

Melissa officinalis* L., *Mentha x piperita* L. ve *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) Uçucu Yağlarının *Acanthamoeba castellani* Kist ve Trofozoitleri Üzerine İn Vitro Etkisinin Araştırılması

Investigation of the In Vitro Effects of *Melissa officinalis* L., *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) Essential Oils on the Cysts and Trophozoites of *Acanthamoeba castellani*

Ceren ERGÜDEN¹, Soykan ÖZKOÇ¹, Bintuğ ÖZTÜRK², Songül BAYRAM DELİBAŞ¹

¹ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

¹ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Izmir, Turkey.

² Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, İzmir.

² Ege University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, Izmir, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 31.05.2016 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 28.09.2016

* Bu çalışma, birinci yazarın tez çalışması olarak gerçekleştirilmiştir.

ÖZ

Dünyada yaygın olarak bulunan *Acanthamoeba* türleri, serbest yaşayan amipler olup, özellikle kontakt lens kullananlarda ve minör kornea travmalarında *Acanthamoeba keratiti* (AK) olarak bilinen ve körlüğe yol açabilen enfeksiyonlara neden olmaktadır. Günümüzde AK olgularının tedavisinde antifungaller ve antiseptiklerden yararlanılmakta, ancak tedavi süresinin uzun olması ve buna bağlı yan etkilerin ortaya çıkışı, kronik enfeksiyonlarda gözlenen kist formlarının ilaçlara dirençli oluşu gibi sorunların ortadan kaldırılması için alternatif ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan çalışmalar, bazı bitkisel ekstraktların ve bitkisel kaynaklı uçucu yağların *Acanthamoeba* spp. üzerine etkili olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmanın amacı, *Lamiaceae* ailesinde yer alan *Mentha x piperita* L. (nane), *Melissa officinalis* L. (oğulotu) ve *Ocimum basilicum* L. (fesleğen) bitkilerine ait uçucu yağların *Acanthamoeba castellanii* kist ve trofozoitleri üzerindeki etkilerinin in vitro olarak araştırılmasıdır. Çalışmada kullanılan *A. castellanii* T4 genotipi, çevreden en sık izole edilen, AK ve granüloamatöz amibik ensefalite neden olabilen bir türdür. Amibisidal aktivitenin belirlenmesinde, Neo-Clevenger tipi distilasyon düzeneği ile elde edilen *Mentha x piperita* L., *Melissa officinalis* L. ve *Ocimum basilicum* L. uçucu yağları kullanılmıştır. İn vitro deneyler 96 çukurlu mikropklarda gerçekleştirilmiş; uçucu yağ dilüsyonlarının üzerine kist ve trofozoit

İletişim (Correspondence): Ceren Ergüden, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, 35340 Balçova, İzmir, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 232 412 4548, **E-posta (E-mail):** cerenerguden@hotmail.com

solüsyonu eklenerek, kistler için 40, 20, 10, 5, 2.5 ve 1.25 µg/ml'lik, trofozoitler için ise 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ve 0.313 µg/ml'lik son konsantrasyonlar elde edilmiştir. Plaklar, 30°C'de 1, 6, 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edilmiş ve bu süreler sonunda amip formlarının canlılığı, tripan mavisi ile boyanarak ışık mikroskopu ile değerlendirilmiştir. Çalışmada, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, her bir uçucu yağın *A.castellanii* kist ve trofozoitleri üzerinde doza ve süreye bağımlı olarak artan amibisidal etki gösterdiği belirlenmiştir. Kullanılan uçucu yağların etkinliği değerlendirildiğinde, kist ve trofozoit formları için en yüksek letal etkinin *Melissa officinalis* ile olduğu, bunu *Mentha x piperita* ve *Ocimum basilicum*'un izlediği belirlenmiştir. Çalışmamızda, *A.castellanii* kistlerinin uçucu yağlara karşı duyarlılığı, beklendiği üzere trofozoitlerden daha düşük bulunmuştur. *Melissa officinalis* ve *Mentha x piperita* uçucu yağları için en yüksek konsantrasyonda (40 µg/ml) %100 öldürücü etkinin görüldüğü, buna karşın *Ocimum basilicum* uçucu yağının 72 saat sonunda ve en yüksek konsantrasyonda (40 µg/ml) bile kistlerin ancak %63.3'ünü öldürebildiği saptanmıştır. Sonuç olarak, *Acanthamoeba* spp. kist ve trofozoitlerine karşı *Mentha x piperita*, *Melissa officinalis* ve *Ocimum basilicum* bitkilerinden elde edilen uçucu yağ aktivitelerinin incelendiği bu ilk çalışmanın verileri, bu bitkilere ait uçucu yağların *Acanthamoeba* spp. enfeksiyonlarının tedavisinde geliştirilebilecek yeni ve alternatif doğal ürünler olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: *Acanthamoeba*; *Melissa officinalis*; *Mentha x piperita*; *Ocimum basilicum*; uçucu yağ.

ABSTRACT

Acanthamoeba species are free living amoeba found widely all over the world. They are responsible for *Acanthamoeba* keratitis (AK), an infection which is especially seen in contact lens users and after minor corneal traumas, that may lead blindness. At present, antifungals and antiseptics are used for the treatment of AK cases, however, some problems such as long treatment periods and the occurrence of side effects, resistance of cyst forms against drugs, emphasize the need for new drugs. There are some published studies that pointed out the effectiveness of plant extracts and essential oils on *Acanthamoeba* spp. The aim of this study was to investigate the in vitro effects of essential oils of *Mentha x piperita* L. (peppermint), *Melissa officinalis* L. (lemon balm) and *Ocimum basilicum* L. (basil) belonging to *Lamiaceae* family, on the cysts and trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. The strain used in our study, namely *A. castellanii* T4 genotype, is the most frequently isolated amoeba from environment and also the causative agent of AK and granulomatous amebic encephalitis. For the determination of amebicidal activity, essential oils obtained from *Mentha x piperita* L., *Melissa officinalis* L. and *Ocimum basilicum* L. by Neo-Clevenger type of distillation apparatus have been used. In vitro experiments were performed by using 96-well microplates. Cyst and trophozoite solutions were added on the essential oil dilutions to obtain the last concentrations of 40, 20, 10, 5, 2.5 and 1.25 µg/ml for the cysts, and 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 and 0.313 µg/ml for the trophozoites. After the incubation of microplates at 30°C for 1, 6, 24, 48 and 72 hours, the viability of parasitic forms were evaluated under the light microscope followed by staining trypan blue. It was found that, each essential oil showed amebicidal effect on *A.castellanii* cysts and trophozoites dependent on dosage and time, when compared with the control group, The maximum lethal effect occurred with *Melissa officinalis* followed by *Mentha x piperita* and *Ocimum basilicum*, respectively. In our study, susceptibility of *A.castellanii* trophozoites to essential oils were more than the cysts, as expected. The essential oils of *Melissa officinalis* and *Mentha x piperita* showed 100% lethal effect at their highest concentrations whereas the essential oil of *Ocimum basilicum* showed only 63.3% lethal effect on cysts after 72 hours at the highest concentration (40 µg/mL). The results of this first study investigating the activities of essential oils extracted from *Mentha x piperita*, *Melissa officinalis* and *Ocimum basilicum* against *Acanthamoeba* spp. cysts and trophozoites, have suggested that, these essential oils could be potential novel and alternative natural products for the treatment of *Acanthamoeba* spp. infections.

Keywords: *Acanthamoeba*; *Melissa officinalis*; *Mentha x piperita*; *Ocimum basilicum*; essential oils.

GİRİŞ

Acanthamoeba türleri toprak, su ve hava gibi farklı ekolojik ortamlardan izole edilebilen ve bazı amfizoik türleriyle insanlarda hastalıklara yol açan serbest yaşayan amiplerdir. Özellikle T4 genotipindeki suşlar, kontakt lens kullananlarda ve minör kornea travmalarında *Acanthamoeba* keratiti (AK) olarak bilinen ve körlüğe yol açabilen enfeksiyonlara neden olmaktadır^{1,2}. *Acanthamoeba* türlerinin, immün sistemi baskılanmış hastalarda kronik seyirli ve tedavi edilmediğinde ölümcül olabilen granülomatöz amibik ensefalit (GAE)'lere neden olabildiği de bilinmektedir. Bununla birlikte bazı artrit ve rinosinüzit olgularında, hatta kütanöz apse ve nodüllerde de *Acanthamoeba* türlerinin etiyolojik ajan olarak tanımlandığı rapor edilmiştir³.

Günümüzde *Acanthamoeba* enfeksiyonları için kesinleşmiş, standart tedavi uygulamaları bulunmamaktadır. AK için enfekte korneanın durumu, enfeksiyonun evresi, suşun patojenitesi ve klinisyen deneyimi gibi etmenler tedavide belirleyici olabilmektedir². Parazit kist formunun mevcut ilaçlara çoğu zaman dirençli olması, agresif ve kombine ilaç tedavilerini gerektirir. AK tedavisinde ilk seçenek, epitelyal debritleme takiben polihexametil biguanid (%0.02'lik) ve klorheksidin (%0.02'lik) gibi katyonik antiseptikler ile propamidin izotonik solüsyonu gibi aromatik diamidin kombinasyonlarının topikal uygulanmasıdır. Bununla birlikte imidazol türevi antifungaller ve neomisin gibi aminoglikozidler de AK kombine tedavilerinde tercih edilmektedir^{2,3}. GAE ve diğer sistemik enfeksiyonların tedavisi için de tam bir konsensus bulunmamaktadır. Amphotericin B, 5-flusitozin, sülfadiazin, flukonazol gibi antimikrobialler en çok tercih edilen ilaçlar arasında sayılabilir². AK tedavisinde, kombine ilaçların gün içinde sık aralıklarla uygulanma zorunluluğu ve reenfeksiyonları önlemek için bir yıla kadar uzayan tedavi süreleri, hasta uyumunu zorlaştıran faktörlerdir. Uzayan tedavi süreçlerinde, ilaca direnç gelişiminin yanı sıra biguanidlerin keratositler üzerine toksik etkisinin olması, tedavi başarısını azaltan diğer etkenlerdir⁴. Tedavideki bu tür sorunlar nedeniyle, hem trofozoit hem de kistler üzerine etkili ve iyi tolere edilebilen ilaç arayışları devam etmektedir. Henüz standart bir tedavi şemasının olmayışı son yıllarda oldukça popüler bir konu olan bitkisel kimyasallara yönelimi artırmıştır⁵.

Ülkemiz, farklı iklimsel koşulları ve jeomorfolojik yapısının getirdiği eşsiz coğrafi yerleşimi nedeniyle bitkisel çeşitlilik açısından Avrupa'nın en zengin ülkesi, dünyanın ise önde gelen zengin ülkeleri arasında yer almaktadır. Özellikle *Lamiaceae* ailesinde yer alan türler; analjezik, anti-inflamatuar ve diğer metabolik etkileri nedeniyle folklorik olarak sıkça kullanılan bitkilerdir. Bu grubun üyeleri, uçucu yağlar ve diğer sekonder metabolitler bakımından zengin olmaları sebebiyle tıbbi değeri oldukça yüksek bitkilerdir⁶. Bu bitkilerden elde edilen uçucu yağların hücre membranlarından hızlı difüzyonları nedeniyle antimikrobiyal etkinliklerinin, ekstrele göre daha fazla olabildiği belirtilmektedir⁷. Ayrıca uçucu yağ bileşenlerinin ortamdaki besin maddelerinin alımını engelleyebildiği, hücre zarının yapısını değiştirebildiği, nükleer ve ribozomal seviyede enzim sentezini inhibe edebildiği ifade edilmiştir⁸. Yapılan çalışmalarda, *Lamiaceae* ailesine ait bitki ekstraktları ve uçucu yağlarının antiprotozoal özellikler gösterebildiği saptanmıştır⁹; ancak şimdiye dek bu gruba ait uçucu yağların *Acanthamoeba* türleri üzerine etkisinin incelendiği herhangi

bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma, Lamiaceae ailesinde yer alan *Mentha x piperita*, *Melissa officinalis* ve *Ocimum basilicum* uçucu yağlarının *Acanthamoeba* spp. kist ve trofozoitlerine karşı etkinliğinin araştırıldığı ilk çalışmadır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Uçucu yağların eldesi

Organik kültür yoluyla üretilen *Mentha x piperita* (nane), *Melissa officinalis* (oğulotu) ve *Ocimum basilicum* (fesleğen) bitkilerinin yapraklarında bulunan uçucu yağlar, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'nda Avrupa Farmakopesisine uygun olarak Neo-Clevenger tipi distilasyon düzeneği ile elde edildi. DMSO (Dimetilsülfoksit) içinde homojenize edilerek 1 mg/ml stok konsantrasyonda ayarlanan uçucu yağlar, kullanılıncaya kadar +4°C'de karanlıkta saklandı¹⁰. Test solüsyonları, kist deneyleri için PAS (Page's amoeba saline), trofozoit deneyleri için PYG (Peptone-Yeast Extract-Glucose) içerisinde sulandırılarak hazırlandı. En yüksek konsantrasyondaki DMSO oranı %2'yi geçmedi.

Acanthamoeba castellanii suşu

Çalışmada, 2005 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Hastanesi'ne başvuran bir hastanın kornea kazıntısından elde edilen ve halen aksenik olarak DEÜ Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda sürdürülmekte olan *A.castellanii* suşu (Gen Bank no: EU266547) kullanıldı¹¹. Çalışma için gerekli etik onay DEÜ Girişimsel (İnvazif) Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'ndan (Karar no: 2013/19-03) alındı.

Trofozoitler

Trofozoitler, 10 ml PYG [proteoz pepton %0.75 (w/v), maya özütü %0.75 (w/v) ve glukoz %1.5 (w/v)] besiyeri içeren 25 cm²'lik kültür şişelerinde, 30°C'de inkübe edilerek üretildi. Logaritmik üreme fazına (72-96 saat) ulaşan kültür şişeleri buz üzerinde 3-5 dakika bekletilerek trofozoitlerin ayrılması sağlandı. Toplanan besiyeri, steril konik falkon tüplerine alındıktan sonra 750 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Pellet üzerine steril PAS (12 mg NaCl, 0.4 mg MgSO₄·7H₂O, 0.4 mg CaCl₂·2H₂O, 14.2 mg Na₂HPO₄, 13.6 mg KHPO₄, 100 ml steril distile suda) eklenerek iki kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Dipteki pellet üzerine PYG besiyeri eklenerek son konsantrasyon 1.6x10⁴ trofozoit/ml olacak şekilde ayarlandı.

Kistler

Acanthamoeba kistleri, trofozoitlerin, bakterisiz NNA (Non-nutrient agar) kültür plaklarında, 35°C'de üç hafta inkübasyonu sonucu elde edildi. Kistlerin üretildiği NNA kültür plaklarına 5-7 ml PAS solüsyonu eklenerek bistüri yardımıyla yüzeyden dikkatli bir biçimde kistler kaldırıldı ve 15 ml'lik falkon tüpüne, pipet yardımı ile toplandı. Bu işlem plak yüzeyindeki tüm kistler kaldırılana kadar tekrarlandı. Falkon tüpü 2.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi; üst sıvı atılarak kistlerin bulunduğu çökelti PAS solüsyonu ile iki kere yıkandı ve kist konsantrasyonu, PAS içinde 1.6x10⁴ kist/ml olacak şekilde ayarlandı.

Uçucu yağların amibisidal aktivitelerinin belirlenmesi

Tüm deneyler 96 çukurlu hücre kültürü plaklarında (Corning Inc., ABD) gerçekleştirildi. Uçucu yağ dilüsyonları üzerine aynı miktarda (100 µl) kist ve trofozoit solüsyonu eklenerek, kistler için 40, 20, 10, 5, 2.5 ve 1.25 µg/ml'lik, trofozoitler için ise 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ve 0.313 µg/ml'lik son konsantrasyonlar elde edildi. Plaklar, üzeri parafilm ile kapatıldıktan sonra 30°C'de 1, 6, 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübe edildi. Aynı prosedür DMSO içeren (%2) ve içermeyen kist ve trofozoit kontrol çukurları için de tekrarlandı. İnkübasyon sürelerinin sonunda, her çukurdan alınan 50 µl parazit süspansiyonu aynı miktarda %0.5'lik tripan mavisi ile karıştırıldı ve 10 dakika bekledikten sonra ışık mikroskopunda değerlendirildi¹². Tüm testler üç kez tekrarlandı ve her defasında canlı parazit ortalamaları hesaplandı.

İstatistiksel analiz

Çalışma sonunda uçucu yağların bitkiye, doza ve uygulama süresine bağımlı etkisi "SPSS 15.0" istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar yüzde olarak ifade edilerek varyans analizi ile değerlendirildikten sonra Tukey testi ile karşılaştırıldı.

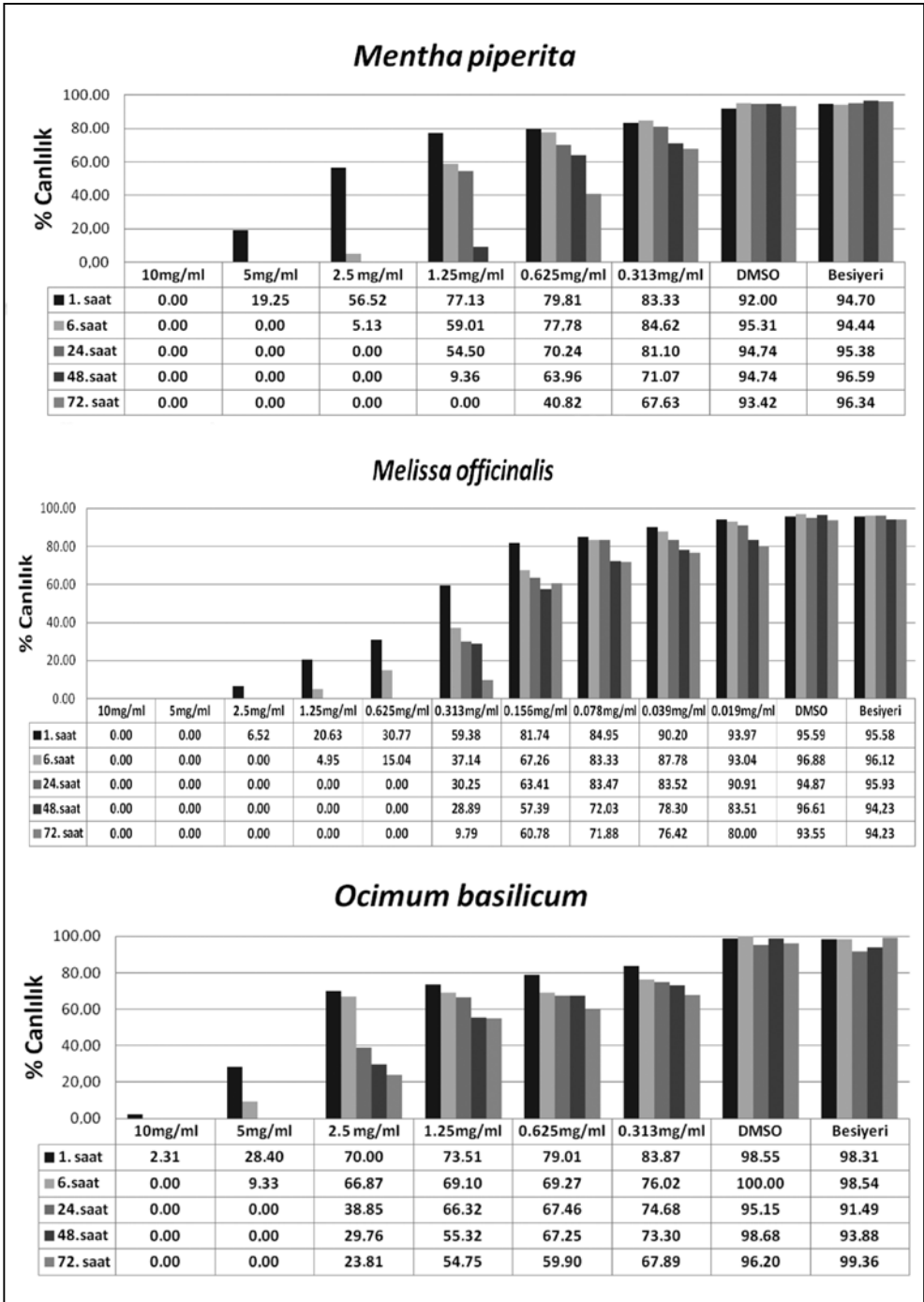
BULGULAR

Uçucu yağların trofozoitler üzerine amibisidal etkisi

Çalışmamızda, *Mentha x piperita*, *Melissa officinalis* ve *Ocimum basilicum* uçucu yağlarının, trofozoitler üzerindeki amibisidal etkilerinin doza ve zamana bağımlı olarak arttığı saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 1). *Ocimum basilicum* uçucu yağının en yüksek konsantrasyonda (10 µg/ml) 1. saatten itibaren, 5 µg/ml konsantrasyonda ise 24 saat ve sonrasında trofozoitlerin %100'ünü öldürdüğü izlenmiştir. Diğer konsantrasyonlarda %100 amibisidal etki olmamasına rağmen inkübasyon süresiyle doğru orantılı olarak öldürücü etkinin arttığı gözlenmiştir. *Mentha x piperita* uçucu yağı, trofozoitler üzerine en yüksek konsantrasyonda 1. saatten itibaren etki göstermiş ve tüm trofozoitleri öldürmüştür. 5 µg/ml konsantrasyonda ilk saatteki öldürücü etki %80.75 iken, sonraki saatlerde öldürücü etki %100 olarak saptanmıştır. 2.5 µg/ml konsantrasyonda saptanan amibisidal etki ise ilk saatte %43.48, 6. saatte %94.87 ve sonraki saatlerde %100 olmuştur. Tüm trofozoitlerin öldüğü en düşük konsantrasyon ise 1.25 µg/ml'dir. En düşük konsantrasyondaki bu etki sadece 72. saatin sonunda gözlenmiştir.

Çalışmamızda, trofozoitler üzerine etkili uçucu yağın *Melissa officinalis* olduğu belirlenmiştir. *Melissa officinalis* uçucu yağı için 5 µg/ml test dozunda 1. saatten itibaren %100 öldürücü etkinin gözlenmesinden dolayı, bu bitkide daha düşük konsantrasyonlar (0.156-0.019 µg/ml) çalışılmıştır (Şekil 1B). *Melissa officinalis* uçucu yağı için diğer iki bitkiden farklı olarak 1.25 ve 0.625 µg/ml konsantrasyonlarda dahi 24. saat ve sonrasında %100 öldürücü etki gözlenmiş; ancak daha düşük konsantrasyonlarındaki farklılık, kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p < 0.05$).

Mentha x piperita, *Melissa officinalis* ve *Ocimum basilicum* uçucu yağlarının kendi test konsantrasyonları arasında aynı zaman dilimindeki etkileri değerlendirildiğinde, istatistik-



Şekil 1. Uçucu yağların etkisiyle A.castellanii trofozoitlerinin canlılık yüzdelерinin zamana bağlı değişimi.

sel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (sırasıyla; $p=0.000$, $p=0.000$, $p=0.000$). Anlamlılığın hangi konsantrasyondan kaynaklandığına Tukey testi ile bakıldığında, *Melissa officinalis* için $0.313 \mu\text{g/ml}$ ve üzerindeki konsantrasyonlar arasında, *Mentha x piperita* için $2.5 \mu\text{g/ml}$ ve üzerindeki konsantrasyonlar arasında, *Ocimum basilicum* için ise sadece $5 \mu\text{g/ml}$ ile üzerindeki konsantrasyonlar arasında anlamlılık saptanmıştır (Şekil 1).

Uçucu yağların kistler üzerine amibisidal etkisi

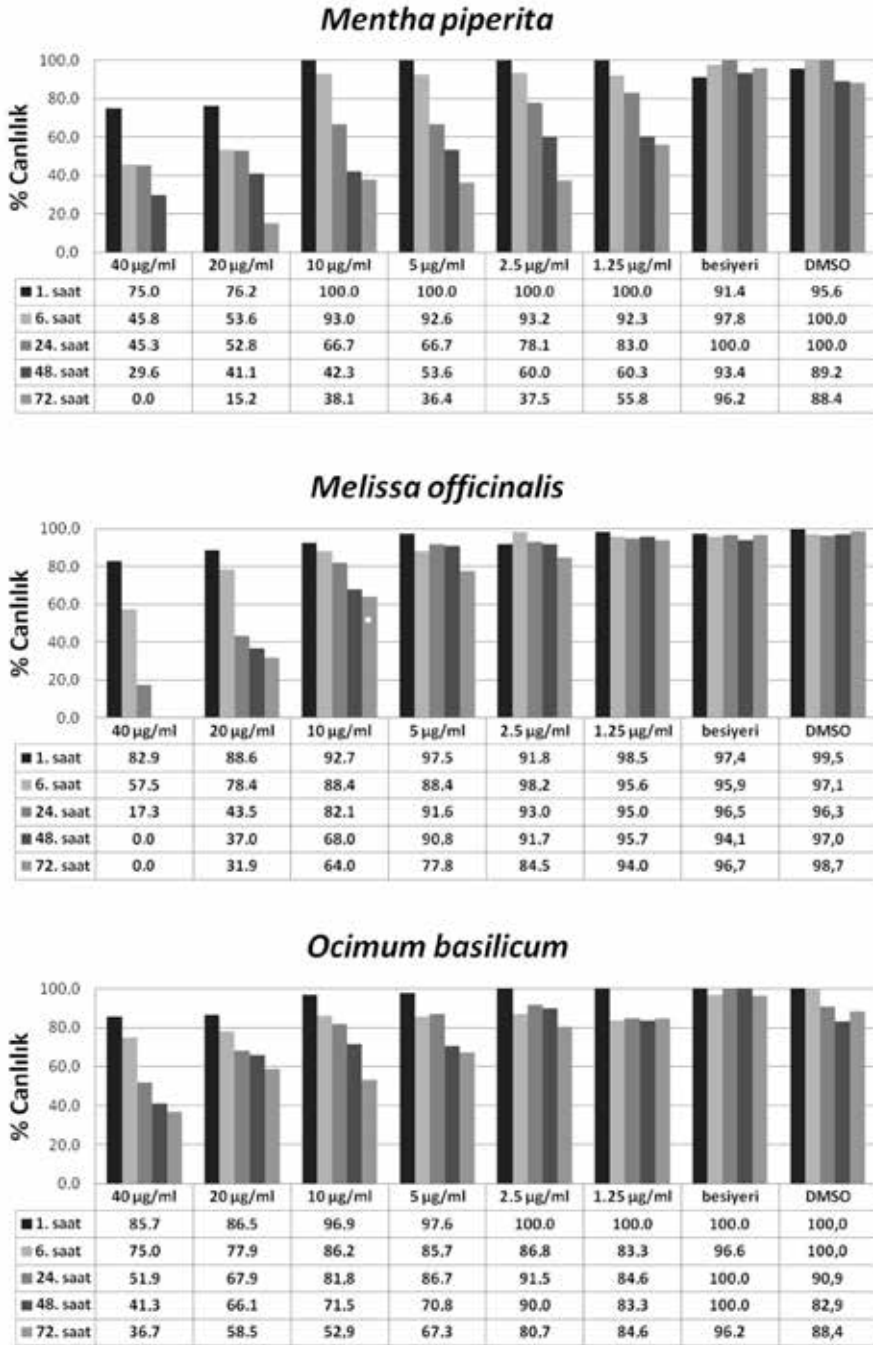
Her bir uçucu yağın, kistler üzerine amibisidal etkilerinin, doza ve zamana bağımlı olarak arttığı gözlenmiştir (Şekil 2). Ancak bu etki, beklenildiği gibi, trofozoitler üzerine olan amibisidal etkiden daha düşüktür. *Ocimum basilicum*'un kistler üzerinde %100 öldürücü etkisinin olmadığı saptanmış; 1. saatteki amibisidal etki %14.3 iken 72. saatte kistlerin sadece %63.3'ünün öldüğü izlenmiştir. *Mentha x piperita* uçucu yağının, en yüksek konsantrasyonda ($40 \mu\text{g/ml}$) kistler üzerine öldürücü etkisi 1. saatte %25 iken 72. saatte %100 olarak tespit edilmiştir. En yüksek konsantrasyondaki bu etki, *Melissa officinalis* için 1. saatte %17.1, 48. ve 72. saatlerde %100'dür. Aynı zaman dilimindeki kistisidal özellikler karşılaştırıldığında; *Mentha x piperita* test konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p= 0.124$). Ancak *Melissa officinalis* ve *Ocimum basilicum* uçucu yağlarının her biri için, test konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir (sırasıyla; $p= 0.000$, $p= 0.016$). Anlamlılığın hangi konsantrasyondan kaynaklandığına Tukey testi ile bakıldığında; *Melissa officinalis* için $40 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyon ile diğer tüm test konsantrasyonları arasında, *Ocimum basilicum* için ise sadece 2.5 ile $40 \mu\text{g/ml}$ arasında anlamlı farklılık saptanmıştır (Şekil 2).

TARTIŞMA

Acanthamoeba spp. trofozoitlerinin, besince zengin, pH'nın nötral olduğu durumlarda, uygun sıcaklık ve ozmolaritede canlılıklarını sürdürdükleri bilinmektedir¹. Diğer durumlarda ise, fiziksel ve kimyasal (dezenfektan, klor, antibiyotik gibi) ajanlara karşı dirençli, çift tabakadan oluşan kist formuna dönüşmektedirler¹³. Trofozoitler üzerine etkili olan ilaçların, dokudaki kist formlarına etkisinin daha az olması, kronik enfeksiyonların tedavisinde başarısızlığa neden olmaktadır. Bununla birlikte ilaçların uzun süre kullanılması ilaç direnci gelişmesine yol açabilmekte, ayrıca hasta uyumunu güçleştirmektedir⁴. Tedavideki bu tür sorunlar nedeniyle hem trofozoit hem de kistler üzerine etkili ve iyi tolere edilebilen ilaç arayışları devam etmektedir.

Türkiye, farklı coğrafi özellikleri nedeniyle birçok bitki türünün gen merkezi durumundadır. Bunların başında yer alan *Lamiaceae* ailesine ait bitki türlerinin antiprotozoal özellikte sekonder metabolitler içerdiklerini gösteren çalışmaların yanında, bazı türlerinin amibisidal aktiviteye sahip olduğu da bildirilmiştir¹⁴. Çalışmamızda kullandığımız bitkilerin parazitler üzerindeki etkinliğinin incelendiği çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda; *Mentha x piperita*'nın *Giardia*, *Melissa officinalis*'in *Leishmania* ve *Trypanosoma*, *Ocimum basilicum*'un ise *Plasmodium* türleri üzerindeki etkinliği gösterilmiştir¹⁵⁻¹⁷.

Bitkisel bileşiklerin *Acanthamoeba* spp. üzerine etkisini araştıran çalışmalarda, sıklıkla metanol ekstraktlarının kullanıldığı görülmektedir. Ülkemizde de, bitkisel özütlerin *Acant-*



Şekil 2. Uçucu yağların etkisiyle *A.castellanii* kistlerinin canlılık yüzdelerinin zamana bağlı değişimi.

hamoeba izolatları üzerine etkisini inceleyen farklı çalışmalar rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalara bakıldığında, farklı bitki türlerinin farklı dozlarda ve farklı sürelerde *Acanthamoeba* spp. kist ve trofozoitleri üzerine etkisi saptanmıştır^{12,18,19}. Bununla birlikte, çalışmada kullandığımız bitkilerden *Melissa officinalis* dışında hiçbirinin *Acanthamoeba* türlerine karşı antiparazitik aktiviteleri incelenmemiştir. Sadece bir çalışmada, *Melissa officinalis* bitkisinin metanol ekstresinin, *A. aktiviteye* sahip olduğu da bildirilmiştir *castellani* trofozoit ve kistleri üzerine orta düzeyde etkili olduğunu; 32 mg/ml konsantrasyon ve 72 saat sonunda trofozoitlerin %44.3'ünü, kistlerin ise %30'unu öldürdüğü rapor edilmiştir¹⁹.

Çalışmamızda, *A.castellani* kistlerinin uçucu yağlara duyarlılığı, beklendiği üzere trofozoitlerden daha düşük bulunmuştur. *Melissa officinalis* ve *Mentha x piperita* uçucu yağları için en yüksek konsantrasyonda %100 öldürücü etkinin görüldüğü, buna karşın *Ocimum basilicum* uçucu yağının 72 saat sonunda ve en yüksek konsantrasyonda bile kistlerin ancak %63.3'ünü öldürebildiği saptanmıştır. Diğer taraftan kullanılan uçucu yağların hepsi, trofozoitlere karşı farklı konsantrasyonlarda ve sürelerde %100 amibisidal etki göstermiştir.

Ekolojik kültür yoluyla yetiştirilen bitkilerden elde edilen ve araştırma materyali olarak kullanılan uçucu yağların, gaz kromatografisi ve kütle spektrofotometresi analizleri ile belirlenen kimyasal içerikleri daha önce yayınlanmıştır. Buna göre; *Mentha x piperita* uçucu yağının ana bileşikleri %34.18 mentol, %29.87 p-menton, %6.27 1,8 sineol, %1.19 mentil asetat ve %3.9 mentofuran; *Melissa officinalis* uçucu yağının ana bileşikleri %38.7 geranial, %27.59 neral, %11.78 sitronellal ve %4.30 β -karyofillen; *Ocimum basilicum* uçucu yağının ana bileşikleri ise %72.6 linalool, %6.98 1,8 sineol, %4.34 geraniol ve %2.32 öjenol olarak rapor edilmiştir^{10,20}. Çalışmamızda kullandığımız uçucu yağ bileşenlerinin büyük kısmını monoterpenlerin oluşturduğu görülmektedir. Monoterpenlerle parazitler arasındaki ilişkiye bakıldığında; *Ocimum basilicum*, *O.canum* ve *Cymbopogon citratus* bitkilerinin ana bileşeni olan linalool, 1,8-sineol ve geranial'ın antimalaryal ve biyosit olarak²¹; *Cinnamomum camphora* bitkisinin uçucu yağından elde edilen linaloolün de anti-şistosomal olarak kullanılabileceği düşünülmüştür²².

Monoterpenlerin protozoonların yağ metabolizmasını ve sterol sentezini bozduğu yönünde yapılmış çalışmalar da vardır²¹. *Acanthamoeba* türlerinin yağ metabolizmasında monoterpenlerin etkisi üzerine yapılmış bir çalışma olmamakla birlikte, mevalonat yolağında HMG-CoA redüktaz inhibisyonunu gerçekleştiren statinlerin, programlanmış hücre ölümünü uyarak *Acanthamoeba* türleri üzerinde etkili olduğu saptanmıştır²³. Bu sebeple, çalışmada kullandığımız uçucu yağların ve içerdikleri monoterpenlerin kaspaz aktivitesi üzerine etkisinin araştırılmasının yerinde olacağı kanısındayız. Ayrıca *Acanthamoeba*'larda ergosterol ve 7-dehidrostigmasterol, trofozoit ve kist safhalarının hücre zarı yapısında bulunan ana steroller olarak rapor edilmiştir²⁴. Kullandığımız uçucu yağların kist ve trofozoitler üzerine etkileri, temel bileşenleri olan monoterpenlerin sterol sentezini inhibe ederek parazitin zar yapısını bozmaları ile ilişkili olabilir.

Uzun süreli ilaç kullanımı, insan hücrelerine toksik etki gösterebilmektedir. Benzer şekilde, bitkisel uçucu yağlarda da toksik ya da yan etkiler görülebilmektedir. *Acanthamoeba*

ba spp. kist ve trofozoitleri için etkili bulunan uçucu yağların memeli hücreleri üzerine sitotoksik etkileriyle ilgili farklı sonuçlar mevcuttur. Sauter ve arkadaşlarının²⁵ çalışmasında, *Pterocaulon polystachyum* bitkisinden elde edilen uçucu yağın trofozoitler üzerine etkili olduğu, aynı zamanda memeli hücreleri üzerinde de sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu araştırmacılar bir başka çalışmada, *Piper hispidinervum* bitkisinden elde edilen uçucu yağın trofozoitler üzerine etkili olduğunu, ancak memeli hücreleri için sitotoksik etki göstermediğini rapor etmişlerdir²⁶. Escobar ve arkadaşları²⁷, Kolombiya'da *Lippia* türlerinden elde ettikleri uçucu yağ ve ana bileşenleri, *Leishmania chagasi* ve *Trypanosoma cruzi* parazitleri üzerinde, Vero ve THP-1 memeli hücre kültürlerini kullanarak test etmişlerdir. Bu araştırmacılar, çalışmamızda en etkili uçucu yağ olarak saptadığımız *Melissa officinalis*'in ana bileşenleri olan geraniol ve neralinin bu çalışmada da ana bileşenler olduğunu ve *T.cruzi* epimastigotları, hücre içi amastigotlar ve *L.chagasi* promastigotları üzerine etkili olurken, memeli hücreleri üzerine sitotoksik etki göstermediğini bildirmişlerdir²⁷. Brezilya'da yapılan bir çalışmada da, bizim çalışmamızda kullandığımız *Ocimum basilicum* uçucu yağının %72.6'sını oluşturan linaloolün de anti-leişmanyal özellikte olduğu ve memeli hücrelerine karşı sitotoksik etkisinin olmadığı saptanmıştır²⁸.

Ana bileşenleri başka çalışmalarda memeli hücreleri üzerinde denenmiş ve sitotoksik olmadığı saptanmış olmakla birlikte, bizim çalışmamızın en büyük kısıtlaması, uçucu yağların keratositler ve/veya memeli hücreleri üzerine olan toksisitesinin değerlendirilememiş olmasıdır. Zira uçucu yağların içeriğinde bulunan daha az miktardaki bileşenlerin antagonist etkilerinin olabileceği göz ardı edilemez. Bu maddelerin klinik etkinliğinin test edilmesinden önce, memeli hücreleri üzerindeki sitotoksite deneylerinin in vitro ve in vivo şartlarda mutlaka değerlendirilmesi gerekmektedir. Çalışmada kullandığımız *A.castellanii* T4 genotipinin AK oluşumuna sebep olan başlıca türler arasında olduğu bilinmektedir. Bu nedenle elde edilen sonuçların AK tedavisiyle ilgili çalışmalara ışık tutacağını, tedavinin yanı sıra yeni kontakt lens saklama solüsyonlarının üretiminde kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Bu amaçla, kistler üzerinde öldürücü etkisini daha yüksek bulduğumuz *Melissa officinalis* ve *Mentha x piperita* uçucu yağlarının umut verici olduğu kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev 2006; 30(4): 564-95.
2. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. Parasite 2015; 22:10.
3. Visvesvara GS. Amebic meningoencephalitides and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. Curr Opin Infect Dis 2010; 23(6): 590-4.
4. Lee JE, Oum BS, Choi HY, Yu HS, Lee JS. Cysticidal effect on *Acanthamoeba* and toxicity on human keratocytes by polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. Cornea 2007; 26(6): 736-41.
5. Derda M, Hadaś E, Thiem B. Plant extracts as natural amoebicidal agents. Parasitol Res 2009; 104(3): 705-8.
6. Gürdal B, Kültür S. An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey). J Ethnopharmacol 2013; 146(1): 113-26.
7. Evren M, Tekgüler B. Uçucu yağların antimikrobiyel özellikleri. Elektronik Mikrobiyoloji Derg 2011; 9(3): 28-40.

8. Božović M, Piroli A, Ragno R. *Mentha suaveolens* Ehrh. (*Lamiaceae*) essential oil and its main constituent piperitenone oxide: biological activities and chemistry. *Molecules* 2015; 20(5): 8605-33.
9. Anthony J-P, Fyfe L, Smith H. Plant active components-a resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitol* 2005; 21(10):462-8.
10. Esetili BÇ, Çobanoğlu Ö, Tepecik M, Öztürk B, Anaç D. Organik şartlarda yetiştirilen nanenin (*Mentha x piperita* L.) verim, besin maddesi ve uçucu yağ içeriği. *Uludağ Üni Ziraat Fakültesi Derg* 2015; 29(1): 29-36.
11. Ozkoc S, Tuncay S, Bayram Delibas S, et al. Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkampfia* sp. from two clinical samples. *J Med Microbiol* 2008; 57(Pt 3): 392-6.
12. Polat ZA, Vural A, Tepe B, Çetin A. In vitro amoebicidal activity of four *Allium* species on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells. *Parasitol Res* 2007; 101(2): 397-402.
13. Bowers B, Korn ED. The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol* 2014; 41(4):786-805.
14. Monzote L, Alarcón O, Setzer WN. Antiprotozoal activity of essential oils. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 2012; 77(4):167-75.
15. Vidal F, Vidal JC, Gadelha APR, Lopes CS, et al. *Giardia lamblia*: the effects of extracts and fractions from *Mentha x piperita* Lin. (*Lamiaceae*) on trophozoites. *Exp Parasitol* 2007; 115(1): 25-31.
16. Mikus J, Harkenthal M, Steverding D, Reichling J. In vitro effect of essential oils and isolated mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Med* 2000; 66(4): 366-8.
17. Inbaneson SJ, Ravikumar S, Suganthi P. In vitro antiplasmodial effect of ethanolic extracts of traditional medicinal plant *Ocimum* species against *Plasmodium falciparum*. *Asian Pac J Trop Med* 2012; 5(2): 103-6.
18. Tepe B, Malatyali E, Degerli S, Berk S. In vitro amoebicidal activities of *Teucrium polium* and *T. chamaedrys* on *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts. *Parasitol Res* 2012; 110(5): 1773-8.
19. Malatyali E, Tepe B, Degerli S, Berk S. In vitro amoebicidal activities of *Satureja cuneifolia* and *Melissa officinalis* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Parasitol Res* 2012; 110(6): 2175-80.
20. Tepecik M, Esetili BÇ, Çobanoğlu Ö, Çiçekli M, Öztürk B, Anaç D. Effects of conventional and organic fertilizers on plant nutrition and essential oil components of basil. *Fresenius Environmental Bulletin* 2015; 23(5): 1159-65.
21. Akono Ntonga P, Baldovini N, Mouray E, Mambu L, Belong P, Grellier P. Activity of *Ocimum basilicum*, *Ocimum canum*, and *Cymbopogon citratus* essential oils against *Plasmodium falciparum* and mature-stage larvae of *Anopheles funestus* s.s. *Parasite* 2014; 21:33.
22. Yang F, Long E, Wen J, et al. Linalool, derived from *Cinnamomum camphora* (L.) Presl leaf extracts, possesses molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis* and inhibits infection of *Schistosoma japonicum*. *Parasit Vectors*. 2014; 7:407.
23. Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Sifaoui I, et al. Statins and voriconazole induce programmed cell death in *Acanthamoeba castellanii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(5): 2817-24.
24. Smith FR, Korn ED. 7-Dehydrostigmasterol and ergosterol: major sterols of an amoeba. *J Lipid Res* 1968; 9(4): 405-8.
25. Sauter IP, dos Santos JC, Apel MA, et al. Amoebicidal activity and chemical composition of *Pterocaulon polystachyum* (*Asteraceae*) essential oil. *Parasitol Res* 2011; 109(5): 1367-71.
26. Sauter IP, Rossa GE, Lucas AM, et al. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (*Piperaceae*) essential oil. *Industrial Crops and Products* 2012; 40: 292-5.
27. Escobar P, Milena Leal S, Herrera LV, Martinez JR, Stashenko E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian Lippia spp essential oils and their major components. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(2): 184-90.
28. do Socorro S Rosa Mdo S, Mendonça-Filho RR, Bizzo HR, et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(6): 1895-901.