8,76 μ M	[42]
12	5-arilidin-2,4-tiyozolidindion	Sentetik türevler	Rodanin türevleri	λ , β , IC ₅₀ : 5,90 μ M	[43]
13	Octadesil trans-p-kumarat	<i>Artemisia annua</i>	Alkil p-kumaratlar	α , β , IC ₅₀ : 68,00, 23.10 μ M Memeli, balık ve	[44] [45]
14	Piransin	Sentetik türevler	Asetojeninler	böcek DNA pol IC ₅₀ : 2,30, 15,80 μ M	[45]

Tablo 1 (devamı). DNA polimeraz inhibisyonu gösteren bileşikler

Sıra	Bileşik	Kaynağı	Kimyasal yapısı	İnhibitör aktivitesi, Polimerazlar	Referans
15	γ -Lakton türevleri	Sentetik türevler	Asetojeninler	Memeli, balık ve böcek DNA pol	[45]
16	Penisilol A,B	<i>Penicillium daleae</i>	5-metoksi-3(2H)-furanonlar	μ , IC ₅₀ : 19,80, 32,50 μ M	[46]

Tablo 2. ters transkriptaz inhibisyonu gösteren bileşiklerin kimyasal gruplarını ve IC₅₀ değerlerini kapsamaktadır.

Tablo 2. Ters transkriptaz inhibisyonu gösteren bileşiklerin kimyasal grupları ve IC₅₀ değerleri.

Sıra	Bileşik	Kaynağı	Kimyasal yapısı	İnhibitör aktivitesi, (RT)	Referans
1	2,4-diarilanilin türevi	Sentetik türevler	Diarilanilin	EC ₅₀ : 0,53 nM	[47]
2	N-{2-[4-(aminosülfonil)fenil]etil}-2-(2-tienil)asetamit	Sentetik türevler	Tiyobileşikler	RNA ve DNA-pol IC ₅₀ : 1,20 ve 2,10 μ M	[48]
3	6-(Arilmetil)-1-alkil-5-halourasil	Sentetik türevler	Arilurasiller	EC ₅₀ : 0.006 – 2,543 μ M	[49]
4	Diflorometilbenzoksazol pirimidin tiyoeter türevi	Sentetik türevler	Pirimidin Tiyoeter	EC ₅₀ : 6,400 μ M	[50]
5	Tiyoüre türevi	Sentetik türevler	Piridinler	EC ₅₀ : 0,012 μ M	[51]
6	İmidazol-5-on	Sentetik türevler	İmidazol	IC ₅₀ : 3,800 μ M	[52]
7	Piridon	Sentetik türevler	Piridon	IC ₅₀ : 35,000 nM	[53]
8	Piperidin bağlı amino triazin türevi	Sentetik türevler	Piperidin	EC ₅₀ : 4,601 nM	[54]
9	1-benzil-1H-1,2,3-triazoller	Sentetik türevler	Triazoller	IC ₅₀ : -	[55]

1.8. Bitkisel Bileşenlerin Ekstraksiyonu ve İzolasyonu

Bitkisel bileşenlerin biyoaktivitelerinin belirlenebilmesi için öncelikle bitkilerden

uygun yöntemlerle bu moleküllerin ekstrakte edilmeleri ve izolasyon işlemi ile saflaştırılmaları gerekmektedir. Bu şekilde biyoaktiviteden sorumlu moleküllerin tespiti mümkün olur.

1.8.1. Bitkisel Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon, bir katı veya sıvı içerisindeki bir veya daha fazla bileşeni çözen fakat bu bileşenlerin bulunduğu matriks ile karışmayan uygun bir çözücü yardımıyla yapılan ayırma işlemidir. Biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu, tıbbi ve aromatik bitkilerin analizinin ilk basamağıdır ve ileri analizlerde oldukça önemli bir rol oynar [56].

Bitkilerden tıbbi ve aromatik bileşiklerin elde edilmesinde, verimliliğinden dolayı en yaygın kullanılan çözücü metanoldür. Fenolik asitler ve flavanoitlerin ekstraksiyonu ve kararlı bir şekilde muhafaza edilmeleri için de metanol en ideal çözücüdür. Uygun bir çözücü ile elde edilen bitki özütünü fraksiyonlarına ayırmak için farklı çözücüler kullanılarak sıvı-sıvı ekstraksiyonu gerçekleştirilebilir [57]. Bu işlemde özüt, mevcut çözücü ile karışmayan başka bir çözücü muamele edilir. Farklı yoğunluktaki çözücü, ortamda bulunan bileşenlere farklı afinite veya seçicilik sergiler ve bu şekilde daha etkili bir ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş olur. Eter, etil asetat, kloroform, aseton fenolik maddelerin izolasyonu için yaygın kullanılan çözücülerdir. Dietil eter ve etil asetat çoğunlukla flavonoit ekstraksiyonu için uygundur. Fenolik asitler ve glikozidik polifenoller için ise su tercih edilir [58]. Uçucu yağların ekstraksiyonu için kullanılan en yaygın ve en kolay metotlardan biri hidrodistilasyondur. Bu işlem su ile bitki materyalinin bir cam balon içerisinde ısıtılması ve ardından buharla taşınan eden uçucu moleküllerin bir soğutucuda sıvılaştırılmasıyla sudan ayrılması prensibine dayanır. Bu işlemin temel özelliği, kaynar su ve bitki materyali arasında doğrudan temas olmasıdır. Bu işlem iyi öğütülmüş numunelerin ekstraksiyonunda çok verimlidir. Hidrodistilasyon işleminin diğer pratik avantajları, işlemin ucuz, kolay ve saha işletimi için uygun olmasıdır. Su distilasyonunun temel dezavantajı, tam ekstraksiyonun mümkün olmamasıdır. Ayrıca, bazı esterler sıcaklık etkisiyle kısmen hidrolize olur ve aldehitler gibi hassas maddeler de polimerize olma eğilimindedir. Su buharı distilasyonu için laboratuvarlarda en yaygın kullanılan cihaz Clevenger sistemidir [59, 60].

Uçucu yağların ekstraksiyonu için kullanılan diğer bir yöntem de katı faz mikroekstraksiyon sistemidir (SPME). Katı faz mikroekstraksiyonu, hava veya su

matrislerinde analitlerin bir fiberin polimerik kaplamasına tutunduğu basit, hızlı, hassas ve çözücü içermeyen bir numune hazırlama tekniğidir [61]. SPME, optik fiberlerin polimer kaplamasının organik bileşikler için bir sorbent olarak kullanılmasına dayanır. Fiberler, ısınan numuneye maruz bırakılır ve organik bileşikler, kaplama ile numune arasında bir denge sağlanana kadar polimer kaplamaya adsorbe olur [62]. Analitler daha sonra ayırma, tespit ve niceleme için bir gaz kromatografisinin enjeksiyon bölgesine termal olarak desorbe edilir. SPME'de, ekstraksiyon etkinliği, numune matrisi ve SPME fiberinin polimer kaplaması arasındaki bir analitin dağılma katsayısı ile belirlenir. Polidimetilsiloksan, divinilbenzen, poliakrilat, karboksen ve karbowaks fiber üretiminde kullanılırlar [63, 64]. Ayrıca polidimetilsiloksan/divinilbenzen, karboksen/polidimetilsiloksan, karbovaks/divinilbenzen gibi farklı özelliklerde de fiberler hazırlanabilir [65].

SPME örnekleme, analit zenginleştirme, matris ayırma ve örnek girişini tek adımda birleştirir. Gelişiminden bu yana, bu yenilikçi teknik çevre analizinde yaygın bir kullanım alanı bulmuştur [66]. SPME'nin ana dezavantajı, tüplerin duvarlarında adsorpsiyon veya yüklü fiberden buharlaşma ile kontrolsüz analit kaybı nedeniyle, numunelerin düşük depolama kararlılığıdır. SPME fiberler giderek artan oranda kullanılmalarına rağmen bazı diğer dezavantajlara da sahiptirler. Genel olarak kabul edilen dezavantajlar göreceli olarak tekrarlanabilirlik ve seçiciliğinin düşük olması, organik çözücülere karşı fiberlerin duyarlılığı, örneklemenin zaman alması, maliyeti ve düşük polariteli sabit fazların ticari olarak temin edilmesi noktasındaki sıkıntılardır [67, 68].

1.8.2. Bitkisel Bileşiklerin İzolasyonu

Biyoaktiviteden sorumlu olan bileşiklerin izole edilmesi ve saflaştırılması için çeşitli çözücülerle hazırlanan özütler kromatografik teknikler uygulanır. Kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi, çoğunlukla, sabit fazlardaki çeşitlilik, uygun maliyet ve kolay temininden dolayı yaygın olarak kullanılmaktadır. Silika, alümina, selüloz ve poliamid fitokimyasalların ayrılması için en uygun dolgu maddeleridir [68, 69].

Kromatografi, fiziksel ve kimyasal özellikleri birbirine çok yakın olan molekül karışımlarını birbirinden ayırmaya ve tanımlamaya olanak veren bir tekniktir. Tüm

kromatografik uygulamalarda bir "sabit faz" ve bir "hareketli faz" bulunur. Bir karışımdaki maddeler hareketli faz ile sürüklenerek sabit faz üzerinden taşınır; örnekteki maddelerin sabit faz ve hareketli faz arasında dağılımlarının farklı olması, her bir maddenin sabit faz üzerinde değişen hızlarda ilerlemesine yol açar ve böylece karışım içindeki maddeler birbirinden ayrılırlar [70].

Gaz kromatografisi, bir karışımda gaz halinde bulunan ya da kolayca buharlaştırılabilen bileşenlerin birbirinden ayrılması amacıyla kullanılan kromatografi yöntemlerinin genel adıdır. Gaz kromatografisi ilk defa James ve Martin tarafından 1952 yılında uçucu yağ asitleri karışımlarının analizlerinde ve ayrılmasında kullanılmıştır. Gaz kromatografisine bağlanabilen çeşitli dedektörler sayesinde ayrılan bileşiklerin yapıları ve miktarları hakkında da bilgi edinilebilir. Gaz kromatografisinde en yaygın şekilde kullanılan dedektör evrensel dedektör olan kütle dedektörüdür. Kütle dektörüne bağlı gaz kromatografisi (GC-MS) sisteminde kromatografi kolonundan çıkan örnek kütle spektrometresinin girişine transfer edilir. Burada yüksek enerjili elektronlarla bombardıman edilir ve molekülün elektron kaybederek iyonlaşması sağlanır. Elektron bombardımanının fazla enerjisi iyonik molekülün parçalanıp fragmantlere dönüşmesine neden olur. Kütle analizörüne giren iyonlar burada kütle-yük oranı (m/z) değerlerine göre sıralanırlar [71].

1.9. Bitki Bileşenlerinin Spektroskopik Yöntemlerle Tanımlanması

Bitkilerden çeşitli yöntemlerle izole edilen doğal bileşiklerin yapılarının aydınlatılması amacıyla spektroskopik yöntemlerden faydalanılır. UV-görünür, Kızılötesi (IR), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ve kütle spektroskopisi gibi farklı spektroskopik teknik çeşitleri, saflaştırılmış bileşikleri tanımlayabilir. Bu yöntemler tek başlarına yapı aydınlatmada yetersiz kaldıkları için iki ya da daha fazla spektroskopik tayin yönteminden elde edilen bilgilerin birlikte değerlendirilmesi sonucunda bileşiğin yapısı aydınlatılır.

1.9.1. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi

Kızılötesi veya infrared (IR) spektroskopisi, bir molekülde bulunan çeşitli bağların titreşim frekanslarının ölçümü sayesinde moleküldeki bağlar ve fonksiyonel

gruplar hakkında bilgi verir. Kızılötesi spektroskopisi temel olarak kızılötesi ışığın incelenen madde tarafından soğurulmasına dayanır. Bu yöntem ile, moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak; katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı belirlenebilir. FTIR spektroskopisi, özellikle kimya ve eczacılık alanlarında, malzeme testlerinin kalite kontrol aşamasında, araştırmalarda ve akademik çalışmalarda oldukça sık kullanılmaktadır. Ayrıca biyokimyasal olarak; karbonhidrat, fosfolipit, aminoasit ve proteinlerin yapı analizlerinde belirleyici olabilir [69].

1.9.2. Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometresi, kromatografik olarak ayrılan bileşiklerin yapı tayini için bir dedektör olarak kullanılabilirdiği gibi, saf bileşiklerin direkt enjeksiyonu ile yalnız başına bir spektrometre olarak da kullanılabilir. Kütle spektrumu, örnekteki bileşiklerin kolaylıkla hareket edebilen iyonlara (çoğunlukla pozitif) dönüştürülmesi ve bu iyonların kütle/yük oranına göre sıralanmasıyla elde edilir. İyonizasyon işlemi, çoğunlukla kütle dağılımı ana maddeye göre özel olan, bir pozitif tanecikler serisi meydana gelir. Bir kütle spektrumu kimyasal yapı hakkında önemli bilgiler verir. Spektral veriler, bazı bakımlardan, infrared ve NMR spektrumlarından daha kolay tanımlanır; çünkü bilgiler, bir örneğin, yapısal bileşiminin moleküler kütlesi cinsinden ifade edilir. Kütle spektrumu kompleks karışımların kantitatif analizlerinde de kullanılır. Burada, moleküler iyon bolluklarının konsantrasyonla olan ilişkisinden yararlanır [72].

1.9.3. Nükleer Manyetik Rezonans

Nükleer manyetik rezonans (NMR) Spektroskopisi, kuvvetli bir manyetik alan içerisine yerleştirilen bir molekülde bulunan bazı atom çekirdeklerinin radyo frekansı alanındaki elektromanyetik ışınları absorblaması üzerine kurulmuş olan ve organik bileşiklerin yapılarının belirlenmesinde kullanılan en güçlü tekniktir [73]. Belirli atom çekirdekleri, kuvvetli manyetik alan etkisine bırakıldıklarında enerjilerinin kuantlı enerji hallerine yarılmaya yol açan spin ve manyetik momente sahiptirler. Bu enerji hallerinden düşük olanından yüksek olanına geçişler, 0,1–900 MHz radyofrekans aralığında elektromagnetik ışınım soğurumuyla gerçekleşebilir. Bu tür ışınım

soğurumları, sadece ışınım enerjisi magnetik olarak yarılan iki düzey arasındaki enerji farkına eşit olduğunda ve rezonans koşulları sağlandığında oluşur. Bu soğurumu oluşturan frekansların ölçülmesi işlemlerine NMR spektroskopisi denir. NMR'de ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P gibi çekirdeklerin de manyetik özellikleri incelenebiliyorken ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR kimyasal yapı aydınlatılmasında en fazla kullanılan yöntemlerdir. Hidrojen atomu hemen hemen her molekülde bulunur ve ana izotopu olan ^1H % 98,985 bolluğundadır. Yüksek bolluğundan dolayı analizi nispeten ^{13}C 'e göre daha kolaydır. ^{13}C NMR, doğal bolluğu sadece % 1,1 olan karbonun ^{13}C izotopunu tespit eder, ana karbon izotopu ^{12}C NMR aktif değildir [74].

1.9.4. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi

Ultraviyole görünür (UV-vis) spektroskopisi en popüler analitik tekniklerden biridir, çünkü çok yönlüdür ve neredeyse her molekülü tespit edebilmektedir. Bu yöntem ile UV-Vis ışığı bir numuneye gönderilerek örneğin geçirgenliği ve absorpsiyonu ölçülür. Ayrıca bileşiğin farklı dalga boylarında emilimini gösteren absorpsiyon spektrumu da elde edilir. Herhangi bir dalga boyundaki absorpsiyon miktarı molekülün kimyasal yapısından kaynaklanmaktadır. UV-Vis, fonksiyonel grupları tanımlamak veya absorpsiyon spektrumunu eşleştirerek bir bileşiğin yapısını aydınlatmak için kalitatif bir şekilde kullanılabilir. Analitin konsantrasyonu Lambert-Beer Yasası kullanılarak alınan absorpsiyonla ilgili olduğundan kantitatif şekilde de kullanılabilir. Biyokimyasal ve moleküler özelliklerinden dolayı fenolik bileşiklerin UV-görünür ışıkla analizi oldukça uygundur. Fenolik halkanın UV absorpsiyonu bu bileşiklerin analizi için kullanılır. Buna ek olarak, bazı fenolik bileşiklerin renkli olması nedeniyle görünür bölge ışınları da değerli bilgiler sağlayabilir. Ayrıca UV-vis spektrofotometreleri birçok bileşiğin bu bölgede absorpsiyon yapması nedeniyle kromatografik tekniklerde yaygın olarak kullanılan bir dedektördür [75].

1.10. Bitkisel Uçucu Yağlar

Bitkisel uçucu yağlar, güçlü bir koku ile karakterize edilen ve aromatik bitkiler tarafından ikincil metabolitler olarak üretilen, doğal uçucu kompleks bileşiklerdir. Özellikle kokularından ve yağsı yapıda olmalarından dolayı esansiyel yağlar olarak da

isimlendirilirler. Uçucu yağların yapısı genel olarak oksijen türevli terpenik veya terpenik olmayan hidrokarbonlardır. İzopren (C₅) birimlerinin polimerizasyonu ile monoterpen (C₁₀), seskiterpen (C₁₅), diterpen (C₂₀) halinde terpen türevlerini oluştururlar. Terpenik olmayan hidrokarbonlar ise metandan oluşan parafin türevleridir [76].

Bitki esansiyel yağları ve bileşenlerinin antimikrobiyal, sitotoksik ve antioksidan aktiviteler gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Günümüzde, özellikle farmasötik, tarımsal, gıda, sıhhi, kozmetik ve parfüm endüstrilerinde 300'ü ticari açıdan önemli olan yaklaşık 3000 uçucu yağ tanımlanmıştır. Ayrıca, uçucu yağların bitkisel yağlarla karıştırılmasıyla elde edilen farklı formları aromaterapide çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bazı uçucu yağların, çeşitli organ işlev bozukluklarını veya sistemik bozuklukları tedavi ettiği iddia edilmektedir [60].

1.11. Antioksidan Aktivite Tayinleri

İnsan vücudu, serbest radikallerin ve diğer oksidanların zararlı etkilerine karşı koyan karmaşık bir enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemine sahiptir. Serbest radikaller, vücutta oksijen, azot ve kükürt atomlarının eksik indirgenmesiyle oluşan ve molekülün dış kabuğunda eşleşmemiş bir elektrona sahip olan kimyasal türlerdir. Bu tek elektron nedeniyle serbest radikaller yüksek oranda reaktif olmakta ve proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve DNA ile reaksiyona girmektedirler. Metabolik yollarda bozukluk ve DNA hasarına sebep olan serbest radikaller, kanser, alkole bağlı karaciğer hastalığı, ülser, ateroskleroz, şeker hastalığı, enflamasyon, kalp ve cilt hastalıkları gibi birçok hastalığa neden olmaktadır [77]. Metabolizmada çeşitli sebeplerle üretilen bu radikallerin azaltılması ancak onların elektronik olarak kararlı hale dönüşümüyle mümkündür. Diğer yandan oluşan hasarların da iyileştirilmesi gerekmektedir. Bu noktada devreye antioksidan olarak adlandırılan moleküller girer. Antioksidanlar, ya doğrudan serbest radikallerle reaksiyona girerek veya serbest radikal üreten enzimlerin aktivitesini veya ekspresyonunu inhibe ederek ya da hücre içi antioksidan enzimlerinin aktivitesini veya ekspresyonunu artırarak dolaylı yoldan oksidatif hasarı azaltabilir. C vitamini, E vitamini, ürik asit ve glutatyon gibi küçük moleküller hücrel antioksidanlar olarak önemli roller oynar. Tert-butilhidroksil-toluen, tert-butilhidroksianisol ve tert-butilhidrokinon gibi sentetik antioksidanlar, gıda endüstrisinde lipit oksidasyonunu geciktirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bununla birlikte, bu tür sentetik antioksidanlar, toksikolojik kaygılar nedeniyle farmakolojik kullanım için tercih edilmez. Bu nedenle diyet antioksidan takviyeleri olarak kullanılacak bitki özütlerinin belirlenmesi üzerine yoğun ilgi vardır [78]. Bu amaçla bitki özütlerinin antioksidan özelliklerini araştırmak için çeşitli yöntemler kullanılır.

1.11.1. Toplam Polifenol Tayini

Toplam polifenol miktarı tayini, kolorimetrik Folin-Ciocalteu yöntemine göre belirlenir. Folin reaktifi, fenolik bileşenlerin in vitro analizlerinde kullanılan fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımıdır. Bazık ortamda elektronların fenolik bileşiklerden sarı renkli fosfotungstik/fosfomolibden kompleksine transferi ile mavi renkli tungsten-molibdenyum kompleksi oluşur. Fenolik yapıdaki moleküllerin konsantrasyonuna bağlı olarak tungsten-molibdenyum kompleksinin artan miktarı mavi renk şiddetini artırır. İndirgenmiş Folin-Ciocalteu reaktifinin absorbanısı 750-770 nm aralığında bir spektrofotometre ile tespit edilebilir. Yöntemde referans standart bileşik olarak genellikle gallik asit ve kuersetin kullanılır ve sonuçlar gram özütteki gallik asit-kuersetin eşdeğeri olarak ifade edilir [79].

1.11.2. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesi

Bu yöntem antioksidanlarla etkileşime giren DPPH radikalinin renk değişiminin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Alkollü ortamda mor renkli DPPH radikali hidrojen vericisi olan bir antioksidan molekül ile reaksiyona girdiğinde soluk sarı renkli indirgenmiş formuna dönüşür. Mor rengin şiddetindeki azalma, doğrusal olarak antioksidan konsantrasyonuna ve kapasitesine bağlıdır. Sonuçlar SC₅₀, yani ilk DPPH konsantrasyonunu % 50 azaltmak için gerekli olan antioksidan miktarı olarak verilmektedir [80, 81].

1.11.3. ABTS Radikal Temizleme Aktivitesi

Bu analiz, mavi/yeşil renkli ABTS radikal katyonuna antioksidanların eklenmesiyle ABTS'nin indirgenmesi sonucu rengindeki değişim esasına dayanır. ABTS,

potasyum persülfat ile oksitlenerek elde edilen, 734 nm'de maksimum absorbans gösteren kararlı ve azot merkezli bir sentetik radikal katyondur. Bir antioksidan bileşen, ABTS katyonuna bir elektron vererek onu radikal olmayan bir şekle dönüştürebilir. Antioksidan bileşikler bu şekilde radikali indirgeyerek renk değişimine sebep olur. Bu değişim hızlıdır ve kararlı olan son nokta, antioksidan etkinliğin bir ölçüsü olarak alınır [81]. Sonuçlar DPPH testinde olduğu gibi yine SC_{50} , olarak verilmektedir.

1.12. Moleküler Modelleme

Biyolojik mekanizmalar, sonuçların matematik ve bilgi teknolojileri kullanarak analiz edilmesiyle daha anlaşılır hale gelmektedir. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı, enzim, molekül, protein, ligant gibi kavramların teknoloji ile bileşiminin çeşitli kombinasyonlarıyla oluşmaktadır [82]. Moleküler modelleme, bir molekülün başka bir molekülün aktif bölgesine bağlandığı zaman tüm sistemin serbest enerjisini en aza indirecek şekilde sabit bir kompleks oluşturmasını öngören bir yöntemdir. Düşük maliyeti ve kullanım kolaylığı gibi nedenlerle ilaç keşfinin önemli bir bileşeni haline gelmiştir. Moleküler modelleme ilaç, katalizör veya makromolekül reseptörü gibi iki veya daha fazla moleküler yapının birlikte mükemmel bir uyum içerisinde nasıl eşleştiğine dair bilgiler sunmaktadır. Protein-protein modelleme iki protein molekülünün deneysel ölçüme ihtiyaç duymadan bağlanmasını içeren basit bir prosedürdür. Protein- ligant modelleme ise en yaygın kullanılan modelleme tekniğidir. Bir ligant reseptöre bağlandığında inhibitör veya aktivatör olarak hareket edebilir. İlaç keşfinde geleneksel analiz yöntemleri uzun zaman alabileceği için bilgisayar destekli modelleme ilaç tasarım sürecinin daha hızlı hareket etmesine yardımcı olur. Ayrıca modelleme sayesinde üç boyutlu kristal yapısı bilinen milyonlarca bileşik, ilaç, ligant ve reseptörün sanal olarak taraması yapılabilir [83].

1.13. Literatür Özeti

Paeonia cinsine ait olan bazı türlerinde monoglikozit terpenler, uçucu yağlar, flavonitler, tanenler, stilbenler, triterpenoitler, paenoller ve fenoller gibi metabolitler çok geniş yelpazede analiz edilmiştir. He vd. Moutan bölümünü oluşturan 8 türü üzerinde HPLC-DAD bağımlı olarak kimyasal içeriklerini tespit etmişlerdir. Çalışılan türler *P.*

suffruticosa, *P. qiui*, *P. ostii*, *P. rockii*, *P. jishanensis*, *P. decomposita*, *P. delavayi* ve *P. ludlowii*'dir. Toplamda 47 pik elde edilmiş olup bunların 23 tanesi paeoni (şakayık) ağacında tespit edilmiştir. Elde edilen metabolitlerden 43 tanesi alıkonma zamanı, UV absorpsiyon ve HPLC-MS sistemiyle referans standart maddelerle karşılaştırılarak analiz edilmiştir. İzole edilen 43 bileşikten 17 tanesi monoterpenoit glikozit, 11 tanesi gallol glukoz, 5 tanesi flavonoit, 6 tanesi paenol ve 4 tanesi fenolik bileşiktir [84].

Liu vd. *Paeonia rockii* meyve kabuğundaki resveratrol trimerlerini incelemişlerdir. Çalışmalarında aseton özütlerinin etil asetat fraksiyonlarının silika jelde ve preparatif HPLC'de çalışılmasıyla rockiol C, gnetin H, suffrutikosol A, B ve C bileşenleri elde edilmiştir. Bu moleküllerin yapıları 2 boyutlu NMR teknikleri ve farklı MS teknikleriyle aydınlatılmıştır. İzole edilen bileşenlerden rockiol C yeni bir bileşik olup diğer moleküllerle beraber Gram (+) bakterilere karşı güçlü antibakteriyal etki göstermiştir [85].

Jia vd. otsu şakayık türlerinde HPLC-ESI-MS sistemiyle antosiyanozit içeriğini incelemişlerdir. 9 yabani şakayık örneği analiz edilip 6 temel antosiyanin molekülü tespit edilmiştir. Bunlar; peonidin-3,5-di-O-glukozit, peonidin-3-O-glukozit- 5-O-arabinozit (Pn3G5Ara), peonidin-3-O-glukozit, pelargonidin-3,5-di-O-glukozit, siyanidin-3,5-di-O-glukozit, ve siyanidin-3-O-glukozittir(Cy3G) [86].

Orhan vd. 12 *Paeonia* türünün köklerinin uçucu yağ analizi ve antioksidan etkisine bakmışlardır. GC-MS sistemiyle yapılan uçucu yağ analizinde temel bileşen olarak salisilaldehit, cis-mirtanal ve metil salisilat görülmüştür. Bunun yanında referans olarak rutin ve propil gallat kullanılarak DPPH ve Nitrik oksit radikal temizleme aktivitesiyle de antioksidan etkileri incelenmiştir [87].

Triterpenler *Paeonia* türlerinde bol bulunan biyomoleküllerdir. Gao ve arkadaşları *Couepia polyandra* ve *Edgeworthia gardneri* özütlerinin biyodenemelerinde triterpen türevi olan DNA pol β inhibitörü olan betulinik asit elde edilmiştir. Bu pol β inhibitörünün liyaz ve polimeraz inhibisyonuna sahip olduğu ve IC₅₀ değerlerinin sırasıyla 33.7±4.9 ve 46.25±3.1 μ M olduğu görülmüştür [35].

Kondanse tanen veya oligomerik flavonoit olarak adlandırılan proantosiyaninler tüketilen birçok bitkide bulunur ve birçok biyolojik aktiviteye sahiptirler. Kateşin ve epikateşin içeren prosiyanidinler memeli DNA α pol ve sıçan DNA pol β 'ya karşı önemli aktivite göstermiştir [37].

Triterpen türevi olan betulin; *Betula alba* ve *Betula pubescent* bitkilerinin dış

kabuğundaki mantar tabakasında doğal olarak bulunan bir triterpendir. Betulin ve daha aktif formu olan betulinik asit kanser hücrelerindeki sitotoksik aktivitelerinin yanında antitümör, anti-HIV, ve antiinflamatuar etki göstermiştir [88].

Antosiyaninlerin antioksidatif, antiinflamatuar ve antiobezite etkilerinin olduğu bilinmektedir. Esselen vd. de delfinidin'in DNA/topo arasına kovalent bağlanmadan insan topo I ve II aktivitesini etkilediğini göstermişlerdir [89].

Flavonoidler bitkilerde bolca bulunan ikincil metabolitlerdir. Kuersetin ve kuersetin-3-O-glikozitler gıdalarda en bol bulunan flavonoidlerdir. Bunların sayısız biyolojik aktivitesi vardır ve hastalıkların önlenmesine katkıda bulunabilirler. Ayrıca yaygın gıda takviyesi olarak satılmaktadırlar. Yüksek konsantrasyonlarda Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin çoğalmasını inhibe etmelerinden dolayı antibakteriyel aktivitelerine olan ilgi artmıştır. Abugafar vd. yeni bir türev olan 3,7-diaçilkuersetini bakterilerde spesifik hedef ve tercihlerini incelemek için hazırlamışlardır. Bu bileşikler hem *E. coli* DNA giraz hem de *Staphylococcus* topo IV'ün önemli inhibitörüdürler [90].

Bicchi vd. yaptığı çalışmada İtalya'nın Sardinya şehrinden toplanan *Ridolfia segetum* (L.) Moris ve *Oenanthe crocata* L.'nin uçucu yağları RNA-bağımlı DNA polimeraz ve (RDDP) ribonükleaz H (RNase H) enzimlerine karşı inhibisyon göstermişlerdir. Biyokimyasal çalışmalarda; uçucu yağların RDDP'yi doza bağımlı olarak inhibe ettiği görülmüştür [91].

Literatürde yer alan bu çalışmalar dışında *Paeonia daurica* subsp. *macrophylla* bitkisinden elde edilen fraksiyonlarının replikatif DNA polimeraz enzimleri üzerindeki inhibisyon etkisinin incelenmediği görülmüştür.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallardan sodyum karbonat (Na_2CO_3), etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), magnezyum klorür (MgCl_2), gallik asit, kuersetin, bromofenol mavisi, ksilen siyanol, sodyum dodesil sülfat (SDS), formamit, poliakrilamid, bütanol, askorbik asit, ABTS (2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik acid) diamonyum tuz), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), potasyum persülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), gliserol, üre Sigma Aldrich'den satın alınmıştır. HPLC saflıkta metanol, hekzan, etilasetat, dietil eter, troloks, askorbik asit, folin reaktifi, Tris, etanol, dötero metanol, Sefadex LH-20 kolon, Merck'ten satın alınmıştır.

Bu çalışmada, numunelerin ön hazırlığında Precisa analitik terazi, Waring öğütücü, ekstraksiyonu gerçekleştirmek için Heidolph ısıtıcılı çalkalayıcı, Bandelin Sonorex su banyosu, Hettich santrifüj, Heidolph evaporatör, Nuve FN 400 etüv, Velp Scientifica vorteks, Sartorius Stedim Biotech Arium 61316 Pro-UV saf su cihazı kullanılmıştır. İzole edilen bileşiklerin yapı karakterizasyonu için NMR spektrumları Agilent 400 MHz cihazında, IR spektrumları Perkin Elmer 100 FT-IR spektrometresinde, Kütle spektrumları Thermo TSQ Quantum Access Max cihazında alınmıştır. Toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivitesi belirlemede Thermo Scientific Multiskan Go spektrofotometresi kullanılmıştır. Enzim inhibisyon denemelerinde jel görüntülemek için Typhoon lazer görüntüleme sistemi kullanılmıştır.

2.2. *Paeonia daurica* subsp. *macrophylla* Bitkisinin Toplanması

Bitki Rize'nin Çamlıhemşin ilçesine bağlı 2300 m rakımlı Çeymakçur yaylasından toplanmıştır. Bitkinin tanımlanması, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden Prof. Vagif Atamov tarafından yapılmıştır.



Şekil 2. *Paeonia daurica* subsp. *macrophylla* bitkisinin resimleri.

2.3. Bitkiden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu ve İzolasyonu

Bitki toplandıktan sonra tüm dokularıyla beraber tazeliğini muhafaza etmesi için ekstraksiyon işlemine kadar -20 °C’de bekletildi. Meyve, meyve kabuğu, yaprak, gövde ve bitkinin kök kısımları ayrılarak sıvı azotla kurutulup havanda toz haline getirildi. Enzim inhibisyonu ve antioksidan testleri için *P. daurica*’nın öğütülen her bir dokusundan 10 gram alınıp 50 mL metanol eklenerek 37 °C’de 2,5 saat boyunca çalkalayıcı su banyosunda (Heidolph Unimax 1010, Almanya) tutulduktan sonra 25 °C’de 1 saat süreyle ultrasonik su banyosunda (Elma Clean Box, Elma) bekletildi. Numuneler 4000 rpm’de 4 °C’de 20 dakika boyunca santrifüjlenerek süpernatantlar falkon tüpüne aktarıldı ve buharlaştırıldı (EZ-2 Evaporatör, GeneVac). Bitkinin tüm dokularının polimeraz enziminin inhibisyonu üzerinde yapılan ön denemelerinden elde edilen veriler ışığında ve literature de uyumlu olarak bitkinin kök kısmının fraksiyonlarına odaklanıldı. Bu bağlamda metanolik kök özütü sıvı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutuldu. Kurutulan kök özütü ultra saf suyla çözülerek yağlı ve mumlu bileşenlerden arınması için 10 dakika boyunca iki kez 10 mL n-hekzan ile muamele edildi. Kök özütünün sıvı-sıvı fraksiyonlanması için dietil eter ve etil asetat kullanıldı. Saf metanol özütü ve fraksiyonlamadan sonra geri kalan sulu kısım da biyolojik aktiviteleri bakımından incelendi.

Bitkinin kök kısmından temel bileşenlerin izolasyonu için 300 gram kurutulmuş örnek 500 mL metanol ile 28 °C’de çalkalayıcı ısı banyosunda 16 saat bekletilerek ekstrakte edildi ve mavi bant süzgeç kağıdı ile süzüldü. Bu işlem 2 kez tekrarlandıktan

sonra süzüntüler birleştirilerek çözücüleri evaporatör yardımıyla 30 °C’de kuruluğa kadar buharlaştırıldı. Elde edilen ham metanol özütünün 7 gramı su: metanol (1:1) karışımında çözüldü ve Sefadex LH-20 kolona (3 cm x 25 cm) tatbik edilerek metanol ile elüsyon gerçekleştirildi. Fraksiyonlar 20’şer mL halinde toplandı. Sefadex kolondan alınan fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi ile kontrol edilerek benzer olanlar birleştirildi. Fraksiyonlar 5-10 evaporatörde yoğunlaştırıldı ve 3,9 gram ekstre elde edildi. 3 cm x 30 cm’lik cam kolon ve kolon dolgu maddesi olarak LiChroprep RP-18, 25-40 µm (Merck 9303) kullanıldı. Vakum likit kromatografi ve çözücü sistemi olarak su-metanol karışımlarının kullanıldığı yöntem ile ana bileşenlerin izolasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Elüsyona su:MeOH (100:0) ile başlandı. Su:MeOH (100:0→0:100) oranlarında çözücü sistemi ile gradient elüsyon uygulandı. Fraksiyonlar 10 mL halinde toplanarak toplam 116 fraksiyon elde edildi. Fraksiyonlar kontrol edilerek benzer olanlar birleştirildi.

2.4. Hidrodistilasyon ve Katı Faz Mikroekstraksiyon ile Uçucu Yağ Eldesi

Bitkinin meyve, meyve kabuğu, kök ve gövde kısımlarına ait uçucu yağ eldesi hidrodistilasyon ve SPME olmak üzere 2 yöntemle yapıldı.

Hidrodistilasyon işleminde, 35 °C’de kurutulup öğütülen 100 g bitki örneği, Neo-Clevenger aparatında 5 saat boyunca damıtıldı. Elde edilen uçucu yağ fazı, 0,5 mL HPLC safliktaki n-hekzan içerisine alınarak analize kadar 4 °C’de bekletildi. Uçucu yağ miktarı, mL/100 g kuru madde olarak ifade edildi ve özütler Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi cihazında analiz edildi.

Katı faz mikroekstraksiyon (SPME) yöntemi için zaman, sıcaklık ve numune miktarı dedektör doygunluğu gibi adsorpsiyon parametreleri optimize edildi. Buna göre 0,2 g taze bitki numunesi ısıtılmış blok üzerinde 15 mL’lik bir şişeye konularak 55 °C’de 10 dakika süreyle bekletilerek uçucu yağların SPME fiberine (Supelco SPME Holder, Manual, 57330-U) tutunması sağlandı. Numune şişesi içerisinde bekletilen fiber daha sonra Gaz Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi cihazının desorpsiyon ünitesine konularak analiz edildi.

2.5. Toplam Fenolik İçeriğinin Belirlenmesi

Numunelerin metanolik özütlerinin toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu

yöntemi ile tayin edildi [92]. Özütle rin fenolik içeri ği belirlenirken standart olarak gallik asit ve kuersetin kullanıldı. Standart bileşikleri n 0,6-0,019 mg/mL konsantrasyon aralı ğında 6 farklı seyreltmedeki çözeltilerinden faydalanarak kalibrasyon grafi ği elde edildi ve özütle rin toplam fenolik içerikleri bu grafikler ile gallik asit ve kuersetin eşde ğeri cinsinden ifade edildi. Tayinde standart çözeltilisi veya metanolik özütle rinden 20 µL alınıp üzerine 680 µL saf su ve 400 µL 0,2 N folin reaktifi eklenip çalkalanarak 3 dakika bekletildi. Sonrasında 400 µL % 10'luk Na₂CO₃ eklenip karanlıkta 2 saat bekletilerek spektrofotometrede 760 nm'de ölçüm yapıldı. Tüm özütle ve standart konsantrasyon noktaları üç tekrarlı olarak çalışıldı. Elde edilen veriler Tablo 6.'da gösterildi.

2.6. DPPH Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi

Bitki özütle rinin DPPH radikaline karşı serbest radikal temizleme aktivitesi Mishra vd. [80]'ne göre yapıldı. 0,15 mL 0,1 mM radikal üzerine 0,15 mL özütle veya standart ilave edilip karanlıkta 30 dakika bekletilerek renk de ğişimi spektrofotometrik olarak 517 nm'de ölçüldü. Standart olarak gallik asit, kuersetin ve troloks kullanılarak sonuçlar SC₅₀ (µg özütle /mL) olarak verildi.

2.7. ABTS Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi

7 mM ABTS çözeltilisi ve 2,4 mM potasyum persülfat çözeltilisi eşit hacimlerde karıştırılarak 18 saat boyunca karanlıkta bekletilerek ABTS radikalinin oksidasyonu sağlandı. Elde edilen ABTS^{•+} radikalik çözeltilisi 734 nm'de (Thermo Scientific Multiskan Go, USA) 0,70 ± 0,01 absorbans elde edilene kadar yaklaşık 30 kat metanolla seyreltildi [81]. 50 µL özütle veya standart üzerine 250 µL ABTS^{•+} ilave edilerek karanlıkta 30 dakika bekletildi ve 734 nm'de renk de ğişimi izlendi. Özütle rin ABTS radikal temizleme kapasitesi troloks, askorbik asit ve gallik asit standartlarıyla karşılaştırıldı.

2.8. Uçucu Ya ğ Analizleri

Bitkinin kök, gövde, meyve ve meyve kabu ğu dokularından hidrodistilasyon ve katı faz mikroekstraksiyon yöntemiyle (SPME) elde edilen uçucu bileşenler GC-MS

(Shimadzu QP-2010 Ultra) sistemiyle analiz edildi. Uçucu yağ analizinde Rxi-5MS kolon (30 m, 0,25µm kalınlık ve 0,25 mm iç çap) kullanıldı. Taşıyıcı gaz olarak 1,44 mL/dak akış hızında helyum kullanılarak enjeksiyon; split oranı 25 olacak şekilde ve 250 °C’de yapıldı. Kolon sıcaklığı başlangıçta 40 °C’de 2 dakika tutulduktan sonra sıcaklık dakikada 4 °C artacak şekilde 240 °C’ye kadar çıkartılıp burada 3 dakika bekletilerek toplam 55 dakikada analiz sonlandırıldı.

2.9. DNA Polimerazlar ve Substratların Hazırlanması

DnaE, *E. coli* K12 genomundan, PolC ise *B. subtilis* ATCC66333 genomundan daha önceki bir çalışma kapsamında klonlandı, rekombinant protein üretildi ve saflaştırıldı [93, 94]. M-MLV-RT enzimi ise New England (BioLabs, M0253S) firmasından satın alındı. 32-mer DNA ve Cy5 işaretli 14-mer primer MacroGen (Netherland, Amsterdam), RNA kalıpları ise Iontek (Türkiye, İstanbul) firmaları tarafından sentezlenmiştir. Aktivite deneylerinde kullanılacak çift zincir sentetik DNA substratlarının oluşturulması Sandallı vd. [95]’ne göre yapıldı. Primer uzatma deneylerinde kullanılan DNA substratları Tablo 3’te verildi.

Tablo 3. Primer Uzatma Deneylerinde kullanılan DNA substratları

Enzim	DNA kalıp / DNA primer
PolC- DnaE	3’- GCAATCGGTGAGGCTGACGCCATATTGCGCGT – 5’ 5’- cy5CGTTAGCCACTCCGACTG – 3’
^a M-MLV-RT	3’- GCAATCGGTGAGGCTGACGCCATATTGCGCGT – 5’ 5’- cy5CGTTAGCCACTCCG – 3’
^b M-MLV-RT	3’- GCAAUCGGUGAGGCUGACGCCAU <u>AUUGCGCGU</u> – 5’ 5’- cy5CGTTAGCCACTCCG – 3’

^a: DNA bağımlı polimeraz, ^b:RNA bağımlı polimeraz

DNA polimeraz aktivitesinin saflaştırılmış moleküllerin varlığında ve yokluğunda inhibisyonu primer uzatma deneyi (tek nükleotit veya çoklu nükleotit ilavesi) ile araştırıldı.

2.10. *Paeonia daurica*'nın Farklı Kısımlarında DNA Polimeraz İnhibisyonunun İncelenmesi

Saflaştırılan moleküllerin ve bitki dokularının DNA polimeraz inhibisyon etkileri primer uzatma deneyi ile incelenmiştir. İlk önce meyve, meyve kabuğu, yaprak, gövde ve kök kısımlarından ayrı ayrı hazırlanan metanol özütlerinde tarama yolu ile bakteriyel replikatif ve viral M-MLV RT'ye yönelik inhibisyon etki araştırıldı. Saflaştırma işlemleri en güçlü inhibisyon etkinin gözlemlendiği kök kısımlarından yapılarak primer uzatma deneyleri ile her adımı takip edildi. İnhibisyon deneyleri toplam 20 µL hacimde gerçekleştirildi ve analitik yöntemler ile elde edilen her bir fraksiyonun inhibisyon etkisi ayrı ayrı araştırıldı. İnhibisyon etkinin araştırılmasında iki ayrı reaksiyon bileşeni hazırlandı. Birinci bileşen koşulları inhibisyon koşullarını oluşturmak, 2. bileşen koşulları ise reaksiyonu başlatmak için kullanıldı.

Bileşen 1: 2 µL PAB (10X stok 10 ve 3 mM MgCl₂ içeren); 1 µL polimeraz (25 nM DnaE veya polC, 2 ünite MMLV-RT); 7,5 µL dH₂O ve 3 µL örnek.

Bileşen 2: 5 µL sentetik substrat (50mM stok); 1,5 µL dNTP (100 µM).

Öncelikle birinci bileşen hazırlandı ve 10,5 µL'si reaksiyon tüplerine aktarıldı. Üzerine 3 µL inhibisyon etkisinin araştırılacağı fraksiyon örneklerinden eklendi ve oda şartlarında 5 dakika bekletildi. Sonrasında 6,5 µL ikinci reaksiyon bileşeni ile deneyler başlatıldı ve 37 °C'de 10 dakika inkübe edildiler. Sonrasında her bir reaksiyon sırasıyla 20 µL 2X durdurma boyası ile sonlandırıldı. Son olarak 95 °C'de 5 dakika ısı muamelesi yapıldı ve Üre-PAGE'de yürütme işlemi gerçekleştirilip Typhoon lazer görüntüleme sistemi kullanılarak sonuçlar görüntülendi.

2.11. Moleküler Modelleme Çalışmaları

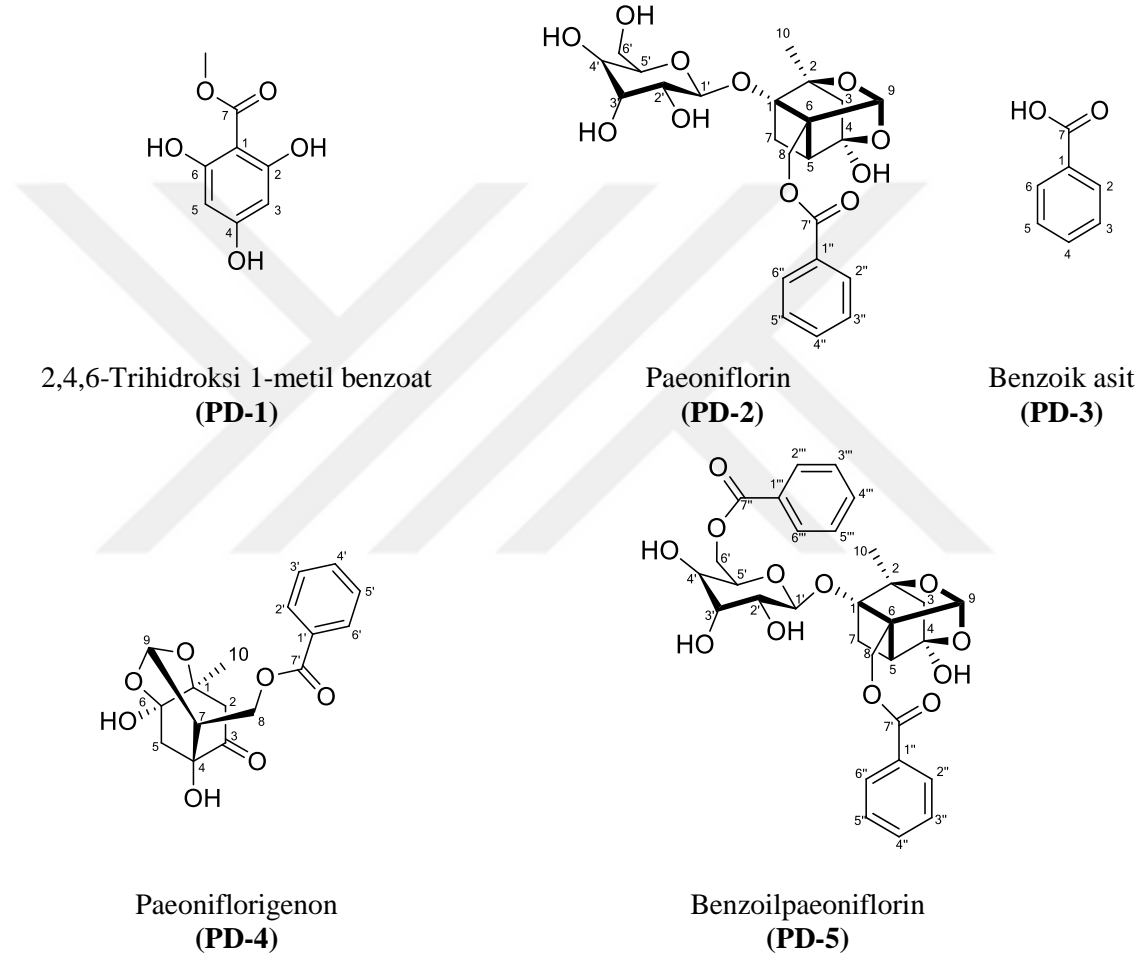
Çalışılan enzimlerin X ışını kristal yapıları, Protein Veri Bankasından PDB kodları; 4MH8 [96], 3F2B [97], 3E0D [98] kullanılarak indirildi. Moleküler modelleme çalışmaları, Maestro Moleküler Modelleme platformu (sürüm 10.1) Schrödinger programı kullanılarak yapıldı. Induced Fit-docking protokolü ile birleştirilmiş Glide/XP yöntemi, ligantlar ve proteinin aktif bölgesi arasındaki bağlanma pozları ve etkileşimlerin

öngörülmesi için uygulanmıştır. IFD, bağlanma enerjilerinin öngörülmesi ve ligant-protein komplekslerinin etkileşimlerinin öngörülmesi için ligant ve reseptör esnekliği sağlayan en önemli docking (kenetleme) yöntemlerinden biridir. Enzim yapıları Protein Hazırlama modülü kullanılarak kenetleme işlemine hazırlanmıştır. Proteinlerin yapısındaki eksiklikler Prime modülü kullanılarak tamamlandı. Ligant moleküllerinden protein etkileşimi incelenecek olanlar Maestro ara yüzüne aktararak LigPrep modülü kullanılarak fizyolojik pH'da OPLS_2005 kuvvet alanı kullanılarak olası tüm konformasyonları elde edilerek 3-boyutlu yapıları kaydedildi. Hazırlanan protein ve ligant yapıları docking işlemine tabi tutularak IFD skorları ve docking skorları elde edilmiştir. Docking skoru ne kadar negatif olursa bağlanma etkileşimleri o kadar kuvvetli olduğunu göstermektedir. Elde edilen docking skoru ve posları dikkate alınarak en iyi enzim ligant kompleksleri görsel olarak sunulmuştur. Enzim-ligand kompleksleri için yaklaşık serbest bağlanma enerjilerini tahmin etmek için Schrodinger'in moleküler modelleme platformunun Prime modülünde uygulanan Moleküler Mekanik /Genelleştirilmiş Born Yüzey Alanı (MM-GBSA) yöntemi kullanılmıştır. MM-GBSA bağlanma enerjilerinin daha negatif değeri, daha güçlü bağlanma afinitesini gösterir.

3. BULGULAR

3.1. İzole Edilen Moleküllerin Tanımlanması

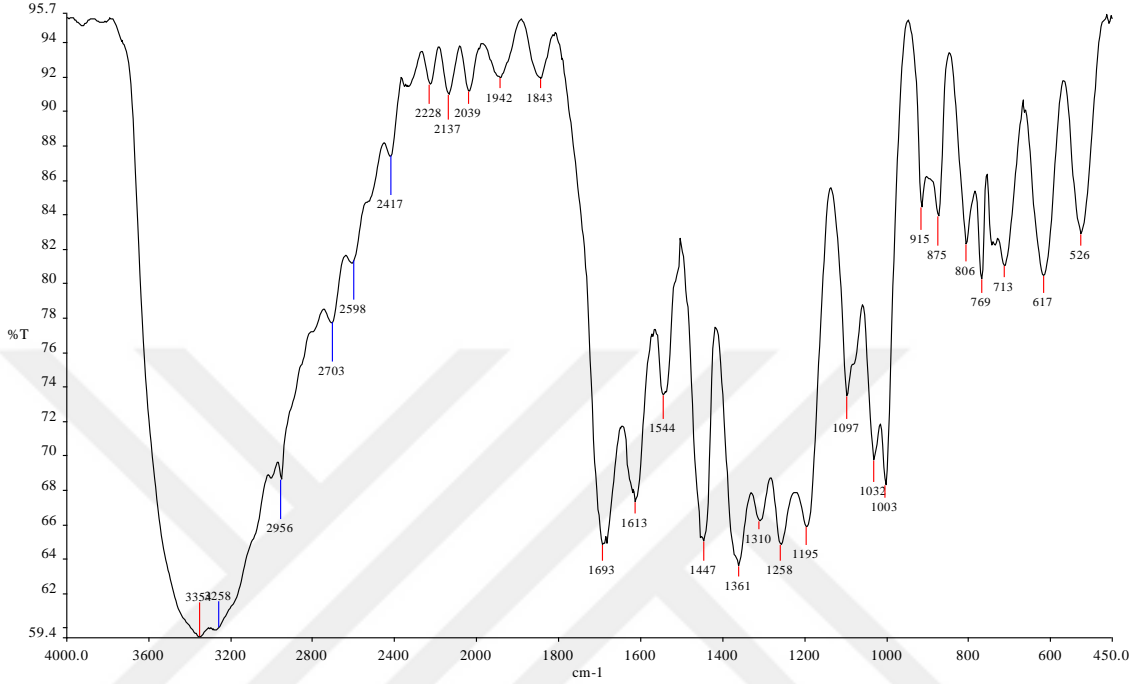
Metanolik kök özütünden izole edilerek FT-IR, ESI-MS, NMR teknikleriyle yapıları aydınlatılan moleküller Şekil 3'te verildi.



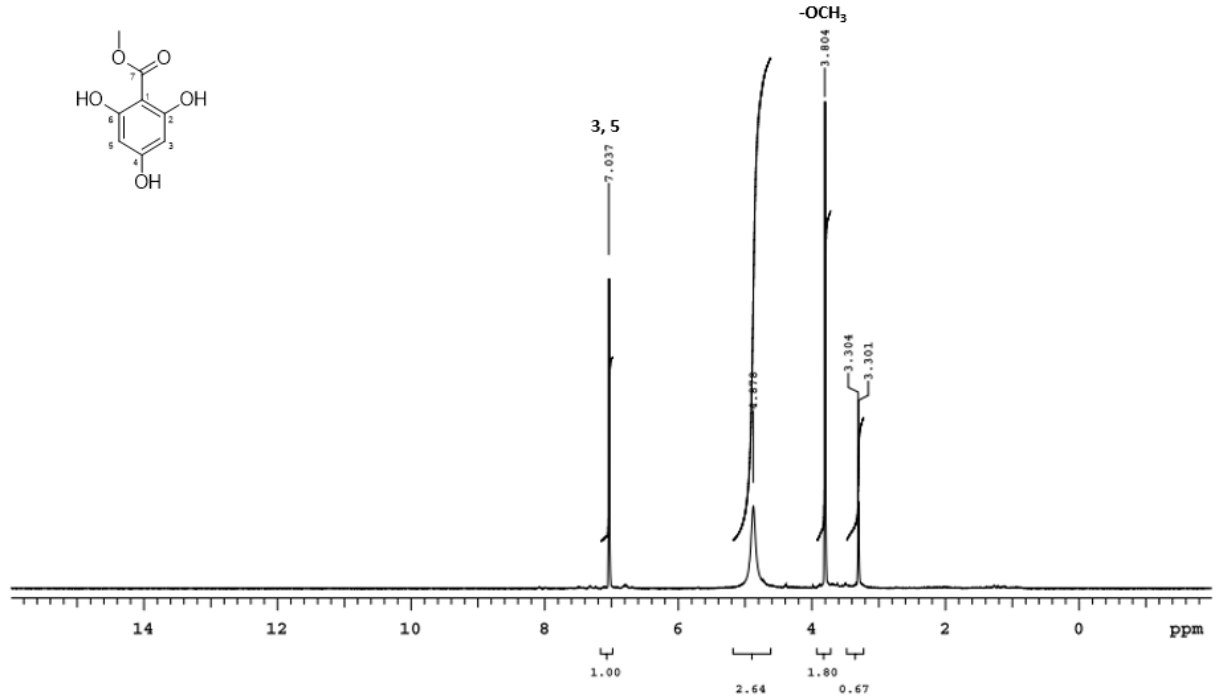
Şekil 3. İzole edilen bileşiklerin moleküler yapıları

2,4,6-Trihidroksi 1-metil benzoat (PD-1): Krem-açık sarı toz; E.N. 157 °C, $R_f[\alpha]_D^{25} +1,631$ (c 0,037, MeOH); UV (MeOH) $\lambda_{max}(\log\epsilon)$ 219 nm (3,45) [99]; IR (ATR) ν_{max} : 3354, 3258 (OH); 1693 (C=O); 1258, 1195 (C-O) cm^{-1} ; 1H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ = 7,03 (2H, s, H-3, H-5), 3,80 (3H, s, -OCH₃); ^{13}C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ = 167,6 (C, C=O), 145,1 (C, C-2, -6), 138,3 (C, C-4), 120,0 (C, C-1), 119,6 (CH, C-3, -5), 50,9 (CH₃, OCH₃); ESI-MS m/z [M-H]⁻ C₈H₇O₅ için hesaplanan 183,07, bulunan 182,90; MS²

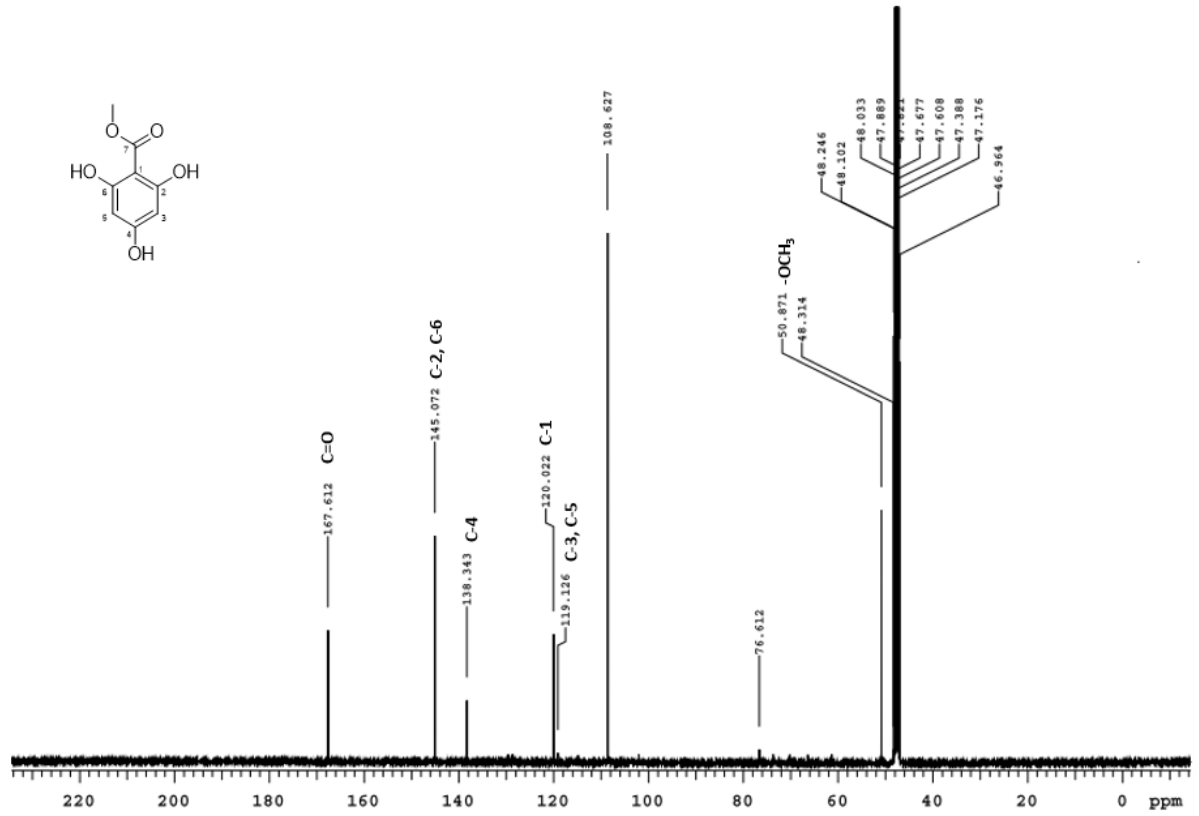
fragmentleri m/z $[M-CH_3]^-$ 167,97 ve $[M-CH_3COO]^-$ 123,87. Safılaştırılan 2,4,6-Trihidroksi 1-metil benzoat bileşimine ait FT-IR, 1H -NMR, ^{13}C -NMR ve MS spektrumları sırasıyla Şekil 4-7’de verildi.



Şekil 4. 2,4,6-Trihidroksi 1-metil benzoat (PD-1)’in IR spektrumu

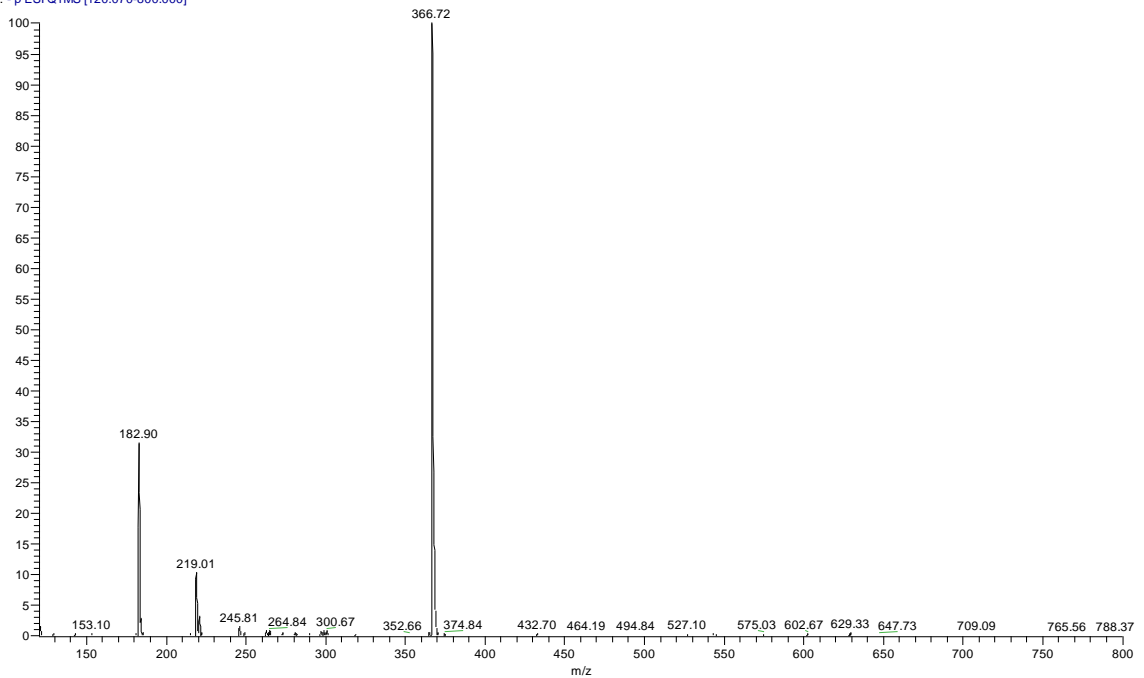


Şekil 5. 2,4,6-Trihidroksi 1-metil benzoat (PD-1)’in 1H -NMR spektrumu



Şekil 6. 2,4,6-Trihidroksi 1-metil benzoat (PD-1)'in ^{13}C -NMR spektrumu

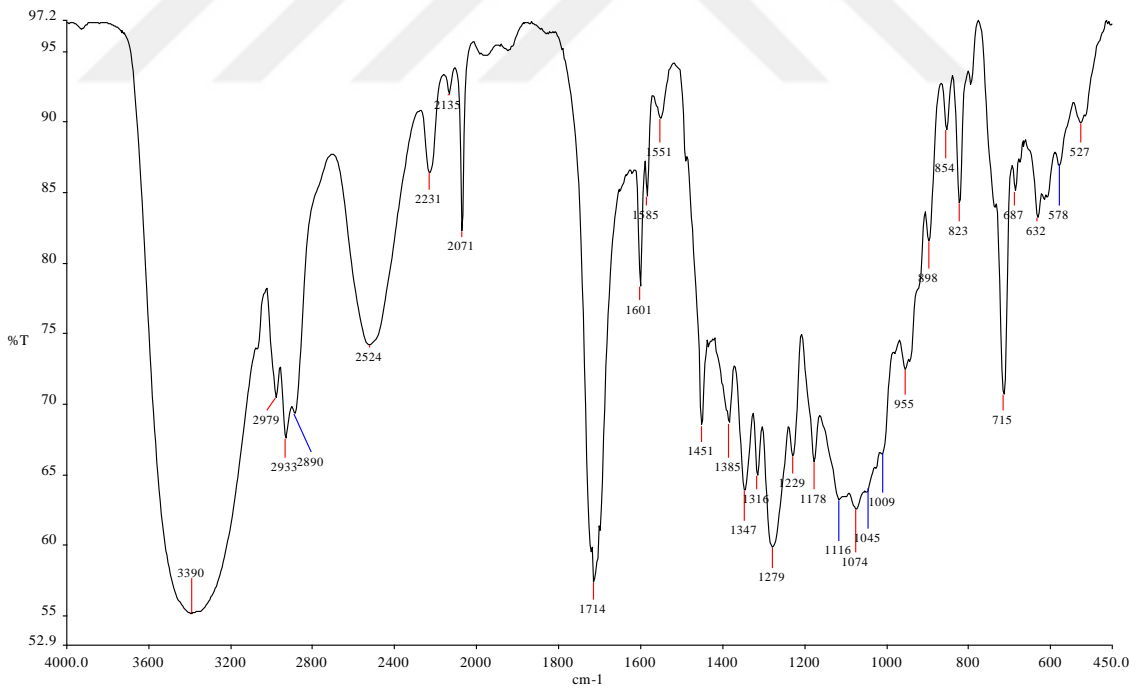
PW-4-TEKRAR #34-37 RT: 0.30-0.33 AV: 4 NL: 1.10E7
T: -p ESI Q1MS [120.070-800.000]



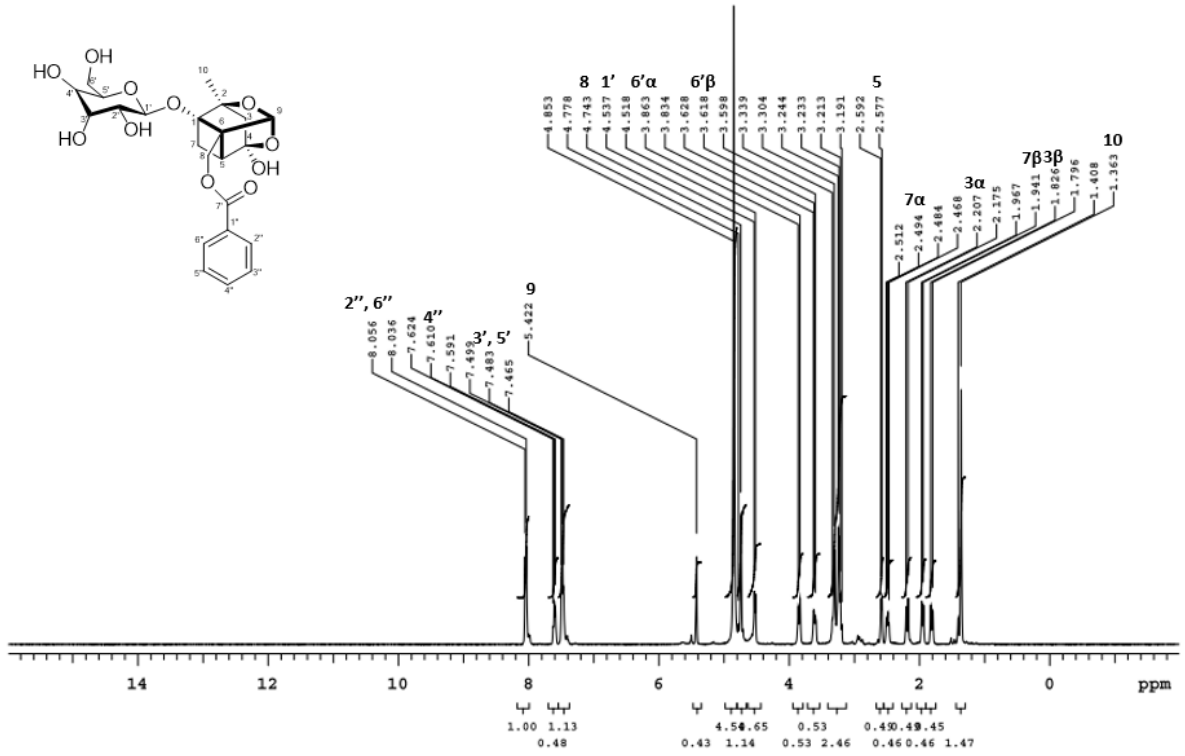
Şekil 7. 2,4,6-Trihidroksi 1-metil benzoat (PD-1)'in ESI-MS spektrumu

Paeniflorin (PD-2): Beyaz amorf toz; E.N. 157-158°C, Rf[α]_D²⁵+17 (c 1,00, MeOH);

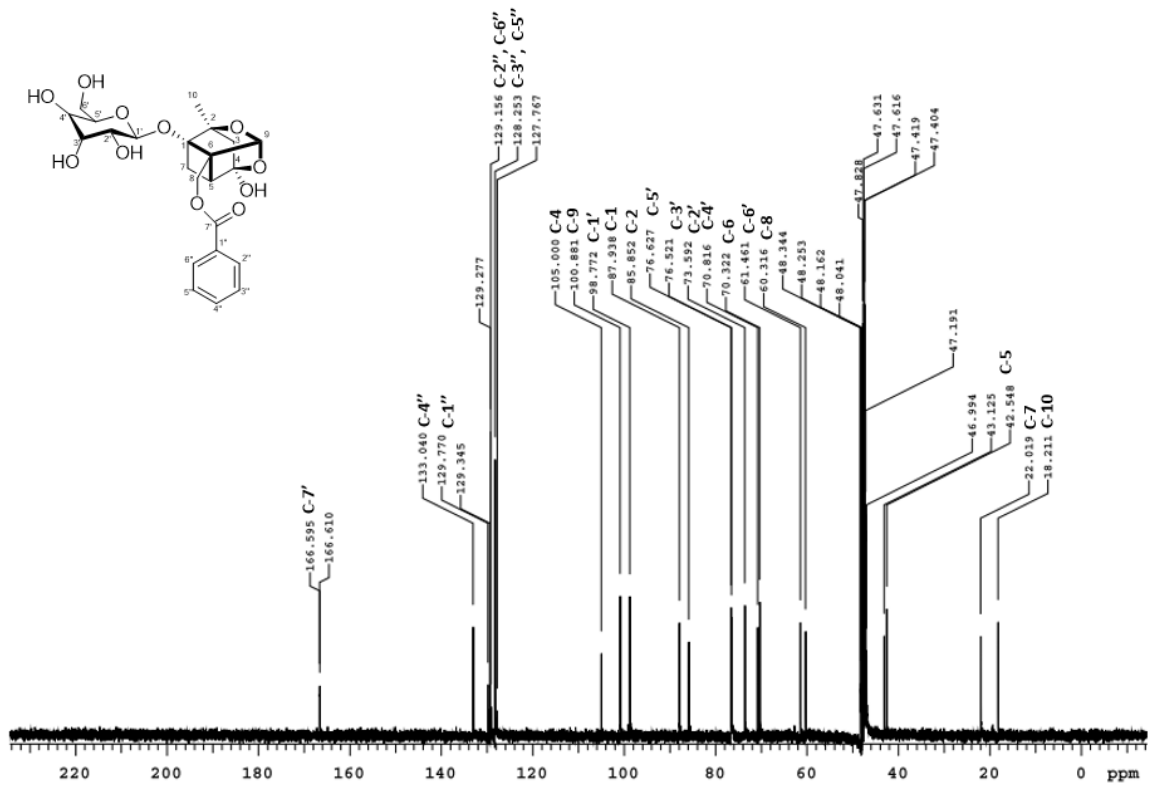
UV(MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 229 nm (3,68) [100] ; IR (ATR) ν_{\max} : 3390 (OH); 1714 (C=O); 1279 (C-O-C); 1178, 1116, 1074 (C-O), 715 (mono Subs. Ar.) cm^{-1} ; ^1H NMR (CD_3OD , 400 MHz): δ = 8,05 (2H, d, J = 8,0, H-2'', H-6''), 7,61 (1H, m, H-4''), 7,48 (2H, t, J = 6,8, H-3'', H-5''), 5,42 (1H, s, H-9), 4,74 (1H, s, H-8), 4,53 (1H, d, J = 7.6, H-1'), 3,85 (1H, d, J = 11,6, H-6' α), 3,61 (1H, d, J = 10, H-6' β), 3,34-3,19 (4H, şeker protonları), 2,58 (1H, d, J = 6, H-5), 2,49 (1H, m, H-7 α), 2,19 (1H, d, J = 12,4, H-3 α), 1,95 (1H, d, J = 10,4, H-7 β), 1,81 (1H, d, J = 12,4, H-3 β), 1,36 (1H, s, H-10); ^{13}C NMR (CD_3OD , 100 MHz): δ = 166,6 (C, C-7'), 133,0 (CH, C-4''), 129,8 (C, C-1''), 129,2 (CH, C-2'', -6''), 128,3 (CH, C-3'', -5''), 105,0 (C, C-4), 100,9 (CH, C-9), 98,8 (CH, C-1'), 87,9 (C, C-1), 85,9 (C, C-2), 76,6 (CH, C-5'), 76,5 (CH, C-3'), 73,6 (CH, C-2'), 70,8 (CH, C-4'), 70,3 (C, C-6), 61,5 (CH_2 , C-6'), 60,3 (CH_2 , C-8), 42,5 (CH, C-5), 22,0 (CH_2 , C-7), 18,2 (CH_3 , C-10); ESI-MS m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_{11}\text{Na}$ için hesaplanan 502,41, bulunan 502,88; MS^2 fragmentleri m/z $[\text{M}-\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}]^+$ 380,98 ve $[\text{M}-\text{glukozil}+\text{H}]^+$ 340,88. Saflaştırılan paeoniflorin bileşiğine ait FT-IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR ve MS spektrumları sırasıyla Şekil 8-11'de verildi.



Şekil 8. Paeoniflorin (PD-2)'in IR spektrumu

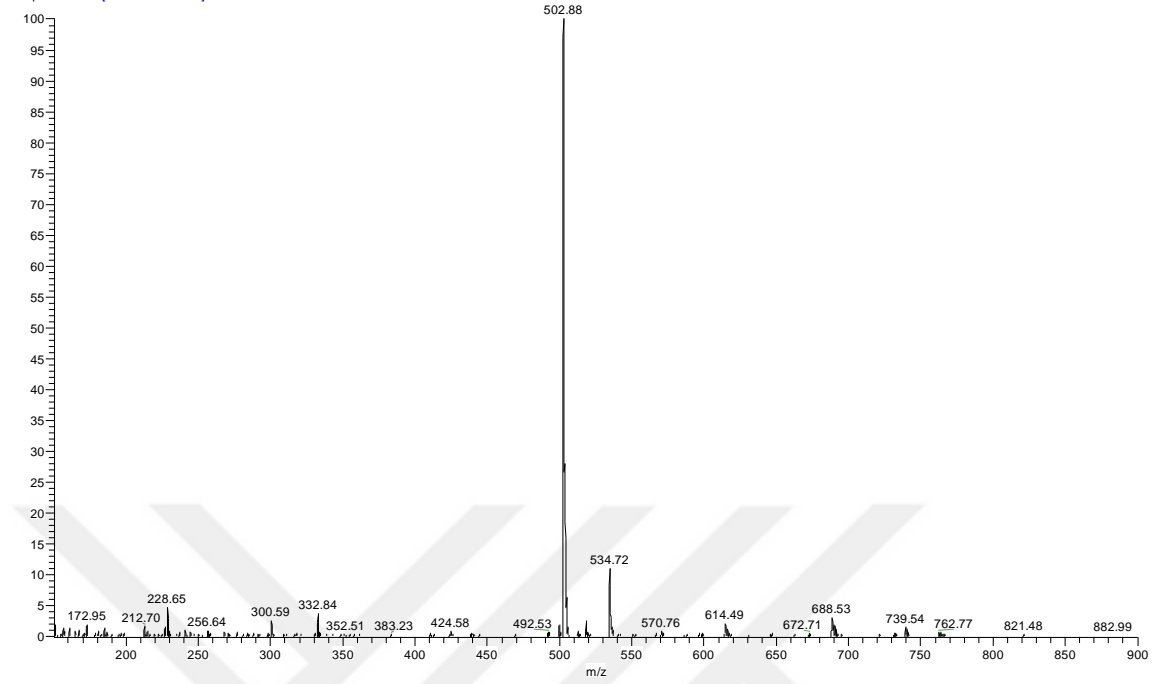


Şekil 9. Paeoniflorin (PD-2)'in ¹H-NMR spektrumu



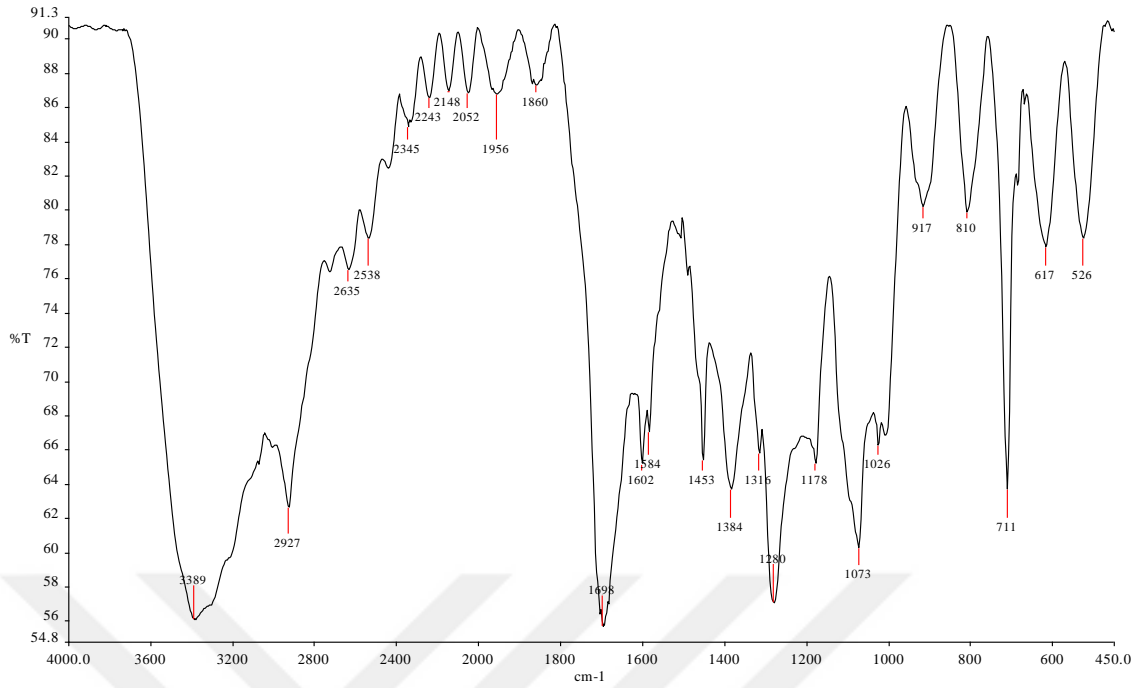
Şekil 10. Paeoniflorin (PD-2)'in ¹³C-NMR spektrumu

PW-1+-TEKRAR #23-29 RT: 0.20-0.26 AV: 7 SB: 8 0.16-0.19, 0.26-0.28 NL: 1.57E7
T: +p ESI Q1MS [150.070-900.000]

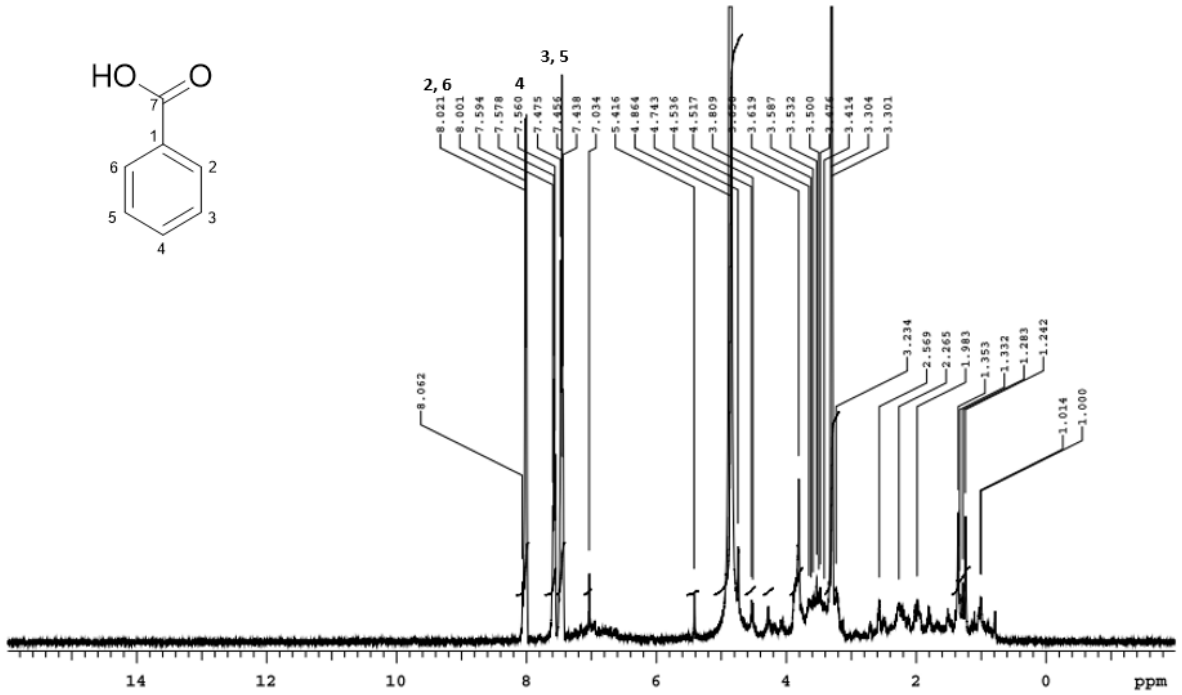


Şekil 11. Paeoniflorin (PD-2)'in ESI-MS spektrumu

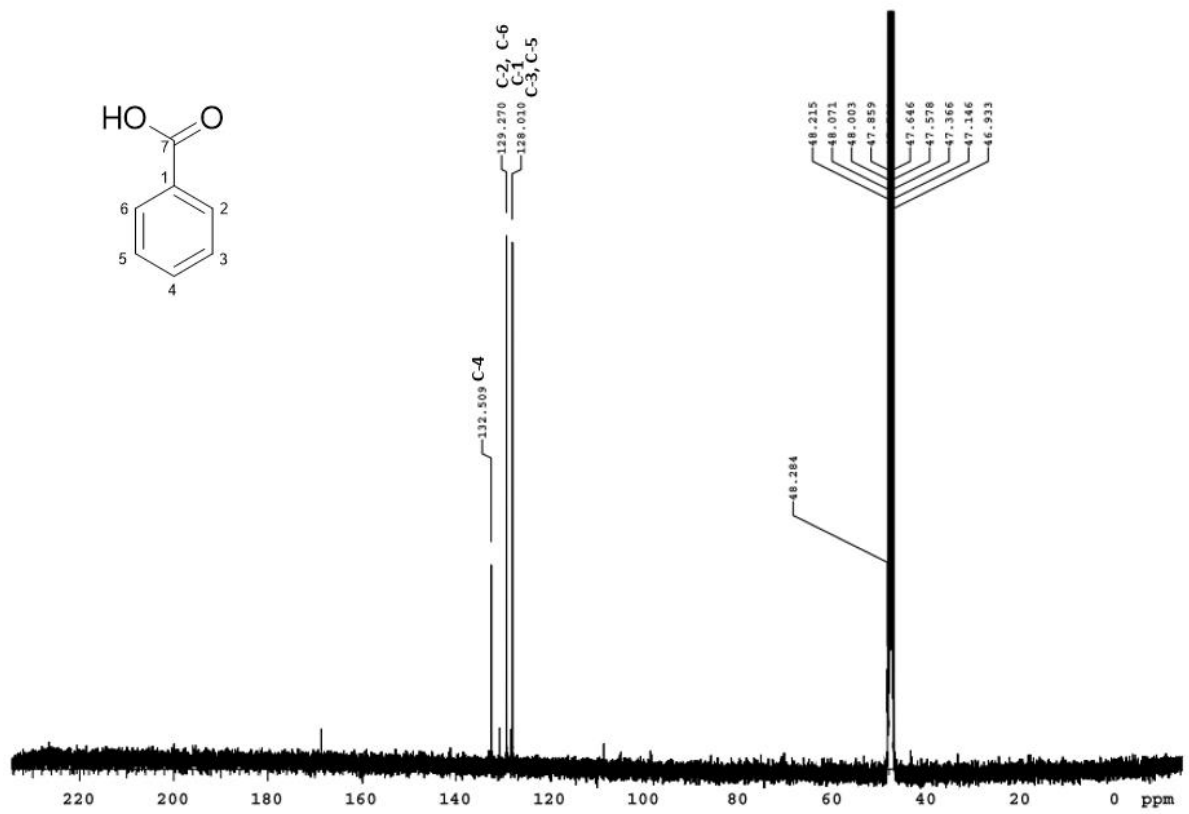
Benzoik asit (PD-3): Beyaz amorf toz; E.N. 122 °C; Rf [α]_D²⁵ +1,54 (c 1,00, MeOH); UV(MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 225 nm (3,98) [101]; IR (ATR,) ν_{\max} : 3389 (OH); 1698 (C=O); 1178 (C-O) cm⁻¹; ¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ = 8,02 (2H, d, J = 7,9, H-2, H-6), 7,56 (1H, t, J = 6,8, H-4), 7,45 (2H, d, J = 7,5, H-3, H-5); ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ = 132,5 (CH, C-4), 129,3 (CH, C-2, -6), 128,2 (C, C-1), 128,0 (CH, C-3, -5); ESI-MS m/z [M-H]⁻C₇H₆O₂ için hesaplanan 121,04, bulunan 121,14; MS² fragmentleri m/z [M-COO]⁻ 76,96 ve [M-OH]⁻ 105,08. Saflaştırılan benzoik asit bileşiğine ait FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve MS spektrumları sırasıyla Şekil 12-15' te verildi.



Şekil 12. Benzoik Asit (PD-3)'in IR spektrumu

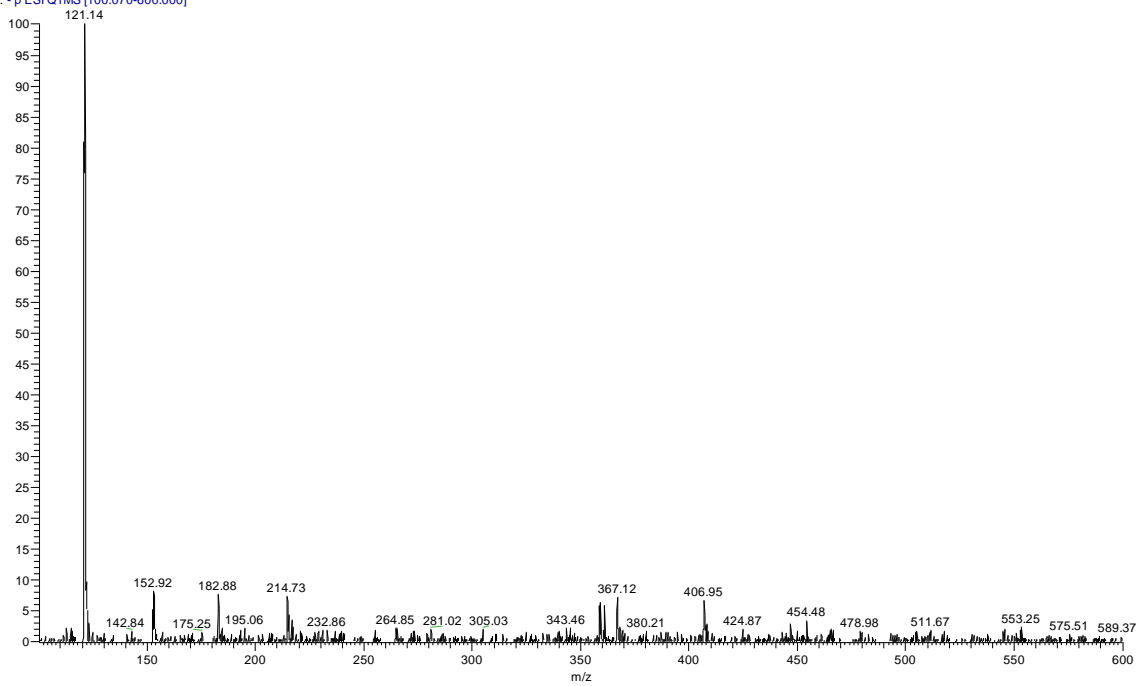


Şekil 13. Benzoik Asit (PD-3)'in ¹H-NMR spektrumu

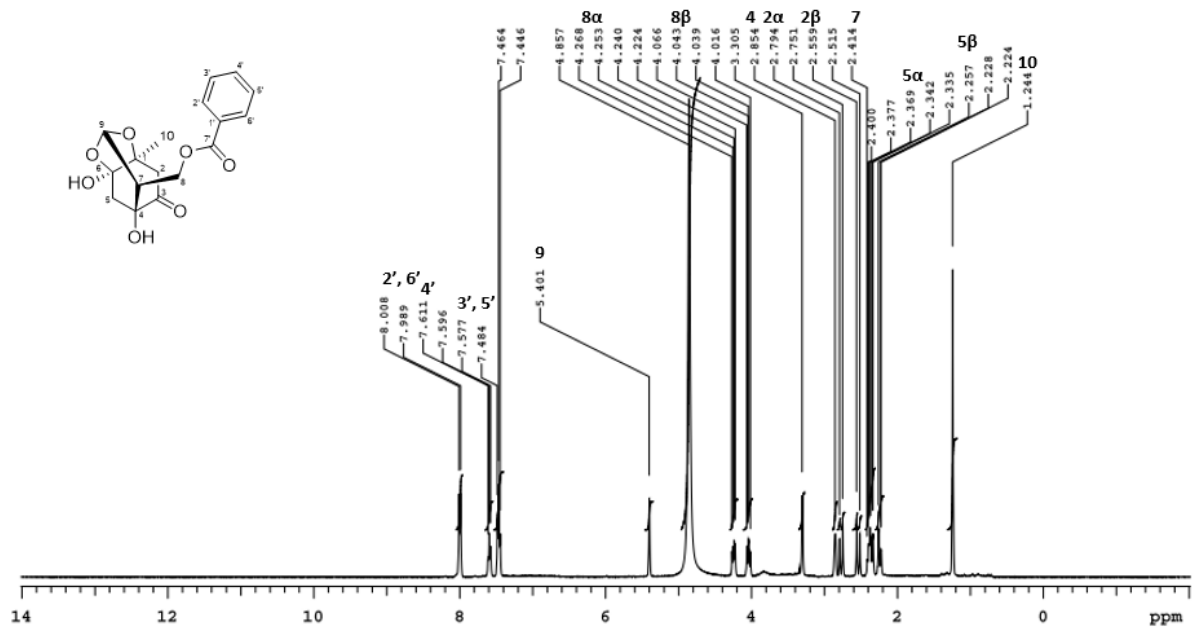


Şekil 14. Benzoik Asit (PD-3)'in ¹³C-NMR spektrumu

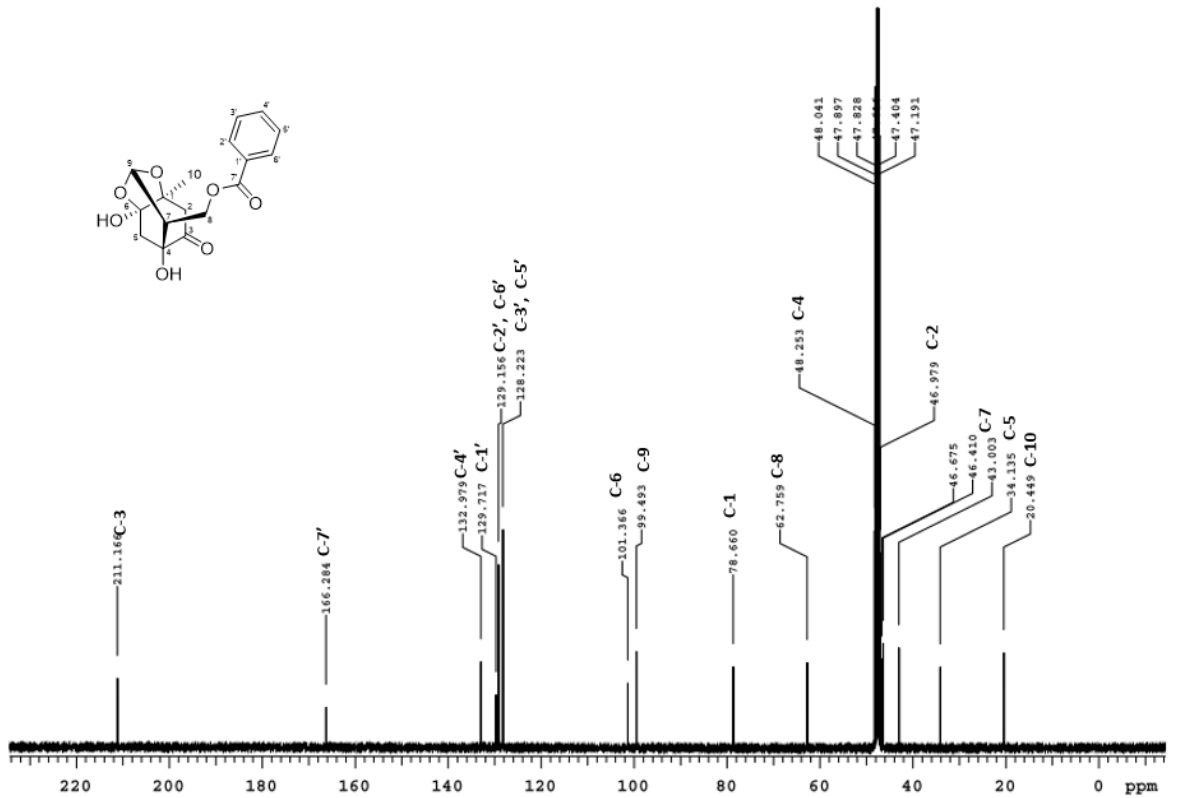
PW-2-TEKRAR #28-32 RT: 0.24-0.28 AV: 5 SB: 11 0.20-0.24 , 0.28-0.31 NL: 4.45E5
T: -p ESI Q1MS [100.070-600.000]



Şekil 15. Benzoik Asit (PD-3)'in ESI-MS spektrumu

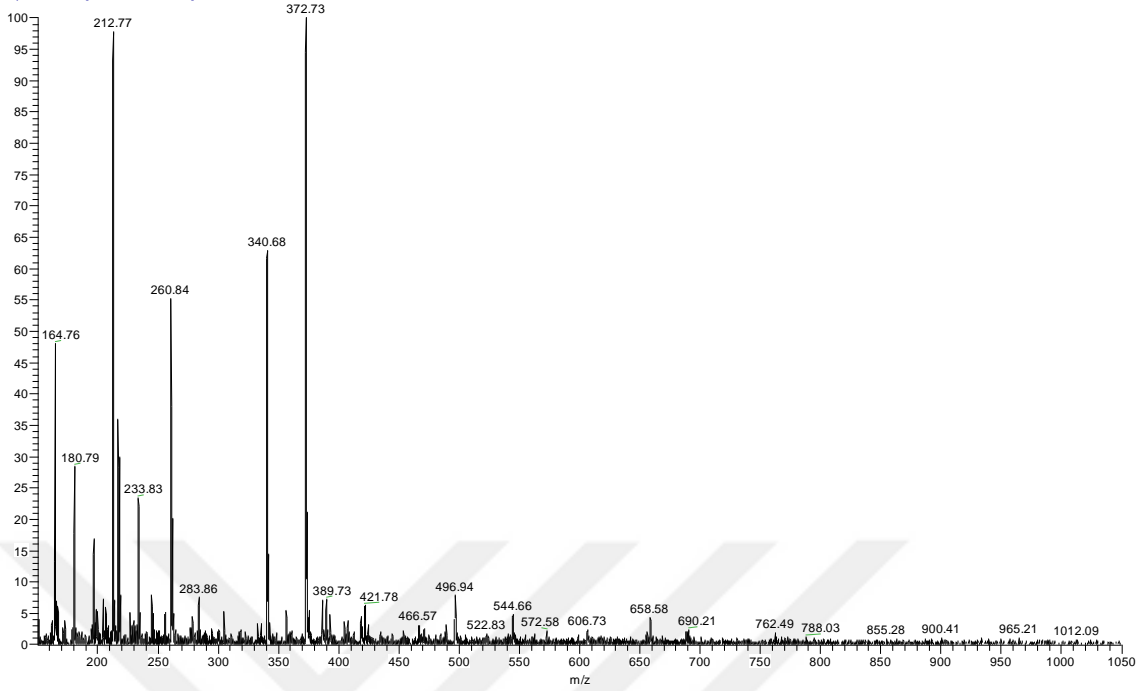


Şekil 17. Paoniflorigenon (PD-4)'un ¹H-NMR spektrumu



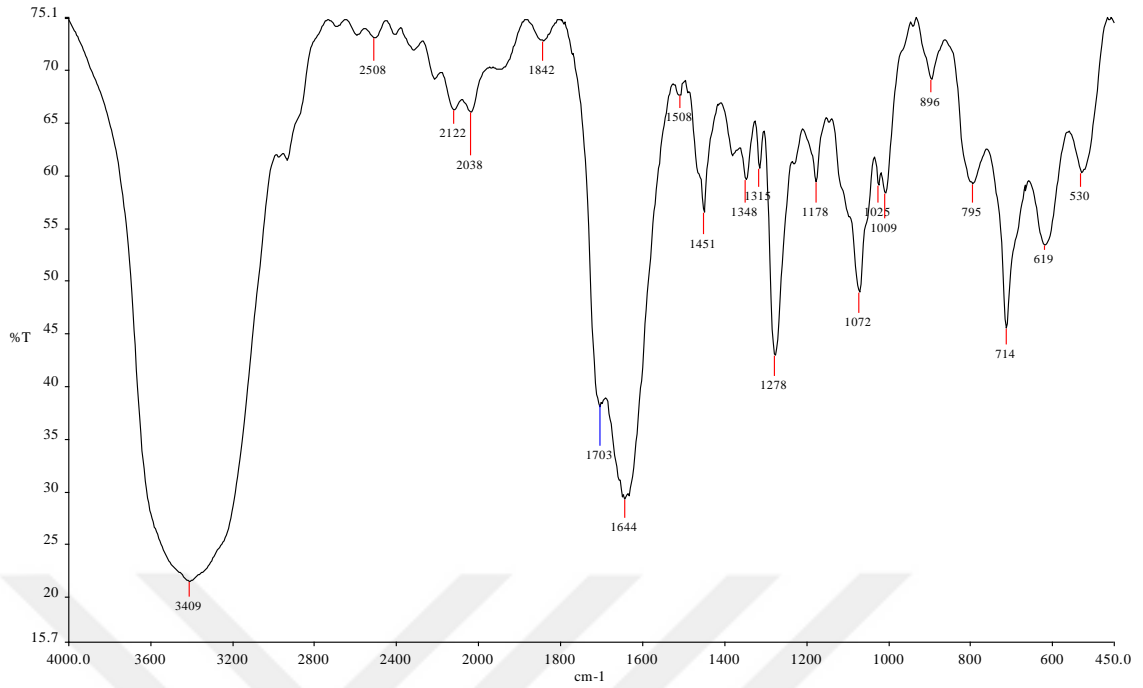
Şekil 18. Paoniflorigenon (PD-4)'un ¹³C-NMR spektrumu

PW-5-tekrar2 #20-27 RT: 0.18-0.24 AV: 8 SB: 49 0.05-0.18, 0.28-0.58 NL: 6.63E6
T: +p ESI Q1MS [150.070-1050.000]

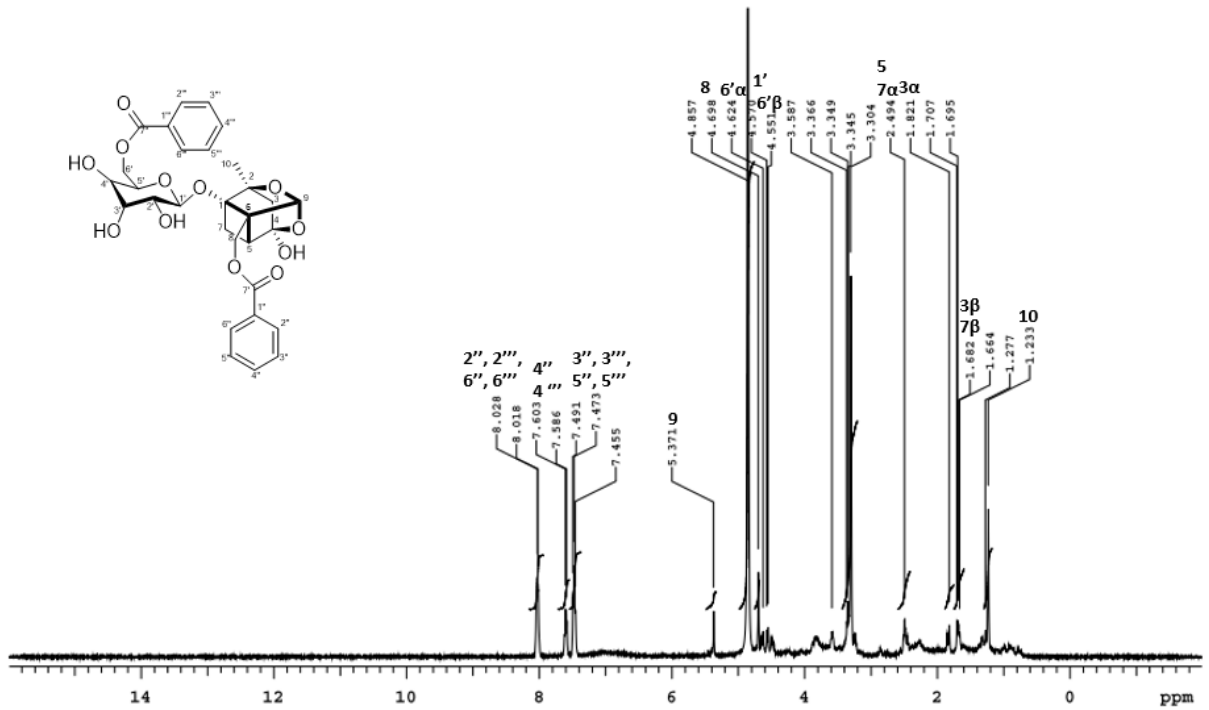


Şekil 19. Paeoniflorigenon (PD-4)'un ESI-MS spektrumu

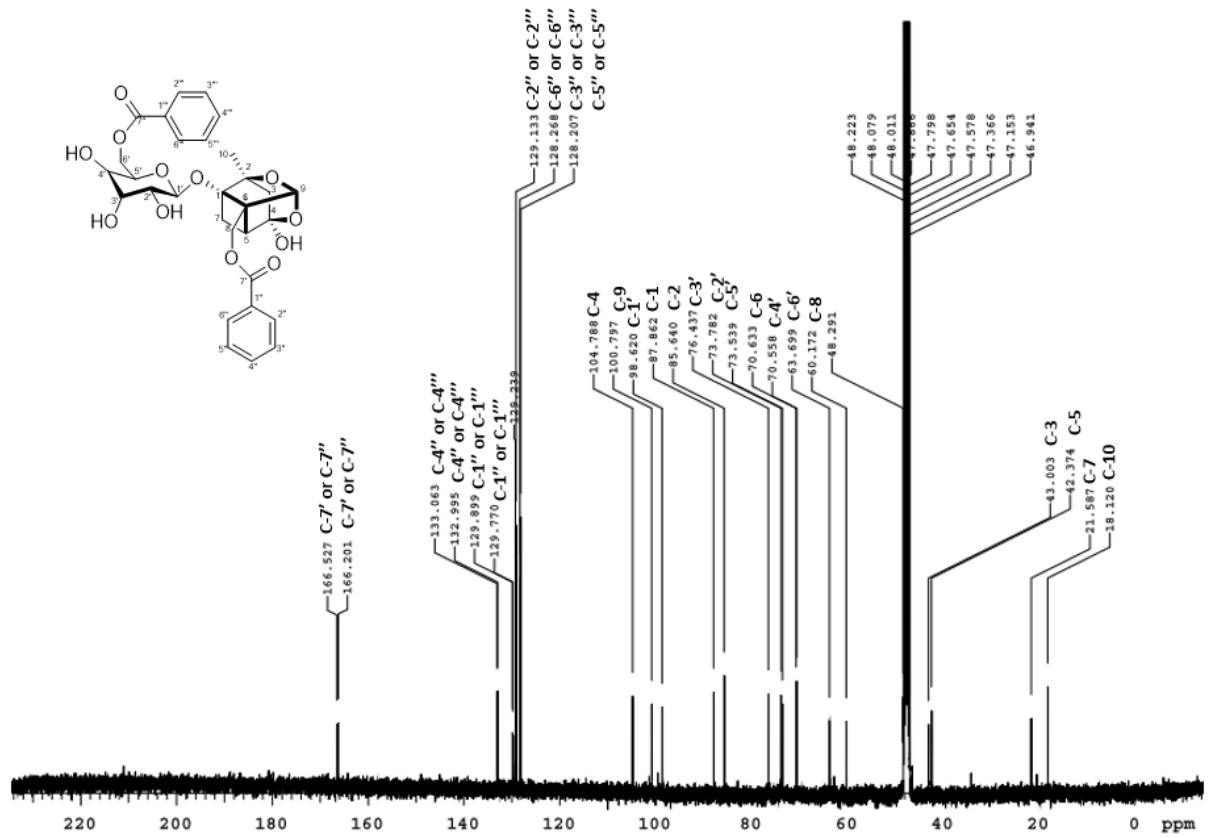
Benzoilpaeoniflorin(PD-5): Beyaz amorf toz; E.N 131-132 °C; $R_f[\alpha]_D^{25} +42$ (c 0,67, MeOH); UV(MeOH) λ_{max} (log ϵ) 229 nm (4,42) [100]; IR (ATR) ν_{max} : 3406 (OH); 1703, 1644 (C=O); 1278 (C-O-C); 1072 (C-O), 714 (mono subs, Ar,) cm^{-1} ; 1H NMR (CD₃OD, 400 MHz): δ = 8,03 (1H, m, H-2'', H-2''', H-6'', H-6'''), 7,60 (1H, t, J = 6,8, H-4'', H-4'''), 7,47 (1H, t, J = 7,2, H-3'', H-3''', H-5'', H-5'''), 5,37 (1H, s, H-9), 4,70 (1H, s, H-8), 4,62 (1H, m, H-6' α), 4,56 (1H, d, J = 7,6, H-1'), 4,48 (1H, m, H-6' β), 3,59-3,24 (4H, m, şeker protonları), 2,49(1H, m, H-7 α), 2,49 (1H, m, H-5), 1,84 (1H, d, J = 12,8, H-3 α), 1,68 (1H, m, H-7 β), 1,68 (1H, m, H-3 β), 1,23 (1H, s, H-10); ^{13}C NMR (CD₃OD, 100 MHz): δ = 166,2 veya 166,5 (C, C=O, C-7', -7''), 133,0 veya 133,1 (CH, C-4'', -4'''), 129,8 veya 129,9 (C, C-1'', -1'''), 129,1 veya 129,2 (CH, C-2'', -2''', -6'', -6'''), 128,2 veya 128,3 (CH, C-3'', -3''', -5'', -5'''), 100,8 (CH, C-9), 104,8 (C, C-4), 98,6 (CH, C-1'), 87,9 (C, C-1), 85,6 (C, C-2), 76,4 (CH, C-3'), 73,8 (CH, C-2'), 73,5 (CH, C-5'), 70,6 (C, C-6), 70,6 (CH, C-4'), 63,7 (CH₂, C-6'), 60,2 (CH₂, C-8), 43,0 (CH₂, C-3), 42,4 (CH, C-5), 21,6 (CH₂, C-7), 18,1 (CH₃, C-10); ESI-MS m/z [M+Na]⁺ C₃₀H₃₂O₁₂Na için hesaplanan 606,60, bulunan 606,73; MS² fragmenti m/z [M- C₆H₅COO]⁺ 484,94. Saflaştırılan benzoilpaeoniflorin bileşiğine ait FT-IR, 1H -NMR, ^{13}C -NMR ve MS spektrumları sırasıyla Şekil 20-23'te verildi.



Şekil 20. Benzoilpaeoniflorin (PD-5)'in IR spektrumu

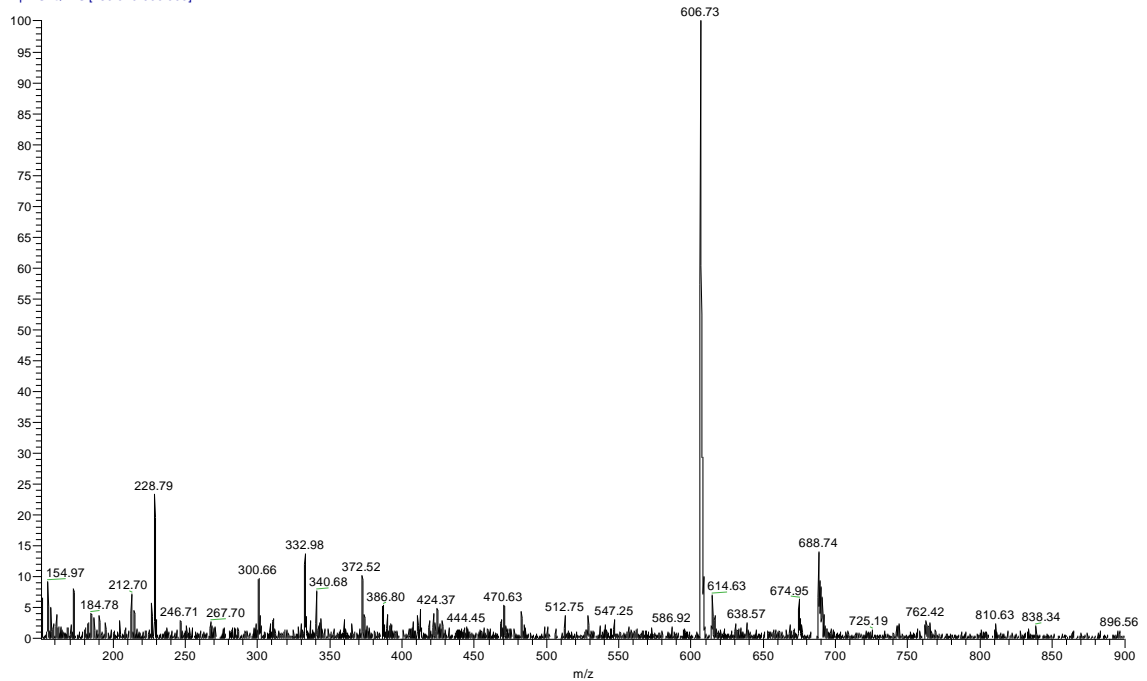


Şekil 21. Benzoilpaeoniflorin (PD-5)'in $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



Şekil 22. Benzoilpaeoniflorin (PD-5)'in ¹³C-NMR spektrumu

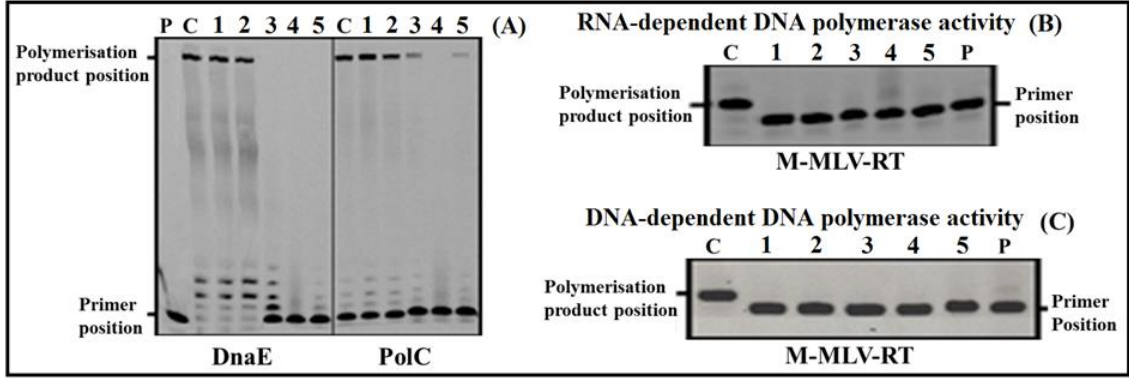
PW-6-TEKRAR+++ #24-27 RT: 0.21-0.24 AV: 4 SB: 9 0.16-0.19 , 0.26-0.29 NL: 5.40E6
T: +p ESI Q1MS [150.070-900.000]



Şekil 23. Benzoilpaeoniflorin (PD-5)'in ESI-MS spektrumu

3.2. Bitki Dokularının ve İzole Moleküllerin Polimeraz İnhibisyon Etkileri

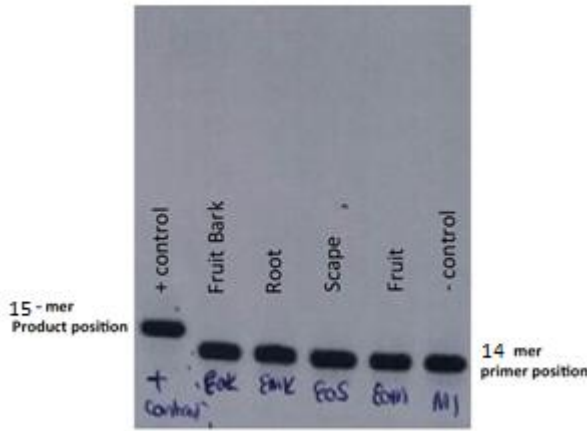
Paeonia daurica'nın metanolik kök özütünden izole edilen ve yapısı aydınlatılan 5 ana bileşiğin bakteriyel (polC ve DnaE) ve viral (MMLV-RT) DNA polimerazların inhibisyon özelliklerini işaret eden jel görüntüleri Şekil 24'te verildi.



Şekil 24. İzole Moleküllerin Primer uzatma deneyi ile İnhibisyon Etkileri. (A); DnaE ve PolC üzerinde inhibisyon etkileri. (B) ve (C); M-MLV-RT üzerinde RNA-bağımlı DNA and DNA-bağımlı DNA polimeraz inhibisyon etkileri. **P:** primer, **C:** kontrol, **1:** 2,4,6-trihidroksi-1-metil benzoat, **2:** paeoniflorin, **3:** benzoik asit, **4:** paeoniflorigenon, **5:** benzoilpaeoniflorin.

3.3. Uçucu Yağların Polimeraz İnhibisyon Etkileri

Hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağların bakteriyel (polC ve DnaE) ve viral (MMLV-RT) DNA polimerazların inhibisyon özelliklerini işaret eden jel görüntüleri Şekil 25'te verildi.



Şekil 25. Bitkinin farklı dokularına ait uçucu yağların M-MLV-RT üzerindeki etkileri.

3.4. Bitkinin Farklı Kısımlarının Uçucu Yağ Analizi

Paeonia daurica subsp. *macrophylla*'nın kök, gövde, meyve ve meyve kabuğu kısımlarının SPME ve hidrodistilasyon yöntemiyle elde edilen uçucu yağları GC-MS sisteminde analiz edildi.

3.4.1. SPME Yöntemiyle Uçucu Yağ Analizi

Bitkinin farklı kısımlarının SPME yöntemiyle elde edilen uçucu yağ analiz sonuçları Tablo 4'te verildi.

Tablo 4. SPME yöntemiyle Uçucu Yağ Analizi

Aİ	AZ	Bileşik	Kök (%)	Gövde (%)	Meyve (%)	Meyve Kabuğu (%)
630	1.276	Propilen glikol	-	-	1,47	-
647	1.579	Decanal dimethyl acetal	-	-	1,29	-
662	1.869	Sikloheksil asetat	-	-	1,18	-
699	2.581	Sikloheksa 1-4-dien	Tr	-	1,35	-
725	3.067	Hekz-2(Z)-enol	-	-	-	0,59
805	4.633	Kapronaldehit	Tr	0,26	2,06	0,48
815	4.920	Sorbinol	-	-	-	0,99
855	6.120	Hekz-2(E)-enal	-	0,78	0,71	2,22
962	9.781	Benzaldehit	0,56	2,41	2,15	1,67
991	10.811	Oksibenzen	0,87	0,15	-	-
1008	11.482	Kaprilaldehit	-	0,39	-	-
1020	11.903	3-metil-pentanol	-	-	-	2,17
1024	12.068	Neodene	-	1,49	-	-
1024	12.095	Oct-2(E)-enal	-	-	0,60	0,72
1028	12.236	Kapril alkol	-	3,70	1,99	3,91
1040	12.684	<i>p</i> -hidroksi benzaldehit	24,53	7,23	1,39	18,34
1050	13.070	Salisilaldehit	49,23	36,23	32,45	43,43
1078	14.152	Pelargol	-	1,38	-	-
1094	14.756	Terpinolen	-	0,10	-	-
1100	15.000	Klorus	0,57	0,14	-	0,40
1106	15.241	Linalool	-	0,70	-	Tr
1143	16.615	<i>Cis</i> -pinokampon	0,97	0,91	0,51	0,21
1186	18.269	β -Thujon	3,30	-	-	1,77
1189	18.365	Miritanal	12,55	4,46	16,79	6,12
1193	18.541	(Z)-dihidro-Karvone	0,59	-	-	-
1193	18.519	L-sitronelol	-	-	-	0,65
1196	18.619	<i>Trans</i> -Miritanol	2,60	0,37	5,68	2,06
1198	18.714	Etil salisilat	-	-	-	0,81
1200	18.804	Metil-salisilat	0,98	11,75	2,31	4,89
1202	18.88	Miritenal	1,01	1,64	2,21	1,67
1227	19.776	Lavandulol	-	-	-	1,52
1229	19.826	Santolinatrien	0,30	4,17	1,29	-
1236	20.111	Nerol	-	3,89	-	0,67
1249	20.561	Neral	Tr	4,47	-	0,73

Tablo 4 (devamı). SPME yöntemiyle Uçucu Yağ Analizi

Aİ	AZ	Bileşik	Kök (%)	Gövde (%)	Meyve (%)	Meyve Kabuğu (%)
1255	20.792	Beta-sinensal	-	0,74	-	-
1261	20.986	Isopulegol	0,40	-	-	-
1263	21.082	Geraniol	-	5,13	-	1,14
1268	21.254	Pinan-2-tiyol	0,32	0,39	-	Tr
1275	21.493	Roz oksit	0,44	0,23	-	Tr
1279	21.643	Geranial	-	4,72	-	0,82
1282	21.752	Perilaldehit	0,25	0,37	-	0,37
1298	22.350	<i>cis</i> -lanseol	-	0,40	-	0,28
1307	22.655	Peril alkol	Tr	0,74	-	0,87
1353	24.255	β -patchoulen	-	-	1,85	-
1360	24.492	α -cubeben	-	-	0,95	-
1378	25.093	Siklosativen	-	-	5,99	0,22
1382	25.231	α -kopaen	-	-	7,10	-
1400	25.871	<i>r</i> -kadinen	-	-	3,73	-
1409	26.137	Tetradekan	Tr	Tr	-	Tr
1509	29.395	Pentadekan	Tr	Tr	-	Tr
1533	30.111	Miristisin	-	0,20	-	-
1606	32.363	Dietil fitalat	-	-	0,57	-
	Tanımlanan Bileşik	23	32	23	33	
	Tanımlanan Bileşik (%)	99,30	99,65	95,62	99,90	
	Aldehitler (%)	88,20	62,96	59,65	76,55	
	Terpenoidler (%)	8,24	16,47	25,81	9,57	
	Esterler (%)	1,55	11,89	4,06	6,10	
	Hidrokarbonlar (%)	0,44	4,28	2,64	0,11	
	Diğer (%)	0,87	4,05	3,46	7,57	

Aİ: Alıkonma İndeksi, AZ: Alıkonma Zamanı, Tr: <0,1%

3.4.2. Hidrodistilasyon Yöntemiyle Elde Edilen Uçucu Yağ Analizleri

Bitkinin farklı kısımlarına ait hidrodistilasyon sonucu elde edilen uçucu yağ analiz sonuçları Tablo 5'te verildi.

Tablo 5. Hidrodistilasyon Yöntemiyle Elde Edilen Uçucu Yağ Analizleri

Aİ	AZ	Bileşik	Kök (%)	Gövde (%)	Meyve (%)	Meyve kabuğu (%)
714	2.830	2,5-dimetil tetrahidrofuran	1,13	0,18	0,16	0,15
1013	11.579	1,3-dimetil- sikloheksan	-	0,53	-	0,93
1027	12.117	D-Limonen	-	0,26	-	0,14
1038	12.597	Salisilaldehit	30,47	0,51	1,28	1,14
1071	13.828	<i>Trans</i> -Linalool oksit	-	0,30	-	0,93
1087	14.429	<i>cis</i> -Linalool oksit	-	-	-	0,69
1087	14.432	Terpinolen	-	0,58	-	-
1093	14.646	Klorus	-	-	0,37	0,14
1099	14.894	Linalool	-	15,62	0,32	13,63
1132	16.198	2(5H)-Furanon	1,68	-	-	-
1156	17.150	Non-2(E)-enal	0,25	0,39	0,17	0,10
1169	17.550	Etil Benzoat	-	-	0,99	-
1173	17.703	Octanoik asit	-	0,60	0,17	-
1176	17.805	Terpinen-4-ol	-	0,50	-	1,23
1180	17.960	<i>trans</i> -miritanol	15,61	-	0,36	0,13
1185	18.213	(-)- <i>cis</i> -miritanol	2,23	-	-	-
1190	18.313	α -terpineol	-	20,73	1,04	53,91
1192	18.415	Metil salisilat	-	-	0,82	-
1192	18.494	Miritenal	1,91	-	-	0,15
1196	18.572	γ -terpineol	-	-	-	0,38
1211	19.123	4(dimethylamino)Benzonitril	-	4,57	13,60	0,92
1214	19.216	3-okzabisiklooktan-2-on	-	1,84	-	0,77
1216	19.301	1-fenoksi-2-kloropropan	-	1,34	-	-
1229	19.803	Nerol	-	1,81	-	0,73
1240	20.179	Neral	-	0,62	-	0,25
1250	20.585	10-merkaptopinan	5,49	-	-	-
1255	20.719	Geraniol	-	6,94	0,87	4,02
1257	20.849	<i>trans</i> -Shisool	4,23	-	-	-
1261	20.918	Dec-2(E)-enal	-	2,04	-	-
1270	21.251	Geranial	-	2,23	0,28	0,89
1272	21.350	Perilaldehit	-	-	-	2,34
1273	21.368	Pellandral	2,85	3,44	1,17	-
1292	22.061	<i>p</i> -simen-7-ol	0,30	1,96	-	1,00
1299	22.330	Peril alkol	0,41	1,28	-	1,84
1297	22.321	Tridecan	1,46	-	-	-
1315	22.857	Deca-2(E),4(E)-dial	-	0,61	0,18	0,22
1351	24.082	α -kubeben	-	-	1,01	-
1355	24.335	2,6-oktadienoik asit-etil ester	-	13,45	-	2,97
1366	24.663	n-dekanoik asit	-	0,84	-	0,26
1368	24.682	Siklosativen	-	-	20,36	-
1372	24.821	α -Kopaen	-	-	7,09	-
1391	25.454	β -patçulen	-	-	9,87	-
1399	25.759	Tetradekan	2,61	0,29	0,18	0,12
1430	26.830	5-siyantropolon	7,66	-	-	-
1452	27.491	Bisikloheptan-3-on	-	0,27	-	0,16
1479	28.346	3,11-Akoradien	-	-	3,41	-
1481	28.426	α -amorfen	-	-	1,60	-
1497	29.020	Pentadekan	4,77	-	0,15	-
1501	29.077	α -Murolen	-	0,35	-	-
1502	29.099	Himaçala-2,4-dien	-	-	1,72	-
1509	29.315	β -bisabolen	-	-	1,20	-
1521	29.703	Miristisin	-	3,49	0,18	0,34
1544	30.40	α -kalakoren	-	-	1,96	-
1563	30.982	Dodekanoik asit	2,16	7,78	7,37	5,74

Tablo 5 (devamı). Hidrodistilasyon Yöntemiyle Elde Edilen Uçucu Yağ Analizleri

AI	AZ	Bileşik	Kök (%)	Gövde (%)	Meyve (%)	Meyve kabuğu (%)
1592	31.857	Çedene	-	0,56	0,32	-
1599	32.078	Hekzadekan	6,48	-	0,33	0,21
1601	32.220	4-propilbenzaldehit	0,51	-	-	-
1608	32.329	2-naftalen metanol	-	-	1,13	-
1611	32.450	Tetradekanal	-	0,22	0,81	-
1622	32.813	Pirazol-5-ol	3,75	-	-	-
1630	33.002	α -bisabolol	-	-	0,93	-
1634	33.116	γ -eudesmol	-	-	1,02	0,19
1644	33.407	α -epi-murolol	-	0,27	3,18	0,32
1647	33.469	Cedren-13-ol	-	-	2,19	-
1656	33.755	α -eudesm-(7)-11-en-4-ol	-	0,31	2,10	0,31
1660	33.864	Tridekanoik asit	-	0,45	0,37	0,38
1666	34.026	Beta-nootkatol	-	-	2,79	-
		Yağ verimi (% v/w)	0,20	0,07	0,06	0,10
		Tanımlanan Bileşik	20	35	39	36
		Tanımlanan Bileşik (%)	95,96	95,31	93,14	98,29
		Aldehitler (%)	35,48	8,21	3,89	5,09
		Terpenoidler (%)	35,93	53,02	64,42	80,65
		Esterler (%)	1,3	13,63	2,34	3,26
		Hidrokarbonlar (%)	15,32	0,85	0,83	0,72
		Diğer (%)	8,10	19,60	21,66	8,57

AI: Alıkonma İndeksi, AZ: Alıkonma Zamanı

3.5. Bitkinin Farklı Dokularının ve Kök Fraksiyonlarının Antioksidan Etkileri

Bitkinin meyve, meyve kabuğu, gövde ve kök özütlelerinin toplam fenolik içerikleri (TFİ) ile DPPH ve ABTS radikal süpürücü aktiviteleri (RSA) Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Bitki Özütlelerinin Antioksidan Kapasiteleri

Numune/Standart	TFİ ^a		RSA ^b	
	mgGAE/g	mgKE/g	DPPH SC ₅₀	ABTS SC ₅₀
Kök-Metanolik özüt	130,86±4,49	87,54±3,04	10,03±0,48	16,78±0,91
Kök-Eter fraksiyonu	217,77±3,65	147,02±2,49	6,47±0,39	12,00±0,27
Kök-Etil asetat fraksiyonu	671,63±18,28	462,11±12,64	3,00±0,09	7,39±0,16
Kök-Su fraksiyonu	192,64±5,53	128,58±3,83	28,57±1,87	33,81±1,86
Meyve-Metanolik özüt	373,48±5,41	251,11±3,74	8,33±0,51	35,10±2,14
M. kabuğu- Met. özüt	322,42±20,63	220,94±14,30	4,61±0,21	28,89±1,49
Gövde-Met. özüt	69,43±1,52	46,31±1,03	28,48±1,08	79,44±3,89
Gallik Asit	-	-	1,45±0,04	-
Kuersetin	-	-	7,35±0,10	10,48±0,37
Troloks	-	-	6,71±0,24	14,59±0,31
Askorbik Asit	-	-	-	11,71±0,29

^aToplam fenolik içerikleri (mg GAE/g özüt, mg KE/g özüt). ^bRadikal Süpürücü Aktiviteleri

3.6. Moleküler Modelleme Denemeleri

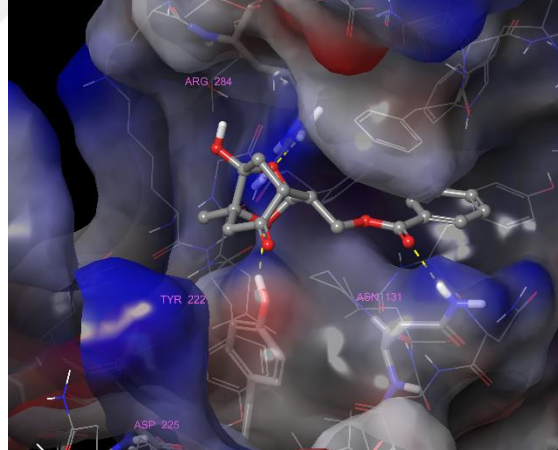
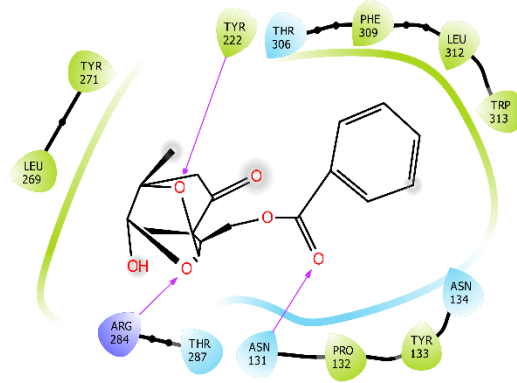
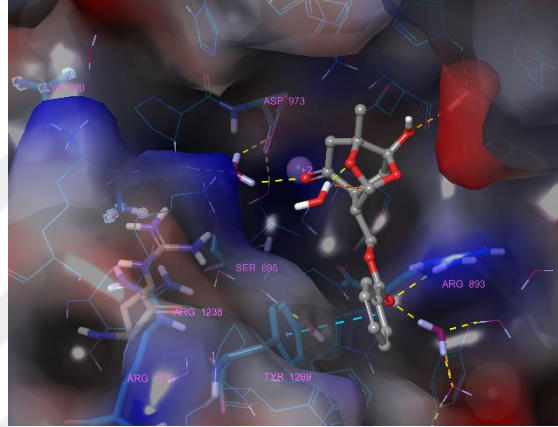
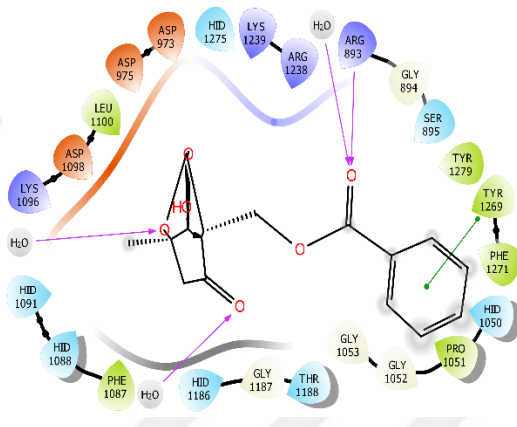
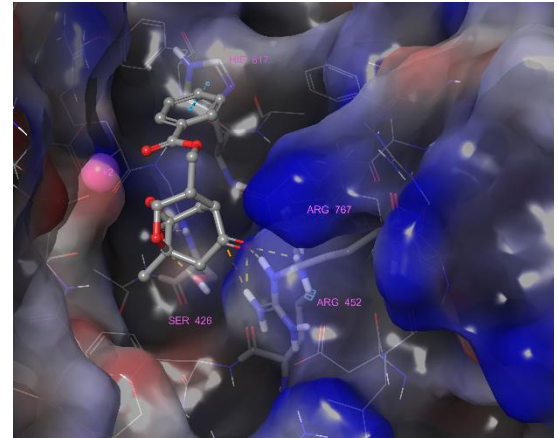
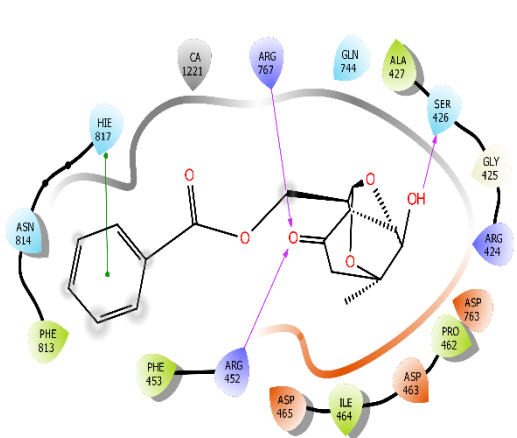
İzole edilen bileşiklerin çalışılan enzimlerle etkileşimlerini gösteren docking skorları, IFD skorları ve bağlanma enerjileri Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. İzole edilen bileşiklerin Docking skorları , IFD skorları ve bağlanma enerjileri

Kod	MMLV-RT			DNA polimeraz DNaE			DNA polimeraz polC		
	^a Docking Skor	^a IFD Skor	^a ΔG	^a Docking Skor	^a IFD Skor	^a ΔG	^a Docking Skor	^a IFD Skor	^a ΔG
PD-1	-5.64	-15683	-21.2	-2.30	-2336.8	-24.3	*	*	*
PD-2	-7.12	-15649	-60.9	-9.13	-2336.9	-57.9	-13.1	-833.9	-60.1
PD-3	-5.23	-15489	-11.6	*	*	*	*	*	*
PD-4	-6.99	-15676	-48.9	-9.9	-2354.8	-34.5	-11.2	-839.9	-48.8
PD-5	-7.18	-15685	-61.9	-9.3	-2344.1	-54.9	-13.0	-844.4	-56.9

^akcal/mol

Primer uzatma deneylerine göre, Paeoniflorigenon (PD-4), üzerinde çalışılan proteinlerin inhibisyonunda daha aktif olduğundan, enzim-ligant kompleks yapılarındaki konformasyonları ve sırasıyla DnaE, polC ve M-MLV-RT ile etkileşimleri görsel olarak Şekil 26'da verilerek analiz edildi.



- Charged (negative)
- Charged (positive)
- Hydrophobic
- Metal
- Polar
- Unspecified residue
- Water
- Hydration site
- Hydration site (displaced)
- Distance
- H-bond
- Metal coordination
- Pi-Pi stacking
- Pi cation
- Salt bridge
- Solvent exposure

Şekil 26. Paeniflorigenon'un enzim-ligant kompleks yapılarındaki konformasyonları ve etkileşimleri

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Paeonia türleri, monoterpen ve monoterpen glikozit tipleri ile birlikte ana bileşikler olarak "kafes benzeri" monoterpen glikozitler içerir [103]. *Paeonia* cinsi için karakteristik monoterpen glikozid olan Paeoniflorin (PD-2), *P. daurica* köklerinin metanol özütünden en fazla izole edilen bileşikti (7 g özüt içinde 55 mg). Paeoniflorin yapısı, "kafes benzeri" pinan iskeletine bağlı bir benzoil ve bir glikozil grubu içerir. Benzoilpaeoniflorin (PD-5), paeoniflorinin glikozil grubuna bağlı ekstra bir benzoil grubuna sahiptir. Paeoniflorigenon (PD-4), yapısal olarak paeoniflorinin aglikonuna benzemektedir ve paeoniflorin monoterpen iskeletinin küçük bir yapısal modifikasyonuna sahip olan "kafes benzeri" iskelete bağlı bir benzoil grubunu içermektedir. Diğer iki izole edilmiş bileşikler ise benzoik asit (PD-3) ve 2,4,6-trihidroksi 1-metil benzoat (PD-1) olarak tanımlandı.

Bitkilerin türlerinin veya taksonlarının ayırt edilmesi için kemotaksonomik çalışmalar genellikle sekonder metabolitlerin kalitatif ve kantitatif analizlerine dayanır. Aynı cins içindeki farklı türler büyük olasılıkla benzer sınıftaki sekonder metabolitleri birbirine yakın miktarda içermektedir [104]. Bununla beraber sekonder metabolitleri içeren taksonomik çalışmalarda coğrafi dağılımlar ve iklimsel farklılıklar da dikkate alınmalıdır. Literatürde *Paeonia daurica* ile ilgili fitokimyasal çalışmalardaki eksiklikten dolayı, bu türün kimyasal içeriğinin karşılaştırılması ancak *Paeonia* cinsindeki diğer türlerle mümkün olabilir. *Paeonia rockii*'nin kök kısmının kimyasal bileşimi araştırılmış ve metanol özütündeki bazı polifenoller, terpen türevleri ve bütanol fraksiyonları izole edilmiştir [105]. Özütler çalışmamızla uyumlu şekilde yüksek miktarda paeoniflorin ve gallik asit türevlerini içermektedir. *Paeonia lactiflora* köklerinden izole edilen paeoniflorin, deneysel olarak indüklenen hiperlipidemik sıçanlarda kolesterol seviyesini düşürerek anti-enflamatuar ve bağışıklık sistemini düzenleyici etkiler göstermiştir [106, 107]. *Paeonia emodi* meyvelerinin metanolik özütünden bir resveratrol polimeri olan paeoninol, paeonin C, oligostilben ve monoterpen galaktosid izole edilmiştir [108]. Paeonin C'nin moleküler yapısı, paeoniflorine oldukça benzemektedir, paeoniflorindeki benzoil grubu yerine paeonin C' de, o-hidroksi benzoil grubu yer almaktadır.

Bitki ham özütlerinin ve izole edilen moleküllerin DNA polimerazları inhibe edici etkisini araştırmak için, 5' floresan etiketli primerin, DNA polimerazlar tarafından uzatılmasına ve sonucun Typhoon FLA9500 tarafından görüntülenmesine dayanan

yöntem güçlü bir yaklaşım sunar. Bu yöntem DNA polimerazlarına karşı inhibe edici etkiyi tarif etmek için çok hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar verir. DNA polimerazların tekli nükleotit ekleme aktivitesinin inhibisyonu da bu yaklaşımla ölçülebilir. Çalışmamızda *Paeonia daurica*'nın meyve, meyve kabuğu, yaprak, gövde ve kök özütlерinde MMLV-RT ve bakteriyel replikatif DNA polimerazları (polC ve DnaE) üzerindeki inhibitör etkisi araştırıldı. *P. daurica* bitki kısımlarından hazırlanan bütün metanol özütleri bakteriyel DNA polimerazlar üzerinde inhibe edici etki gösterdi. Her iki polimerazın da kök kısmının ham metanol özütü ile güçlü şekilde inhibe edilmesi, DNA polimeraz üzerindeki yeni inhibe edici moleküllerin *Paeonia daurica*'nın kökünden saflaştırılabileceğini gösterdi. Bu nedenle, kök kısmının metanolik özütü metabolitlerin izolasyonu ve tanımlanması için seçildi ve izole edilen beş bileşiğin, bakteriyel ve viral replikatif DNA polimerazları üzerindeki inhibisyon etkileri test edildi.

İzole edilen moleküllerin MMLV-RT'nin hem RNA-bağımlı hem de DNA-bağımlı DNA polimeraz aktiviteleri üzerindeki inhibisyon etkisi, tek nükleotit ekleme analizi ile araştırıldı. Numune çözücüsünün MMLV-RT'nin polimerizasyon aktivitesini inhibe etmediği ve tek bir nükleotit kullanarak 14-mer primeri 15-mer pozisyonuna uzattığı tespit edildi. MMLV-RT izole edilen moleküllerin varlığında 14-mer primere tek bir nükleotit bile ekleyemedi. Böylece izole edilen tüm moleküllerin, hem RNA (Şekil 24 B) hem de DNA bağımlı (Şekil 24 C) substratlarla MMLV-RT'nin polimerizasyon aktivitesini tamamen inhibe ettiğini ortaya konmuştur. Tüm moleküller MMLV-RT üzerinde güçlü inhibe edici etkiye sahip olduğu için, tüm reaksiyon ürünlerinin primer pozisyonda tutulduğu görülmüştür.

İzole edilen moleküllerin polC ve DnaE'nin DNA polimeraz aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisi, çoklu nükleotit ekleme deneyleri ile araştırıldı. Metanolün, hem polimerazların hem de enzimlerin polimerizasyon aktivitesini inhibe etmediği yani 14-mer primerin 32-mer pozisyonuna uzamasını engellemediği görüldü (Şekil 24 A). Paeoniflorigenon'un (PD-4) her iki enzimin polimeraz aktivitesini kuvvetle inhibe ettiği gözlemlendi. Benzoilpaeoniflorin de benzer şekilde her iki polimeraz üzerinde inhibe edici etki gösterdi ancak DnaE üzerinde PolC'den daha etkili olduğu jel görüntüsü ile belirlendi. Benzoik asit (PD-3), DnaE üzerinde primerin uzamasını engelleyerek inhibisyon etkisi göstermesine rağmen, PolC üzerinde nispeten düşük inhibisyon etkisi gösterdi. Paeoniflorin (PD-2) ve 2,4,6-trihidroksi-1-metil benzoatın (PD-1) hem polC hem de DnaE'ye karşı etkisiz olduğu jel görüntüsü ile belirlendi.

Primer uzatma sonuçlarına göre, paeoniflorigenon (PD-4) viral ve bakteriyel tüm polimerazları kuvvetle inhibe eden temel aktif bileşik olarak bulundu. Paeoniflorigenon'un (PD-4) polimerazlar üzerindeki bu inhibisyon etkisini onların aktif bölgesine bağlanarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Ayrıca, her iki DNA polimerazında da farklı derecede inhibitör etkisi gözlemlendi. Tüm saflaştırılmış moleküller tarafından MMLV-RT üzerinde güçlü bir inhibisyon etkisi gözlemlendiği için *P. daurica*'nın viral ters transkriptaz polimerizasyon inhibisyonu gösteren birçok bileşene sahip olduğu söylenebilir. Ters transkriptaz, çok fonksiyonlu bir enzimdir ve viral tek iplikli RNA genomundan çift iplikli DNA'nın sentezi için gereken hem RNA hem de DNA'ya bağımlı DNA polimeraz aktivitelerini gerçekleştirir. MMLV-RT, hem DNA hem de RNA kalıbı kullanarak DNA'yı sentezlediği için, DNA polimeraz olarak sınıflandırılır. HIV veya hepatit B/C gibi viral enfeksiyonlar için ters transkriptaz inhibitörlerinin farklı kombinasyonlarından oluşan tedaviler kullanılır. HIV-1 ters transkriptaz, ilaca dirençli suşlar üzerinde aktif olan yeni inhibitörlerin tanımlanması için oldukça çekici bir farmasötik hedefdir. Bu bağlamda MMLV-RT, bitkilerde nükleozit inhibitörlerini araştırmak için bir model olarak kullanılabilir. Bitkilerden saflaştırılan moleküllerin DNA polimerazlar üzerinde inhibisyon etkisini gösteren bazı çalışmalar mevcuttur. Mizushima vd. *Myrsine seguinii*'den elde edilen benzoik asit türevlerinin DNA polimerazlar üzerindeki inhibe edici etkisini araştırdıkları çalışmalarında, karboksilik asit ve fenolik hidroksil grubu içeren terpeno-benzoik asit türevlerinin güçlü inhibisyon gösterdiğini bildirmişlerdir [109]. Benzoik asit türevlerinin hidrofobik bölgesinden enzime seçici olarak bağlanarak inhibisyon etkisi gösterdiğini belirtmişlerdir. Çayda en çok bulunan epigallokateşingallatin HIV-1 replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [110]. Başka bir çalışma, bitkilerde yaygın olarak bulunan doğal kumarinlerin, DNA polimerazlar üzerinde benzer bir inhibe edici etkisi olduğunu göstermiştir [111]. Ayrıca, Çin geleneksel tıbbında kullanılan *Schisandra chinensis*'in meyve özütlerinde HIV-1 RT üzerinde inhibisyon etkisi olan bazı yeni moleküller tanımlanmıştır [112]. *P. daurica* zengin bir sekonder metabolit kaynağına sahip olmasının yanı sıra viral ve bakteriyel polimerazları inhibe etmede kullanılan yeni yapıları tanımlamak için iyi bir kaynak olarak değerlendirilebilir.

Ticari antibiyotikler bakteri hücrelerinde farklı metabolik yolları etkiler ve bakteriler antibiyotik etkisinin üstesinden gelmek için alternatif bir mekanizmaya sahip olabilir. Bakterilerde antibiyotik direncinin artması nedeniyle, yeni antibiyotiklerin

keşfedilmesi ve geliştirilmesi için çalışmalar yapılması acilen gereklidir. Bu nedenle, yeni etki mekanizmalarına sahip güçlü ve güvenli antibakteriyel bileşiklere olan ihtiyaç kaçınılmazdır. DNA polimerazlar uzun yıllar önce antibiyotik gelişimi için hedef olarak belirlenmiştir [113]. Yeni antibakteriyel ilaçlar üretmek için canlı bakterilerde DNA polimeraz aktivitesinin inhibisyonunun mükemmel bir hedef olduğu düşünülmektedir. Replikatif DNA polimeraz III' lerin yapıları hem Gram (+) pozitif hem de Gram (-) negatif patojenlerde güçlü bir şekilde korunur. Fonksiyonlarına göre bakıldığında DNA polimerazlar genel olarak bilinen replikatif ve replikatif olmayan iki gruba aittir. Replikatif DNA polimerazlar, genomu çoğaltmak için sadece hücre bölünmesi sırasında gerekirken, replikatif olmayan DNA polimerazlar hücrenin yaşam döngüsü boyunca gereklidir. Bitkilerce sentezlenen sekonder moleküllerden, bakteriyel ve viral DNA polimerazlar üzerinde inhibisyon etkisi olanlar, yeni antibiyotiklerin geliştirilmesinde kesinlikle faydalı olacaktır. Daha önceki çalışmamızda *Sorbus* cinsinden bazı türlerin Gram (+) ve Gram (-) bakterilerde hem replikatif hem de replikatif olmayan DNA polimerazlarına karşı inhibitör özelliği gösteren molekülleri olduğunu gösterdik [114]. Bu tez çalışmasında, *P. daurica*'nın bakteriyel DNA polimerazlara karşı inhibe edici moleküller için potansiyel bir kaynak olarak değerlendirilebileceği gösterildi. Bu tez çalışması ile ilk defa, paeoniflorigenonun (PD-4) DNA polimerazlar üzerindeki inhibe edici etkisi belirlendi. Bu bileşik doğrudan antibiyotik veya antiviral olarak kullanılabilir gibi farklı türevlerinin sentezlenmesi için iskelet yapı olarak kullanılabilir.

Paeonia daurica'nın kök, meyve, meyve kabuğu ve gövde kısımlarının metanol özütleri ve kök kısmının metanol özütünün sıvı-sıvı fraksiyonları, toplam fenolik içerik ve radikal süpürme aktivitesi açısından spektrofotometrik tayinlerle incelendi. Özütlerin toplam fenolik içeriği gallik asit ve kuersetin standartlarına eşdeğer olarak hesaplandı. Bitki dokularının metanol Özütleri arasında en yüksek fenolik içeriğe sahip olan ilk iki özüt meyve ve meyve kabuğu özütleriydi (sırasıyla 373,48 ve 322,42 mgGAE/g). Tüm özüt ve kök kısmına ait fraksiyonlar içerisinde ise kök kısmının etil asetat fraksiyonunun en yüksek fenolik içeriğe, gövde kısmının ise en düşük fenolik içeriğe sahip olduğu görüldü. Bu sonuçların antioksidan test sonuçları üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir. Özütlerin DPPH süpürme kapasiteleri gallik asit, kuersetin ve troloks standartları ile karşılaştırıldı. Konsantrasyona bağlı olarak kök kısmının etil asetat fraksiyonu ve meyve kabuğu metanol özütünün, DPPH radikal temizleme kapasitesinde kontrol olarak

kullanılan kuersetin ve trolokstan bile daha yüksek radikal temizleme etkisine sahip olmasının polifenol içeriklerinin yüksek olmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Gövde kısmının ise en düşük DPPH radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu görüldü. Benzer şekilde kökün etil asetat fraksiyonu SC₅₀ değeri 7,39 µg/mL ile hem diğer özütlere hem de standart antioksidan olarak kullanılan kuersetin, troloks ve askorbik asitten (SC₅₀ değerleri sırasıyla 10,48; 14,59 ve 11,71 µg/mL) daha yüksek ABTS süpürme aktivitesi gösterdi. Gövde özütü ise (SC₅₀: 79,44 µg/mL) en zayıf süpürme aktivitesi gösterdi. Bu sonuçların diğer çalışmalarla karşılaştırılması *Paeonia daurica* subsp. *macrophylla* üzerine yapılan çalışmaların eksikliğinden dolayı ancak *Paeonia* cinsinin diğer türleriyle mümkün olabildi. Elde edilen sonuçlar literatürdeki diğer *Paeonia* türlerinin sonuçlarına oldukça benzemektedir. Önceki çalışmalar *Paeonia* türlerinin metanol özütlüğünün genellikle çözünür fenolik bileşiklere ve terpen türevlerine sahip olduğunu bildirmiştir. Lee vd. *Paeonia lactiflora*'nın kök kısmının metanol özütünün antioksidan özelliklerinden dolayı normal hücrelerde oksidatif hasarı önlediğini bildirmişlerdir [115]. Fazal vd. *P. emodi*'nin etanol özütünün DPPH radikal süpürme aktivitesini inceleyerek yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir [116]. *Paeonia rockii*'nin metanol özütü ve bütanol ile elde edilen fraksiyonlarının radikal süpürücü aktiviteleri çalışılmış olup bu numunelerin bazılarının yüksek kapasiteye sahip oldukları belirtilmiştir [105]. *Paeonia lactiflora* çiçeğinin güçlü antioksidan aktivite gösterdiği ve bunun oksidatif stres kaynaklı hastalıkları önlemek için doğal kaynak olabileceği belirtilmiştir [106]. Zhang vd. Çin'e özgü dokuz şakayık türünün tohumlarının antioksidan aktivitesini araştırarak bu bitkilerin yüksek fenolik içeriğe ve buna bağlı olarak güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduklarını göstermişlerdir [117].

Paeonia daurica'nın kök, meyve, meyve kabuğu ve gövde kısmına ait olan uçucu yağ bileşenleri SPME ve hidrodistilasyon yöntemleriyle elde edilerek GC-MS sistemiyle analiz edilerek her iki yöntem sonuçları karşılaştırılmıştır. Hidrodistilasyonla kök, meyve, meyve kabuğu ve gövde kısmına ait uçucu yağ miktarları (v/w) sırasıyla % 0,2, % 0,06, % 0,1, % 0,07 şeklinde bulunmuştur. Salisilaldehit tüm SPME deneylerinde en bol bulunan bileşik iken (\geq % 32,45), hidrodistilasyon analizlerinde sadece kök kısmında en yüksek miktarda bulunan bileşik (% 30,47) olmuştur. Salisilaldehitin ardından p-OH benaldehit kök kısmında (% 24,53) ve meyve kabuğunda (% 18,34), mirital meyvede (% 16,79), metil salisilat (% 11,75) ise gövde kısmında en bol bulunan ikinci moleküllerdir. Uçucu yağ bileşenlerinin kimyasal sınıf dağılımları Tablo 4 ve Tablo 5'te

ayrıntılı olarak verilmektedir. Bileşikler terpenoitler, esterler, aldehitler, hidrokarbonlar ve diğerleri olarak beş ana sınıfa ayrılmıştır. Aldehitlerin kök (% 88,20), gövde (% 62,96), meyve (% 59,65) ve meyve kabuğu (% 76,55) bileşenlerinin ana grubu olduğu gösterilmiştir. Hidrodistilasyon sonuçlarına bakıldığında, kök kısmında salisilaldehit (% 30,47) ve *trans*-miritanal (% 15,61), meyvede siklosativen (% 20,36) ve 4-dimetilamino-benzonitril (% 13,60), meyve kabuğunda α -terpineol (% 53,91) ve linalool (% 13,63), gövde kısmında α -terpineol (% 20,73) ve linalool (% 15,62) en bol bulunan bileşikler olarak görülmüştür. Literatürde SPME çalışmalarında aldehitlerin ana grup olduğu, hidrodistilasyon çalışmalarında ise terpenlerin ana grup olduğu görülmektedir [39, 54, 95]. Benzer şekilde, çalışmamızda salisilaldehit tüm SPME sonuçlarında ana bileşendir ve hidrodistilasyon çalışmasının sadece kök kısmında büyük miktarda bulunmuştur. Bunun yanında hidrodistilasyon çalışmalarında terpen türevleri kök kısmında % 35,93, meyvede % 64,42, meyve kabuğunda % 80,65 ve gövde kısmında % 53,02 oranında bulunmuştur. Hidrodistilasyon sonuçları, α -terpineol miktarının gövde ve meyve kabuğunda yüksek olduğunu, meyvede düşük olduğunu, kökte ise rastlanmadığını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, literatürde *Paeonia daurica* örneklerinde siklosativen varlığıyla alakalı çalışma bulunmamaktadır. HD ve SPME'den elde edilen sonuçlar arasındaki fark muhtemelen uzun ekstraksiyon süresinden dolayı bileşiklerin hidroliz olarak bozunmasıyla ilgili olabilir. SPME analizinde bazı bileşiklerin olmaması, polar alkollerin ve düşük moleküler kütleli terpenlerin kullanılan PDMS fibri tarafından iyi adsorbe edilmediğini göstermektedir [76, 115, 118]. Ek olarak, ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı, numune miktarı, çözücü etkisi ve partikül büyüklüğü gibi faktörler de analizler arasında farklılığa neden olabilir [119, 120].

Önceki çalışmalarda Orhan vd. [87] *Paeonia daurica*'nın kök numunesinde 24, Tosun vd. [121] 74 bileşiğe rastlamışken mevcut çalışmada SPME ile 52, hidrodistilasyon ile 67 uçucu bileşene rastlanmıştır. Salisilaldehit, mirtanal ve metil salisilat Yunanistan'da bulunan üç *Paeonia* türünün (*P. clusii*, *P. mascula* ve *P. parnassica*) kurutulmuş köklerinde karakteristik uçucu bileşikler olarak bulunurken, mevcut çalışmada da bu moleküller ana uçucu bileşikler olarak saptanmıştır [122]. Sonuçlarla paralel şekilde bu çalışmada da benzoik asit ve türevleri görülmüştür. Bu da Türkiye ve Yunanistan'da yetişen *Paeonia* taksonlarının benzerliğine işaret edebilir. *Paeonia* türlerinin kökleri üzerindeki kimyasal çalışmalar, paeonol türevlerinin, flavonoidlerin ve çeşitli terpen türevlerinin varlığını göstermiştir. [123-125]. Anadolu'da bulunan 14

Paeonia türünden sadece *P. mascula* subsp. *bodurii* ve *P. peregrina*'da paeonol bulunduğu görülmüştür. Mevcut çalışmada da *Paeonia daurica* subsp. *macrophylla*'nın paeonol içermediği fakat yüksek miktarda terpen içerdiği görülmüştür [87]. Farklı *Paeonia* türlerinin uçucu bileşen ve miktarları çevresel faktör, iklim ve bitki kısımlarına göre farklılık gösterebilmektedir.

Uçucu yağlar bakteri, virüs, mantar ve parazitlere karşı koruyucu olarak farmasötik, tıp, kozmetik, tarım ve gıda endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle sağlık alanında uçucu yağların biyolojik aktiviteleri araştırılan birçok çalışma bulunmaktadır [56]. *Paeonia daurica*'nın içerdiği uçucu yağların da bazı biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır. α -terpineolün antibakteriyal antifungal ve antiepileptik aktivitesinin yanında NF- κ B yolunun inhibisyonunu içeren bir mekanizma ile tümör hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği görülmektedir [126]. Miritenal ve miritanolün eklem kireçlenmelerinde önemli rol oynayan nitrik oksit üretimini engellediği belirtilmiştir. Linalool ve α -terpineol diş hastalıklarına sebep olan bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal aktivite göstermektedir [127]. Kapoen insan lenfosit kültürleri üzerinde yüksek derecede sitotoksik, genotoksik ve antioksidan aktivite göstermiştir [128].

Uçucu yağların kozmetikte geniş kullanımlarına aşına olmamıza rağmen insan sağlığı, çevre ve tarım alanlarında yeni uygulamalar elde etmek için biyolojik etki biçimlerinin iyi anlaşılması oldukça önemlidir. Bu sonuçlar, *Paeonia daurica* subsp. *macrophylla* bitkisinden elde edilen uçucu yağların yeni uygulamaların oluşturulmasına katkıda bulunabilir.

MMLV-RT ve bakteriyel replikatif DNA polimerazlarının potansiyel inhibisyonunu modellemek için deneysel olarak belirlenmiş bileşikler, ilgili enzimlerin kristal yapıları kullanılarak moleküler kenetleme çalışmasına tabi tutuldu. Deneysel olarak belirlenen fenolik bileşiklerin kenetleme çalışmasından elde edilen reseptör-ligant kompleksleri, Docking skorları, IFD skorları ve ligant bileşiklerin hedef enzimlerin aktif bölgesindeki konformasyonu açısından analiz edildi. Bileşiklerin docking skorları, IFD skorları ve bağlanma enerjileri Tablo 7'de verildi. Buna göre, paeoniflorin (PD-2), paeoniflorigenon (PD-4) ve benzoilpaeoniflorin (PD-5) bileşikleri, MMLV-RT, PolC ve DnaE polimeraz enzimlerine diğer bileşiklere nazaran daha güçlü bağlandıkları söylenebilir. Primer uzatma deneylerine göre, Paeoniflorigenon (PD-4), üzerinde çalışılan proteinlerin inhibisyonunda daha aktif olduğundan, enzim-ligant kompleks yapılarındaki konformasyonları ve etkileşimleri görsel olarak Şekil 26'da verilerek analiz

edildi.

In-silico sonuçlarına göre, paeoniflorigenonun (PD-4), DnaE enziminin SER426, ARG452 ve ARG767 amino asitleri ile hidrojen bağı etkileşimleri ve HIS817 amino asit kalıntısı ile π - π istifleme etkileşimi oluşturabildiği açıkça görülmektedir. Bu etkileşimlere ait docking skoru -9.91 kcal/mol olarak bulunmuştur. PolC enziminin ARG893 amino asiti ile doğrudan ve HIS1186 amino asiti ile su molekülü üzerinden hidrojen bağı etkileşimleri oluşturduğu, ayrıca TYR1269 amino asit kalıntısı ile π - π istifleme etkileşimi yaptığı görülmektedir. Bu etkileşimlere ait docking skoru ise -11.25 kcal/mol olarak bulunmuştur. Benzer şekilde MMLV-RT enzimi ile etkileşimi incelendiğinde ASN131, TYR222 ve ARG284 amino asitleri ile hidrojen bağı etkileşimleri ön plana çıkmakta ve -6.99 kcal/mol docking skoru oluşturmaktadır.

Tablo 7'de ayrıca, incelenen bileşiklerin bağlanma serbest enerjileri, reseptör-ligant komplekslerinin moleküler dinamik simülasyonlarına dayanan MM/GBSA yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. İzole edilmiş bileşikler PD-2, PD-4 ve PD-5, her üç enzim yapısı için, üzerinde çalışılan diğer bileşiklerden daha negatif bağlanma serbest enerji değerine sahiptir, bu da daha kararlı enzim-ligant komplekslerinin oluşumu anlamına gelmektedir. Bağlanma serbest enerji hesaplamaları da docking skorları gibi deneysel sonuçlara paralellik göstermektedir.

In-silico çalışmanın sonuçları, paeoniflorigenonun (PD-4) polimerazların aktif bölgesine yerleştiğini ve aktif amino asitlerle doğrudan veya bu amino asitlere yakın amino asitlerle etkileşime girdiğini göstermektedir. Aktif bölgenin paeoniflorigenone (PD-4) tarafından işgal edilmesi, bu enzimlere karşı inhibisyon etkisi göstermesinin nedeni olabilir.

5. ÖNERİLER

Tarih boyunca insanların ölüm nedenleri arasında en başta gelenlerden biri enfeksiyon hastalıklarıdır. Veba, kolera, tifo, tifüs, tüberküloz, çiçek gibi enfeksiyon hastalıkları savaşların sebep olduğu ölümlerden bile daha fazla ölüme sebep olmuştur. Zamanla çeşitli ilaçlarla önlenmeye çalışıldıysa da antibiyotiklerin keşfine kadar enfeksiyon hastalıkları ölüm sebeplerindendi. 1940'lı yılların ortalarında penisilin, streptomisin, kloramfenikol, tetrasiklin gibi Gram (+) ve Gram (-) bakterilere ve aside dirençli bakterilere etkili antibiyotiklerin tedavide kullanıma olanağının doğması, bakteriyel enfeksiyon hastalıklarının sonunun yaklaştığını düşündürmüştü. Ancak, bakterilerde antibiyotik direncinin artması nedeniyle, mevcut antibiyotikler etkisiz kalmakta ve acilen yeni etki mekanizmalarına sahip güçlü ve güvenli antibiyotiklerin keşfedilmesi ve geliştirilmesi için çalışmalar yapılması gerekmektedir. Günümüzde antibiyotik direnç, modern tıbbı ve küresel halk sağlığının sürdürülebilirliğini tehdit etmektedir. Etkili antibiyotikler hem önleyici hem de iyileştirici özelliklere sahip olmakla beraber hastaları cerrahi ve kemoterapi gibi karmaşık işlemlere karşı da korumalıdır. Bu bağlamda, tıbbi bitkilerden elde edilen doğal bileşiklerin dirençli bakterilere karşı etkileri incelenmektedir. DNA polimerazlar uzun yıllar önce antibiyotik gelişimi için hedef olarak belirlenmiştir. Mevcut bulgular *Paeonia daurica*'nın kök kısmından izole edilen aktif bileşenlerin Gram (+), Gram (-) bakteri ve virüs enfeksiyonlarını önlemede faydalı olabileceğini göstermektedir. Ayrıca bitkinin farklı dokularının uçucu yağlarının virüslere karşı yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edildi. Bu veriler doğrultusunda izole edilen bileşenlerin başta hücre kültürü deneyleri olmak üzere hayvan deneyleriyle de test edilerek ilaç etken maddesi olma potansiyelleri değerlendirilebilir. Bitkinin diğer kısımlarının aktif bileşenleri de izole edilerek elde edilen saf bileşiklerin bakteri ve virüslere karşı etkileri incelenebilir. Elde edilen özütlerin memeli DNA polimerazlar üzerindeki etkilerinin de incelenmesi, kanserli dokuların ve tümörlerin tedavisi için doğal ilaçların keşfine de yol gösterebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Pungitore, C.R. (2008). Natural products as inhibitors of DNA related enzymes. *Current Enzyme Inhibition*. 4(4), 194-215.
- [2] Newman, D. J., Cragg, G. M. and Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66(7), 1022-1037.
- [3] Ferguson, D. and T., Sang. (2001). Speciation through homoploid hybridization between allotetraploids in peonies (*Paeonia*). Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America, 98(7), 3915–3919.
- [4] Takagi, K. and Harada, M. (1969). Pharmacological studies on herb paeony root. II. Anti-inflammatory effect, inhibitory effect on gastric juice secretion, preventive effect on stress ulcer, antidiuretic effect of paeoniflorin and combined effects with licorice component Fm 100. *Yakugaku Zasshi*, 89(9), 887-92.
- [5] Harada, M., Yamashita, A. and Aburada, M. (1972). Pharmacological studies on the root bark of *Paeonia moutan*. II. Anti-inflammatory effect, preventive effect on stress-induced gastric erosion, inhibitory effect on gastric juice secretion and other effects of paeonol. *Yakugaku Zasshi*, 92(6), 750-756.
- [6] Zhang, J., Wang, L., Shu, Q., Liu, Z., Li, C., Zhang, J., Wei, X. and Tian, D. (2007). Comparison of anthocyanins in non-blotches and blotches of the petals of *Xibei tree peony*. *Scientia Horticulturae*, 114(2), 104-111.
- [7] Baytop, T. (1999). Türkiye’de Bitkile ile Tedavi: Geçmişte ve Bugün. Nobel Kitabevi, 2. Baskı, 480s., 3-92.
- [8] Kim, H. G., Park, G., Piao, Y., Kang, M., Pak, Y., Hong, S., Oh, M. (2014) Effects of the root bark of *Paeonia suffruticosa* on mitochondria-mediated neuroprotection in an MPTP-induced model of Parkinson’s disease. *Food and Chemical Toxicology*, 65, 293-300.
- [9] Li, J.J., (1999). Distribution and taxonomy in *Paeonia* spp. Chinese Tree Peony and Herbaceous Peony. China Forestry Press, 150p., 25–47.
- [10] Hijikata, Y., Yasuhara, A., Yoshida, Y. and Sento, S. (2006). Traditional chinese medicine treatment of epilepsy. *Journal of alternative Complementary Medicine*. 12(7), 673-7.
- [11] Wen, K. C., Huang, C., Y., Liu, F. S. (1992). Determination of cinnamic acid and paeoniflorin in traditional chinese medicinal preparations by highperformance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography*, 593(1- 2), 191-199.
- [12] Stearn, W. T. and Davis, P. H. (1984). Peonies of Greece. A Taxonomic and Historical Survey of the Genus *Paeonia* in Greece. Goulandris National History Museum, 136p., 71-76.
- [13] Davis, P. H., Mill, R. R., Tan, K. (1998). Flora of Turkey and the East Aegean

- Island. University of Edinburg Press, Vol 10, ISBN: 9780852245590, 590p., 22-23.
- [14] Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. and Başer, K. H. C. (2000). Flora of Turkey and the east Aegean Islands. University of Edinburg Press, Vol 11, 197p., 48-52.
- [15] Hong, D. Y. and Zhou, S. L. (2003). *Paeonia* in the Caucasus. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 143(2), 135-150.
- [16] Fedorov, A. A. (1999). Flora of Russia. CRC press, Vol 4, ISBN-10: 9054107529, 340p., 245-256.
- [17] Şahin, G. (2007). Türkiye’den toplanan bazı *paeonia* türlerinin antibakteriyel etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Ankara, 58 s.
- [18] Güner, A. ve Aslan, S. (2012). Türkiye bitkileri listesi:(damarlı bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M. T. (Ed.), 1290s., 659-660.
- [19] Maruo, S., Kuriyama, I., Kuramochi, K., Tsubaki, K., Yoshida, H. and Mizushina, Y. (2011). Inhibitory effect of novel 5-O-acyl juglones on mammalian DNA polymerase activity, cancer cell growth and inflammatory response. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19(19), 5803-5812.
- [20] Bailey, S., Wing, R. A. and Steitz, T. A. (2006). The structure of *T. aquaticus* DNA polymerase III is distinct from eukaryotic replicative DNA polymerases. *Cell*, 126(5), 893-904.
- [21] Inoue, R., Kaito, C., Tanabe, M., Kamura, K., Akimitsu, N. and Sekimizu, K. (2001). Genetic identification of two distinct DNA polymerases, DnaE and PolC, that are essential for chromosomal DNA replication in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Genetics and Genomics*, 266(4), 564-571.
- [22] Lamers, M. H., Georgescu, R. E., Lee, S. G., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (2006). Crystal structure of the catalytic α subunit of *E. coli* replicative DNA polymerase III. *Cell*, 126(5), 881-892.
- [23] Kornberg, A. and Baker, T. A. (2005). DNA Replication. Paperback Edition by University Science Books, Sausalito, CA, ISBN: 1-891389-44-0, 871p. 243-260.
- [24] Robinson, A., Causer, R. J. and Dixon, N. E. (2012). Architecture and conservation of the bacterial DNA replication machinery, an underexploited drug target. *Current Drug Targets*, 13(3), 352-372.
- [25] Campbell, E. M. and Hope, T. J. (2008). Live cell imaging of the HIV-1 life cycle. *Trends in Microbiology*, 16(12), 580-587.
- [26] Reynolds, C., de Koning, C. B., Pelly, S. C., van Otterlo, W. A. and Bode, M. L. (2012). In search of a treatment for HIV—current therapies and the role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs). *Chemical Society Reviews*, 41(13), 4657-4670.

- [27] Mizushina, Y., Lida, A., Ohta, K., Sugawara, F. and Sakaguchi, K. (2000). Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase. *Biochemical Journal*, 350(3), 757-763.
- [28] Konoshima, T., Takasaki, M., Tokuda, H. and Nishino, H. (2000). Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga decumbens*. *Cancer Letters*, 157(1), 87-92.
- [29] Sluis-Cremer, N. and Tachedjian, G. (2008). Mechanisms of inhibition of HIV replication by non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Virus Research*, 134(1-2), 147-156.
- [30] Pungitore, C. R. (2014). Natural Products, Synthetic and Non-Nucleoside Compounds as Inhibitors of Enzymes Related to DNA: Update 2013. *Current Enzyme Inhibition*, 10(1), 13-38.
- [31] De Clercq, E. (1998). The role of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the therapy of HIV-1 infection. *Antiviral Research*, 38, 153-179. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(98\)00025-4](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(98)00025-4).
- [32] Jochmans, D. (2008). Novel HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Virus Research*, 134, 171-185. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.01.003>.
- [33] Pauwels, R. (2004). New non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in development for the treatment of HIV infections. *Current Opinion in Pharmacology*, 4, 437-446. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.07.005>.
- [34] Anderson, A. C. (2011). Winning the arms race by improving drug discovery against mutating targets. *ACS Chemical Biology*, 7(2), 278-288.
- [35] Gao, Z., Maloney, D. J., Dedkova, L. M. and Hecht, S. M. (2008). Inhibitors of DNA polymerase β : activity and mechanism. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(8), 4331-4340. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.02.071>.
- [36] Mizushina, Y., Zhang, J., Pugliese, A., Kim, S. H. and Lü, J. (2010). Anti-cancer gallotannin penta-O-galloyl-beta-D-glucose is a nanomolar inhibitor of select mammalian DNA polymerases. *Biochemical Pharmacology*, 80(8), 1125-1132.
- [37] Saito, A., Mizushina, Y., Tanaka, A. and Nakajima, N. (2009). Versatile synthesis of epicatechin series procyanidin oligomers, and their antioxidant and DNA polymerase inhibitory activity. *Tetrahedron*, 65(36), 7422-7428.
- [38] Mizushina, Y., Takahashi, Y., Sato, Y., Yamaguchi, Y., Takeuchi, T., Kuriyama, I. and Yoshida, H. (2012). Inhibition of DNA polymerase λ by glucosyl compounds from soybean (*Glycine max* L.) and their associated inflammatory activity. *Food Chemistry*, 132(4), 2046-2053.
- [39] Maeda, J., Nishida, M., Takikawa, H., Yoshida, H., Azuma, T., Yoshida, M. and Mizushina, Y. (2010). Inhibitory effects of sulfobacin B on DNA polymerase and inflammation. *International Journal of Molecular Medicine*, 26(5), 751-758.

- [40] Pungitore, C. R., García, C., Sotero, V. M. and Tonn, C. E. (2012). Inhibition of Taq DNA polymerase by iridoid aglycone derivatives. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, 58, 1786-1790.
- [41] Kamiya, K., Hamabe, W., Tokuyama, S., Hirano, K., Satake, T., Kumamoto Yonezawa, Y. and Mizushina, Y. (2010). Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B- and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation. *Food Chemistry*, 118(3), 725-730.
- [42] Mizushina, Y., Manita, D., Takeuchi, T., Sugawara, F., Kumamoto-Yonezawa, Y., Matsui, Y. and Takikawa, H. (2009). The inhibitory action of kohamaic acid A derivatives on mammalian DNA polymerase β . *Molecules*, 14(1), 102-121.
- [43] Strittmatter, T., Bareth, B., Immel, T. A., Huhn, T., Mayer, T. U. and Marx, A. (2011). Small molecule inhibitors of human DNA polymerase λ . *ACS Chemical Biology*, 6(4), 314-319.
- [44] Nishimura, K., Takenaka, Y., Kishi, M., Tanahashi, T., Yoshida, H., Okuda, C. and Mizushina, Y. (2009). Synthesis and DNA polymerase α and β inhibitory activity of alkyl p-coumarates and related compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57(5), 476-480.
- [45] Matsui, Y., Takeuchi, T., Kumamoto-Yonezawa, Y., Takemura, M., Sugawara, F., Yoshida, H. and Mizushina, Y. (2010). The relationship between the molecular structure of natural acetogenins and their inhibitory activities which affect DNA polymerase, DNA topoisomerase and human cancer cell growth. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1(1), 19-26.
- [46] Kimura, T., Takeuchi, T., Kumamoto-Yonezawa, Y., Ohashi, E., Ohmori, H., Masutani, C. and Mizushina, Y. (2009). Penicillliols A and B, novel inhibitors specific to mammalian Y-family DNA polymerases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17(5), 1811-1816.
- [47] Sun, L. Q., Qin, B., Huang, L., Qian, K., Chen, C. H., Lee, K. H. and Xie, L. (2012). Optimization of 2, 4-diarylanilines as non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(7), 2376-2379.
- [48] Herschhorn, A., Oz-Gleenberg, I. and Hizi, A. (2008). Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by the novel broad-range DNA polymerase inhibitor N-{2-[4-(aminosulfonyl) phenyl] ethyl}-2-(2-thienyl) acetamide. *Biochemistry*, 47(1), 490-502.
- [49] Wang, X., Zhang, J., Huang, Y., Wang, R., Zhang, L., Qiao, K. and Zhang, Z. (2012). Design, synthesis, and biological evaluation of 1-[(2-benzyloxy/alkoxy) methyl]-5-halo-6-arylracils as potent HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors with an improved drug resistance profile. *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(5), 2242-2250.
- [50] Boyer, J., Arnoult, E., Médebielle, M., Guillemont, J., Unge, J. and Jochmans, D.

- (2011). Difluoromethylbenzoxazole pyrimidine thioether derivatives: a novel class of potent non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(23), 7974-7985.
- [51] Hunter, R., Younis, Y., Muhanji, C. I., Curtin, T. L., Naidoo, K. J., Petersen, M. and Anderson, K. S. (2008). C-2-Aryl O-substituted HI-236 derivatives as non-nucleoside HIV-1 reverse-transcriptase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(24), 10270-10280.
- [52] Mokale, S. N., Lokwani, D. and Shinde, D. B. (2012). Synthesis, biological activity and docking study of imidazol-5-one as novel non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(9), 3119-3127.
- [53] Kennedy-Smith, J. J., Arora, N., Billedeau, J. R., Fretland, J., Hang, J. Q., Heilek, G. M. and Liang, W. (2010). Synthesis and biological activity of new pyridone diaryl ether non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Medicinal Chemistry Community*, 1(1), 79-83.
- [54] Chen, X., Zhan, P., Liu, X., Cheng, Z., Meng, C., Shao, S. and Liu, X. (2012). Design, synthesis, anti-HIV evaluation and molecular modeling of piperidine-linked amino-triazine derivatives as potent non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 20(12), 3856-3864.
- [55] da Silva, F. D. C., de Souza, M. C. B., Frugulhetti, I. I., Castro, H. C., Silmara, L. D. O., de Souza, T. M. L. and Rodrigues, C. R. (2009). Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1H-1, 2, 3-triazole derivatives of carbohydrates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44(1), 373-383.
- [56] Ignat, I., Volf, I. and Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- [57] Dhawan, D. and Gupta, J. (2017). Comparison of different solvents for phytochemical extraction potential from *Datura metel* plant leaves. *International Journal of Biological Chemistry*, 11, 17-22.
- [58] Temidayo, A. R. (2013). Extraction and isolation of flavonoids present in the methanolic extract of leaves of *Acanthospermum hispidum* DC. *Global Journal of Medicinal Plant Research*, 1(1), 111-123.
- [59] Silvestre, W. P., Livinalli, N. F., Baldasso, C. and Tessaro, I. C. (2019). Pervaporation in the separation of essential oil components: a review. *Trends in Food Science and Technology*.
- [60] Renda, G., Celik, G., Korkmaz, B., Karaoglu, S. A. and Yayli, N. (2016). Antimicrobial activity and analyses of six *Geranium* L. species with headspace SPME and hydrodistillation. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(8), 2003-2016.
- [61] Frazey, P. A., Barkley, R. M. and Sievers, R. E. (1998). Solid-phase microextraction

- with temperature-programmed desorption for the analysis of iodination disinfection byproducts. *Analytical Chemistry*, 70(3), 638-644.
- [62] Arthur, C. L. and Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62(19), 2145-2148.
- [63] Olariu, R. L., Vione, D., Grinberg, N. and Arsene, C. (2010). Sample preparation for trace analysis by chromatographic methods. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 33, 1174–1207.
- [64] Dietz, C., Sanz, J. and Cámara, C. (2006). Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *Journal of Chromatography A*, 1103(2), 183-192.
- [65] Malik, A. K., Kaur, V. and Verma, N. (2006). A review on solid phase microextraction-High performance liquid chromatography as a novel tool for the analysis of toxic metal ions. *Talanta*, 68(3), 842-849.
- [66] Kataoka, H., Lord, H. L. and Pawliszyn, J. (2000). Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 880(1-2), 35-62.
- [67] Kumar, A., Malik, A. K., Tewary, D. K. and Singh, B. (2008). A review on development of solid phase microextraction fibers by sol-gel methods and their applications. *Analytica Chimica Acta*, 610(1), 1-14.
- [68] Psillakis, E. and Kalogerakis, N. (2001). Solid-phase microextraction versus single-drop microextraction for the analysis of nitroaromatic explosives in water samples. *Journal of Chromatography A*, 938(1-2), 113-120.
- [69] Kacurakova, M., Capek, P., Sasinkova, V., Wellner, N. and Ebringerova, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43(2), 195-203.
- [70] Dugo, P., Cacciola, F., Kumm, T., Dugo, G. and Mondello, L. (2008). Comprehensive multidimensional liquid chromatography: theory and applications. *Journal of Chromatography A*, 1184(1-2), 353-368.
- [71] Gröger, T. M., Käfer, U. and Zimmermann, R. (2019). Gas chromatography in combination with fast high-resolution time-of-flight mass spectrometry: Technical overview and perspectives for data visualization. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 115677(122), 1-10.
- [72] Hai-Wei, G., Yun-Peng, Q., Ning, X., Jian-Hua, D., Yan-Bo, A. and Huan-Wen, C. (2012). Nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry-based metabolomics for cancer diagnosis. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40(12), 1933-1937.
- [73] Santos, A. D. C., Dutra, L. M., Menezes, L. R. A. and Barison A. (2018). Forensic NMR spectroscopy. *TrAc Trends in Analytical Chemistry*, 107, 31-42.

- [74] Sobolev, A. P., Thomas, F., Donarski, J., Ingallina, C., Circi, S., Marincola, F. C. and Mannina, L. (2019). Use of NMR applications to tackle future food fraud issues. *Trends in Food Science and Technology*, 91, 347-353.
- [75] Aleixandre-Tudo, J. L. and Du Toit, W. (2018). The Role of UV-Visible Spectroscopy for phenolic compounds quantification in winemaking. In *Frontiers and New Trends in the Science of Fermented Food and Beverages*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.79550.
- [76] Gazim, Z. C., Rezende, C. M., Fraga, S. R., Dias Filho, B. P., Nakamura, C. V. and Cortez, D. A. G. (2008). Analysis of the essential oils from *Calendula officinalis* growing in Brazil using three different extraction procedures. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(3), 391-395.
- [77] Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A. and Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 687-704.
- [78] Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q. and Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 840-860.
- [79] Chen, G. L., Chen, S. G., Xie, Y. Q., Chen, F., Zhao, Y. Y., Luo, C. X. and Gao, Y. Q. (2015). Total phenolic, flavonoid and antioxidant activity of 23 edible flowers subjected to in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 17, 243-259.
- [80] Mishra, K., Ojha, H. and Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043.
- [81] Arnao, M. B., Cano, A. and Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239-244.
- [82] Berry, M., Fielding, B. and Gamiieldien, J. (2015). Practical considerations in virtual screening and molecular docking. *Emerging Trends in Computational Biology, Bioinformatics, and Systems Biology*, 27, 487-502.
- [83] Gane, P. J. and Dean, P. M. (2000). Recent advances in structure-based rational drug design. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(4), 401-404.
- [84] He, C., Peng, B., Dan, Y., Peng, Y. and Xiao, P. (2014). Chemical taxonomy of tree peony species from China based on root cortex metabolic fingerprinting. *Phytochemistry*, 107, 69-79.
- [85] Liu, P., Wang, Y., Gao, J., Lu, Z., Yin, W. and Deng, R. (2014). Resveratrol trimers from seed cake of *Paeonia rockii*. *Molecules*, 19(12), 19549-19556.
- [86] Jia, N., Shu, Q. Y., Wang, D. H., Wang, L. S., Liu, Z. A., Ren, H. X. and Tilt, K. M. (2008). Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry in herbaceous peony species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133(3), 418-426.

- [87] Orhan, I., Demirci, B., Omar, I., Siddiqui, H., Kaya, E., Choudhary, M. I. and Başer, K. H. C. (2010). Essential oil compositions and antioxidant properties of the roots of twelve Anatolian *Paeonia* taxa with special reference to chromosome counts. *Pharmaceutical Biology*, 48(1), 10-16.
- [88] Chowdhury, S., Mukherjee, T., Sengupta, S., Chowdhury, S. R., Mukhopadhyay, S. and Majumder, H. K. (2011). Novel betulin derivatives as antileishmanial agents with mode of action targeting type IB DNA topoisomerase. *Molecular Pharmacology*, 80(4), 694-703.
- [89] Esselen, M., Fritz, J., Hutter, M. and Marko, D. (2009). Delphinidin modulates the DNA-damaging properties of topoisomerase II poisons. *Chemical Research in Toxicology*, 22(3), 554-564.
- [90] Hossion, A. M., Zamami, Y., Kandahary, R. K., Tsuchiya, T., Ogawa, W., Iwado, A. and Sasaki, K. (2011). Quercetin diacylglycoside analogues showing dual inhibition of DNA gyrase and topoisomerase IV as novel antibacterial agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(11), 3686-3703.
- [91] Bicchi, C., Rubiolo, P., Ballero, M., Sanna, C., Matteodo, M., Esposito, F. and Tramontano, E. (2009). HIV-1-inhibiting activity of the essential oil of *Ridolfia segetum* and *Oenanthe crocata*. *Planta Medica*, 75(12), 1331-1335.
- [92] Singleton, V. L., Orthofer, R. and Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *In Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- [93] Midilli, A. (2016). *Diospyros kaki* yaprak ve meyve özütlerinin gram (+) replikatif dna polimeraz (PolC) üzerine inhibisyonunun araştırılması. Doktora Tezi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 60 s.
- [94] Budak, E. E. (2015). *Escherichia coli* replikatif DNA polimeraz III α (DnaE)'ye inhibisyon etkili bitki organ özütlerinde fenolik bileşiklerin HPLC-DAD ile aydınlatılması. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, Türkiye, 78 s.
- [95] Sandalli, C., Singh, K., Modak, M. J., Ketkar, A., Canakci, S., Demir, İ. and Belduz, A. O. (2009). A new DNA polymerase I from *Geobacillus caldxylosilyticus* TK4: cloning, characterization, and mutational analysis of two aromatic residues. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 105-117.
- [96] Das, D. and Georgiadis, M. M. (2004). The crystal structure of the monomeric reverse transcriptase from Moloney murine leukemia virus. *Structure*, 12(5), 819-829.
- [97] Evans, R. J., Davies, D. R., Bullard, J. M., Christensen, J., Green, L. S., Guiles, J. W. and Jarvis, T. C. (2008). Structure of PolC reveals unique DNA binding and fidelity determinants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(52), 20695-20700.

- [98] Wing, R. A., Bailey, S. and Steitz, T. A. (2008). Insights into the replisome from the structure of a ternary complex of the DNA polymerase III α -subunit. *Journal of Molecular Biology*, 382(4), 859-869.
- [99] Duan, W. J., Jin, X., Chen, L. X., Zhang, X., Yao, X. S. and Qiu, F. (2009). Four new compounds from *Paeonia albiflora*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11(4), 299-305.
- [100] Kaneda, M., Iitaka, Y. and Shibata, S. (1972). Chemical studies on the oriental plant drugs—XXXIII: the absolute structures of paeoniflorin, albiflorin, oxypaeoniflorin and benzoylpaeoniflorin isolated from Chinese *paeony* root. *Tetrahedron*, 28(16), 4309-4317.
- [101] Wang, Q., Wang, W., Wei, S., Yu, F., Peng, F. and Fang, Y. (2012). Study on effect of different processing methods on seven main chemical components of wild and cultivated *Paeonia lactiflora*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*, 37(7), 920-924.
- [102] Shimizu, M., Hayashi, T., Morita, N., Kiuchi, F., Noguchi, H., Iitaka, Y. and Sankawa, U. (1983). The structure of paeoniflorigenone, a new monoterpene isolated from *Paeoniae radix*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 31(2), 577-583.
- [103] He, C., Peng, B., Dan, Y., Peng, Y. and Xiao, P. (2014). Chemical taxonomy of tree *peony* species from China based on root cortex metabolic fingerprinting. *Phytochemistry*, 107, 69-79.
- [104] Zhao, D. D., Jiang, L. L., Li, H. Y., Yan, P. F. and Zhang, Y. L. (2016). Chemical components and pharmacological activities of terpene natural products from the genus *Paeonia*. *Molecules*, 21(10), 1362.
- [105] Picerno, P., Mencherini, T., Sansone, F., Del Gaudio, P., Granata, I., Porta, A. and Aquino, R. P. (2011). Screening of a polar extract of *Paeonia rockii*: Composition and antioxidant and antifungal activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(3), 705-712.
- [106] He, D. Y. and Dai, S. M. (2011). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Paeonia lactiflora* Pall., a traditional Chinese herbal medicine. *Frontiers in Pharmacology*, 2, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00010>.
- [107] Yang, H. O., Ko, W. K., Kim, J. Y. and Ro, H. S. (2004). Paeoniflorin: an antihyperlipidemic agent from *Paeonia lactiflora*. *Fitoterapia*, 75(1), 45-49.
- [108] Riaz, N., Malik, A., Rehman, A. U., Ahmed, Z., Muhammad, P., Nawaz, S. A. and Choudhary, M. I. (2004). Lipxygenase inhibiting and antioxidant oligostilbene and monoterpene galactoside from *Paeonia emodi*. *Phytochemistry*, 65(8), 1129-1135.
- [109] Mizushima, Y., Miyazaki, S., Ohta, K., Hirota, M. and Sakaguchi, K. (2000). Novel anti-inflammatory compounds from *Myrsine seguinii*, terpeno-benzoic acids, are

inhibitors of mammalian DNA polymerases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1475(1), 1-4.

- [110] Li, S., Hattori, T. and Kodama, E. N. (2011). Epigallocatechin gallate inhibits the HIV reverse transcription step. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 21(6), 239-243.
- [111] A Garro, H. and R Pungitore, C. (2015). Coumarins as potential inhibitors of DNA polymerases and reverse transcriptases. Searching new antiretroviral and antitumoral drugs. *Current Drug Discovery Technologies*, 12(2), 66-79.
- [112] Xu, L., Grandi, N., Del Vecchio, C., Mandas, D., Corona, A., Piano, D. and Tramontano, E. (2015). From the traditional Chinese medicine plant *Schisandra chinensis* new scaffolds effective on HIV-1 reverse transcriptase resistant to non-nucleoside inhibitors. *Journal of Microbiology*, 53(4), 288-293.
- [113] Wright, G. E. and Brown, N. C. (1990). Deoxyribonucleotide analogs as inhibitors and substrates of DNA polymerases. *Pharmacology and Therapeutics*, 47(3), 447-497.
- [114] Turumtay, H., Midilli, A., Turumtay, E. A., Demir, A., Selvi, E. K., Budak, E. E. and Atamov, V. (2017). Gram (-) microorganisms. DNA polymerase inhibition, antibacterial and chemical properties of fruit and leaf extracts of *Sorbus acuparia* and *Sorbus caucasica* var. *yaltirikii*. *Biomedical Chromatography*, 31(6), 390-398.
- [115] Lee, S. E., Hwang, H. J., Ha, J. S., Jeong, H. S. and Kim, J. H. (2003). Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. *Life Sciences*, 73(2), 167-179.
- [116] Fazal, H., Ahmad, N. and Haider Abbasi, B. (2013). Identification, characterization, and palynology of high-valued medicinal plants. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-9.
- [117] Zhang, Y., Liu, P., Gao, J. Y., Wang, X. S., Yan, M., Xue, N. C. and Deng, R. X. (2018). *Paeonia veitchii* seeds as a promising high potential by-product: Proximate composition, phytochemical components, bioactivity evaluation and potential applications. *Industrial Crops and Products*, 125, 248-260.
- [118] Chen, Y. F., Wu, K. J. and Wood, W. G. (2013). *Paeonia lactiflora* extract attenuating cerebral ischemia and arterial intimal hyperplasia is mediated by paeoniflorin via modulation of VSMC migration and Ras/MEK/ERK signaling pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1-12.
- [119] Kim, N. S. and Lee, D. S. (2002). Comparison of different extraction methods for the analysis of fragrances from *Lavandula* species by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 982(1), 31-47.
- [120] Wiesenfeld, E. (1999). Aroma Profiles of *Lavandula* species. *Scientific Instruments Services*, 57, 1-9.
- [121] Tosun, G., Kahriman, N., Albay, C., Karaoğlu, Ş. A. and Yayli, N. (2011). Antimicrobial activity and volatile constituents of the flower, leaf, and stem of

- Paeonia daurica* grown in Turkey. *Turkish Journal of Chemistry*, 35(1), 145-153.
- [122] Papandreou, V., Magiatis, P., Chinou, I., Kalpoutzakis, E., Skaltsounis, A. L. and Tzarbopoulos, A. (2002). Volatiles with antimicrobial activity from the roots of Greek *Paeonia* taxa. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(1), 101-104.
- [123] Yoshikawa, M., Uchida, E., Kawaguchi, A., Kitawaga, I. and Yamahara, J. (1992). Galloyl-oxypaeoniflorin, suffruticosides A, B, C, and D, five new antioxidative glycosides, and suffruticoside E, A paeonol glycoside, from Chinese moutan cortex. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 40(8), 2248-2250.
- [124] Kamiya, K., Yoshioka, K., Saiki, Y., Ikuta, A. and Satake, T. (1997). Triterpenoids and flavonoids from *Paeonia lactiflora*. *Phytochemistry*, 44(1), 141-144.
- [125] Kostova, I. N., Simeonov, M. F., Todorova, D. I. and Petkova, P. L. (1998). Two acylated monoterpene glucosides from *Paeonia peregrina*. *Phytochemistry*, 48(3), 511-514.
- [126] Hassan, S. B., Gali-Muhtasib, H., Göransson, H. and Larsson, R. (2010). Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF- κ B signalling. *Anticancer Research*, 30(6), 1911-1919.
- [127] Park, S. N., Lim, Y. K., Freire, M. O., Cho, E., Jin, D. and Kook, J. K. (2012). Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*, 18(3), 369-372.
- [128] Türkez, H., Çelik, K. and Toğar, B. (2014). Effects of copaene, a tricyclic sesquiterpene, on human lymphocytes cells in vitro. *Cytotechnology*, 66(4), 597-603.

ÖZGEÇMİŞ

Adem DEMİR 1985 yılında Afyonkarahisar’da doğdu. İlköğrenimini İzmir Çiğli Selim DİNİZ İlköğretim okulunda tamamladı. Ortaöğrenimini Afyon Çay Endüstri Meslek Lisesi Kimya Bölümü’nde okul birinciliği ile bitirdi. Önlisans eğitimini Afyonkarahisar Kocatepe Üniversitesi’nde tamamlayıp lisans eğitimini Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nde bölüm birinciliği ile tamamladı. Yüksek Lisans eğitimini 2011 yılında tamamlayıp aynı yıl başladığı Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine devam etmektedir. 2013 yılından itibaren Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi’nde Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce olup evli ve bir çocuk babasıdır.