

***Laurocerausus officinalis* Roemer (Taflan) Meyve Ekstrelerinden Nanoçiçek Sentezi ile Akantamoebisidal Aktivitenin Arttırılmasında Yeni Bir Strateji**

A New Strategy for Enhancing Acanthamoebicidal Activity with Synthesis of Nanoflower of *Laurocerausus officinalis* Roemer (Cherry laurel) Fruit Extracts

Ayşe BALDEMİR¹, Ülkü KARAMAN², Sadi YUSUFBEYOĞLU³, Ayşe EKEN⁴, Nilay ILDİZ⁵,
Selen İLGÜN¹, Cemil ÇOLAK⁶, Gamze KAÇMAZ², İsmail ÖÇSOY⁷, Soner ÇANKAYA⁸

¹ Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Kayseri.

¹ Erciyes University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, Kayseri, Turkey.

² Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Ordu.

² Ordu University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Ordu, Turkey.

³ Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kayseri.

³ Erciyes University, Faculty of Pharmacy, Kayseri, Turkey.

⁴ Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

⁴ Erciyes University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology, Kayseri, Turkey.

⁵ Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

⁵ Erciyes University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Kayseri, Turkey.

⁶ İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Malatya.

⁶ Inonu University Department of Medical Biostatistics, Faculty of Medicine, Malatya, Turkey.

⁷ Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Kayseri.

⁷ Erciyes University Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Kayseri, Turkey.

⁸ Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı, Ordu.

⁸ Ordu University Faculty of Medicine, Department of Biostatistics and Medical Informatics, Ordu, Turkey.

* Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeler Birimi (BAP) tarafından TLO-2017-7131 kodlu proje ile desteklenmiş ve 10-12 Mayıs 2017 tarihinde Konya'da düzenlenen I. Uluslararası Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Kongresi'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 08.08.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 04.01.2018

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Ayşe Baldemir, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi,
Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Melikgazi, Kayseri, Türkiye.
Tel (Phone): +90 352 207 6666, **E-posta (E-mail):** aysebaldemir@gmail.com

ÖZ

Patojenik *Acanthamoeba* türleri çoğunlukla kontakt lens kullanan kişilerde *Acanthamoeba* keratiti olarak bilinen enfeksiyona neden olmaktadır. Bu enfeksiyon tedavi edilmediği takdirde, korneada ülserasyon, görmede azalma hatta körlüğe neden olabilmektedir. *Acanthamoeba* enfeksiyonunun tedavisinde birçok seçenek bulunmasına rağmen, bunlar zor ve sınırlı etkinliğe sahiptir. *Acanthamoeba*'ya karşı etkili olan ve sıklıkla kullanılan hidrojen peroksit (H_2O_2) kontakt lens dezenfektanı olmasına rağmen, korneada toksik etki yapmaktadır. Bu nedenle, *Acanthamoeba* enfeksiyonları için yeni ve daha etkili tedaviler gerekmektedir. Bu konuyla ilişkili olarak bitkilerin yeni ilaçların geliştirilmesinde doğal kaynaklar olduğu düşünülmektedir. Tıbbi bir bitki olan *Laurocerasus officinalis* Roem. (Rosaceae) Karadeniz Bölgesi'nde yetişmektedir; meyveleri "Taflan", "Laz kirazı" ve "Karayemiş" olarak bilinmektedir. Tohumları halk arasında şeker hastalığına karşı kullanılırken, meyveleri ise yiyecek olarak tüketilmekte, idrar söktürücü ve böbrek taşı düşürücü olarak kullanılmaktadır. Bu bölgede, taflan tohumlarının antiparazitik olarak kullanıldığı da bildirilmiştir. Bu çalışmada, meyvenin halk arasındaki antiparaziter kullanımının doğrulanması ve potansiyel etkinliğinin organik-inorganik hibrit sentezi yolu ile artırılması amaçlanmıştır. Meyvenin endokarp, mezokarp ve tohumlarından hazırlanan metanol ekstraktlarının toplam fenol içerikleri hesaplanmıştır. Metanol ekstraktlarının ve bu ekstraktlardan sentezlenen nanoçiçek (NÇ) yapıların *Acanthamoeba castellanii* proliferasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Böylece, ilk kez NÇ olarak bilinen yeni bir organik-inorganik nano-biyo-antiparazitik ajan üretilmiş ve NÇ'nin amibisidal aktivite üzerindeki etkisi aydınlatılmıştır. NÇ'lerin ayrıntılı özellikleri taramalı elektron mikroskobu (SEM), Kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ve Enerji Dağılımlı Spektrometre (EDX) yöntemleri kullanılarak gösterilmiştir. Meyve ekstraktları ve NÇ'lerin katalitik aktiviteleri H_2O_2 varlığında gayakole karşı ölçülmüştür. Amibisidal aktivite için kullanılan *A. castellanii* kistlerinin canlılık testi %4 Trypan blue kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Metanol ekstraktları ve nanoçiçekler %0.9'luk serum fizyolojik içinde 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 mg/ml konsantrasyonlarda hazırlanmış ve tüplere 200'er µl dağıtılmış ve canlılığı %98 olan *A. castellanii* parazitinden 200'er µl eklenerek oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sonuçlar SPSS V.22.0 programı kullanılarak değerlendirilmiş ve varyans analizine göre ekstrakt ile karşılaştırıldığında NÇ'lerin amibisidal aktivitesinde anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır ($p \leq 0.05$). Çalışmada, örneklerin belirli zamanlarda parazitleri öldürdüğü veya parazit çoğalmasını azalttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, taflan meyve ekstraktlarından sentezlenen NÇ'lerin tek başına ekstraktlardan yaklaşık üç kat daha etkili amibisidal aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu durum, NÇ olarak bilinen yeni bir nano-biyo-antiparazitik ajanın *A. castellanii* üzerinde yüksek proliferatif etkisi olarak açıklanabilir.

Anahtar sözcükler: *Laurocerasus officinalis*; *Acanthamoeba castellanii*; nanoçiçek; katalitik aktivite; amibisidal aktivite.

ABSTRACT

Pathogenic *Acanthamoeba* species often cause infection known as *Acanthamoeba* keratitis among people who use contact lenses. It is a type of infection that can result in corneal ulceration, visual loss or even blindness, if not treated. There are various therapeutic options available in the treatment of *Acanthamoeba* infections but they are usually tough treatments with limited efficacy. For instance, hydrogen peroxide (H_2O_2) is a commonly used contact lens disinfectant which is effective against *Acanthamoeba* but it is toxic to the cornea. For these reasons, new and more efficacious treatment options are required for *Acanthamoeba* infections. In this context, plants are considered natural resources for the discovery of new drugs. *Laurocerasus officinalis* Roem. (cherry laurel) (Rosaceae) grows in Black Sea region; and it is known as "Taflan", "Laz kirazı" or "Karayemiş". Local people are using the seeds against diabetes, while the fruits are consuming as food, and used for diuretic and passing kidney stones. It has also been reported that the seeds of the cherry laurel are used as an antiparasitic agent in this area. The aim of the study was to confirm the traditionally use of antiparasitic activity of this fruit and to increase the potential effect by means of organic-inorganic hybrid synthesis. Total phenol contents of methanol extracts prepared from endocarp, mesocarp and seeds of the fruit were calculated. The effects of methanol extracts and nano flower (NFs) plants synthesized from these extracts on the proliferation

of *Acanthamoeba castellanii* were investigated. Thus, for the first time, novel organic-inorganic nanobio-antiparasitic agents called NFs were produced from cherry laurel and the increase in the amoebicidal activity of the NFs was elucidated. The characterization of NFs were determined with Scanning Electron Microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectrometer (FT-IR) and Energy-Dispersive X-ray (EDX) techniques. In addition, the catalytic activity of the fruit extracts and the NFs were measured against guaiacol in the presence of H_2O_2 . The viability testing of *A.castellanii* cysts used for amoebicidal activity was performed using 4% trypan blue. Methanol extracts and nano-flowers were prepared at concentrations of 32, 16, 8, 4, 2 and 1 mg/ml in 0.9% saline and distributed 200 μ l each in tubes and incubated in the room temperature with the addition of 200 μ l of 98% viable *A.castellani* parasites. The results were evaluated using the SPSS V.22.0 program and it was determined that there was a significant increase in the amoebicidal activity of NFs compared with the other extracts according to variance analysis ($p \leq 0.05$). In the study, it was determined that samples killed parasites or reduced parasite proliferation at certain times. As a result, NFs synthesized from fruit extracts were demonstrated about three times more effective than the non hybrid extracts for amoebicidal activity. This situation can be explained as high proliferative effect of a new nano-bio-antiparasitic agent known as nanoflower against *A.castellanii*.

Keywords: *Laurocerasus officinalis*; *Acanthamoeba castellanii*; nanoflower; catalytic activity; amoebicidal activity.

GİRİŞ

Acanthamoeba doğal su kaynaklarında, deniz suyunda ve toprakta serbest yaşayan bir amip türüdür. Aynı zamanda yüzme havuzu, musluk suyu, şişelenmiş maden suyu gibi örneklerde ve hatta kontakt lens bakım solüsyonu gibi çeşitli ortamlardan da izole edilmiştir. *Acanthamoeba*'lar fırsatçı patojen olup trofozoit ve kist formları bulunmaktadır. Trofozoit formu çeşitli bakteriler üzerinde yaşamakta ve çevresel koşullar olumsuz hale geldiğinde, kist formuna dönüşmektedir. Granülomatöz amibik ensefalit (GAE) olgularında da sık olarak *Acanthamoeba culbertsoni*, *A.castellanii* ve *A.rhysoides* türleri tespit edilmiştir. *Acanthamoeba keratiti* çeşitli *Acanthamoeba* türlerinin neden olduğu bir parazitozdur. Travma, kontakt lens kullanımı, etkeninin bulaştığı suyla korneanın teması hazırlayıcı faktörlerdir. Asemptomatik kişilerde şiddetli oküler ağrı, yangı, görme bozukluğu ve halka şeklinde stromal infiltrasyon görülmektedir. Bu tip durumlarda zamanla görme bozularak görme kaybı olabilmektedir. *Acanthamoeba keratitli* olgularda *A.castellanii* ve *A.polyphaga* türleri sık olarak tespit edilmiştir^{1,2}. *Acanthamoeba* enfeksiyonu korneal dokuda ve göz yüzeyinde tolere edilebilen konsantrasyonlardaki birçok antimikrobiyal ajana dirençlidir. *Acanthamoeba*'ya bağlı oftalmik enfeksiyonların tedavisi ve eradike edilmesi zordur³⁻⁶.

Bu enfeksiyonun tedavisinde birçok seçenek olmasına rağmen, bunlar zor ve sınırlı etkinliğe sahip tedavi yöntemleridir^{3,5,7}. Tedavide etkili olan antibiyotikler arasında pro-pamidin izotiyonat, ketokonazol, mikonazol ve itrakonazol sayılabilir. Lezyonun cerrahi olarak temizlenmesinin; buna ek olarak ağızdan ve lokal olarak mikonazol verilmesinin etkili olduğu belirlenmiştir⁷. Ayrıca, *Acanthamoeba*'ya karşı etkili olan hidrojen peroksit (H_2O_2) sık kullanılan bir kontakt lens dezenfektanı olmasına rağmen kornea için toksiktir⁴. Bu nedenle, *Acanthamoeba* enfeksiyonları için yeni yaklaşımlar ve daha etkili tedavi

protokollerine gereksinim bulunmaktadır. Günümüzde birçok bilimsel alanda olduğu gibi, paraziter enfeksiyonlarda da bitki ekstraları ve onların biyoaktif bileşenleri ile yapılan çalışmalar artmaktadır^{3,8-11}. Ayrıca, nanomateryal sentezinde de bakteriler, mantarlar ve bitki ekstralarının kullanıldığı biyosentetik yöntemler daha kompleks kimyasal sentetik işlemlere karşı basit ve geçerli bir alternatif olmuştur¹²⁻¹⁶.

Son yıllarda metal nanoparçacıkların sentezi için etkin yeşil kimya yöntemlerinin geliştirilmesi araştırmaların odak noktası haline gelmiştir. Bu çalışmalarda temel amaç iyi karakterize olmuş nanomateryallerin üretimi için çevre dostu ve pratik bir teknik bulmaktır¹⁷. İlk defa Ge ve arkadaşları¹⁸, inorganik bileşen olarak Cu^{+2} iyonunu ve organik bileşen olarak da çeşitli protein ve enzimleri (laktalbumin, lakkaz, karbonik anhidraz, lipaz ve sığır serum albumini) kullanarak nano yapraklardan oluşan çiçek benzeri (flower-like) şekillere sahip organik-inorganik hibrit yapıları geliştirmiştir. Bu yeni teknik ile aynı zamanda oluşan hibrit yapıların diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında kararlılığının ve aktivitesinin dikkat çekici ölçüde arttığını göstermişlerdir^{16,18,19}.

Bu çalışmada, yetiştiği bölgede halk arasında antiparaziter kullanımının yanı sıra fenolik bileşikler yönünden de zengin olması ile organik komponent olarak *Laurocerasus officinalis* Roem. meyve ekstraları ve inorganik bileşen olarak da Cu (II) iyonu kullanılarak fosfat tamponu ortamında çiçek şekilli hibrit nano yapıların sentezlenmesi ve ekstralar ile organik bileşen olarak kullanılan ekstre- Cu hibrit yapılarının amibisidal ve katalitik aktivitelerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

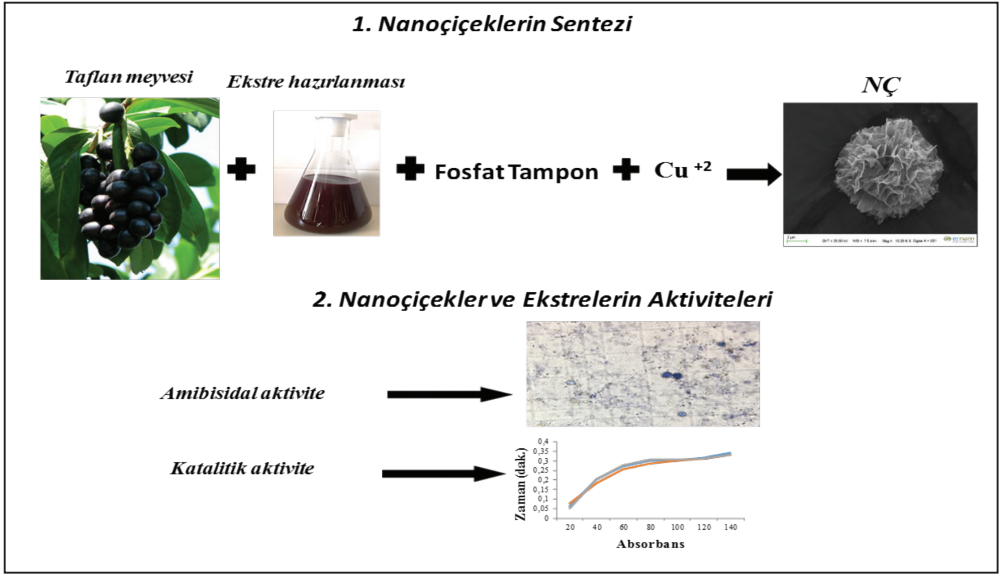
Çalışmada taflan meyve ekstraları materyal olarak kullanıldı ve ekstralardan nanoçiçek sentezi ve aktivite çalışmaları olmak üzere temel olarak iki basamak hedeflendi. Çalışmanın şekilsel özeti Şekil 1’de görülmektedir.

Bitki Materyali

Taflan meyveleri Trabzon ilinin Akçaabat ilçesinden 2015 yılı Eylül ayında toplandı. Bitki örneği Yrd. Doç. Dr. Ayşe Baldemir tarafından tayin edilerek Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbarium’una (AEF 26257) kaydedildi. Meyveler laboratuvara soğuk zincir koşullarında getirilerek distile suda yıkandı ve etüvde 40°C’de üç gün boyunca kurutulup çalışma anına kadar derin dondurucuda saklandı.

Ekstrelerin Hazırlanması

Meyvelerin mezokarp + ekzokarp (ekzokarp, mezokarpı saran yapışık zar şeklinde), endokarp ve tohumlarından fenolik bileşikler yönünden zengin ekstre hazırlamak amacıyla, ayıklanan kısımları değirmende toz haline getirildi ve her birinden 20 g olmak üzere 200 ml metanol içerisinde üç gün boyunca oda sıcaklığında maserasyon yapıldı. Gün sonunda ekstralar Whatman no.1 filtre kağıdı kullanılarak süzülde ve tekrar çözöcö eklendi. Süzöntöler birleştirilerek rotavapor ile yoğunlaştırıldı. Tüm ekstralar liyofilize edildi.



Şekil 1. Çalışmanın şekilsel özeti.

L.officinalis Meyve Ekstresi- Cu^{+2} Hibrit Nanoçiçek Sentezi

Çiçek benzeri hibrid nanoyapılar (NÇ), modifiye edilmiş yöntemle sentezlendi^{16,20-22}. 50 ml 10 mM PBS (pH 7.4) ve 0.8 mM Cu^{+2} iyon ihtiva eden karışıma, 0.1 ve 0.5 mg/ml konsantrasyonlarda taflan ekstresi ilave edildi. Her bir karışım 30 saniye vorteksledi ve 3 gün boyunca 4°C'de inkübe edildi. Reaksiyon tüplerinin tabanında oluşan çökelti toplandı ve 15 dakika 10.000 devirde santrifüj kullanılarak suyla yıkandı. Yıkama işlemi üç kez tekrarlandı ve son ürünler 50°C'de kurutuldu.

Sentezlenecek Ekstre- Cu^{+2} Organik-İnorganik Hibrit Nano Yapıların Karakterizasyonu

Ekstre ve standartlardan sentezlenecek organik-inorganik hibrit nano yapıların morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edildi. Enerji Dağılımlı Spektrometre (EDX) ve FTIR ile hibrit nano yapıların oluşumları incelendi¹⁶⁻¹⁸.

L.officinalis Ekstrelerinden Sentezlenen Nanoçiçeklerin Katalitik Aktivitesi

Eşit miktarlarda taflan meyve ekstralarının ve NÇ'lerin katalitik aktivitesi, spektroskopik yöntem kullanılarak gayakole karşı test edildi²². Klasik aktivite ölçüm protokolü (pH 6.8, 0.1 M mono potasyum fosfat (KH_2PO_4), 25°C) kullanıldı. Taflan ekstraları ve NÇ'ler, 1 ml PBS içinde ayrı ayrı çözüldü ve bunu takiben 1 ml 22.5 mM hidrojen peroksit (H_2O_2) ve 1 ml 45 mM gayakol ilave edildi. Elde edilen her bir karışımın inkübasyonundan sonra gayakolün oksitlenmesine bağlı olarak absorbans değerlerinde oluşan değişiklikler UV-vis spektrofotometresinde 470 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi.

Antiparazitik Aktivite Çalışmaları

Cumhuriyet Üniversitesi Parazitoloji Laboratuvarından *A.castellani* ve Ordu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden *Escherichia coli* izolatları elde edildi ve parazitin kültürü yapılarak devamlılığı sağlandı^{8,23,24}.

Acanthamoeba besiyeri

Non-nutrient Agar

Kullanım prosedürüne göre hazırlanan EMB besiyerinde *E.coli* üretildi. Çalışmada Page'in amip tuzlu su solüsyonu kullanıldı. Hazırlanan solüsyon 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra 4°C'de saklandı.

1.5 g agar 100 ml Page solüsyonunda ısıtılarak çözüldü ve 121°C'de 15 dakika otoklavda bekletilerek ve petrilere dağıtıldı. Hazırlanan besiyerleri deney yapılarına kadar 4°C'de saklandı.

Kültür

Hazırlanan besiyerlerinin üzeri 0.5 ml Page solüsyonu ile sulandırıldı ve 24 saatlik *E.coli* izolatı agar üzerine yayıldı. *A.castellani* izolatından alınan örnekler besiyerine ekildi. Ekim yapılan parazitler 72 saat 26°C'de bekletildi ve trofozoitler zedelenmeden petriden Page solüsyonu ile toplandı ve yıkama işlemi için 1500xg'de 5 dakika santrifüj edildi.

Trofozoitlerin canlılığını test etmek için %4'lük tripan mavisini kullanıldı ve hemositometri lamında sayıldı.

Ekstre Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Ekstreler %0.9'luk serum fizyolojik içinde 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 mg/ml, konsantrasyonlarda hazırlandı ve steril endorf tüplerine 200'er µl olacak şekilde dağıtıldı. *A.castellani* son konsantrasyonu 30 x 10⁶ trofozoit/ml olacak şekilde ayarlandı ve 200'er µl tüplere eklenerek oda sıcaklığında inkübe edildi. Canlılığı %98 olan *A.castellani* (20 x 10⁶ parazit/ml) 200'er µl eklenerek oda sıcaklığında inkübe edildi. Parazitin canlılığı belirli saatlerde kontrol edilerek kayıt edildi. Canlı hücre tespit edilmeyen tüplerden tekrar kontrol ekimleri yapıldı ve hiçbirinde üreme saptanmadı. Ekstre/NC eklenmeyen parazitler kontrol olarak aynı ortamda bekletildi.

Ekstrelerin Toplam Fenol Miktarı Tayini

Mezokarp + ekzokarp, endokarp ve tohum metanol ekstralarının içerdikleri toplam fenol miktarı gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplandı²⁵. Bunun için 6 ml distile su, 100 µl örnek çözelti ve 500 µl Folin-Ciocalteu reaktifi hazırlandı. Bir dakika sonra 1.5 ml %20'lik sulu Na₂CO₃ ilave edilip distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanıldı. İnkübasyon 25°C'de ve 2 saat süre ile yapıldı. Daha sonra 760 nm'de absorbans değerleri ölçüldü ve gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırıldı. Ekstrelerin toplam fenol miktarları gallik asite eşdeğer olarak hesaplandı. Deneyler üç kere yapıldı ve sonuçlar ortalama değer olarak belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Veriler öncelikli olarak, varyansların homojenliği açısından logaritmik transformasyona tabi tutuldu. Bitki türlerinin canlılığı ile uygulama dozları açısından anlamlı bir farklılığın olup olmadığını ortaya koymak için transformasyona tabi tutulmuş verilere tekrarlanan ölçümlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Analiz sonucunda veriler tekrar orijinal haline dönüştürülerek araştırma bulguları n, ortalama ve standart sapma şeklinde gösterildi. Bulgular, $p \leq 0.05$ önem seviyesinde anlamlı olarak kabul edildi. Tüm istatistiksel hesaplamalar SPSS V22.0 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi.

BULGULAR

Taflan meyvesinin ekzokarp-mezokarp (M-eks.), endokarp (E-eks.) ve tohum (T-eks.) metanol ekstrelerinden çiçek şekilli hibrit nano yapılar (NÇ) üretilmiştir. Erciyes Üniversitesi Teknoloji ve Uygulama Araştırma Merkezi'nde bulunan taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Leo 440, Polaron SC7620 Sputter Coater) ile sentezlenen nanoçiçeklerin görüntüleri alınmış ve boyutları belirlenmiştir (Şekil 2A-F).

Ekstrelerin ve bunlardan üretilen NÇ'lerin yapıları Fourier Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) (Perkin Elmer Spectrum 400) kullanılarak analiz edilmiştir (Şekil 3).

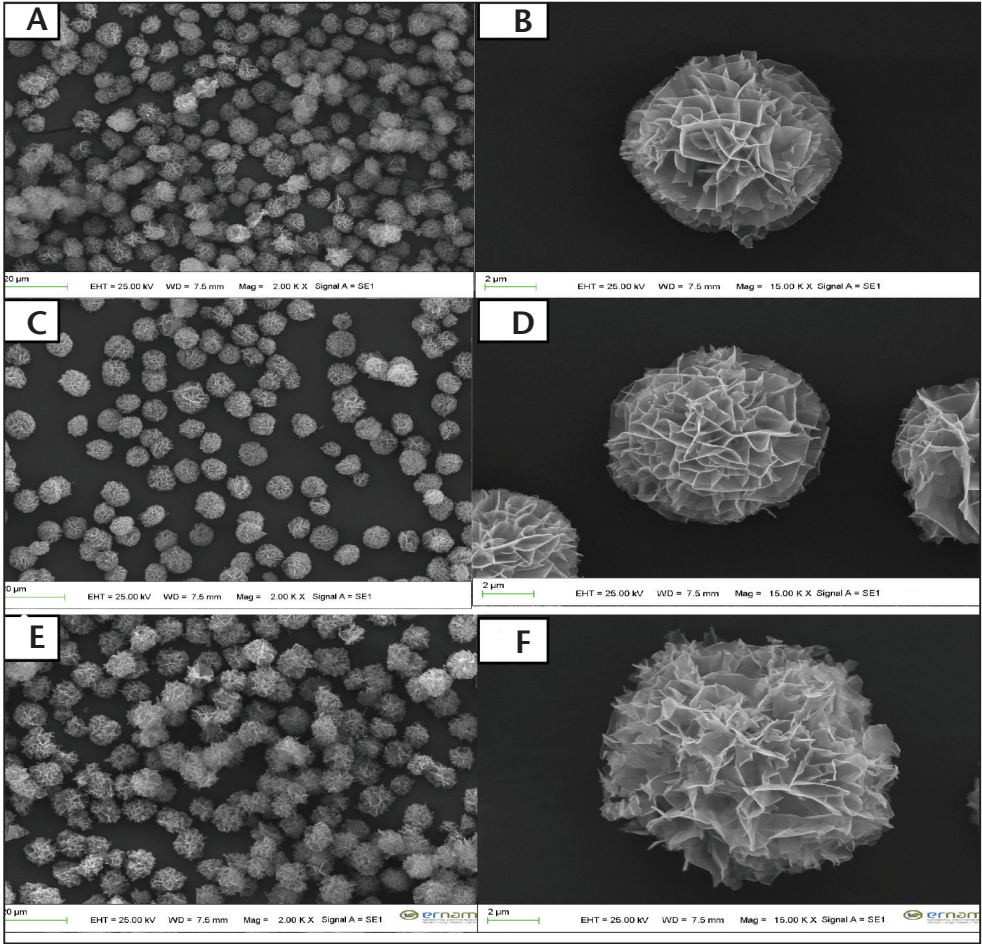
Endokarp-eks.-NÇ hibrit yapıdaki bakır metali varlığı EDX ile element analiz yapılarak ispatlanmıştır (Şekil 4).

L.officinalis meyve ekstreleri ve bu ekstrelerden ilk kez sentezlenen nanoçiçek hibrit yapıların *A.castellanii* proliferasyonuna karşı etkileri araştırılmıştır. Çalışmada her ölçüm iki kere yapılmış ve ortalamaları alınmıştır. Parazit türlerinin doz ve saate göre canlılık düzeylerine ait tekrarlanan ölçümlü varyans analiz tablosu Tablo I'de, tanımlayıcı istatistikler (ortalamaları ve standart sapmaları) ise Tablo II'de verilmiştir.

Tablo I. Parazit, Zaman ve Doza Göre Varyans Analiz Tablosu

Varyasyon Kaynağı	KT	SD	KO	F	p
Ölçüm zamanı	378.539	5	75.708	57.949	0.001
Ölçüm zamanı *örnek (ekstre/NÇ)	98.161	25	3.926	3.005	< 0.001
Ölçüm zamanı *dozlar	218.636	30	7.288	5.578	< 0.001
Ölçüm zamanı *örnek *dozlar	325.807	150	2.172	1.663	< 0.001
Hata (Ölçüm zamanı)	274.354	210	1.306		
Örnek	275.877	5	55.175	18.856	< 0.001
Dozlar	1315.371	6	219.228	74.921	< 0.001
Örnek * dozlar	426.751	30	14.225	4.861	< 0.001
Hata	122.897	42	2.926		

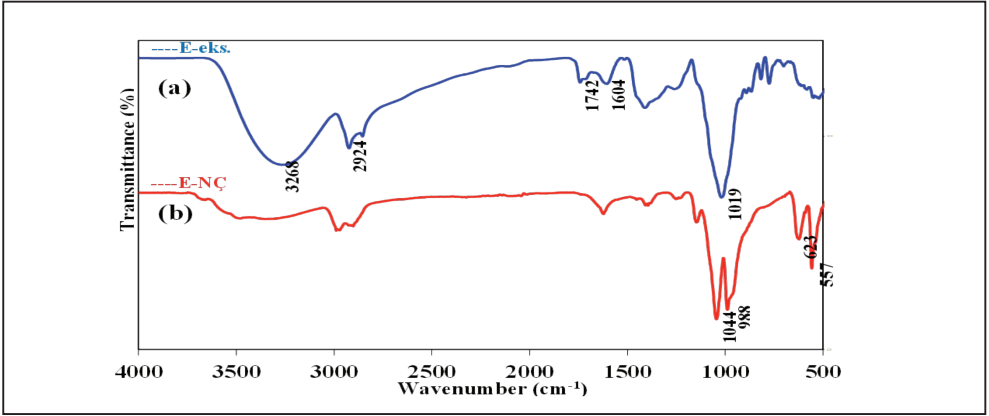
KT: Kareler toplamı; SD: Serbestlik derecesi; KO: Kareler ortalaması.



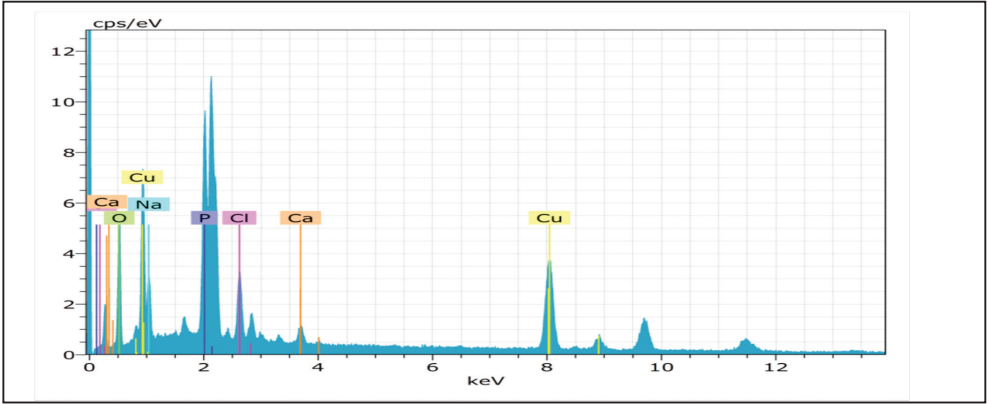
Şekil 2. *L.officinalis*'in meyve ekstrelerinden sentezlenen hibrit nanoçiçek yapıların SEM görüntüleri, (A,B) mezokarp + ekzokarp NÇ'si (M-NÇ), (C,D) endokarp NÇ'si (E-NÇ), (E,F) tohum NÇ'si (T-NÇ). NÇ, ekstre-Cu+2 hibrit nanoçiçek yapı.

Taflan ekstreleri ve ekstrelerden sentezlenen NÇ'lerin katalitik aktiviteleri, H_2O_2 varlığında gayakole karşı ölçülmüştür²². Ürünün absorbands değişiklikleri spektrofotometrik olarak 470 nm'de kaydedilmiştir (Şekil 5).

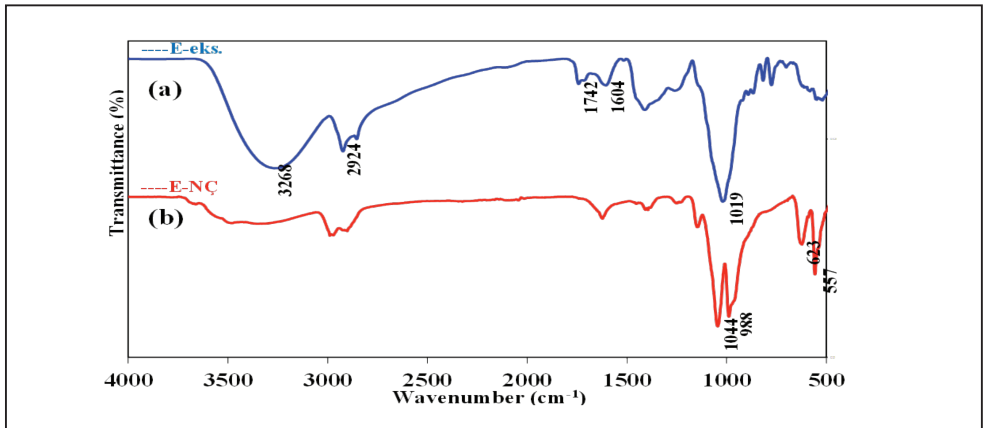
Taflan meyve ekstrelerinin toplam fenol içerikleri gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır²⁵. Tablo III'te görüldüğü gibi fenolik içerik bakımından en zengin ekstre endokarp ekstresi olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. Endokarp ekstre (E-eks.) ve endokarp-nanoçiçek (E-NÇ) hibrit yapının FTIR analizi.



Şekil 4. Cu metalinin varlığını gösteren NÇ'nin EDX analizi.



Şekil 5. Taflan meyve ekstreleri ve nanoçiçek (NÇ) yapıların katalitik aktiviteleri.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, taflan meyve ekstrelerinin ve ekstrelerden sentezlenen NÇ'lerin katalitik aktiviteleri ile *A.castellanii* 'ye karşı antiparazitik etkileri araştırılmıştır. Katalitik aktivite NÇ'lerin yapısındaki bakırın hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında peroksidaz tipi aktivite göstermesi ile açıklanmaktadır. Fenton benzeri bir reaksiyon olan bu aktivite için mekanizmanın şu şekilde gerçekleştiği düşünülmektedir: Çiçek yapıdaki nano katalizör içerisindeki Cu^{+2} iyonları hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek Cu^{+1} iyonlarını oluşturmakta ve oluşan Cu^{+1} ile H_2O_2 'nin reaksiyonu tepkimesi sonucunda oldukça reaktif bir hidroksil radikali oluşmaktadır. Bu serbest hidroksil radikali gayakol substratının oksidasyonunu başlatmaktadır. Gayakol, HRP enzimi için ideal bir substrat olmakla birlikte, serbest hidroksil radikalleri ile hızlı bir şekilde 3,3'-dimetoksi-4,4'-bifenokinon yapısına oksitlenmektedir. Dolayısıyla, NÇ'ler H_2O_2 varlığında gösterdikleri peroksidaz benzeri aktiviteleri ile Fenton ajanı ya da reaktifi gibi davranmaktadırlar^{16,22}.

Çalışmamızda katalitik aktivite deneyinde ekstrelerden sentezlenen hibrit NÇ'lerin (M-NÇ, E-NÇ, T-NÇ) diğer ekstreler (M-eks., E-eks., T-eks.) göre aktivitelerinin çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5-7). Bitki ekstresinden Cu (II) metali kullanılarak nanoçiçek sentezine dair çalışmalar literatürde oldukça azdır. İldiz ve arkadaşları¹⁶ yaptıkları çalışmada *Viburnum opulus* L. meyve metanol ekstresi-Cu⁺² nanoçiçek hibrit yapıları sentezlemiş ve tek başına ekstre ile kıyaslandığında antimikrobiyal ve katalitik aktivitede yüksek bir artış olduğunu rapor etmişlerdir¹⁶. *Ficus benghalensis* L. yaprak ekstresinden bakır nanoçiçekler sentezlenerek bu yapıların metilen mavisinin katalitik deagragasyonunda artışa neden olduğu tespit edilmiştir¹⁹. Baldemir ve arkadaşları²⁰ yeşil çayın (*Camellia sinensis* L.) etanol ve su ekstreleri ile içerdiği kafein ve kateşin maddelerinden NÇ yapıları sentezleyerek antimikrobiyal ve katalitik aktivitenin arttığını göstermişlerdir. Çalışmamızda NÇ'lerin diğer ekstreler (M-NÇ, E-NÇ, T-NÇ) göre amibisidal aktivitesinde artışın görülmesi literatürü destekleyici niteliktedir.

Çalışmada, ilk hedef olan meyve ekstrelerinden NÇ'lerin sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Mezokarp + ekzokarp, endokarp ve tohum NÇ'lerinin SEM görüntüleri incelendiğinde şekil ve boyutlarının ilginç bir şekilde çok benzer olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, bütün ekstre türlerinin içeriği ile NÇ oluşumunda fosfat tampon içinde Cu^{+2} iyon ve ekstrelerin etkileşimlerinin de benzer olduğu şeklinde yorumlanmıştır. SEM görüntüleri incelendiğinde NÇ'lerin morfolojik olarak genelde tek dağılımlı, kompakt ve küresel oldukları saptanmıştır (Şekil 2). Mezokarp nanoçiçek (M-NÇ), endokarp nanoçiçek (E-NÇ) ve tohum nanoçiçek yapılarının (T-NÇ) boyutları ise sırasıyla yaklaşık 8.63, 8.59 ve 11.54 µm olarak belirlenmiştir.

Analiz sonucunda tüm bitki ekstrelerinin ve NÇ'lerin FTIR spektrumlarının kendi aralarında benzer olduğu görülmüş ve örnek olarak endokarp ekstresi (E-eks.) ve endokarp ekstre-nanoçiçek (E-eks.-NÇ)'lerin FTIR spektrumu yorumlanmıştır (Şekil 3). Buna göre, E-eks.-NÇ'lerin içerdiği PO_4^{3-} gruplarının titreşim bantlarındaki eğilme 1044 cm^{-1} , bü-

Tablo II. L.officinalis Meyve Ekstreleri ve Ekstreden Sentezlenen NÇ'lerin A.castellanii Proliferasyonu Üzerine Etkileri

Ekstre ve NÇ'ler	Doz (mg/ ml)	Deney Periyodu											
		3 s		17 s		44 s		71s		98 s		110 s	
		Ortalama	SD	Ortalama	SD	Ortalama	SD	Ortalama	SD	Ortalama	SD	Ortalama	SD
T-eks	1.0	24 x 10 ⁶	0.00	23 x 10 ⁶	0.00	21.5 x 10 ⁶	1.01	21 x 10 ⁶	0.00	20.5 x 10 ⁶	1.04	50.6 x 10 ⁶	5.09
	2.0	21.5 x 10 ⁶	1.03	19.5 x 10 ⁶	1.04	21.5 x 10 ⁶	1.03	17.5 x 10 ⁶	1.04	15.5 x 10 ⁶	1.05	42.7 x 10 ⁶	5.37
	3.0	20 x 10 ⁶	0.00	18.5 x 10 ⁶	1.04	45.4 x 10 ⁶	1.03	16.5 x 10 ⁶	1.04	15.5 x 10 ⁶	1.05	39.5 x 10 ⁶	5.39
	4.0	18 x 10 ⁶	0.00	14.5 x 10 ⁶	1.05	12.5 x 10 ⁶	4.85	11 x 10 ⁶	0.00	10.5 x 10 ⁶	1.07	20.5 x 10 ⁶	5.68
	5.0	14 x 10 ⁶	1.11	11 x 10 ⁶	0.00	10 x 10 ⁶	1.06	4.5 x 10 ⁶	1.17	2.5 x 10 ⁶	1.33	4.5 x 10 ⁶	8.32
	6.0	8.5 x 10 ⁶	1.09	195 x 10 ⁶	5.09	4.4 x 10 ⁶	0.00	1.4 x 10 ⁶	1.63	0	0.00	0	0.00
T-NÇ	Kontrol	30.5 x 10 ⁶	1.02	36.5 x 10 ⁶	1.02	102.7 x 10 ⁶	1.17	102.7 x 10 ⁶	4.98	99.6 x 10 ⁶	4.98	285 x 10 ⁶	1.03
	1.0	14.5 x 10 ⁶	1.05	13 x 10 ⁶	0.00	12 x 10 ⁶	4.98	11.5 x 10 ⁶	1.06	6.5 x 10 ⁶	1.12	6.5 x 10 ⁶	1.12
	2.0	10 x 10 ⁶	1.15	9 x 10 ⁶	0.00	8.5 x 10 ⁶	0.00	7.9 x 10 ⁶	1.19	4.5 x 10 ⁶	1.17	4.5 x 10 ⁶	1.17
	3.0	7.5 x 10 ⁶	1.10	7 x 10 ⁶	0.00	6 x 10 ⁶	1.09	5 x 10 ⁶	0.00	4 x 10 ⁶	0.00	4 x 10 ⁶	0.00
	4.0	4.5 x 10 ⁶	1.17	3.5 x 10 ⁶	1.23	3 x 10 ⁶	0.00	2.5 x 10 ⁶	1.33	1.4 x 10 ⁶	1.63	1000	17484
	5.0	24.5 x 10 ⁶	1.33	1.4 x 10 ⁶	1.63	1000	0.00	1000	17484	0	0.00	0	17484
E-eks	6.0	0	0.00	0	0.00	0	17484	0	0.00	0	0.00	0	17484
	Kontrol	30.5 x 10 ⁶	1.02	36.5 x 10 ⁶	1.02	102.7 x 10 ⁶	0.00	102.7 x 10 ⁶	4.98	99.6 x 10 ⁶	4.98	285 x 10 ⁶	17484
	1.0	25 x 10 ⁶	0.00	50.6 x 10 ⁶	5.09	8.5 x 10 ⁶	4.98	7.5 x 10 ⁶	1.10	7.5 x 10 ⁶	1.10	7 x 10 ⁶	17484
	2.0	24.5 x 10 ⁶	1.03	14.5 x 10 ⁶	1.05	0.6 x 10 ⁶	1.09	5.5 x 10 ⁶	1.14	1000	17484	1000	17484
	3.0	22.5 x 10 ⁶	1.03	9.5 x 10 ⁶	1.08	5.5 x 10 ⁶	0.00	4 x 10 ⁶	0.00	1000	17484	1000	17484
	4.0	20.5 x 10 ⁶	1.04	0.9 x 10 ⁶	0.00	5 x 10 ⁶	1.14	3 x 10 ⁶	0.00	1000	17484	1000	17484
E-NÇ	5.0	17.5 x 10 ⁶	1.04	8.5 x 10 ⁶	1.09	5 x 10 ⁶	0.00	3 x 10 ⁶	0.00	1000	17484	1000	17484
	6.0	15 x 10 ⁶	0.00	8.5 x 10 ⁶	1.09	4.5 x 10 ⁶	0.00	1 x 10 ⁶	0.00	1000	17484	1000	17484
	Kontrol	30.5 x 10 ⁶	1.02	36.5 x 10 ⁶	1.02	102.7 x 10 ⁶	1.17	102.7 x 10 ⁶	4.98	99.6 x 10 ⁶	4.98	285 x 10 ⁶	1.03

Tablo II. *L. offinalis* Meyve Ekstreleri ve Ekstreden Sentezlenen NÇ'lerin *A. castellanii* Proliferasyonu Üzerine Etkileri (Devamı)

Ekstre ve NÇ'ler	Doz (mg/ ml)	Deney Periyodu											
		3 s			17 s			44 s			71 s		
		Ortalama	SD	Ortalama	Ortalama	SD	Ortalama	Ortalama	SD	Ortalama	Ortalama	SD	Ortalama
E-NÇ	1.0	16 x 10 ⁶	0.00	15.5 x 10 ⁶	1.05	14 x 10 ⁶	4.98	14.5 x 10 ⁶	1.05	12 x 10 ⁶	0.00	11.5 x 10 ⁶	1.06
	2.0	10.5 x 10 ⁶	1.07	8.5 x 10 ⁶	1.09	7 x 10 ⁶	0.00	6.5 x 10 ⁶	1.12	6 x 10 ⁶	0.00	5.5 x 10 ⁶	1.14
	3.0	10.5 x 10 ⁶	1.07	7.5 x 10 ⁶	1.10	6 x 10 ⁶	0.00	6 x 10 ⁶	0.00	4.5 x 10 ⁶	1.17	3.5 x 10 ⁶	1.23
	4.0	6.5 x 10 ⁶	1.12	5 x 10 ⁶	0.00	4.5 x 10 ⁶	0.00	4 x 10 ⁶	0.00	3.5 x 10 ⁶	1.23	2.5 x 10 ⁶	1.33
	5.0	6.5 x 10 ⁶	1.12	3.5 x 10 ⁶	1.23	2 x 10 ⁶	1.17	1.4 x 10 ⁶	1.63	1000	17484	0	0.00
	6.0	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
M-eks	Kontrol	30.5 x 10 ⁶	1.02	36.5 x 10 ⁶	1.02	102.7 x 10 ⁶	0.00	102.7 x 10 ⁶	4.98	99.6 x 10 ⁶	4.98	285 x 10 ⁶	1.03
	1.0	25.5 x 10 ⁶	1.03	23 x 10 ⁶	0.00	6.5 x 10 ⁶	4.98	20 x 10 ⁶	1.07	18.5 x 10 ⁶	1.04	17 x 10 ⁶	0.00
	2.0	24.5 x 10 ⁶	1.03	22 x 10 ⁶	0.00	17.5 x 10 ⁶	5.27	8.5 x 10 ⁶	1.09	4 x 10 ⁶	0.00	3 x 10 ⁶	0.00
	3.0	23.5 x 10 ⁶	1.03	22 x 10 ⁶	0.00	13.5 x 10 ⁶	1.04	5 x 10 ⁶	0.00	1.4 x 10 ⁶	1.63	1.4 x 10 ⁶	1.63
	4.0	20 x 10 ⁶	0.00	13.5 x 10 ⁶	1.05	11.5 x 10 ⁶	1.05	3.5 x 10 ⁶	1.23	1 x 10 ⁶	0.00	1000	17484
	5.0	18 x 10 ⁶	0.00	13 x 10 ⁶	0.00	11 x 10 ⁶	1.06	3.5 x 10 ⁶	1.23	0	0.00	0	17484
M-NÇ	6.0	16 x 10 ⁶	0.00	12.4 x 10 ⁶	1.06	3.3 x 10 ⁶	0.00	2.5 x 10 ⁶	1.33	0	0.00	0	17484
	Kontrol	30.5 x 10 ⁶	1.02	36.5 x 10 ⁶	1.02	102.7 x 10 ⁶	5.45	102.7 x 10 ⁶	4.98	99.6 x 10 ⁶	4.98	285 x 10 ⁶	17484
	1.0	8.4 x 10 ⁶	1.09	4 x 10 ⁶	0.00	2.5 x 10 ⁶	4.98	2 x 10 ⁶	0.00	1.4 x 10 ⁶	1.63	1000	17484
	2.0	5.5 x 10 ⁶	1.14	4.4 x 10 ⁶	1.17	3.4 x 10 ⁶	1.33	2.5 x 10 ⁶	1.33	2 x 10 ⁶	0.00	1000	17484
	3.0	4.4 x 10 ⁶	1.17	3 x 10 ⁶	0.00	2 x 10 ⁶	36.5 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	0.00	0.1 x 10 ⁶	0.00	0	0.00
	4.0	4 x 10 ⁶	0.00	2.5 x 10 ⁶	1.33	1.4 x 10 ⁶	0.00	1000	17484	1000	17484	0	0.00
Kontrol	5.0	3 x 10 ⁶	0.00	1000	17484	1000	1.63	1000	17484	0	0.00	0	0.00
	6.0	0	0.00	0	0.00	0	17484	0	0.00	0	0.00	0	0.00
	Kontrol	30.5 x 10 ⁶	1.02	36.5 x 10 ⁶	1.02	102.7 x 10 ⁶	0.00	102.7 x 10 ⁶	4.98	99.6 x 10 ⁶	4.98	285 x 10 ⁶	1.03

Tablo III. Taflan Meyve Ekstrelerinin Verimleri ve Toplam Fenol İçerikleri

Metanol ekstreleri	Ekstre verimleri %	Toplam fenol (mgGAE/g ekstre)
Taflan ekzokarp-mezokarp (M-eks.)	42.9	49.8 ± 0.8
Taflan endokarp (E-eks.)	5.8	76.2 ± 0.9
Taflan tohum (T-eks.)	14.7	47.09 ± 0.5

külme ise 557 cm⁻¹ olarak gözlenmiştir. Bu durum NÇ'nin yapısına PO₄⁻³ gruplarının entegre olduğunu göstermektedir. Titreşim bantları incelediğinde ~1604 cm⁻¹ ve ~1742 cm⁻¹'de NH₂ grupları E-ekstrede daha belirgin iken, E-eks.-NÇ hibrit yapıda daha zayıf olarak belirlenmiştir. Bu durum, bazı NH₂ gruplarının kısmen NÇ içerisine gömülmesinin bir sonucu olabilir. Son olarak, yaklaşık 2920 civarında cm⁻¹ arasında bulunan CH₂ ve CH₃ gruplarına atfedilen germe bantları E-ekstrenin spektrumunda daha keskin görülürken, E-eks.-NÇ'de daha zayıf olarak saptanmıştır. Yaklaşık 1742 cm⁻¹ ve yaklaşık 3268 cm⁻¹'deki piklerinde iki tepe noktası E-ekstredeki fenolik bileşiklerden C= O ve O-H gruplarını temsil etmektedir. Taflan ekstreleri içeriğindeki negatif yüklü gruplardan dolayı NÇ'ler ile kıyaslandığında çok daha düşük oranda katalitik aktivite göstermiştir. Buna karşın, yüksek katalitik aktiviteler, negatif yüklü gruplar ve Cu⁺² iyonlarına sahip NÇ'ler vasıtasıyla görülmüştür. Negatif yüklü gruplar, Fenton benzeri reaksiyona bağlı olarak NÇ'lerde Cu⁺¹ iyonları üreterek substratı okside edebilir. EDX analizleri ise ekstre- Cu⁺² hibrit yapının oluşması için bakır metalinin gerekliliğini ve E-eks.-NÇ'nin yapısında bulunduğunu göstermiştir (Şekil 4).

Çalışmada, ayrıca ekstrelerin toplam fenol içerikleri incelenmiş ve en zengin ekstrenin endokarp ekstresi olduğu tespit edilmiştir (Tablo I). Karahallil ve arkadaşlarının²⁶ yaptıkları çalışmada da taflan meyvesinin tohumdan ayıklanmış kısmının fenolik içeriği 1.094 g GAE/100 g kuru ağırlık olarak bulunmuştur. Sunulan çalışma sonuçlarına göre, üç ekstrenin toplam fenol içeriği araştırmacıların bildirdiği değerden yüksektir. Bu durumun taflan türlerinin farklı genotipe sahip olmalarından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu sonucu destekler nitelikte olan Akbulut ve arkadaşlarının²⁷ yaptıkları çalışmada Karadeniz Bölgesi'nde yetişen 28 farklı genotipteki taflan meyveleri üzerine bazı fizikokimyasal testler yapılmış ve genotipler arası farklılıklar olduğu tespit edilmiştir.

Türkiye'de "Taflan", "Laz kirazı" ve "Karayemiş" isimleri ile bilinen *L.officinalis* Roem. (Rosaceae) genellikle Karadeniz kıyı kesiminde doğal olarak yetişmektedir. Bu bölgede popüler olan meyveler pazarlarda satılmakta ve meyve olarak yenilmektedir. Halk arasında fırınlarda kurutulmuş meyveden elde edilen tohumlar şeker hastalığına karşı, taze meyveler ise idrar söktürücü ve böbrek taşı düşürücü olarak kullanılmaktadır. Ayrıca arazi çalışması sırasında bu bölgede taflan tohumlarının antiparazitik olarak kullanıldığı bilgisi edinilmiştir²⁸.

Amibisidal aktivite çalışmasında parazit canlılığı açısından zaman, örnekler (ekstreler ve NÇ'ler) ve dozlara göre anlamlı bir farklılık olduğu belirlenmiştir (Tablo II). Ayrıca, örnek-doz-zaman interaksiyon etkisinin de parazit canlılığı üzerine anlamlı bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, ekstre ve NÇ'lerde değişmekle beraber, doz arttıkça parazitin canlılığının azalma oranının düştüğü şeklinde yorumlanabilir. Yine zamana bağlı olarak da parazitin canlılığında azalma gözlenmiştir. Buna ek olarak, dozlara göre parazit canlılık düzeylerindeki farklılaşmanın nedeni ise, ekstre ve NÇ'lerin farklı oranlarda anti-parazitik etkisi olduğu şeklinde açıklanabilir. Ayrıca, ekstreler ile kıyaslandığında NÇ'lerin amibisidal aktivitesinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir²⁸.

Literatürde taflan ekstresi ve diğer ekstrelerden sentezlenen NÇ'lerin amibisidal etkisinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak farklı araştırmalarda *Trigonella foenum-graecum*'un 400 mg/mL²⁹, *Peucedanum caucasicum*, *P.palimbioides*, *P.chryseum* ve *P.longibracteolatum*'un 32 mg/mL⁸, *Salvia staminea*'nın 16 mg/mL³⁰, Propolis'in 15.62 mg/mL³¹ *Origanum syriacum* ve *Origanum laevigatum*'un 32 mg/mL²⁴ dozlarda amibisidal etki gösterdiği ve ayrıca kullanılan dozların toksik etkisinin olmadığı da belirlenmiştir. Çalışmamızda taflanin belirli saatlerde parazitin üremesinde gerileme yaptığı ve öldürdüğü belirlenmiştir. Ancak, bu bitkinin ilaç olarak kullanılabilmesi için in vivo çalışmalara ve kontrollü deneylere ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, katalitik aktivite sonuçlarına göre mezokarp, endokarp ve tohumdan sentezlenen NÇ'lerin aktivitelerinin tek başına ekstrelerin aktivitelerinden daha yüksek olduğu (T-NÇ > tohum ekstre > E-NÇ > endokarp ekstre > M-NÇ > mezokarp-ekstre) tespit edilmiştir (Şekil 5).

Sonuç olarak, NÇ'lerin tek başına ekstrelerden yaklaşık üç kat daha etkili amibisidal aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Bu durum, NÇ olarak bilinen yeni bir nano-biyo-antiparazitik ajanın *A.castellani*'ye karşı amibisidal aktivitesindeki artış olarak açıklanabilir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda NÇ'lerin standardizasyonunun yapılması hedeflenmektedir. Böylece, bitki ekstresinden sentezlenen nanomateryal doğal bir antiparazitik madde olarak kullanılabilir.

TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan örneklerin SEM görüntüleri ve spektroskopik analizleri Erciyes Üniversitesi Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (ERNAM) ve Teknoloji ve Uygulama Araştırma Merkezi (TAUM)'nde yapılmıştır. *A.castellani* izolatının temini için Cumhuriyet Üniversitesi'nden Prof. Dr. Serpil Değerli hocamıza teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Saygı G, Polat Z. Özgür yaşayan amipler ve neden oldukları parazitozlar (Primer amibik meningoensefalit - Granümatöz amibik ensefalit - Keratit) CÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2003; 25 (3): 140-9.
2. Sharma S, Garg P, Rao GN. Patient characteristics, diagnosis, and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba keratitis*. Br J Ophthalmol 2000; 84(10): 1103-8.
3. 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.

4. Hughes R, Andrew PW, Kilvington S. Enhanced killing of *Acanthamoeba* cysts with a plant peroxidase-hydrogen peroxide-halide antimicrobial system. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(5): 2563-67.
5. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(2): 273-307.
6. Polat ZA, Vural A, Ozan F, Tepe B, Özcelik S, Cetin A. In vitro evaluation of the amoebicidal activity of garlic (*Allium sativum*) extract on *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potential on corneal cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2008; 24(1): 8-14.
7. Ertabaklar H, Dayanir V, Apaydin P, Ertuğ S, Walochnik J. Olgu Sunumu: *Acanthamoeba* Keratiti. *Türkiye Parazitol Derg* 2009; 33: 283-5.
8. 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.
9. Derda M, Hadas E, Thiem B. Plant extracts as natural amoebicidal agents. *Parasitol Res* 2009; 104(3): 705-8.
10. Ródio C, da Rocha Vianna D, Kowalski KP, Panatieri LF, von Poser G, Rott MB. In vitro evaluation of the amoebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res* 2008; 104(1): 191-4.
11. Sifaoui I, López-Arencibia A, Martín-Navarro CM, et al. Activity assessment of Tunisian olive leaf extracts against the trophozoite stage of *Acanthamoeba*. *Parasitol Res* 2013; 112(8): 2825-9.
12. Ahmad Z, Pandey R, Sharma S, Khuller GK. Alginate nanoparticles as antituberculosis drug carriers: Formulation development, pharmacokinetics and therapeutic potential. *Ind J Chest Dis Allied Sci* 2005; 48(3): 171-6.
13. Logeswari P, Sivagnanam S, Jayanthi A. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. *J Saudi Chem Soc* 2015; 19(3): 311-7.
14. Retchkiman-Schabes PS, Canizal G, Becerra-Herrera R, Zorrilla C, Liu HB, Ascencio JA. Biosynthesis and characterization of Ti/Ni bimetallic nanoparticles. *Opt Mater* 2006; 29(1): 95-9.
15. Gu H, Ho PL, Tong E, Wang L, Xu B. Presenting vancomycin on nanoparticles to enhance antimicrobial activities. *Nano Lett* 2003; 3(9): 1261-3.
16. Ildiz N, Baldemir A, Altinkaynak C, Özdemir N, Yilmaz V, Ocsoy I. Self assembled snowball-like hybrid nanostructures comprising *Viburnum opulus* L. extract and metal ions for antimicrobial and catalytic applications. *Enzyme Microb Technol* 2017; 102: 60-6.
17. Irvani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chem* 2011; 13(10): 2638-50.
18. Ge J, Lei J, Zare RN. Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nat Nanotechnol* 2012; 7(7): 428-32.
19. Agarwal M, Bhadwal AS, Kumar N, et al. Catalytic degradation of methylene blue by biosynthesised copper nanoflowers using *F.benghalensis* leaf extract. *IET Nanobiotechnol* 2016; 10(5): 321-25.
20. Baldemir A, Köse NB, Ildiz N, et al. Synthesis and characterization of green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) extract and its major components-based nanoflowers: a new strategy to enhance antimicrobial activity. *RSC Adv* 2017; 7(70): 44303-8.
21. Yilmaz E, Ocsoy I, Ozdemir N, Soylak M. Bovine serum albumin-Cu(II) hybrid nanoflowers: An effective adsorbent for solid phase extraction and slurry sampling flame atomic absorption spectrometric analysis of cadmium and lead in water, hair, food and cigarette samples. *Anal Chim Acta* 2016; 906: 110-7.
22. Somturk B, Yilmaz I, Altinkaynak C, Karatepe A, Ozdemir N, Ocsoy I. Synthesis of urease hybrid nanoflowers and their enhanced catalytic properties. *Enzyme Microb Tech* 2016; 86: 134-42.
23. Polat ZA, Vural A, Cetin A. Efficacy of contact lens storage solutions against trophozoite and cyst of *Acanthamoeba castellanii* strain 1BU and their cytotoxic potential on corneal cells. *Parasitol Res* 2007;101(4): 997-1001.
24. Degerli S, Tepe B, Celiksoz A, Berk S, Malatyali E. In vitro amoebicidal activity of *Origanum syriacum* and *Origanum laevigatum* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Exp Parasitol* 2012; 131(1): 20-4.
25. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventó S RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, pp: 152-315. In: Packer L (ed), *Methods in Enzymology*. 1999, Academic Press, San Diego, CA.

26. Karahalil FY, Şahin H. Phenolic composition and antioxidant capacity of Cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) sampled from Trabzon region, Turkey. *Afr J Biotechnol* 2011; 10(72): 16293-9.
27. Akbulut M, Macit I, Ercisli S, Koc A. Evaluation of 28 cherry laurel (*Laurocerasus officinalis*) genotypes in the Black Sea region, Turkey. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 2007; 35(4): 463-5.
28. Baytop T. Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present). pp: 178-249. 1999, 1st ed. İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.
29. Dodangeh S, Niyati M, Kamalinejad M. Anti-*Acanthamoeba* activities of chloroformic fractions of *Trigonella foenum graecum* (seed) and their cytotoxicity on mice macrophage cell. *Novel Biomed* 2015; 3(4): 182-8.
30. Goze I, Alim A, Dag S, Tepe B, Polat ZA. In vitro amoebicidal activity of *Salvia staminea* and *Salvia caespitosa* on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009; 25(4): 293-8.
31. Topalkara A, Vural A, Polat Z, et al. In vitro amoebicidal activity of propolis on *Acanthamoeba castellanii*. *J Ocul Pharmacol Ther* 2007; 23(1): 40-5.