

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Brassica oleracea var. *viridis* L. ve *Smilax excelsa* L. BİTKİ
ÖZÜTLERİNİN *Acanthamoeba castellanii* TROFOZOİTLERİ
ÜZERİNE İN VİTRO AMOEBİSİDAL AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI

HAMİ YEŞİLTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORDU 2018

TEZ ONAY

Hami YEŞİLTAŞ tarafından hazırlanan “*Brassica oleracea* var. *viridis* L. ve *Smilax excelsa* L. BİTKİ ÖZÜTLERİNİN *Acanthamoeba castellanii* TROFOZOİTLERİ ÜZERİNE İN VİTRO AMOEBİSİDAL AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 13. 08. 2018 tarihinde yapılmış ve jüri tarafından oybirliği ile Ordu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman : Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN

Üye : Doç. Dr. Şahin DİREKEL
Tıbbi Mikrobiyoloji,
Üniversitesi

Giresun

Üye : Doç. Dr. Beyhan TAŞ
Moleküler Biyoloji ve Genetik, Ordu
Üniversitesi

08/10/2018 tarihinde enstitüye teslim edilen bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 11/10/2018... tarih ve 2018.. / 477 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Enstitü Müdürü

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Sami GÜLER

TEZ BİLDİRİMİ

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



Hami YEŞİLTAS

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

ÖZET

BRASSICA OLERACEA VAR. VIRIDIS L. VE SMILAX EXCELSA L. YAPRAK ÖZÜTLERİNİN ACANTHAMOEBA CASTELLANII TROFOZOİTLERİ ÜZERİNE IN VITRO AMOEBİSİDAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Hami YEŞİLTAŞ

Ordu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 2018

Yüksek Lisans Tezi, 58s.

Danışman: Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN

Acanthamoeba spp. rutubetli ya da ıslak topraklarda, göllerde, yüzme havuzlarında, baraj göllerinde, tatlı su birikintilerinde, çeşme sularında, kontak lens solüsyonlarında ve havada yaygın olarak bulunmaktadır. Toprak, su ve havayla sıkı temasta olan insanlara serbest yaşayan amiplerin yerleşmesi ve amebiyaz, oluşturabilmesi olasılığı yüksektir. Serbest yaşayan amipler arasında *Acanthamoeba* türleri, Granülatöz amibik ensefalit, *Acanthamoeba* keratitisi ve Kutanöz acanthamoebiasis gibi önemli hastalıklara neden olmaktadır. Günümüzde bu hastalıkları tamamen ortadan kaldıracak tedavi protokolleri bulunmamaktadır. Özellikle *Acanthamoeba* kistlerinin oluşturduğu enfeksiyonlar uygun ve etkili tedaviler uygulanmadığı sürece genellikle tekrarlayabilmektedir. Kistlerin uygulanan tedavi yöntemlerine karşı dirençli olması, uygulanan tedavi protokollerinin çok fazla yan etkilere sahip olması ve istenilen selektiviteyi göstermemesi gibi nedenler bu parazitlere karşı alternatif ve etkili ilaç arayışlarını ortaya çıkarmıştır.

Bu çalışmada, *Brassica oleracea* var. *viridis* L. ve *Smilax excelsa* L. yapraklarından elde edilen etanol özütlerinin *Acanthamoeba castellanii* trofozoitleri üzerindeki IC50 değeri ve yüzde (%) canlılık etkisi araştırılmıştır. *B. oleracea* var. *viridis* L. etanol özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki IC50 değeri 72. ve 48. saatlerde sırasıyla 9 ve 60 mg/ml; *S. excelsa* etanol özütünün ise 72. saatte 60 mg/ml olarak bulunmuştur. *B. oleracea* var. *viridis* L.'nin 73 ve 36.5 mg/ml özütlerinin 72. saatte *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki % canlılık oranları sırasıyla 22.67±0.33 ve 25±0.58 olarak saptanmıştır. *S. excelsa*'nın 73 ve 36.5 mg/ml özütlerinin 72. saatte % canlılık oranları sırasıyla 46.33±0.88 ve 56.33±1.20 olarak bulunmuştur.

Çalışmanın sonucunda, *B. oleracea* var. *viridis* L. ve *S. excelsa* bitki özütlerinin *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu ve bu etkinin de konsantrasyonlara bağlı olarak değiştiği görülmüştür. Ayrıca, *B. oleracea* var. *viridis* L. özütünün, trofozoitler üzerinde *S. excelsa* özütüne göre daha etkili amoebisidal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. *B. oleracea* var. *acephala* ve *S. excelsa* bitki özütlerinin trofozoitler üzerinde sitotoksik etkiye neden olduğunu gösteren bu çalışmanın *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının alternatif tedavi arayışlarında yer bulabileceği ve fitoterapi amacıyla temel oluşturacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Acanthamoeba castellanii*, Amoebisidal aktivite, *Brassica oleracea* var. *viridis* L., *Smilax excelsa* L.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF IN VITRO AMOEBICIDAL EFFECTS OF *BRASSICA OLERACEA* VAR. *VIRIDIS* L. AND *SMILAX EXCELSA* L. ON *ACANTHAMOEBA CASTELLANII* TROPHOZOITES

Hami YEŞİLTAS

University of Ordu ,

Institute for Graduate Studies in Science and Technology

Department of Molecular Biology and Genetics, 2018

MSc. Thesis, 58p

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zeynep KOLÖREN

Acanthamoeba species live commonly in damp and wet soil, freshwater accumulations, sewage, swimming pools, contact lens equipment, lakes, dam lakes, tap water and air. It is highly likely that free-living amoebae can settle humans in contact with soil, water, air and they create amoebiasis. *Acanthamoeba* spp. which are among in the free living amoebae, cause of Granulomatous amoebic encephalitis, *Acanthamoeba* keratitis and Cutaneous acanthamoebiasis. Today, there are no treatment protocols to completely eliminate these diseases. In particular, infections caused by *Acanthamoeba* cysts can usually repeat if suitable and effective treatments are not applied. Because cysts are resistant to the treatment methods applied and the treatment protocols applied have too many side effects and they do not show the desired selectivity, reveal the search for alternative and effective drugs against these parasites.

In this study, the percent (%) viability and IC₅₀ values of *Acanthamoeba castellanii* trophozoites exposed to ethanol extracts obtained from *Brassica oleracea* var. *viridis* L. and *Smilax excelsa* L. plants were investigated. The IC₅₀ values of *A. castellanii* trophozoites at 72 and 48 hours were determined in ethanol extract of *B. oleracea* var. *acephala* with 9 and 60 mg/ml, respectively and in the ethanol extract of *S. excelsa* with 60 mg/ml at 72 h. The viability rates (%) of *A. castellanii* trophozoites exposed to the 73 and 36.5 mg / ml extracts of *B. oleracea* var. *acephala* at 72 h were 22.67 ± 0.33 and 25 ± 0.58 , respectively. The viability rates (%) trophozoites exposed to the ethanol extract of *S. excelsa* with 73 and 36.5 mg/ml at 72 h were 46.33 ± 0.88 and 56.33 ± 1.20 , respectively.

As a result of the study, there is *B. oleracea* var. *viridis* L. and *S. excelsa* plant extracts have cytotoxic effects on *A. castellanii* trophozoites and this effect has also been shown to vary with concentrations. In addition, it is indicated that *B. oleracea* var. *acephala* extract showed more effective amoebicidal activity on trophozoites than *S. excelsa* extract.

This study showing that *B. oleracea* var. *viridis* L. and *S. excelsa* plant extracts cause cytotoxic effect on trophozoites is thought to be the basis of phytotherapy and can be used in alternative treatment searches for *Acanthamoeba* infections.

Keywords: *Acanthamoeba castellanii*, Amoebicidal activity, *Brassica oleracea* var. *viridis* L., *Smilax excelsa* L.

TEŞEKKÜR

Tüm çalıőmalarım boyunca her zaman bilgisi ve deneyimleriyle yolumu açan çok değerli hocam Doç. Dr. Zeynep KOLÖREN'e en içten teőekkürlerimi sunarım.

Benden her türlü desteğini, sabrını ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen niőanlım Gülőah BARIŐ'a ve kız kardeőim Berna Nur YEŞİLTAŞ'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca laboratuvar çalıőmalarımda her zaman yanımda olan değerli arkadaőlarım İlknur KOYUN, Bülent KAYNAK ve Kasım DEMİR'e teőekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEZ BİLDİRİMİ	I
ÖZET	II
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
ÇİZELGELER LİSTESİ	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR	IX
1. GİRİŞ	1
1.1 Çalışmada Kullanılacak Bitkiler Hakkında Genel Bilgi.....	6
1.1.1 <i>B. oleracea</i> var. <i>viridis</i> L.	6
1.1.2 <i>S. excelsa</i>	7
1.2 Mikroorganizmalar.....	9
1.2.1 <i>A. castellani</i> Hakkında Genel Bilgiler.....	9
1.2.1.1 <i>Acantamoeba</i> spp. Yaşam Alanları.....	9
1.2.1.2 <i>Acanthamoeba</i> 'nın Hayat Devri.....	11
1.2.1.3 <i>Acanthamoeba</i> 'nın Morfolojik Özellikleri.....	12
1.2.1.4 <i>Acanthamoeba</i> Türlerinin Sebep Olduğu Hastalıklar.....	13
1.2.1.5 Bulaşma Yolları.....	16
1.2.1.6 <i>Acanthamoeba</i> spp. 'nin Epidemiyolojisi.....	17
1.2.1.7 Tanı.....	19
1.2.1.8 <i>Acanthamoebiasis</i> Tedavisi.....	22
1.2 <i>Echerichia coli</i>	23
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	25
3. MATERYAL ve YÖNTEM	30
3.1 Bitki Özütlerinin <i>A.castellani</i> Trofozoitleri Üzerindeki Ameobisidal Etkisini Gösteren Yöntemlerin Akış Şeması.....	30
3.2 Bitki Materyalleri.....	30
3.3 Besiyerleri ve Solüsyonların Hazırlanması.....	31
3.3.1 Ringer Solüsyon Hazırlanması.....	31
3.3.2 İzotonik (% 0.85) Solüsyon Hazırlanması.....	32
3.3.3 Phosphate Bufferet Saline (PBS) Solüsyon Hazırlanması.....	32
3.3.4 Ringer Agar Besiyeri Hazırlanması.....	32
3.3.5 EMB (Eosin Methylene Blue) Agar Besiyeri Hazırlanması.....	32
3.4 <i>E. coli</i> Kültürünün Hazırlanması.....	33
3.5 <i>A. castellani</i> Kültürünün Hazırlanması.....	33
3.5.1 Ringer Agar Besiyerinde <i>A. castellani</i> Trofozoitlerinin Üretilmesi, Toplanması ve Sayımı.....	33
3.6 Bitki Özütlerinin Hazırlanması.....	34
3.6.1 Bitki Özütlerinden Konsantrasyon Serilerinin Hazırlanması.....	35
3.6.2 <i>B. oleracea</i> var. <i>viridis</i> L. ve <i>S. excelsa</i> Özütlerinin <i>A. castellani</i> Trofozoitleri Üzerinde Ameobisidal Aktivite Çalışması.....	35
3.7 İstatistiksel Analiz.....	36
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	37
4.1 <i>A. castellani</i> Trofozoitlerin Üretilmesi, Toplanması ve Sayımı.....	37

4.2	<i>A. castellani</i> Trofozoitleri Üzerinde <i>B. oleracea</i> var. <i>viridis</i> L. Özüütünün Farklı Konsatrasyon Serilerinin Ameobisidal Etkisi.....	38
4.3	<i>A. castellani</i> Trofozoitleri Üzerinde <i>S. excelsa</i> Özüütünün Farklı Konsatrasyon Serilerinin Ameobisidal Etkisi.....	41
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER	49
6.	KAYNAKLAR	50
	ÖZGEÇMİŞ	58



ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1	<i>B. oleracea</i> var. <i>viridis</i> L. 'nın görüntüsü.....	6
Şekil 1.2	<i>B. oleracea</i> var. <i>viridis</i> L.nın Türkiye'deki yayılış alanı.....	7
Şekil 1.3	<i>S. excelsa</i> 'nın görüntüsü.....	8
Şekil 1.4	<i>S. excelsa</i> bitkisinin Türkiye' ki yayılış alanı.....	9
Şekil 1.5	<i>Acanthamoeba</i> spp.'nin yaşam alanları.....	10
Şekil 1.6	<i>Acanthamoeba</i> türlerinin hayat formları.....	12
Şekil 3.1	<i>A. castellanii</i> trofozoitleri üzerine in vitro amoebisidal etki şeması.....	30
Şekil 3.2	<i>B. oleracea</i> var. <i>viridis</i> L. görüntüsü.....	31
Şekil 3.3	<i>S. excelsa</i> görüntüsü.....	31
Şekil 3.4	Bitki özütlerinin 2,25-73 mg/ml konsantrasyonlarında hazırlanması.....	35
Şekil 4.1	<i>A. castellanii</i> trofozoitlerinin İnvert mikroskop altındaki görüntüsü.....	37
Şekil 4.2	Thoma lamında Trypan blue ile muamele edilmiş ölü <i>A. castellanii</i> trofozoitleri.....	38
Şekil 4.3	<i>B. oleracea</i> var. <i>viridis</i> L.özütünün <i>A. castellanii</i> trofozoitleri üzerine amoebisidal etkisini gösteren grafik.....	40
Şekil 4.4	Farklı konsantrasyonlardaki <i>S. excelsa</i> özütünün <i>A. castellanii</i> trofozoitleri üzerine amoebisidal etkisini gösteren grafik.....	43

ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1	<i>B. oleracea</i> var. <i>viridis</i> L nin sistematığı.....	7
Çizelge 1.2	<i>S. excelsa</i> hakkında genel bilgiler.....	7
Çizelge 1.3	<i>S. excelsa</i> 'nin sistematığı.....	8
Çizelge 1.4	<i>A. castellani</i> sistematığı.....	9
Çizelge 1.5	<i>Acanthamoeba</i> türlerinin morfolojik olarak gruplandırılması.....	13
Çizelge 1.6	<i>Acanthamoeba</i> türleri ve sebep olduğu hastalıklar.....	14
Çizelge 1.7	<i>E. coli</i> 'nin taksonomik sınıflandırılması.....	24
Çizelge 4.1	<i>B. oleracea</i> var. <i>viridis</i> L yaprak özütünün <i>A. Castellani</i> trofozoitleri üzerindeki amoebisidal etkisi.....	39
Çizelge 4.2	Farklı konsantrasyonlardaki <i>B. oleracea</i> var. <i>acephala</i> özütünün <i>A. castellanii</i> trofozoitleri üzerindeki IC50 değeri.....	41
Çizelge 4.3	<i>S. excelsa</i> L. yaprak özütünün <i>A. castellani</i> trofozoitleri üzerindeki amoebisidal etkisi.....	42
Çizelge 4.4	Farklı konsantrasyonlardaki <i>S. excelsa</i> özütünün <i>A. castellanii</i> trofozoitleri üzerindeki IC50 değeri.....	43

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C	: Santigrat Derece
G	: Gram
M	: Metre
AK	: <i>Acanthamoeba</i> Keratiti
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
Mm	: Milimetre
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
Atm	: Atmosfer
GAE	: Granülomatöz Amibik Ensefalit
GLA	: γ -linolenik asit
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
rpm	: Dakikada Devir Sayısı
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
NaCl	: Sodyum Klorür

1. GİRİŞ

Bitkiler tedavi amaçlı antik çağlardan günümüze kadar kullanılmaktadır. İnsanoğlunun yerleşik hayata geçmesiyle birlikte tıbbi bitkiler hastalıkları tedavi etmek için kullanılmış ve zamanla bu durum bir gelenek haline gelmiştir (Njume ve ark., 2009). Bitkilerdeki drog (bitkilerin ilaç olarak kullanılan kısmı) miktarları Mezopotamya döneminde 250 civarında iken Gregler döneminde 600'ü bulmuştur. Arap- Fas döneminde ise bu sayı daha da artarak 4.000'e kadar ulaşmıştır. Günümüze daha yakın bir tarih olan 19 yy. da tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitki miktarı ise 13.000 olarak bildirilmiştir (Arslan, 2006).

Yüzyıllardır insanoğlu bitkilere ihtiyaç duymuş ve doğayı da doğal bir eczane olarak görmüştür. Doğada yetişen tıbbi bitkileri yemek ve ilaç olarak kullanmak bunun bir göstergesidir. Sentetik olarak üretilen ilaçların kullanılması ile tıbbi ve aromatik bitkilere olan ilginin azaldığı görülse de ilaçların yan etkilerinin anlaşılması bu bitkilere ilginin tekrar artmasına neden olmuştur (Gül ve Dinler, 2015)

Eski zamanlardan bu yana bitkilerin insanoğluna bir hediye olarak gönderildiği düşünülmektedir. İnsan bitki ilişkisinin sürekliliği 1957-61 yılları içinde Kuzey Irak'ta Şanidar Mağarası'nda yapılan kazı çalışması sırasında bir kez daha ortaya konulmuştur. Bu kazıda mezar içinde bulunan Neandertal kalıntılarla birlikte bulunan bitkiler, insan-bitki beraberliğinin başlangıç doneleri olarak kabul edilmektedir. Altmış bin yıl öncesinde yaşadığı varsayılan bir şamana ait mezarın için de de şamanla beraber gömülen birçok bitki kalıntılarına rastlanmıştır. İçlerinden en fazla dikkate çekenleri; mor sümbül, peygamber çiçeği, civanperçemi, efedra, gül hatmi ve kanarya otu kalıntılarıdır. Yaşamını yitiren bireylerin tekrar dirilerek bu bitkileri kullanacağı varsayımının yanısıra şifalı ve yenilebilen kategorilerine ayrıldığı da ayrıca düşünülmektedir. Günümüzde ise aynı bitkiler tıbbi bitki olarak kullanılmakta ve önem teşkil etmektedir (Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) hazırladığı rapora göre, gelişmekte olan dünya ülkelerinin % 80'inin genel sağlık ihtiyaçlarını geleneksel ve bitki kaynaklı ilaçlardan yararlanarak karşıladığı bildirilmiştir. Günümüzde kullanılan birçok ilaçların etken maddelerinin de % 25'lik kısmı bitkilerden temin edilmektedir. Sentetik birçok ilacın etken maddesi de ilk defa bitkilerden ayrıştırılan kimyasalların

yapı benzerleridir. Tıbbi bitkilerin doğru kullanıldığında toksik yönünün bulunmaması, yan etkilerinin olmaması ve aynı zamanda uygun fiyatlı olması gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde bu bitkilere olan talebi arttırmaktadır (Sekar ve Kandavel, 2010).

Hastalıklara karşı kullanılan tıbbi bitkilerin kimyasal içerikleri önemli biyolojik aktivitelere sahiptir. Bitkilerin oluşturduğu taninler, berberinler, flavonoidler, emetinler, terpenoidler, kininler ve alkaloidler gibi kimyasallar hastalıkların tedavi sürecinde kullanılmaktadır. Bitkilerin tohum, yaprak, kök ve gövde kısımlarından uygun yöntemlerle ayrıştırılan özütlerin mikroorganizmaların gelişimini durduran veya olanları öldüren aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir. Birçok bitkinin antitümör, antioksidan, antihipertansif ve antimikrobiyal özelliklerinin olduğu da yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Berber ve ark., 2013).

DSÖ yaklaşık olarak 20 000 bitki türünün tıbbi amaç için kullanıldığını bildirmiştir (Maregesi ve ark., 2008).

Türkiye florası önemli bir gen merkezi olup, dünya üzerinde kabul görmüş tür sayısı ve endemik bitki çeşitliliğine sahiptir. Tüm Avrupa' da 12 000 bitki türü olmasına rağmen, ülkemizde 9 000 civarında bitki türü bulunmaktadır. Bu türlerin 3 000 kadarının endemik olması ülkemizdeki tür çeşitliliğinin önemini vurgulamaktadır. Ülkemizde tıbbi amaçla kullanılan bitki türlerinin sayısı kesin olarak bilinmemekle beraber bu sayının 500-1 000 aralığında olduğu tahmin edilmektedir. Bunun yanında dış ülkelere tıbbi bitki olarak yaklaşık 200 bitki ihraç edilmektedir (Berber ve ark., 2013).

Aynı zamanda Türkiye'nin, İran-Turan, Avrupa-Sibirya ve Akdeniz fitocoğrafik bölgeyi içinde barındırması, yüksek tarım potansiyeline ve zengin bitki örtüsü sahip olması ülkemizi önemli bir gen merkezi haline dönüştürmüştür. Türkiye, bitki muhteviyatlı kimyasallar, bitkisel ilaç, katkı maddeleri, gıda, parfümeri ve kozmetik alanlarında hammadde sağlayan bitkisel ürünü florasında bulundurmaktadır (Gül ve Dinler, 2015).

Türkiye'nin geniş yüzölçümü ve bitki çeşitliliği gibi özellikleri tıbbi ve aromatik bitkilerin ticaretinde önde gelen ülkelerden biri olmasını sağlamıştır. Kategori olarak incelediğimizde bitki kimyasalları, bitkisel ilaç, katkı maddeleri, gıda, kozmetik ve parfümeri sanayileri bitkisel ürünlerin en önemli getirileridir. Tıbbi ve aromatik bitkiler Marmara, Akdeniz, Ege, Doğu Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nden toplanmaktadır. Tıbbi ve aromatik bitkilerde sürdürülebilir üretim yapmakla beraber pazar potansiyelinin de yeterince değerlendirilebilmesi için bu ürünlerin istenen miktar ve kalitede olması gerekmektedir. Tüketici ve sanayi taleplerine yanıt vermek için aynı zamanda standart ürünlerin ıslah edilmiş çeşitlerin geliştirilmesi de büyük ölçüde önemlidir. Sürece uygun olarak ekolojik şartların belirlenmesi, bitkilerin zarar görmeden zamanında toplanması, hasat sonrası işlemler ve işleme teknolojisinin belirlenmesi kalite ve süreklilik için hayati önem taşımaktadır. Bu doğrultuda tıbbi ve aromatik bitkilerin üretim ve pazar imkanlarının artırılabilceği bildirilmiştir (Bayram ve ark., 2010; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu, 2011).

Tıbbi ve aromatik bitkilerden yararlanılarak üretilen modern ilaç preparatları diğer ülkelerde geleneksel ilaç ya da bitkiseller olarak tanımlanmaktadır. Avrupa İlaç Değerlendirme Ajansı'nın (EMA) tanımı ise "Herbal Medicinal Products" yani Tıbbi Bitkisel Ürünler şeklindedir (Kartal, 2004).

Hastane enfeksiyonlarına neden olan birçok bulaşıcı hastalık etkeni mikroorganizmanın antibiyotiklere karşı direnç kazandığı bilinmektedir (Janovská ve ark., 2003; Hussain ve ark., 2011; Berber ve ark., 2013). Ayrıca, birçok antiparaziter, antifungal ve antiviral ilaçlar toksik etkilerinden dolayı sınırlı kullanıma sahiptir. AIDS hastaları ve kemoterapi tedavisi gören bağışıklık sistemi baskılanmış bireyler için bu antibiyotiklerin kullanımı ciddi sonuçları da beraberinde getirmektedir (Maregesi ve ark., 2008; Berber ve ark., 2013).

Antimikrobiyal ilaçlara karşı mikroorganizmaların dirençlerinin artması, yeni nesil ilaç üretiminin hem pahalı hem de canlılar için daha çok zarar verici yan etkilere sahip olması, ilaç sektörünün mikroorganizmalara karşı yeni alternatif antimikrobiyal etken maddelerini keşfetmeye yönlendirerek bu alanda daha çok araştırma yapmaya sevk etmiştir (Singh ve ark., 2011; Berber ve ark., 2013).

Bitkilerden elde edilen doğal ürünler, geleneksel ve etnik tıpta birçok hastalıkların tedavi edilmesinde kullanılmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalar son zamanlarda giderek artış göstermektedir. Denizlerden, yağmur ormanlarından, kaplıcalardan vb. gibi birçok farklı yerlerden gelen doğal bileşikler ile bakteriler, mantarlar, bitkiler, protozoonlar, süngerler ve omurgasız canlılar gibi birçok organizmalar üzerinde araştırmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen maddelerin yapısal özelliklerinin etkileyici olması nedeniyle, ilaç firmaları öncelikle yeni ve daha etkili fitokimyasallar bulmak amacıyla rekabet etmeye başlamışlardır. Bitki kaynaklı alkaloidler, terpenler ve fenolikler gibi birçok yeni doğal ürün grubunun antiparazitik özellikleri, bulunmuş ve tanımlanmıştır (Değerli ve ark., 2011 a).

Dünyada en yaygın halk sağlığı problemlerin başında parazitler hastalıkları gelmektedir. Parazitler için endemik olan bölgede yaşayan devletler çok büyük ölçüde ekonomik kayıplar yaşamaktadırlar. Parazitler hastalıklarının kontrolünde en önemli aşama etkili bir tedavinin uygulanmasıdır. Parazit enfeksiyonlarının tedavilerinde kullanılan ilaçlar için ar-ge çalışmaları çok sınırlıdır Ancak bu hastalıklara gereken önem yeterince verilmemiştir. Parazitler hastalıklarının etkin ve başarılı bir şekilde tedavisi kontrolünde çok önemli yere sahiptir. Günümüzde kullanılan antiparazitler ilaçlar sınırlı sayıda bulunmaktadır ve bu ilaçlara karşı da parazitlerin direnç gelişimi bildirilmektedir. Ülkelerin sosyoekonomik düzeyi düşük kesimlerinde yaygın olan bu hastalıklara karşı tedavi geliştirilememiştir. İlaçların birçoğunun etki mekanizmasının tamamen aydınlatılamamış olması da çalışmaların maliyetini yükseltmektedir. Parazitlere karşı seçici toksisite gösteren ilaçların geliştirilmesi parazitlerin ökaryot yapıda olmalarından dolayı daha da zorlaşmaktadır (Liu ve Weller, 1996; Leder ve Weller, 2003; Ergüven, 2012).

Parazit kökenli hastalıklara neden olan serbest yaşayan bir amip türü olan *Acanthamoeba* türüdür. Diğer serbest yaşayan amip türlerine kıyasla çevresel ortamlarda daha fazla bulunmaktadır. Su, toprak ve havayla yayılmaları oldukça kolaydır. Bu kaynaklarla temas halinde olan bireylere yerleşip hastalık oluşturabilme kapasiteleri oldukça yüksektir. Bununla beraber immün sistemi baskılanmış, organ transplantasyonu yapılan kişilerde, AIDS hastalarında ve kanserli bireylerde hastalık oluşturma riski daha fazladır. Yetersiz beslenme ve devamlı stres altında kalan

bireylerde de aynı durum söz konusudur (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Yünlü ve ark., 2015).

Son yıllarda lens kullananların sayısının artmayla beraber *Acanthamoeba keratiti*'ne (AK) karşı yeni ilaç arayışları da hız kazanmaktadır. Bitkisel kaynaklardan içerdikleri anti-mikrobiyal etken maddelerinden dolayı ilaç hammaddesi olarak yararlanılmaktadır.

Acanthamoebasis'e karşı kullanılan ilaçların çoğunun toksik etkileri vardır. Mikroorganizmalar ilaçlara karşı direnç te geliştirebilmektedir. Bu nedenle daha etkili, yeni ve güvenilir ilaçların üretilmesi için farklı doğal kaynaklara ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni ve daha aktif bileşenlerin bulunması için en etkili yol doğal bitkiler hakkında daha fazla bilgi edinmektir.

Artemisinin, kinin ve likokalkon A gibi bitki türevi olan ürünlerden ve Streptomyces gibi mikroorganizmalardan izole edilen, amfoterisin B ve ivermektin gibi bileşenler önemli antiparazitiklerdir. Moleküler yapıda olan birçok doğal ürün laboratuvar ortamında antiparazitik etki göstermiş ve bu konuda ihtiyaç duyulan yeni antiparazitiklerin gelişimleri için öncülük etmiştir (Tepe ve ark., 2011).

Ulaştığımız kaynak bilgilerine göre, *B. oleracea var. viridis* L. ve *S. exselsa* L. yaprak özütlelerinin amoebisidal aktivitesi daha önce çalışılmamıştır. Bu durum dikkate alındığında, çalışmanın amacını bu iki bitkinin *Acanthamoeba* trofozoitleri üzerinde in-vitro amoebisidal aktivitesinin araştırılması oluşturmuştur. Çalışmadan elde edilecek yaygın etkiler; çalışma sonucunda elde edilecek verilerin, ülkemizin bitkisel kaynak kullanımına önemli ölçüde katkıda bulunması beklenmektedir. Antimikrobiyal ve amoebisidal etkileri klinik olarak kanıtlanmış çeşitli ilaçların (metronidazol, streptomycin, sefalosporin grubu antibiyotikler vb.) uzun süreli kullanılmaları sonucunda ortaya çıkan yan etkiler, bilimsel ve toplumsal bir sorun haline gelmiştir. Elde edilen verilerle bu sorunları ortadan kaldırabilecek alternatif çözüm yolları aranacaktır. Aynı zamanda özellikle paraziter enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir fitokimyasalların düşük dozları belirlenerek farmasötik endüstri alanı için önemli kazanımlar elde edileceği düşünülmektedir.

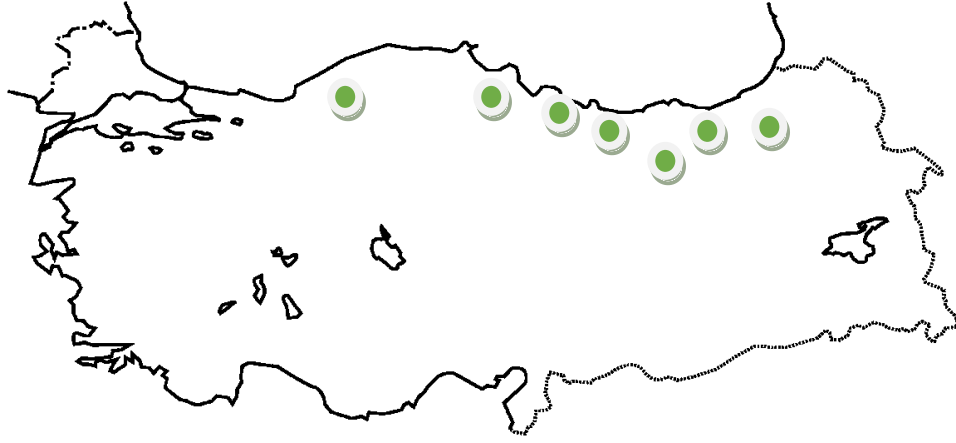
1.1 Çalışmada Kullanılacak Bitkiler Hakkında Genel Bilgi

1.1.1 *Brassica oleracea* var. *viridis* L.

B. oleracea var. *viridis* L. turpgiller familyası içerisinde yer alır. Yabani lahana olarak bilinen kara lahana yaklaşık olarak 50-60 cm kadar boyolanabilen, kazık köklü, açık sarı çiçekleri bulunan, sert saplı ve geniş yapraklı bir bitkidir. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde (Ordu, Giresun, Trabzon, Rize, Artvin) halkın temel besin kaynağıdır. Her mevsim tüketilen bu sebzenin adı eski Yunanca'da 'yenilebilen sebze' anlamındadır. İklim istekleri bakımından seçici olmayan *B. oleracea* var. *viridis* L. kışlık sebze içerisinde yer alan, ılıman bölgelerde geniş bir yayılma alanına sahip olan bir bitkidir. Yağıştan zarar görmezler, hava nemi yüksek deniz ve göl kenarlarında daha iyi gelişirler. Su tutma kapasitesi yüksek drenajı iyi olan ve pH: 6-6.5 arasında olan toprakları daha çok severler. Çiçeklenmeleri için 10 °C derece altında sıcaklığa gereksinim duyarlar (Anonim 2017a). *B. oleracea* var. *viridis* L. görüntüsü Şekil 1.1' de, Türkiye'deki yayılış alanı Şekil 1.2'de ve sistematigi hakkındaki genel bilgiler Çizelge 1.1'de gösterilmektedir.



Şekil 1.1 *B. oleracea* var. *viridis* L. görüntüsü (Anonim, 2017b).



Şekil 1.2 *B. oleracea* var. *viridis* L. nın Türkiye'deki yayılış alanı (Anonim, 2017c)

Çizelge 1.1 *B. oleracea* var. *viridis* L. nın sistematigi (Anonim, 2017d)

Alem:	Plantae
Şube:	Magnoliophyta
Sınıf:	Magnoliopsida
Takım:	Brassicales
Aile:	Brassicaceae
Cins:	<i>Brassica</i>
Tür:	<i>B. oleracea</i> var. <i>viridis</i> L.

1. 1. 2 *Smilax excelsa* L.

S. excelsa. dikenucugiller familyasında bulunan ve melocan, silcan ve diken ucu olarak bilinen, yaklaşık 20 m ye kadar boylanabilen, tırmanıcı, dikenli, çok yıllık bir türdür. Ülkemizde Düzce, İstanbul, Zonguldak, Antalya, Artvin, Aydın, Hatay, Muğla, Samsun, Sinop, Tekirdağ, Trabzon'da yaygın olarak bulunur. Dünya üzerinde ise Bulgaristan ve Yunanistan'da bulunmaktadır (Anonim, 2017b). *S. excelsa* hakkında genel bilgiler Çizelge 1. 2.'de verilmiştir.

Çizelge 1.2 *S. excelsa* hakkında genel bilgiler (Anonim, 2017b).

Yaşamı	Çok yıllık
Yapısal durum	Otsu
İlk çiçeklenme ayı	Mayıs
Son çiçeklenme zamanı	Haziran
Yaşama Bölgesi	Ormanlar, çalılar, makiler
Yükseklik	0 – 760m
Endemik	Endemik değil
Türkiye bulunurluk	Karadeniz, Güney Doğu Anadolu
Genel dağılımı	Bulgaristan, Yunanistan

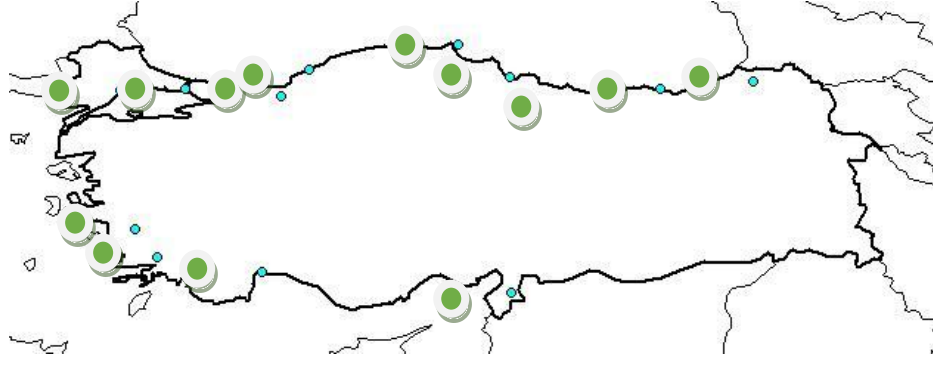
Kışın bitmesiyle beraber ilkbahar aylarında bitki ilk sürgünleri vermeye başlar. Büyüyen yeni sürgünler sebze olarak tüketilmektedir. Bitki yaprağının genel şekli dikensiz, yüreksi, yuvarlak olmakla beraber bazen yaprak kenarları dikenli olabilir. Şemsiye biçiminde olan yaprakları, mayıs ayında yeşil ve sarı tonlarında açar ve çiçeklilik zamanı yaklaşık bir aydır. Meyve büyüklüğü bezelye tanesi iriliğinde, tohumları kapalı tohum özelliği gösteren ve olgunlaşma süresinde siyah ya da koyu kırmızı renkte yaprakları bulunmaktadır (Anonim 2017e). İlkbaharın gelmesiyle daha çok yol kenarlarında, orman kenarları ve çalılıklarda yetişebilen bitki türüdür (Anonim, 2017f). *S. excelsa*'nın Türkiye'nin Karadeniz Bölgesi'nde, günlük diyetle yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. *S. excelsa* yapraklarının su, infüzyon, etanol ve etil asetat ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini değerlendirmek için farklı antioksidan testleri yapılmıştır. Yapılan testlerin sonuçları doğal ve sentetik antioksidanlarla karşılaştırılmıştır ve bitkinin yapraklarının önemli bir doğal antioksidan kaynağı olduğu belirlenmiştir (Ozsoy ve ark., 2008). *S. excelsa*'nın sistematigi Çizelge 1.3'te, görüntüsü Şekil 1.3'te, Türkiye'deki yayılış alanı Şekil 1.4'te verilmiştir.

Çizelge 1.3 *S. excelsa* 'nın sistematigi (Anonim, 2017b).

Alem : Plantae
Şube : Magnoliophyta
Sınıf : Eudicots
Takım : Liliales
Aile : Dikencugiller
Cins : *Smilax*
Tür : *Smilax excelsa* L.



Şekil 1.3 *S. excelsa*'nın görüntüsü (Anonim, 2017g).



Şekil 1.4 *S. excelsa* bitkisinin Türkiye’ki yayılış alanı (Anonim, 2017b)

1.2 Mikroorganizmalar

1.2.1 *A. castellani* Hakkında Genel Bilgiler

Castellani tarafından, *Cryptococcus pararoseus* kültürlerinde *Acanthamoeba* cinsi amipler ilk defa 1930 yılında bulunarak tanımlanmıştır. Sınıflandırılması ise ilk olarak Volkonsky tarafından 1931 yılında yapılmıştır (John, 1998; Aydın, 2008) *Acanthamoeba* cinsinin en son sınıflandırması Çizelge 1.4’te verilmiştir.

Çizelge 1.4 *A. castellani* sistematigi (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003).

Alem	: Protista
Şube	: Rhizopoda
Sınıf	: Lobosea
Altsınıf	: Gymnamoebia
Takım	: Centramoebia
Sınıf	: Acanthamoebidae
Cins	: <i>Acanthamoeba</i>
Tür	: <i>Acanthamoeba castellani</i>

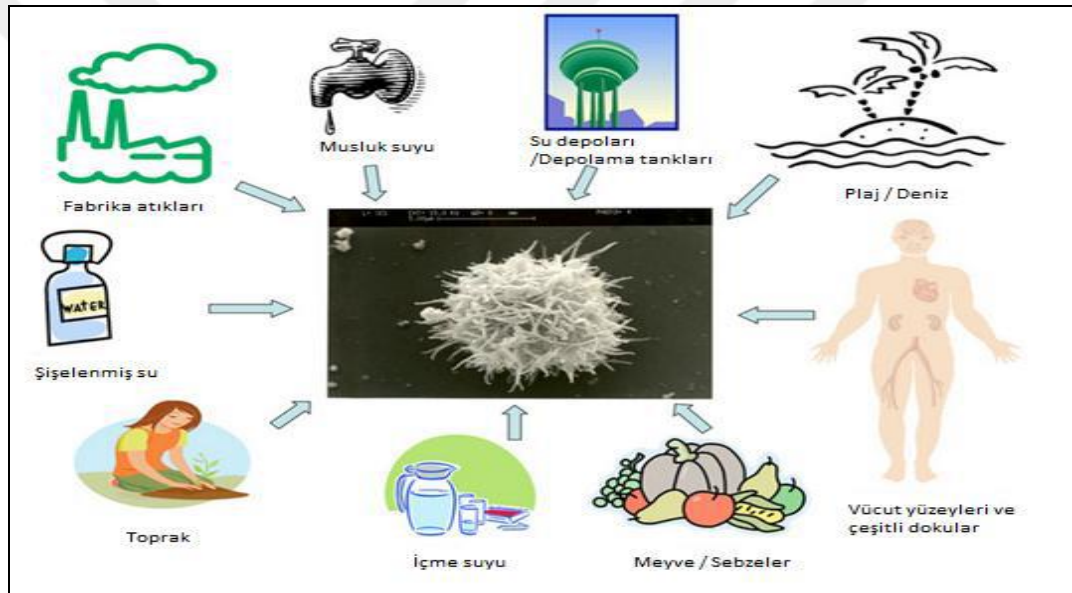
1.2.1.1 *Acanthamoebae* spp. Yaşam Alanları

Serbest yaşayan Amip’lerden (SYA) olan *Acanthamoebae*, tatlı sular, deniz suyu, toprak ve havadan izole edilebilir. Musluk suyu, maden suyu, laboratuvarlarda damıtılmış sular, bu suyla temizlenmiş malzemeler, klorlu yüzme havuzları, kanalizasyon ve kontakt lens sıvıları yaşam alanlarıdır (Ertabaklar ve ark., 2006).

Doğada yaygın olarak topraktan, tozlardan, havadan, kaplıca sularından, deniz suyundan, yüzme havuzlarından, lağım sularından, çamurdan, çeşme sularından, diş tedavi ünitelerinden, diyaliz ünitelerinden, bakteri, maya ve hücre kültürlerinden,

bitkilerden, hayvanlardan, sağlıklı insanların burun ve boğazlarından, kontakt lenslerden, lens saklama kaplarından, lens temizleme solüsyonlarından, dışkıdan, infekte hastaların beyin ve akciğer dokusundan, deri lezyonlarından ve korneal dokulardan izole edilmişlerdir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Khan, 2006; Visvesvara ve ark., 2007).

Acanthamoebae klima sistemlerinde, duşlarda ve diyaliz makinelerinde de bulunur. Amiplerin trofozoit ve kistleri okyanus tortularında, burun-boğaz mukozal sürüntülerinde de bulunmuştur (Derda ve ark. 2015). *Acanthamoeba* türlerinin yaşam alanları Şekil 1.5'te gösterilmiştir.



Şekil 1.5 *Acanthamoeba* spp.'nin yaşam alanları (Kaynak, 2017)

A. castellani, besinlerini, yaşadıkları alanlarda bulunan bakteri, alg ve mantarlardan sağlamaktadırlar. Partikül halinde bulunan besinleri fagositoz ile alırlar. Sıvı ortamda erimiş halde bulunan besinleri ise pinositoz ile alarak beslenebilirler (Aydın, 2008).

Acanthamoeba türlerinin organelleri, karakteristik bir ökaryot hücredeki gibi olup golgi kompleksi, mitokondri, pürüzsüz ve kıvrımlı endoplazmik retikulum, dağınık ribozomlar, besin kofulları ve mikrotubulleri bulunmaktadır. Sitoplazmik içerik, üç katlı plazma membranıyla çevrilidir. Sitoplazmada, hücrenin su dengesini kontrol eden kontraktıl vakuoller bulunmaktadır. Çekirdek tek olup, büyük ve merkezi bir

çekirdekçiğe sahiptir. Üreme, eşeysiz olarak, mitoz bölünme şeklindedir (Saygı, 2002; Aydın, 2008).

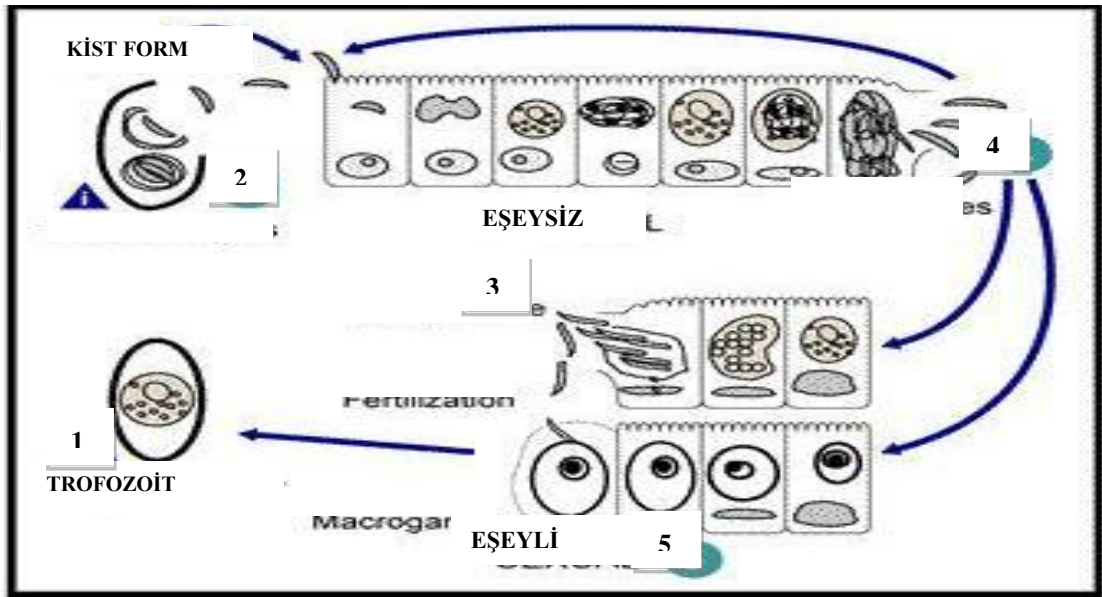
1.2.1.2 *Acanthamoeba*'nın Hayat Devri

Yaşam döngüsü olarak *Acanthamoeba*, iki forma sahiptir. Birinci form olan trofozoit formu çoğalan, büyüeyebilen, hareket edebilen aynı zamanda beslenebilen bir formdur. İkinci form olan kist formu ise olumsuz dış etkenlere karşı dayanıklı olan formdur. Canlılığı tehlikeye girdiğinde trofozoit formdan kist formuna rahatça geçiş sağlayabilmektedir. *Acanthamoeba* trofozoit formunun boyutları 25–56 µm'dir. Ağır hareket etmelerini sağlayan lopopod ve akantapod olarak adlandırılan sahte dikenli ayakları bulunmaktadır (Polat ve ark., 2007a).

Acanthamoeba trofozoitin sitoplazmaları endoplazma ve ekdoplazma olmak üzere iki bölüme ayrılır; ektoplazma kısmı yumurtanın beyaz akışkan kısmı kıvamında, şeffaf görünümlüdür. Hareket kabiliyetini ve dış etkenlere karşı kendini savunmasında önemli rol oynamaktadır. Endoplazma yapı olarak granüler bir durumdadır. Beslenme faaliyeti, kontraktıl vakuelleri bulundurmasıyla beraber çekirdek gibi canlının tüm hayati organellerinin içinde barındırdığı kısımdır. Veziküler yapıda olan çekirdek kısmı canlı içinde bir ya da daha çok bulunabilir. Üremeleri, mitoz ya da promitozla ortadan ikiye bölünerek gerçekleşir (Saygı ve Polat, 2003). Kıvrımlı ve düzgün şekilde bulunan endoplazmik retikulum (ER), serbest ribozomlar, mitokondrium, mikrotubuller, besin vakuelleri, ve golgi kompleksi gibi hücre içi organellere sahiptir. Trofozoit yapısındaki sitoplazmik yapı, üç katmanlı bir plazma membranı ile sarılıdır. Sitoplazma kısmında hücre içi su giriş çıkışlarını kontrol eden kontraktıl kofullar (vurgan koful) mevcuttur. Tek çekirdeği bulunan *Acanthamoeba*'da, büyük ve merkezi bir çekirdekcik mevcuttur. Genel olarak tek çekirdekli olmasına rağmen, sıvı ortamlarda bulunan trofozoitler çok çekirdekli olabilir (Saygı, 2002).

Tek çekirdekli ve yuvarlak görünüme sahip olan kistlerin, çeperleri endokist ve ektokist olarak adlandırılan iki kısımdan oluşmaktadır. Hafif kıvrık olan dış tabaka ile polihedral görünümünde iç tabakası bulunmaktadır. Kistlerin boyutu 13-20 µm arasında değişmektedir. Dezenfektanlara, klora, antibiyotiklere karşı dirençli olan bu kistler düşük sıcaklıklarda (0-2 °C) canlı kalırlar. Gerekli çevre koşulları oluştuğunda

kistlerden trofozoit formuna geçebilirler. *Acanthamoeba* türlerinin kist morfolojisi, agar plakları üzerinden bile kolayca görülüp ayırt edilebilir (John, 1998; Polat ve ark., 2007a; Aydın, 2008). Hava aracılığıyla taşınan kistler, *Acanthamoeba* türlerinin çevreye yayılmasına ve bunların uygun konaklara ulaşmasında rol alırlar. Uygun koşullar bulunduğunda kistler çok uzun süreler patojenitesini koruyarak canlı kalabilmektedir (Madencioğlu, 2014). *Acanthamoeba* türlerinin hayat formları Şekil 1.6'da gösterilmiştir.



Şekil 1.6 *Acanthamoeba* türlerinin hayat formları 1: Trofozoit 2) Kist Form 3:Eşeyli 4:Eşeyli (Anonim, 2018ı)

1.2.1.3 *Acanthamoeba*'nın Morfolojik Özellikleri

Morfolojik olarak tür düzeyinde ayırım yapmak oldukça zordur. *Acanthamoeba* türleri, morfolojik olarak kist büyüklüğü ve biçimine göre 3 sınıftan oluşur:

Grup I: İç duvarlardan (endokist) açıkça ayrılmış yuvarlak dış duvarlara (ektokist) sahip geniş kistler bu gruptadır.

Grup II kistleri: Değişken endokist şekilleri ile daha küçüktür. Ektokistleri buruşuk görünümdeyken endokist poligonal, yıldız, üçgen veya oval biçiminde görülür.

Grup III kistleri: Grup II kistlerine göre daha az olup, duvarları iyi ayrılmamıştır. Temel insan patojenleri Grup II'ye ait olmakla birlikte, Grup III'ten *Acanthamoeba*

culbertsoni de tanınmış bir patojendir (Illingworth ve Cook, 1998; John, 1998; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Aydın, 2008).

Çizelge 1.5 *Acanthamoeba* spp.'nin morfolojik olarak gruplandırılması (Illingworth ve Cook, 1998; Ergüden, 2015).

Grup I	Grup II	Grup III
<i>A. astronyxis</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. lenticulata</i>
<i>A. commandoni</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. culbertsoni</i>
<i>A. echinulata</i>	<i>A. tubiashi</i>	<i>A. healyi</i>
<i>A. pearcei</i>	<i>A. griffini</i>	<i>A. jacobsi</i>
<i>A. tubiashi</i>	<i>A. rhysodes</i>	<i>A. palestinensis</i>
	<i>A. divionensis</i>	
	<i>A. hatchetti</i>	

Kist ve trofozoitlerin morfolojik boyutları türler arasında farklılık göstermektedir. Hem trofozoit hem de kist formu büyük, yoğun, merkezi bir çekirdekçiğe sahip ve tek bir çekirdek ile karakterizedir. Trofozoit form olumsuz çevre şartlarında hücre farklılaşmasıyla çift duvarlı kist formuna dönüşmektedir. (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Khan, 2006; Madencioğlu, 2014).

1.2.1.4. *Acanthamoeba* Türlerinin Sebep Olduğu Hastalıklar

Acanthamoeba türleri başka türlere kıyasla her türlü ortamda fazlaca bulunmaktadır. Su ve toprakla ilişkisi bulunan insanlarda SYA'nın vücuda yerleşmesi, aynı zamanda hastalık yapma durumu oldukça yüksektir. Bağışıklık sistemi zayıflamış hastalarda, kanser hastalarında, AIDS hastası ya da organ nakli yapılan kişilerde çok kolay hastalık oluşturabilirler. Ayrıca immün sistemi baskılayıcı ilaçlar, dengesiz ve yetersiz beslenme yüksek strese maruz kalan insanlarda hastalık oluşturma olasılığı yüksektir (Yünlü ve ark., 2015).

Şimdiye kadar belirlenmiş *Acanthamoeba* spp.'nin 18 alt türü bulunmaktadır. Aynı zamanda bir çok viral bakteri kaynaklı hastalığın da bulaşmasında etkili olduğundan klinik açıdan da oldukça önemli bir konumdadır (Barker ve Brown, 1994; Marciano ve Cabral, 2003; Horn ve Wagner, 2004; Ertabaklar ve ark., 2007).

Çizelge 1.6 *Acanthamoeba* türlerileri ve sebep olduğu hastalıklar (Siddiqui ve Khan, 2012; Kaynak, 2017).

<i>Acanthamoeba</i> Genotipleri	Neden Olduğu Hastalık
T 1	GAE
T 2a	AK GAE
T 2b	Henüz ilişkisi bulunmamıştır
T 3	AK
T 4	AK GAE
T 5	AK GAE
T 6	AK
T 7	Henüz ilişkisi bulunmamıştır
T 8	Henüz ilişkisi bulunmamıştır
T 9	Henüz ilişkisi bulunmamıştır
T 10	AK GAE
T 11	AK
T 12	GAE
T 13	Henüz ilişkisi bulunmamıştır
T 14	Henüz ilişkisi bulunmamıştır
T 15	AK
T 16	Henüz ilişkisi bulunmamıştır

Acanthamoeba türlerinden birkaçının (*A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. healyi* ve *A. divionensis*) GAE'ye sebep olduğu bilinmektedir. Özellikle HIV/AIDS'li hastalarda veya kronik hastalığı olan kişilerde, diyabet hastalarında, organ transplantasyonu yapılanlarda saptanmıştır. Kan-beyin bariyerlerinin invazyonu (istilası), bağ doku ve nöral zarar beyin fonsiyonlarının bozulmasına sebep olmaktadır. Amip alt solunum yollarından girerek, endovasküler alanı istila edip buradan kan dolaşımı ile yayılmaktadır. *Acanthamoeba*'nın 18S

rRNA genine odaklanarak belirlenen T1-T12 genotiplerinden AK'ye yol açan suşların çoğunun T4 genotipinde olduğu bildirilmiştir (Khan, 2006).

Acanthamoeba; kontakt lens takanlarda görülebilen *Acanthamoeba* keratiti (AK) yaygın olarak görülebilmektedir. Konukçularda *Acanthamoeba* keratiti (AK)'nden farklı olarak enfeksiyonlara, cilt lezyonlarına, pnömoni ve çoğu zaman öldürücü olan granülomatöz amibik ensefalit (GAE) gibi hasatalıklara da neden olmaktadır (Ertabaklar ve ark., 2006).

GAE nadir görülüyor olmasına rağmen çoğunlukla ölümcül seyretmektedir. 1972 yılında Jager ve Stamm hastalığı tanımlamışlardır. Kronik ve yavaş ilerleyen GAE'ye *Acanthamoeba* türlerinin sebep olduğu bilinmektedir. Merkezi sinir sistemi (MSS) ve akciğer enfeksiyonu ile karakterize bir hastalıktır. Genellikle immün sistemi zayıflamış bireylerde görüldüğü ileri sürülse de sağlıklı ve güçlü bireylerde de hastalık gözlemlenmektedir. Hastalık etkeni havadan burun yoluyla vücuda alınmaktadır. Kan damarları sayesinde yayılarak beyine ve oradan da MSS'ne ulaşır (Madencioğlu, 2014; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Siddiqui ve Khan, 2012; Khan, 2006).

Acanthamoeba keratiti (AK), sistemik bir hastalık oluşturmayan lokal bir göz enfeksiyonudur. İlk olarak 1974 yılında İngiltere de Nagington hastalığı bildirmiştir. Lens kullanımlarında görülen artış ve sağlıksız kullanımı ve su kaynaklı salgınların fazla olmasından dolayı 1980'lerden sonra görülme sıklığında artış olmuştur (Ertabaklar ve ark., 2009; Madencioğlu, 2014). GAE gibi bağışıklık sistemi zayıf bireylerde görüldüğü düşünülse de sağlıklı bireylerde de görülme oranı yüksektir. Ayrıca hastalık sonrası bağışıklık kazanma gibi bir durum da söz konusu değildir (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003; Madencioğlu, 2014).

AK'nin semptomları ise sırasıyla; şiddetli göz ağrısı, fotofobi, mavi-kırmızı görmedir. Pnömonide ise amoebae, akciğerlerde, trofozoitler ve kistler içeren seröz sıvının eşlik ettiği çok sayıda inflamasyon odağına neden olur. Tüm enfeksiyonlar tipik olarak kronik seyredir (Malatyalı ve ark., 2011a).

AK rahatsızlığı zamanında doğru tedavi uygulanmaz ise ileri derecede kornea zararları, görme yetisi kaybı aynı zamanda geç kalınması durumunda gözün tamamen

kör olmasının yanında yerinden çıkartılması da söz konusu olmaktadır (Yünlü ve ark., 2015).

Genel olarak AK teşhisine *Herpes simplex* ya da fungal türevli keratit şeklinde yanlış birçok tanı konulabilmektedir. İngiltere ve ABD’de ilk defa AK hastalığının varlığı tanımlanmıştır. Bu hastalığın sancılı belirtileri olduğu ve giderek görme kaybını yaşatan korneal zeminli bir rahatsızlık meydana getirdiği gözlenmiştir. Bunun yanında farklı *Acanthamoeba* türleri de *Acanthamoeba hatchetti*, *A. quina*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. lugdunensis*, *A. griffini* ve *A. rhyodes* AK hastalığına neden olduğu raporlara geçmiştir. AK hastalığı sayısındaki diğer bir artış nedeni ise kontakt lenslerin yanlış kullanımı ve lens solüsyonlarının hijyenik olmamasından kaynaklı olabilmektedir (Yünlü ve ark., 2015).

İnsan vücuduna yerleşen *Acanthamoeba* türlerinin bazıları Kutanöz akantamoebizise neden olup, AIDS virüsü barındıran insanlarda mevcut enfeksiyonun birçok organa yayılmasına aynı zamanda otit, sinüs lezyonları, kronik sinüs, kutanöz lezyonları gibi rahatsızlıkların da ortaya çıkmasına neden oldukları bilinmektedir (Polat ve ark., 2007b).

Staphylococcus sp. ve *Proteus* sp. gibi mikroorganizmaları içlerinde taşıyan bazı amip türleri bu hastalık etmenlerinin insanlara bulaşmasında rol oynarlar. *Legionella* türleri ile serbest yaşayan amipler doğal ya da yapay su ortamlarında birlikte bulunurlar. *Legionella*’ların bulunduğu yerlerden *Naegleria*, *Hartmannella* ve *Acanthamoeba* türlerini ayırtmak mümkündür (Yünlü ve ark., 2015).

1.2.1.5 Bulaşma Yolları

1. Hastalıklı bireylerle aynı ortamlarda bulunan sağlıklı bireyler arasındaki iletişim, cinsel ilişkide bulunan insanlar, okul öncesi eğitim alan çocuklar, sağlık personelleri, tarım ve hayvancılık sektörüyle ilgilenenler (Özcel, 2007; Özcel ve ark., 2007).
2. Günlük hayatta temas halinde bulunduğumuz tüm su kaynaklarının ookistler ile kirlenmiş olması
3. Sağlığa ve hijyene önem verilmeden hazırlanan ve çiğ tüketilen besinler (bazı et ve süt ürünleri)
4. Bağışıklık sistemi zayıf olan kişiler ve AIDS’li bireyler

5. Hastalık etkeni bulaşmış olan canlılar (kuş ve eklembacaklılar vb.) taşıyıcı konak olabilmektedir (Özcel, 2007).

SYA'lar günlük hayatta bire bir temas halinde olduğumuz birçok ortamda (toprak, hava, havuz, içme suyu ve kontak lensler vb.) bulunmakta ve bu noktalardan izolasyonu gerçekleştirilmektedir. Temiz ve mikrobiyal yönden hijyenik olmadığı bilinen surların kullanılması AK gibi hastalıklar açısından kesinlikle tehlike oluşturmaktadır. Bu tarz sularda muhafaza edilen lenslerde mantarların üremesi amibin mantarlarla beslenerek buraya yerleşmesine sebep olur (Markel ve ark., 1992, Khan ve ark., 2002, Seal, 2003).

Genellikle korneal yaralanma sonucu ortaya çıkan bir hastalık olarak görülse de AK'li hastaların % 85'inin sebebi kontakt lens kullanımındır. Yumuşak kontakt lenslerin kullanılması AK oluşması için uygun zemini hazırlamaktadır. Araştırma sonuçlarına göre AK vakalarının % 64 ile % 93 arasında yumuşak kontakt lens kullanımından kaynaklandığı belirlenmiştir (Jonathan ve ark., 2014; Page ve Mathers, 2013).

Genel olarak kontamine olmuş lens kutuları ve yumuşak kontakt lenslerle temas etmeden ellerin düzgün ve temiz bir şekilde yıkanmaması, lens kullanımından önce musluk suyu kullanılarak lenslerin temizlenmesi ya da evde yapılan tuzlu suyla temizlemek AK'nin bulaşması için uygun ortam oluşturmaktadır. Bunların yanı sıra *Acanthamoeba* spp. ile kontamine olmuş suların herhangi bir sebepten ötürü (yüzü yıkama, yüzme) direkt kornea dokusu ile teması halinde de AK oluşumu gerçekleşmektedir (Saygı ve Polat, 2003; Kobayashi ve ark., 2015). Tüm bu bulaşma yollarının yanı sıra AK'nin insandan insana bulaşmış olmasıyla ilgili bir rapor henüz kaydedilmemiştir (Ergüden, 2015).

1.2.1.6 *Acanthamoeba* spp.'nin Epidemiyolojisi

Acanthamoeba spp.'nin sebep olduğu hastalıkların gelişim süresi, vektörün kornea ya da bireye temas etmesi, organizmasının sayısı, etki etme gücü gibi faktörler ile ilişkisi olduğu mevcut araştırmalar sonucunda kanıtlanmıştır (Carnt, 2016; Gökpinar, 2010). Epidemiyolojik olarak bakıldığında AK'nin su kökenli bir geçmişi ve ya lens kullanımından kaynaklandığı bilinmektedir (Omana-molina ve ark., 2014). Literatüre

bakıldığı zaman AK olgularının çoğunun kontakt lenslere ait olduğu görülmektedir. (Pacella ve ark., 2013).

Dünya da Amerika, Avrupa, Afrika, Avustralya gibi birçok ülkelerden AK vakaları kayıtlara geçmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda sağlıklı bireylerin yutaklarından alınan örneklerde dahi pozitif kültür sonuçları elde edilmiştir (Ergüden, 2015).

1970'lerde AK hakkında ilk vaka gerçekleşmiştir. Olayda 3 hastadan 2'si korneal travmadan kaynaklanmaktadır. Nagington ve arkadaşları 1974'te ilk kez keratit olgusunu bildirmişlerdir (Alotaibi, 2011; Pacella ve ark., 2013). Amerikan'ın Dallas şehrinde 1973'te Oküler Mikrobiyoloji ve İmmunoloji topluluğunun yapmış olduğu toplantıda bir çiftçiyi enfekte ettiği belirlenmiştir (Yang ve ark., 2001). Belirlenen bu vakaların geçmişine bakıldığında kontakt lens kullanımının olmadığı görülmüştür. AK vaka sayısının 2004'te dünya geneline bakıldığında üç bine yaklaştığı görülmüştür (Schuster ve Visvesvara, 2004).

Kontakt lens kullanımının 1980 de artmasıyla AK'li hasta sayısında da artış olmuştur. 1973 ile 1988 yıllarında, ABD Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezleri'nin (CDC) sunmuş olduğu veriler sonucunda tehdit unsuru olarak kontakt lens kullanıcı yaşı, lensin 12 saatten fazla gözde kalması, lens ile birlikte yüzme gibi faktörlerin üzerinde durmuşlardır (Carnt, 2016).

AK vakası ülkemizde ilk defa 1996'da Elazığ'da ortaya çıkmıştır. İkinci vaka 1999'da İzmir de olmuştur (Akyol ve ark., 1996). Dünya genelinde yapılan çalışmalar sonucu ortaya konulan raporlara göre lens kullanıcılarının bir milyon da 17 – 70 dolaylarında görüldüğü bildirilmiştir (Omana-Molina ve ark., 2014). Aynı vakanın İngiltere'de görülme oranı 85 milyonda bir olarak kaydedilmiştir. Bu iki karşılaştırma arasındaki farkın sebebi sudaki kireç oranı olarak gösterilmiştir. Kireç kalıntısının fazla olduğu tesisat bölgelerinde *Acanthamoeba* spp.'nin bol miktarda olduğu belirtilmiştir. İngiltere ve Amerika'da merkezleri bulunan göz hastanelerinde yapılan kayıtlar sonucunda AK hastaların sayısında artma gözlemlenmiştir (Chawla ve ark., 2014).

1.2.1.7 Tanı

Gözde meydana gelen AK hastalığı *Herpes simplex*, *Pseudomonas aeruginosa* ve fungal keratit gibi hastalıklarla benzediğinden dolayı klinik olarak tanısını yapmak güçtür. Bu benzerlikten dolayı tanı kısmında yanlışlıklar meydana gelebilmektedir. Hastalığın tanısının yanlış yapılması tedavi için uygulanması gereken yöntemi yanlış olmasına, doğru ve geçerli olan tedavinin de gecikmesine sebep olmaktadır (Jhon, 2005). Ayrıca erken tanının yapılmış olması hastalığın tedavi edilebilmesini de arttırmaktadır. Tanının yapılabilmesi için hastalıklı bölgeden (kornea) sürüntü örneği almak yeterli olmamaktadır. Bunun yerine *Acanthamoeba*'nin trofozit veya kistlerini belirleyebilmek için biyopsi ya da korneal kazıntı yapmak daha doğru bir yöntemdir (Mazur, 1995; Jhon, 2005; Society, 2014).

Tanının doğru yapılabilmesi için farklı yöntemler bulunmaktadır:

- 1) Kültüre Almak: Hastalık etkeninin tanımlanabilmesi yönünden oldukça önemlidir. Etken vektörü (*Acanthamoeba*) olan amipin üremesi için birden fazla besiyeri vardır. Tanısı esnasında en sık tercih edilen besiyeri *Escherichia coli* ilave edilmiş besin değeri olmayan agardır. Hazırlanan bu besiyeri için uygun olan materyal de korneal kazıntıdır (Abduz ve ark., 2012). Yapılan bu işlemlere rağmen tanıda karışıklık olabilir. Bunun sebebi de hastadan kornea kazıntısı alınırken veya alındıktan sonra materyalin üzerine mantar veya bakteri bulaşmış olma ihtimalidir. Tanı için kültüre alma işlemi yapıldıktan sonra da sonuç negatifse yani üreme gözlenmemişse korneal biyopsiden kültür hazırlanmalıdır. Aynı zamanda da lens kaplarının ve lens temizleme sularından da örnekler alınarak kültüre alınmalıdır. Tüm bu yapılan tanı işlemlerinin sonucunun pozitif çıkmasına rağmen tanı için net bir şey söylenemez ancak *Acanthamoeba* olduğu düşünülebilir (Jhon, 2005).
- 2) Sitolojik Test: Bu tanı yöntemi de kendi içinde dörde ayrılmaktadır.
 - Antikor testi: Antikor testinin diğer bir adı İndirekt İmmunofloresan'dır. Bu yöntem sayesinde hastalıklı bireyden alınan örneklerde amipin varlığı tespit edilebilir. Varlığı tespit edilen antikorlar indirekt immunofloresan yöntemi ile belirlenebilir (Ergüden, 2015).

- Akridin Turuncusu: Akridin Oranj diye bilinen bu boyama tekniğiyle beyin omurilik sıvısından ve kornea kazıntısından alınan örnekler bu boya ile boyanır ve AK ile GAE'nin tanısı zahmetsiz ve seri olarak yapılmış olur. Boyama işleminde *Acanthamoeba* kistleri turuncu ve sarımsı bir renge boyanmaktadır (Magnet, 2014).
 - Calcoflour Beyazı: Normalde mantarları sınıflandırmada tanımlamada kullanılan bir boyama tekniğidir, ama kemofloresan özelliği olduğu için polisakkaritlere affinitesi vardır. Bundan dolayı trofozoit ve kistlerin tanısında da yararlanılmaktadır. Kolay ve seri sonuç veren bu yöntemden bahsetmek gerekirse; alınan örnek lama yayılır, 3- 4 dakika metil alkol ile tespit edilir. Ardından üzerine % 1'lik Calcoflour beyazı ve yine % 1'lik Evans Blue bir iki damla damlatılarak beş dakika bekletilir. Bekleme işleminden sonra boyanın fazlası uzaklaştırılarak lamelle kapatılıp mikroskopta incelenir. Boyama sonucunda *Acanthamoeba* kist duvarları parlak elma yeşiline boyanır ve trofozoitler ise kahverengi kırmızı arası bir görünümde boyanırlar (Jhon, 2005; El-Sayed ve ark., 2012).
 - Pamuk Mavisi: Laktofenol olarak da bilinen bu teknik oldukça hızlı sonuç vermektedir. Kazıntı örneği lama yayılarak üzerine bir damla pamuk mavisi damlatılır ve lamel kapatılarak ışık mikroskobu ile gözlemlenir. Amipin kist duvarı açığa çıkar ve diğer alanlara göre daha koyu maviye boyanır (Chu ve ark., 1998).
- 3) Konfokal Tanı: Bu yöntem son zamanlarda gelişmekte olan bir tekniktir. Konfokal kornea mikroskopi, korneanın dıştan içe doğru taranmasına imkân vermektedir. Binoküler mikroskopla görülemeyen yapıların konfokal mikroskoptaki büyütme katsayısının fazla olmasından dolayı görülebilme imkânı sağlar (Mattana ve ark., 2004). Böylelikle amiplerin in vivo olarak tanımlanması sağlanmış olur. Sitolojik testlerde kornea örneğine ihtiyaç olması, kültür sonucunun zaman alması ve büyük bölümünün pahallıya mal olmasından dolayı konfokal mikroskopi yöntemini avantajlı kılmıştır. Klinik olarak henüz kullanılmamasına rağmen avantajlı olmasının sebebi amipin

henüz yerleşmemiş yani hastalığın nüfuz etmeden de tanısını sağlamış olabilmektedir (Jhon, 2005; Gardiner, 2000; De Almeida ve ark., 2007).

- 4) PZR Yöntemi ile Tanı: Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) spesifik bir yöntem olmasından kaynaklı son zamanlarda oldukça umut vaat eden bir tekniktir. Kornea kazıntısına kesin ihtiyacın olduğu bu teknikte alınan materyalden DNA izolasyonu yapılır. Elde edilen DNA da *Acanthamoeba* primerleri kullanılarak PZR yöntemiyle hedef gen bölgesi tespit edilerek amibin varlığı kesinleşmiş olur. Teknik uygulanırken kesinlikle özen gösterilmesi zorunlu olan kısım *Acanthamoeba* spp. için kullanılacak olan primerin spesifik olması gerektirir. Ayrıca enfekteli bireyde henüz sadece 4-5 adet gibi az sayılarda amip bulunuyorsa PZR dışındaki yöntemlerle tanı yapılması oldukça zordur. Buna benzer durumlarda gözyaşından alınan örneğe PZR uygulanması tavsiye edilir. Sadece tanının yapılabilmesinin yanı sıra tedavinin sonuç verip vermediğini de kontrol edilmesi için de kullanılabilir (Mazur, 1995; Jhon, 2005).
- 5) FISH Yöntemi: Floresan In Situ Hibridizasyon yöntemi olarak bilinmektedir. Bu yöntem ile *Acanthamoeba*'ya özgü işaretlenmiş radyoaktif özellikte proplar gönderilerek AK'ın varlığı belirlenir. Spesifik olan bu diziler T4 probudur ve 22 bazdan meydana gelmektedir. Ayrıca 18S rDNA dizisinin komplementeridir. FISH tekniğiyle *Hartmannella* ve *Balamuthia* gibi hastalık etkenlerinin tanı işlemi yapılamaz (Matsuzaki ve ark., 2014).
- 6) RFLP Yöntemi: Açılımı Restriction Fragment Length Polymorphism'dir. Tanının konulması için kullanılsa da genellikle *Acanthamoeba*'nın hangi türünün hastalığa sebep olduğunu saptamak için kullanılmaktadır. Alınan örneğe *Acanthamoeba*'ya ait primerler kullanılarak PZR yöntemi uygulanıp varyasyon bölgeleri çoğaltılır. Daha sonra restriksiyon enzimi ile kesilerek restriksiyon endonükleazın tanıdığı bölgelerin niteliği baz alınarak türünün hangisi olduğu belirlenir. Mitokondrial 16S rRNA ve 18S rRNA *Acanthamoeba* cinsinin varyasyon belgeleridir (Jhon, 2005).

1.2.1.8 Acanthamoebiasis Tedavisi

Tedavi edilmeyen *Acanthamoeba* türlerinin neden olduğu hastalıkların çoğu serebral enfeksiyon kaynaklıdır. Hastanın ölümüyle sonuçlanmıştır. Oküler akantamoebiasis tedavisi ise genellikle uzun zaman alır ve çok etkili değildir. İlaç tedavisi, sadece birkaç vakada enfeksiyonun çok erken döneminde etkili olmuştur ve kullanılan ilaçların son derece toksik ve birçok önemli yan etkilere neden olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda enfeksiyonun geç evresinde çoğu ilaç etkili değildir (Derda ve ark., 2015).

Acanthamoeba enfeksiyonlarını kontrol altına almanın zor olmasının iki temel nedeni vardır; tanısal laboratuvarlarda amoebik enfeksiyonunu belirleyen belgelerin bulunmaması ve *Acanthamoeba* trofozoitlerinin ve kistlerinin klasik antiprotozoal ilaçlara karşı göstermiş oldukları daha yüksek direnç seviyeleridir. Bu zamana kadar *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının tedavisinde neomisin, propamidin izetionat, dibromopropamidin izetionat, paromomisin ve imidazol bileşikleri gibi etkili ve çok sayıda ilaç kullanılmıştır. Düşük dozlarda uygulanan bu ilaçların korneaya etkisinin az olması ve verilen ilacın direnç mekanizması nedeniyle tedavi metodlarının çoğu başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bu enfeksiyonlarda, en çok neomisin ve propamidin kullanılması trofozoitin çoğalmasını inhibe eder ve tedavide çok kullanılmasına neden olur. Neomisin ve propamidin tedavisinin birlikte kullanılması korneal epitel toksisitesi ortaya çıkarabilir. Bunun yanında kriyoterapi ve antibiyotik tedavisinin beraber kullanılması durumunda ise, iltihap artışına yol açmasına rağmen, kistik öldürücü etkiyi artırabilir, ancak bu teyit edilmelidir (Değerli ve ark, 2011b).

Acanthamoeba enfeksiyonlarında yok etmek zordur. Çünkü tıbbi tedavi kistlere genellikle trofozoitlerden daha az etkilidir. Kistlerin iki katmanlı sert duvarı onu anti-amoebik ilaçlara karşı oldukça dirençli hale getirir ve kistler başlangıçtaki başarılı tedaviden sonra bile hayatta kalabilirler. Başarısız bir tedavi hastalığın nüksetmesine neden olabilir. Ayrıca, ilaç direnci ve istenmeyen yan etkilerin ortaya çıkma riski önemli sorunlardandır. Bu nedenle, hastaların tedavilerine devam etmesini kolaylaştıran daha aktif ve dinamik terapilerin geliştirilmesi önemlidir. Bu bağlamda, geleneksel tıp tarafından kullanılan bitkilerin araştırılması alternatif tedavinin keşfi için önemli bir strateji oluşturmuştur (Nagwa ve ark., 2011).

Günümüzde *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının eradikasyonunda metronidazol ve emetin en sık kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçların genellikle uzun dönem kullanımı gerekmektedir. Ancak kullanıma bağlı olarak toksik etkiler ortaya çıkabilmekte veya mikroorganizmalar bu ilaçlara karşı direnç oluşturabilmektedir. Bu nedenle yeni, etkili ve daha güvenilir ilaçların geliştirilmesi için yeni kaynaklara ihtiyaç duyulmaktadır. Tıbbi bitkilerin bu amaçla taranması yeni aktif bileşenlerin bulunması için en etkili yoldur (Aydın, 2008).

Başarılı tedavilerde; katyonik antiseptikler (polihexametilen biguanid, klorheksidin), zar fonksiyonlarını inhibe eden, aromatik diamidinler (propamidin izetionat, heksamidin, pentamidin), DNA sentezini inhibe eden aminoglikozidler (neomisin, paromomisin), protein sentezini inhibe eden imidazoller (klotrimazol, flukonazol, ketokonazol, mikonazol, itrakonazol), hücre duvarlarını ve polienleri destabilize eden amfoterisin B gibi ajanların kullanıldığı bildirilmiştir (Nagwa ve ark., 2011).

1.2.2 *Escherichia coli*

E. coli fenotip olarak uç kısımları yuvarlak, düz 2-6 µm boyunda çomak şeklinde bir bakteri türüdür (Bilgihan, 1996). *Escherichia* türü, çok yaygın olarak insan ve hayvanların sindirim sistemlerinde bulunan mikroorganizmalardır. Buldukları canlıların sindirim kanallarında K vitamini başta olmak üzere birçok vitaminleri üretmektedir. *E. coli* fakültatif anaerob bir bakteri türü olduğu için bulunduğu ortamdaki oksijeni kullanır ve böylece sindirim kanalında oksijensiz bir zemin oluşmasını sağlar. Bazı *E. coli* türleri patojendir. Enteropatojen olarak adlandırılan bu türler K antijenine sahiptir. Canlıda ince bağırsak yüzeyine tutunurlar ve burada kolonize olurlar. Üretmiş oldukları enterotoksin maddesi çocuklarda ve bebeklerde ölümle sonuçlanan şiddetli ishallere neden olmaktadır. Aynı şekilde yaşlılarda, vücut direnci ve bağışıklığı zayıf insanlarda genellikle idrar yolları enfeksiyonlarına da sebep olmaktadır (Hasenekoğlu ve Yeşilyurt, 2007). *E. coli*'nin taksonomisi Çizelge 1.7.'de verilmiştir.

Çizelge 1.7 *E. coli*'nin taksonomik sınıflandırılması (Anonim, 2018i)

Alem : Bacteria
Şube : Proteobacteria
Sınıf : Gamma Proteobacteria
Takım: Enterobacteriales
Aile : Enterobacteriaceae
Cins : *Escherichia*
Tür : *Escherichia coli*

Bu çalışmada, *A. castellanii* (ATCC 30010) suşunun ksenik kültür ortamında in vitro çoğaltılması için *E. coli* (ATCC 25922) suşu kullanılmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Polat ve ark. (2007c) yılında yaptıkları bir çalışmada, Türkiye'den dört *Allium* türünün *A. castellanii*'ye karşı metanolik ekstraktının in vitro ortamda etkililiğini ve bunun in vitro korneal hücreler üzerindeki sitotoksitesini araştırmışlardır. *Allium* türlerinin 1.0 - 32.0 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda *A. castellanii* trofozoitleri ve kistlerin proliferasyonu üzerindeki etkisini in vitro olarak incelemişlerdir. *Allium* türlerinin korneal hücreler üzerindeki sitotoksitesinin belirlenmesi için agar difüzyon testleri uygulamışlardır. Test sonuçlarına göre, *Allium scrodoprosu* subsp. *rotundum*, *A. castellanii* üzerinde belirgin şekilde amoebisidal etki gösterirken, diğer türlerin aktif olamadıklarını belirlemişlerdir. *A. scrodoprosu* metanolik ekstraktının *Acanthamoeba*'ya karşı yeni bir doğal ajan olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun yanında biyolojik etkinliğini doğrulamak için in vivo test sistemleri ile değerlendirilmesi gerektiği kanısına varmışlardır.

Rodio ve ark., (2008), yaptıkları deneyde, *Pterocaulon polystachyum*'un (Asteraceae) bitkinin toprak üstünde kalan kısımlarından sağladıkları diklorometan, heksan ve metanol özütlerini *Acanthamoeba castellanii*'ye in-vitro çalışmışlardır. *A. castellanii*'ye uygulanan *P. polystachyum* özütleri sırayla 48. ve 72. saatte trofozoitlerin % 66'sı ve % 70'ini öldürmüştür. Bu etki ise *P. Polystachyum*'dan izole edilen heksan özütü olduğundan elde edilmiştir.

Derda ve ark. (2008) yılında yaptıkları bir çalışmada, *Solidago graminifolia*, *Solidago virgaurea*, *Pueraria lobata* ve *Rubus chamaemorus* bitki özlerinin amoebisit ya da amoebistatik aktivitelerini incelemişlerdir. Kullanılan bitkilerin çiçek, kök ve yaprak gibi kısımlarını kullanmışlardır. Akantamoebiasis için birlikte kullanılacak bir tedavi durumunda, bitki özlerinin hem harici hem de dahili olarak kullanılabilmesini belirlemişlerdir.

Nakisah ve ark. (2010), Malezya'da, bulunan Kapas, Perhentian, Redang Adaları ve Terengganu olmak üzere üç ayrı alandan topladıkları bir deniz süngeri olan *Aaptos aaptos*'un ham metanol özlerini in vitro ortamda *A. castellanii* üzerinde anti-amoebik potansiyelini incelemek üzere test etmişlerdir. Yapılan sitotoksikite ve genotoksikite araştırmalarından elde edilen bulgulardan, *A. aaptos*'un tüm metanol özlerinin *A. castellanii* 'ye karşı anti-amoebik özelliğe sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

Zahir ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada Güney Brezilya'nın yerli bir bitkisi olan *Croton pallidulus*, *C. isabelli* ve *C. ericoides*'in toprak üstü aksamlarından elde edilen uçucu yağları *A. polyphaga*'ya karşı test etmişlerdir. *C. ericoides*'in esansiyel yağının, 0.5 mg/ml konsantrasyonunda trofozoitlerin % 87'sini öldüren en aktif madde olduğunu belirtmişlerdir. *C. pallidulus*'un uçucu yağının, aynı konsantrasyonda trofozoitlerin sadece % 29'unu, *C. isabelli* 'nin uçucu yağının ise, 10 mg/ml konsantrasyonda trofozoitlerin yalnızca % 4'ünü öldürdüğünü belirtmişlerdir. En yüksek amoebisidal etkinliği, *C. ericoides*'in yağında olduğunu bildirmişlerdir.

Değerli ve ark. (2011b) yaptıkları bir çalışma ile Türkiye florasında yetişen ve endemik bir bitki türü olan *Allium sivasicum*'un toprak üstü aksamları ile rizomlarının, *Entamoeba histolytica* üzerinde in vitro amebisit aktivitesini değerlendirmişlerdir. Her iki ekstrakt da trofozoitler üzerinde zamana ve dozaja bağımlı olarak amebisidal etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Çıkan bulgulara göre ekstraktlar arasında, *A. sivasicum*'un rizomlarının, trofozoitler üzerinde en güçlü amebisidal etkiyi gösterdiğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak, çalışmada kullanılan bitki türünün *Entamoeba* enfeksiyonlarını tedavi etmede alternatif olabileceğini ortaya koymuşlar ve aktif fitokimyasalların saptanması için nicel olarak değerlendirilmeye ihtiyaç olduğu fikrini vurgulamışlardır.

Malatyali ve ark. (2011a) yılında yaptıkları çalışmada, Türkiye florasında endemik türler olan *Peucedanum longibracteolatum*, *P. chryseum*, *P. palimbioides* ve *P. caucasicum*'un metanol karışimli özütlerinin in vitro ortamda amoebisidal etkisini araştırmışlardır. Metanolik ekstraktlar (1.0 ile 32.0 mg/ml) varlığında, deney sırasında (72 saat) canlı *A. castellani* trofozoitleri ve kistlerinin sayılarını belirlemişlerdir. Tüm ekstraktların trofozoitler ve kistler üzerinde belli bir zaman ve doza bağımlı amebisit etki gösterdiğini vurgulamışlardır. Test edilen ekstraktlar arasında, *P. longibracteolatum*' un trofozoit ve kistler üzerinde en güçlü amoebisidal etkiyi gösterdiğini belirtmişlerdir. 32 mg/ml konsantrasyonda, 24 ve 72. saatler arasında canlı trofozoit veya kist saptayamamışlardır. Aynı konsantrasyonda kistlerin % 51'i ekstraktın 72. saatinde canlılığını kaybetmişlerdir. Ayrıca beklenildiği üzere, kistlerin ekstraktlara trofozoitlerden daha dirençli oldukları gözlenmiştir.

Malatyali ve ark. (2011b) yaptıkları bir çalışmada, *Satureja cuneifolia* ve *Melissa officinalis*'in metanolik ekstraktlarının in-vitro amoebisidal etkinliğini değerlendirmişlerdir. Deney süresi boyunca metanolik ekstraktların yaşayan *A. castellanii* trofozoitlerinin ve kistlerinin sayılarında azalma kaydetmişlerdir. Her iki bitki ekstraktında da zaman ve doza bağlı olarak amoebisid etki göstermiştir. Ekstraktlar arasında *Satureja cuneifolia*, trofozoitler ve kistler üzerinde en güçlü amoebisidal etkiyi gösterirken, *Melissa officinalis* ise orta dereceli amoebisidal etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Tepe ve ark., (2011), *Teucrium chamaedrys* ve *T. polium*'un metanol özütlerinin amoebisidal etkilerini gözlemlemişlerdir. Metanol ekstraktlarının (1.0 - 32.0 mg/ml yoğunluğunda) , *A. castellanii* trofozoitleri ve kistlerinin canlılığının zamanla orantılı olarak azalttığını kaydetmişlerdir. Bu iki bitki özütünde de kistler ve trofozoitler zaman ve yoğunluğa göre öldürücü etki tespit edilmiştir. Kullanılan özütlerin içinde *T. chamaedrys*'in, en fazla öldürücü etki gösterdiği anlaşılmıştır

Değerli ve ark. (2011a) yılında yaptıkları bir çalışmada, in vitro bir ortamda *Pastinaca armenea* ve *Inula oculus-christi* özütlerinin (1.0 ila 32.0 mg/ml aralığında), amoebisidal etkinliklerini değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sırasında canlı *A. castellanii* trofozoit ve kist sayılarının giderek azaldığı tespit edilmiştir. Her iki ekstraktın da trofozoitler ve kistler üzerinde zamana ve doza bağımlı amoebisid etki gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Test edilen ekstraktlar arasında *Inula oculus-christi*'nin trofozoitler ve kistler üzerinde en güçlü amoebisidal etkiyi gösterdiğini vurgulamışlardır.

Nagwa ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, *Pancreatium maritimum* L. (deniz daffodil), *Curcuma longa* L. (zerdeçal) ve *Arachis hypogaea* L. (yer fıstığı) etanol özütlerinin *A. castellanii* kistleri üzerinde in-vitro amoebisidal etkinliğini test etmişlerdir. Çıkan sonuçlara göre, *A. hypogaea*, *C. longa* ve *P. maritimum*'un etanol ekstraktlarının ilaç kontrolü klorheksidin ile karşılaştırıldığında *Acanthamoeba* kistlerine tüm ekstraktların, Klorheksidin'den daha fazla etkili olduğunu bulmuşlardır ve bu bitkilerin *Acanthamoeba* enfeksiyonlarına karşı uygulanabilecek yeni bir doğal ajan olarak düşünülebileceği fikrini göstermişlerdir.

Jiménez-Arellanes ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada, *Aristolochia elegans* rizomlarının hekzan ekstraktının antimikobakteriyel aktivitesini analiz etmişlerdir. Ayrıca aynı özütün antiprotozoal aktivitelerini de değerlendirmişlerdir. *A. elegans* türündeki iki bileşiğin (fargesin ve kübebin), antimikobakteriyel aktiviteye sahip olduğu ve hekzan özütündeki eupomatenoid-1 bileşiğinin ise *Entamoeba histolytica* ve *Giardia lamblia*'ya karşı önemli antiprotozoal aktiviteye sahip olduğunu da ortaya koymuşlardır.

Tepe ve ark., (2011) yaptıkları çalışmada, *Teucrium polium* ve *T. chamaedrys*'in metanolik ekstraktlarının in vitro amoebisidal etkinliklerini değerlendirmişlerdir. Metanolik ekstraktların (1.0 ile 32.0 mg / ml) *A. castellanii* trofozoitleri ve kistlerinin sayısında deney işlemi sırasında etkili olduğu tespit edilmiştir. Her iki özütün de trofozoitler ve kistler üzerinde zamana ve doza bağlı olarak amoebisit etki gösterdiğini bildirilmiştir. *T. chamaedrys* trofozoitler üzerinde en güçlü amoebisidal etkiyi göstermiştir. *T. polium* ise 32 mg/ml konsantrasyonunda 48 saat içinde canlı trofozoit kalmayacak şekilde etkili olmuştur.

Badria ve ark., (2014) yaptıkları çalışmada, *A. castellanii* kistlerine karşı *Helianthemum lippii* L. (güneş gülleri) etil asetat ve metanol özütlerinin in vitro ortamda etki mekanizmalarını ve amoebisidal potansiyelini incelemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda, iki özütün de *A. castellanii* kistleri üzerindeki amoebisidal etkilerinin klorheksidin ile karşılaştırılabilir sonuçlar vermesi, bu iki özütün güçlü etkilerinin olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda, etil asetat özütlerinin metanol özütlerine oranla daha etkili olduğu da belirlenmiştir.

Hafiz ve ark., (2016), *A. castellanii* kistleri üzerinde *Peganum harmala* bitkisinin metanol tohum özütünü amoebisidal etkisini denemişlerdir. Çalışma *P. harmala* bitkisinin *A. castellanii* üzerinde yüksek derece öldürücü etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

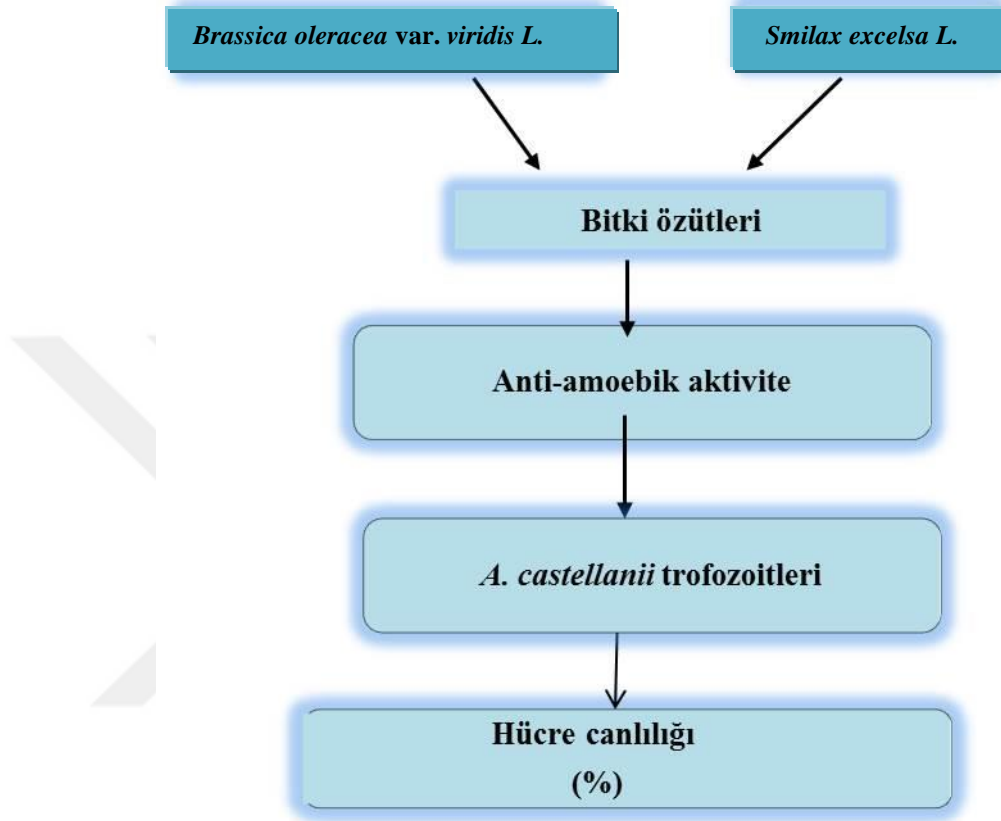
Derda ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, alkol, kloroform ve su ekstraktlarının *Artemisia annua* L. bitkisinin, genel tedavi, lokal tedavi veya akantamoebiasis tedavisinde antibiyotiklerle birlikte uygulanabileceğini belirtmişlerdir. Tedavi amaçlı uygulanan bu bitki özlerinin yalnızca in vitro değil, in vivo etkilerinin de olduğunu vurgulamışlardır. Amoebae ile enfekte edilmiş deney hayvanları üstünde yapılan

araştırmalarında da bu özütlein hayvanlarda yaşam sürelerini önemli ölçüde uzattığını göstermişlerdir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Bitki Özütlерinin *A. castellani* Trofozitoleri Üzerindeki Amoebisidal Etkisini Göstren Yöntemlerin Akış Şeması



Şekil 3.1 Bitki özütlерinin *A. castellanii* trofozitoleri üzerine in vitro amoebisidal etkisinin araştırılması analizinde kullanılan yöntemlerin akış şeması

3.2 Bitki Materyalleri

Çalışmamızda kullanılan kara lahana bitkisi (*B. oleracea* var. *viridis* L.) 07.01.2018 tarihinde Ordu ilinde bulunan Halk Pazarı'ndan alınmıştır. Melocan (*S. excelsa* L.) ise 25.01.2018 tarihinde Ordu ilinde bulunan Rus Pazarı'ndan alınmıştır. Şekil 3.1' de kara lahana bitkisinin Şekil 3.2'de ise melocan bitkisinin görüntüsü verilmiştir.



Şekil 3.2 *B. oleracea* var. *viridis* L. görüntüsü (Anonim, 2018j)



Şekil 3.3 *S. excelsa* görüntüsü (Anonim, 2018k)

3.3 Besiyerleri ve Solüsyonların Hazırlanması

3.3.1 Ringer Solüsyonunun Hazırlanması

Ringer solüsyonu için (Katalog no:1155250001, Merck) 2 tablet kullanılmış, toplam hacim 1000 ml olacak şekilde saf suda çözdürülerek hazırlanmıştır. Sterilizasyon için 20 dakika süreyle 121 °C sıcaklıkta otoklavda bekletilmiştir. Kullanılıncaya kadar 4 °C’de buzdolabında saklanmıştır.

3.3.2 İzotonik (% 0.85) Solüsyonunun Hazırlanması

Dezenfekte edilmiş bir spatülle 8.5 g sodyum klorür (NaCl) alınıp kalibresi yapılmış hassas terazide (Radwag AS220/C/2) tartımı yapılmıştır. Toplam hacim 1000 ml olacak biçimde saf suda çözdürülmüştür. Hazırlanan çözelti 20 dakika boyunca 121 °C sıcaklıkta otoklavlanmıştır (Nüve OT23B). Hazırlanan çözelti kullanılıncaya kadar 4 °C'de en fazla 1 ay muhafaza edilmiştir.

3.3.3 PBS (Phosphate Bufferet Saline) Solüsyonunun Hazırlanması

PBS solüsyonu için (Katalog no: P4417, Sigma) 1 tablet kullanılmış, toplam hacim 200 ml olacak şekilde saf suda çözdürülerek hazırlanmıştır. Sterilizasyon için 20 dakika süreyle 121 °C sıcaklıkta otoklavda steril edilmiştir. Kullanılana kadar 4 °C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.3.4 Ringer Agar Besiyerinin Hazırlanması

Steril bir spatül kullanılarak 3 g agar, stoktan (Katalog no: MC002, Lab M) alınarak hassas terazide tartım işlemi yapılmıştır. Toplam hacim 200 ml'ye ulaşacak şekilde önceden hazırlanan Ringer solüsyonu ilave edilerek ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. 15 dakika boyunca 121 °C'de otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra yaklaşık 50 °C sıcaklığa kadar sıcaklığı düştüğünde biyogüvenlik kabininde (Bilser Class 2A) 90 mm'lik steril petrilere dökülmüştür. Yapmış olduğumuz besiyeri oda sıcaklığında katılaştıktan sonra petrilerin etrafı parafilm ile muhafaza edilmiş ve 4 °C buzdolabına yerleştirilmiştir.

3.3.5 EMB (Eosin Methylene Blue) Agar Besiyerinin Hazırlanması

Stok kabından (Katalog no: CM0069B, OXOID) steril bir spatülle 18.75 g dehidre besiyeri alınarak hassas terazide tartım işlemi yapılmıştır. Toplam hacim 500 ml olana kadar saf su eklenmiştir. Manyetik karıştırıcıda çözdürme sağlanmıştır. 15 dakika boyunca 121 °C'de otoklavda steril edilmiştir. Daha sonra yaklaşık 50 °C sıcaklığa ulaştığında biyogüvenlik kabininde (Bilser Class 2A) 90 mm'lik steril petri kaplarına dökülmüştür.

3.4 *E. coli* Kültürü Hazırlanması

E. coli (ATCC 25922) suşundan EMB besiyerine steril öze kullanılarak biyogüvenlik kabininde ekim işlemi yapılmıştır. Etüvde (36 ± 1 °C) 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Görsel olarak sarı-yeşil metalik refle içeren *E.coli* kolonileri önceden hazırlanan PBS ile yıkanarak ependorf tüplerine alınmıştır.

3.5 *A. castellanii* Kültürünün Hazırlanması

3.5.1 Ringer Agar Besiyerinde *A. castellanii* Trofozoitlerinin Üretilmesi, Toplanması ve Sayımı

Önceden hazırladığımız Ringer agar besiyerlerine ilk olarak 1 ml *E. coli* süspansiyonu ilave edilmiş ve steril öze yardımıyla besiyerine dağıtılmıştır. Daha sonra *A. castellanii* trofozoit suşundan aynı besiyerine 300 µl ilave edilerek steril öze kullanılarak ekimi yapılmıştır. Üremeleri ve olgunlaşmaları için Etüve (Binder BD56) 26 ± 1 °C'de 3 gün süreyle bırakılmıştır. İnvirt mikroskop altında herbir petrideki ekim incelenerek, trofozoitlerin üremesi gözlenmiştir.

Üreme kontrol edildikten sonra trofozoitler zarar görmeden biyogüvenlik kabininde steril PBS solüsyonu ile 3 kez yıkanarak, steril öze ile yüzeyi hafifçe dokundurularak 15 ml'lik falcon tüplerine toplanmıştır. 10 °C ve 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj (ependorf centrifuge 5810R) edilmiştir. Santrifüj tamamlandıktan sonra süpernatantlar tüpten uzaklaştırılıp kalan sediment kısmına 1ml distie su konularak steril edilmiş ependorf tüplerinde saklanmıştır.

A. castellanii trofozoitlerinin sayımının yapılması için Thoma lamı kullanılmıştır. Santrifüjden elde ettiğimiz sedimentten 10 µl alınıp Thoma lamına yerleştirilmiştir. Işık mikroskopunda (LEICA, DM500) 40x büyütme kullanılarak trofozoit sayımı yapılmıştır. Thoma lamında mevcut olan kare bölmeler yardımıyla ml'deki trofozoit sayısı hesaplanmıştır. Trofozoit sayımı 16 büyük kare x sulandırma faktörü x 10 000 oranıyla hesaplanmıştır.

Trofozoitlerin canlılığını kontrol etmek için sedimentten 10 µl alınıp ependorf tüpüne konulmuştur. Aynı tüpün içine % 0,4'lük trypan blue (Sigma T-8154) ayırıcından 10 µl eklenip vorteksle karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında yaklaşık 3 dakika bekletilmiştir. Daha sonra trofozoit ve trypan blue karışımı içeren ependorf tüpünden

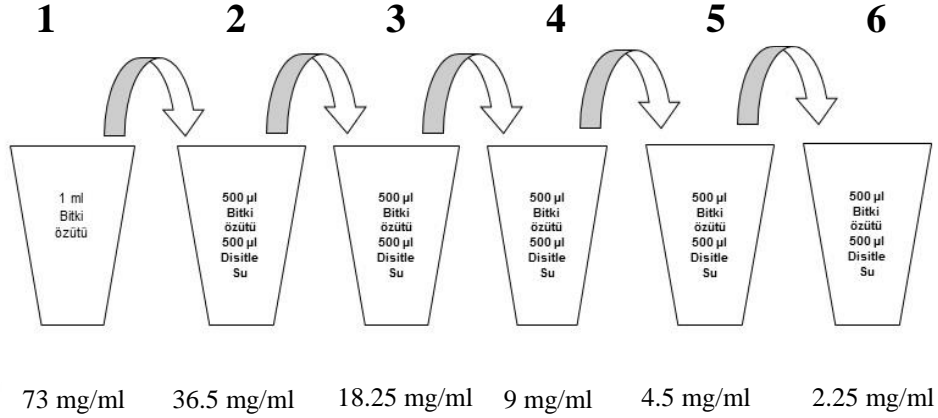
10 µl alınıp preparat hazırlanmıştır. Hazırlanan preparat 40x büyütmede ışık mikroskopunda incelenmiştir. Buradaki ayırıcı unsur boyayı içine alan trofozoitler ölü, almayanlar canlı olarak değerlendirilmiştir. Ölü olan trofoitler mavi renkle diğerlerinden ayrılmıştır.

3.6 Bitki Özütlerinin Hazırlanması

Çalışma için toplanan bitkiler ilk önce saf suyla yıkanmış daha sonra kurutma kağıdı kullanılarak fazla suları alınmıştır. Bitkilerin yapraklarının uç kısımlarından her biri için 60 g olacak şekilde hassas terazide tartım yapılmıştır. Tartım işlemi bittikten sonra üzerine 250 ml etanol (Sigma-Aldrich) eklenerek, bir öğütücü yardımıyla öğütülmüştür. Öğütülmüş karışım steril edilmiş 500 ml'lik payrex şişesine konulmuştur. Işık izolasyonunu sağlamak için payrex şişenin etrafı tamamen alüminyum folyo ile sarılmıştır. Daha sonra elde ettiğimiz karışımı homojen bir şekilde karıştırmak için 100 rpm hız ve % 40 ± 5 nem ve 20 ± 1 °C ye ayarladığımız çalkalayıcı (shaker) mikroklima cihazına (GROTECH GP08) konularak 72 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda cihazdan alınan karışım kaba filtre kağıdı yardımıyla süzülerek filtrasyonu yapılmıştır. Süzüntünün sterilizasyonu için içinde bakteri filtresi bulunan (por çapı: 0.22 µm) vakumlu filterelerden geçirilmiştir. Bu adımdan sonra elde ettiğimiz 200 ml'lik karışım iki farklı steril balon jojeye konulup 40 °C'deki Evaporatörde (Heidolph HB Digital) bekletilerek etanolün uçurulması sağlanmıştır. Altta kalan pellet steril distile su içinde çözdürülerek son konsantrasyonlar *B. oleracea var. Viridis* L. ve *S. excelsa* için 73 mg/ml olarak hesaplanmıştır. Elde edilen özütler daha sonra çalışmada kullanılmak üzere 4 °C'deki buzdolabına konulmuştur.

3.6.1 Bitki Özütlerinden Konsantrasyon Serilerinin Hazırlanması

B. oleracea var. *acephala* ve *S. excelsa*'nın 73 mg/ml'lik konsantrasyonlarındaki stoklarından Şekil 3.4' te gösterildiği gibi seyreltme işlemi yapılarak 2.25 - 73 mg/ml arasında 6 farklı konsantrasyonda özütler elde edilmiştir.



Şekil 3.4 *B. oleracea* var. *acephala* ve *S. excelsa*'nın 2.25-73 mg/ml konsantrasyonlarında özütlerinin hazırlanması

3.6.2 *B. oleracea* var. *viridis* ve *Smilax excelsa* Özütlerinin *A. castellanii* Trofozoitleri Üzerinde Amoebisidal Aktivite Çalışması

A. castellanii trofozoitleri steril olan ependorf tüplerine 100'er µl konulmuştur. Önceden hazırladığımız bitki özütlerinin farklı konsantrasyonlarının her birinden 100'er µl alınarak trofozoit içeren ependorf tüplerine ilave edilerek, vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Karışımı içeren ependorf tüpleri 26 ± 1 °C'deki etüvde 12., 24., 48. ve 72. saatler sonunda canlı ve ölü hücre sayımları için alınmıştır. Canlı ve ölü hücre sayımları için önce her bir tüpe 20'şer µl % 0.4'lük tripan mavisi boyası ilave edilmiştir. Hemen ardından ependorf tüplerine önceden hazırladığımız ve etüvde bulunan farklı konsantrasyonlardaki trofozoit/bitki karışımları sırasıyla 12., 24., 48. ve 72. saatlerde çıkarılarak içinde tripan mavisi bulunan ependorf tüplerine 20'şer µl olacak şekilde ilave edilmiştir. Kontrol için distile su *A. castellanii* trofozoitleri bulunan karışım da aynı şekilde tripan mavisi boyası ile muamele edilmiştir. Oda sıcaklığında 3 dakika bekletildikten sonra sırayla tüm farklı

konsantrasyonlardaki karışımların canlı hücre sayımı Thoma lamında yapılmıştır. Tüm çalışma 3 tekrarlı yapılarak canlılık yüzdesi hesaplanmıştır.

3.7 İstatistiksel Analiz

Yapılan çalışmada altı farklı konsantrasyonda bitki özütleri ve kontrol grubu kullanılmıştır. Bitki özütleri ve trofozoit karışımlarının ışık mikroskobu altındaki canlı hücre sayımları 12., 24., 48. ve 72 saat aralığında yapılmıştır. Bulunan veriler Microsoft Excel programıyla kaydedilmiştir. SPSS 18 paket programı yardımıyla grafikler ve tanımlayıcı veri analizi sağlanmıştır. Elde edilen veriler \pm standart hata kullanılarak ifade edilmiştir. SPSS 18 programında, olasılık değeri % 5 hata oranını makul görerek karşılaştırma yapılmıştır. Yapmış olduğumuz çalışma güven aralığı % 95'tir. SPSS 18 paket programı kullanılarak yaptığımız çalışma sonuçları çoklu karşılaştırma testi (Post-Hock) ile değerlendirilmiştir. Turkey analiziyle de ikili grup karşılaştırılması yapılmıştır. Bu bağlamda *A. castellanii* trofozoitleri üzerine uygulanan farklı derişimlerdeki bitki özütlerinin belirtilen saatlere göre yüzde canlılık oranları arasında farklar ortaya çıkarılmıştır. 12., 24., 48. ve 72. saat dilimlerine göre istatistiksel sonuçlar sırayla a, b, c, d, e, f harfleri kullanılarak belirtilmiştir.

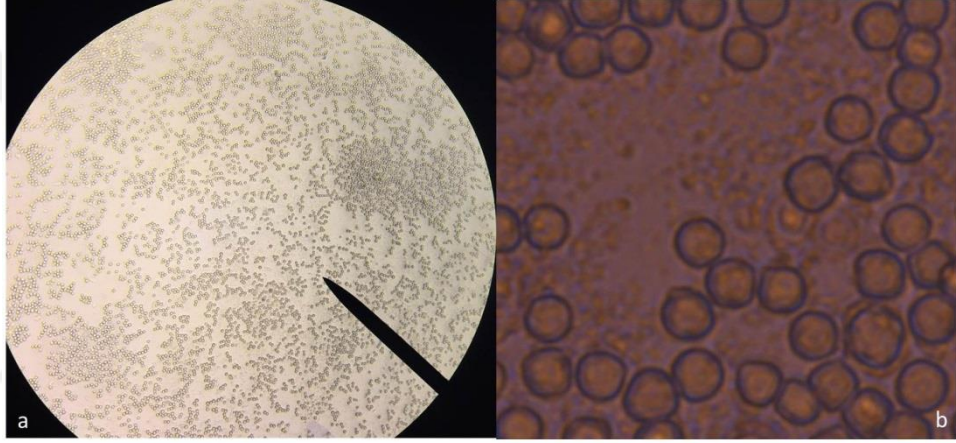
Logaritmik regresyon analizi sayesinde IC50 (trofozoitlerin yarısını öldüren bitki konsantrasyonu; %50 inhibitör konsantrasyonu) değerleri hesaplanmıştır. Logaritmik regresyon analiziyle oluşturulan grafik kullanılarak toplam hücre sayısının %50 sine karşılık gelen ölü hücre değerleri saptanmıştır. Çalışmada kullanılan bitki özüt konsantrasyonlarının etki ettikleri saatler amoebisidal etkinlik anlamında kontrol grubuna göre % hücre ölümü olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

B. oleracea var. *viridis* ve *S. excelsa* bitkileri ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki özütlerin *A. castellanii* trofozoitleri üzerine etkilerinin incelendiği çalışmamızda trofozoitler üzerinde (%) canlılık oranlarının konsantrasyon ve saatlere göre değişimi değerlendirilmiştir. Bunun için yapılan her aşamadaki bulgular aşağıda açıklanmıştır.

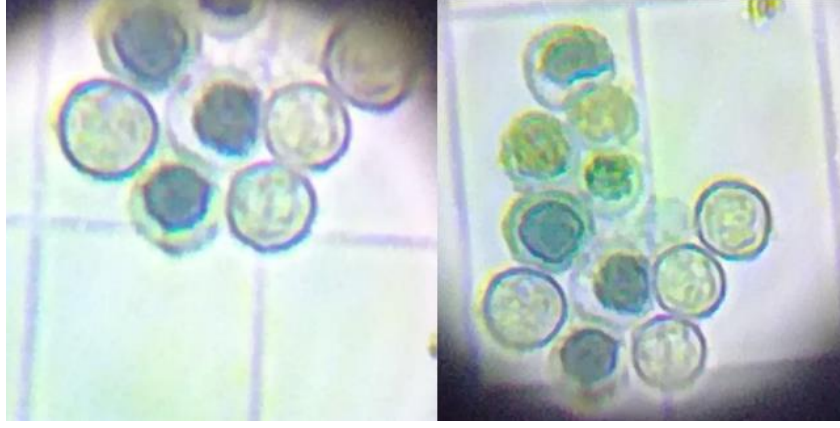
4.1 *A. castellanii* Trofozoitlerinin Üretilmesi, Toplanması ve Sayımı

E. coli ilave edilmiş Ringer agar besiyerlerinde üretilen *A. castellanii* trofozoitlerinin invert mikroskop altındaki görüntüsü Şekil 4.1’de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 *A. castellanii* trofozoitlerinin invert mikroskop altındaki görüntüsü (a: 10x görüntüsü, b: 40x görüntüsü)

B. oleracea var. *viridis* ve *S. excelsa* özütlerinin *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde amoebisidal aktiviteleri araştırılırken kullanılan % 0.4’ lük tripan mavisi boyası canlı ve ölü trofozoitleri ayırt etmemizi sağlamıştır. Tripan mavisi ile muamele edilmiş *A. castellanii* trofozoitinin mikroskop altında (40X) görüntüsü Şekil 4.2’ gösterilmiştir.



Şekil 4.2 Thoma lamında tripan mavisi ile muamele edilmiş ölü *A. castellanii* trofozoitlerinin ışık mikroskobu altındaki (40x) görüntüsü

4.2 *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *B. oleracea* var. *acephala* özütünün farklı konsantrasyon serilerinin amoebisidal etkisi

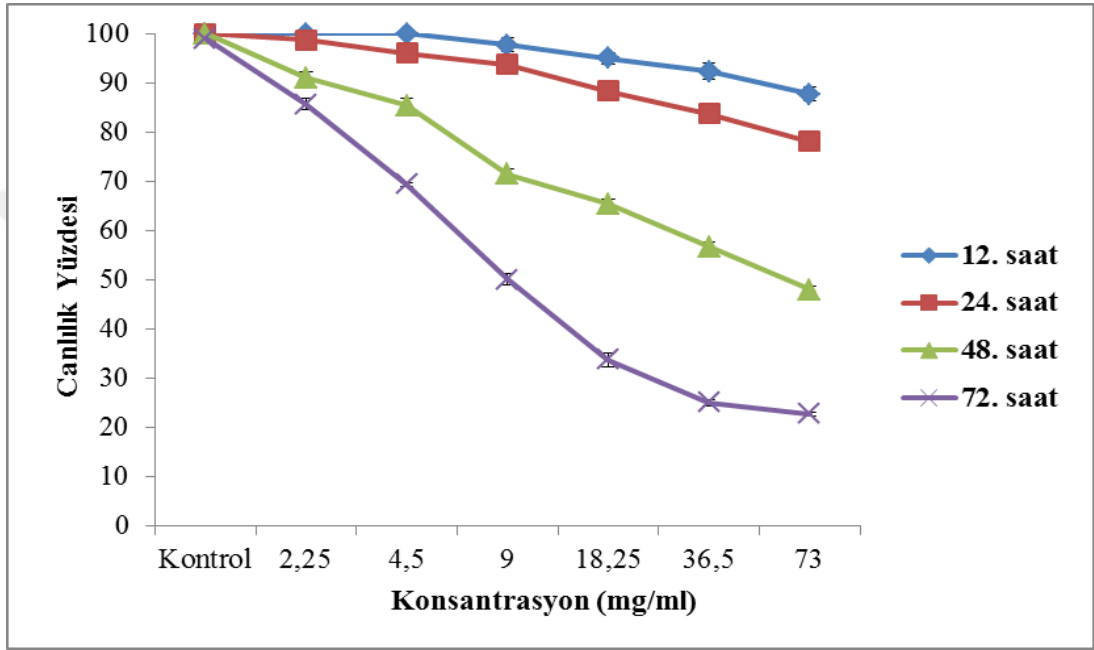
B. oleracea var. *viridis*'in 73 mg/ml konsantrasyonda en yüksek trofozoit ölüm oranının 72. saat sonunda olduğu Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Çizelge 4.1.'deki verilere göre *B. oleracea* var. *viridis* özütünün 73 mg/ml konsantrasyonda 48. saatin sonunda trofozoitlerin % canlılığı 48 ± 0.58 olarak tespit edilmiştir. 73 mg/ml konsantrasyonundaki özütün 48. saatte %52'lik kısmında, 72 saatin sonunda ise % 77 oranında letal etki yaptığı görülmüştür. Bu verilere göre 12.(a), 24.(b) ve 48.(c) saatler ile 72. saat arasında anlamlı istatistiksel farklılıkların ($p < 0.05$) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1 *B. oleracea* var. *viridis* yaprak özütünün *A. castellani* trofozoitleri üzerindeki amoebisidal etkisi

Konsantrasyon (mg/ml)	Yaşam formu	12 saat	24 saat	48 saat	72 saat
73	Trofozoit	87.67±1.45 ^a	78±1.53 ^b	48±0.58 ^c	22.67±0.33
36.5	Trofozoit	92.33±1.76 ^a	83.67±1.45 ^b	56.67±0.88 ^c	25±0.58
18.25	Trofozoit	95±1.15 ^a	88.33±1.20 ^b	65.33±0,88 ^c	33.67±1.45
9	Trofozoit	97.67±1.45 ^a	93.67±1.76 ^b	71.33±1.20 ^c	50±1.15
4.5	Trofozoit	100±0.0 ^a	96±1.0 ^b	85.33±1.45 ^c	69.33±0.33
2.25	Trofozoit	100±0.0 ^a	98.67±0.67 ^b	91±1.15 ^c	72±1.20
Kontrol	Trofozoit	100.0±0.0	100±0.0	100±0.0	99±0.0

Veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir.
a, b, c: 72. saatten farklı istatistiksel değerlerdir, p (0.05).
a: 12.- 72. saat; **b:** 24.- 72. saat; **c:** 48. - 72. saat

B. oleracea var. *viridis* özütünün *A. castellani* trofozoitleri üzerinde amebisidal etkilerinin ölçüldüğü 12., 24., 48 saatler ile 72. saatteki % canlılık oranları arasındaki sayısal veri farkları incelendiğinde, 4.5 mg/ml konsantrasyonundan itibaren özütün 72. saat sonunda letal etki oluşturduğu ve sırasıyla 9, 18.25, 36.5, 73 mg/ml'de artarak hücre ölümünü gerçekleştirdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Farklı konsantrasyonlardaki *B. oleracea* var. *viridis* özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerine amebisidal etkisini gösteren grafik.

Çalışma verilerine göre *B. oleracea* var. *viridis* özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde oluşturduğu IC50 değerleri Çizelge 4. 2' de verilmiştir. Buna göre IC50 değerleri sırasıyla 72. saatte 9 mg/ml ve 48. saatte 60 mg/ml olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2 Farklı konsantrasyonlardaki *B. oleracea* var. *viridis* özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki IC50 değeri

<i>A. castellanii</i>	Uygulanan saat	% 50 inhibitör konsantrasyon (IC50)
Trofozoit	72	9 mg/ml
	48	60 mg/ml

4.3 *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *S. excelsa* özütünün farklı konsantrasyonlarının amoebisidal etkisi

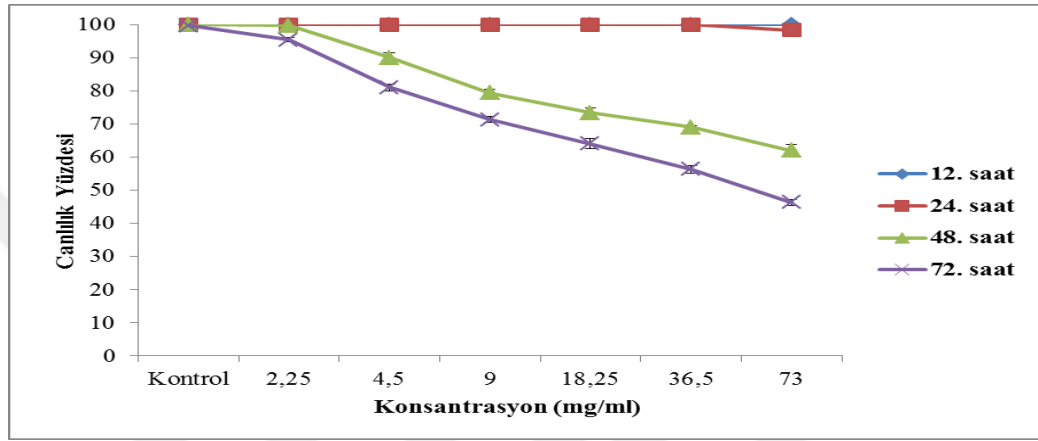
Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterildiği gibi *S. excelsa* özütünün konsantrasyon serilerinden 73 mg/ml'nin 72. saat sonunda en yüksek letal etki gösterdiği ve toplam trofozoitlerin % 53.7' inde hücre ölümü gerçekleştiği gözlenmiştir. *S. excelsa* özütünün 73 mg/ml konsantrasyonda 72., 48. ve 24. saatlerin sonunda trofozoitlerin % canlılığı sırasıyla 46.33 ± 0.88 , 56.33 ± 1.2 , 64 ± 1.53 , 48 ± 0.58 olarak tespit edilmiştir. *S. excelsa* özüt konsantrasyonu azaldığında *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde uygulanan letal etkinin de azaldığı saptanmıştır.

Çizelge 4.3 *S.excelsa* L. yaprak özütünün *A. castellani* trofozoitleri üzerindeki amoebisidal etkisi

Konsantrasyon (mg/ml)	Yaşam formu	12 saat	24 saat	48 saat	72 saat
73	Trofozoit	100±0.0 ^a	98.33±1.20 ^b	62±1.73 ^c	46.33±0.88
36.5	Trofozoit	100±0.0 ^a	100±0.0 ^b	69±0.58 ^c	56.33±1.20
18.25	Trofozoit	100±0.0 ^a	100±0.0 ^b	73.33±1.45 ^c	64±1.53
9	Trofozoit	100±0.0 ^a	100±0.0 ^b	79.33±1.20 ^c	71.33±0.88
4.5	Trofozoit	100±0.0 ^a	100±0.0 ^b	90±1.53 ^c	81±1.0
2.25	Trofozoit	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^b	99.67±0.33 ^c	95.33±0.67
Kontrol	Trofozoit	100.0±0.0	100±0.0	100±0.0	99.67±0.33

Veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir.
a, b, c: 72. saatten farklı istatistiksel değerlerdir, p (0.05).
a: 12.-72. saat; **b:** 24.- 72. saat; **c:** 48. - 72. saat

Yüzde canlılık oranları açısından 12., 24., 48. saatler ile 72. saatler arasında tüm özüt konsantrasyonları (73, 36.5, 18.25, 9, 4.5 ve 2.25 mg/ml) arasında anlamlı istatistiksel farklılıklar gözlenmiştir (Çizelge 4.3). *S. excelsa* 4.5 ve 2.25 mg/ml konsantrasyon serilerinde 72. saatin sonuna kadar trofozoitler üzerindeki letal etkinin diğer konsantrasyonlara oranla daha az olduğu, en yüksek hücre ölümünün ise 73 mg/ml konsantrasyonunda (% 53.7) gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Farklı konsantrasyonlardaki *S. excelsa* özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerine amoebisidal etkisini gösteren grafik.

S. excelsa özütünün 72. saat sonundaki IC50 değeri 65 mg/ml olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.4)

Çizelge 4.4 Farklı konsantrasyonlardaki *S. excelsa* özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki IC50 değeri

<i>A. castellanii</i>	Uygulanan saat	% 50 inhibitör konsantrasyon (IC50)
Trofozoit	72	65 mg/ml

Serbest yaşayan amipler arasında bulunan *Acanthamoeba* türlerinin habitatları genel olarak tüm çevremizdir. Bu kadar içiçe olduğumuz bu türler çoğu zaman canlılar üzerinde hastalık etmeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Maghsood ve ark., Ergüden, 2015, Winck ve ark., 2011). Bu hastalıklardan en önemlileri arasında *Acanthamoeba keratiti* (AK), kutanöz acanthamoebiasis (KA) ve granülomatöz amibik ensefalit (GAE) bulunmaktadır. Bu hastalıkların geçmiş yıllara göre yüksek bir ivmeyle artışı

gözlenmektedir. Tedavi için erken teşhis ve etkili tedavi yöntemleri hastalığın bertarafı için hayati önem taşımaktadır (Siddiqui ve Khan, 2012; Ergüden, 2015)

Bunun yanında merkezi sinir sistemine ve göz gibi yerlere ileri derece etki gösteremeyen antiparazit ilaçları *Acanthamoeba* türlerinin neden olduğu hastalıkların tedavisinde etkili bir rol oynayamamaktadır. AK hastalığı günümüzde çok yaygın olarak görülmekte ve uygulanan bir tedavi şeması bulunmaktadır. Ancak, GAE hastalığı AK hastalığı kadar yaygın olmadığından herhangi bir tedavi şeması mevcut değildir. Bu durum GAE hastalığına yakalanmış bireylerin tedavi sürecini ve etkinliğini olumsuz yönde etkilemektedir (Fiori ve ark., 2006; Ergüden, 2015). Genel anlamda AK ve GAE hastalığı için kullanılan, antifungal, makrolid grubu antibiyotikler, antiseptikler in vivo ya da in vitro olarak hastalığın tedavisinde olumlu sonuçlar vermemektedir (Ergüden, 2015; Mattana ve ark., 2004). Belirttiğimiz hastalıkların tedavisinde kullanılan anti-ameobik ilaçlar ise hastalıkla enfekte olmuş canlı için sitotoksik etkilere neden olmasından dolayı tercih edilmemektedir. Bu ilaçların *Acanthamoeba* türlerinde uzun süreli etki göstermedikleri, çünkü parazitin ilaçlara karşı direnç mekanizması geliştirdiği belirlenmiştir. Yine, uzun süreli bu ilaçların kullanılması hasta tarafından tolere edilmemekte ve farklı hastalıkların ortaya çıkmasına da neden olmaktadır (Fiori ve ark., 2006; Aydın, 2008). Bu sorunlardan dolayı trofozoitler ve kistler üzerine etki edecek aynı zamanda konukçuya herhangi bir zarar ya da yan etki oluşturmayacak tedavi sürecini tamamlayıcı ilaç arayışları günümüzde de devam etmektedir (Saygı ve Polat, 2003; Ergüden, 2015).

Tedavi yöntemlerinde kullanılan ilaçların istenilen spesifikliğe ve aktiviteye sahip olmaması, yapılan tedavinin süre olarak çok uzun olması ve aynı zamanda kullanılan ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması hastalık etkeni olan *Acanthamoeba* kist ve trofozoitleriyle mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle bitkisel kaynaklı kimyasallar günümüzde uygulanan tedavilerin olumsuz yönlerini bertaraf etmek, daha kısa sürede olumlu ve başarılı sonuçlar almak için alternatif tedavi yöntemleri olarak modern tıpta ve ilaç sektöründe giderek artan bir ilgiyle destek görmektedir (Vidal ve ark., 2007; Inbaneson ve ark., 2012).

Bitkilerden izole edilen birçok yağ ve özütlerin amoebisidal etkinliklerinin araştırılması son zamanlarda giderek artan bir ivmeyle devam etmektedir. Aynı oranda *Acanthamoeba* türlerinin trofozoit ve kistleri üzerindeki çalışmalarda da artış gözlenmektedir. Ancak, yapılan araştırmalarda bitkilerden elde edilen yağ ve özütlerin biyolojik aktivitesini oluşturan aktif bileşiklerin etki mekanizmaları hakkında çalışmalar sınırlı kalmıştır.

Metanol ve birçok farklı çözücü kullanarak hazırlanmış bitki yağları ya da özütleri kullanılarak *A. castellani* paraziti üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Polat ve ark., (2007c), *Allium dictyoprosom*, *A. scrodoprosom* subsp. *rotundum*, *A. sivasicum* ve *A. atroviolaceum* türlerinden elde ettikleri dört farklı metanol özütlerinin in vitro amoebisidal aktivitesini ve korneadaki hücrelerde sitotoksitesini çalışmışlardır. En etkili amoebisidal aktiviteyi *A. scrodoprosom* subsp. *rotundum*'da saptamışlardır. Göze ve ark., (2009), *Salvia. caespitosa* ve *S. staminea* türlerinin metanol özütlerinin *A. castellanii* trofozoitleri ve kistleri üzerine in vitro amoebisidal etkisini araştırdıkları çalışmada *S. staminea*'nın özütünün daha etkili amoebisidal aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. *Peucedanum palimbioides*, *P. longibracteolatum*, *P. caucasicum* ve *P. chryseum*'dan elde edilen metanol özütlerinin *A. castellanii* trofozoitleri ve kistleri üzerine in vitro amoebik etkisi Malatyalı ve ark., (2011a) tarafından araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre *P. longibracteolatum*'un, en güçlü amoebik aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Malatyalı ve ark.,(2011b), *Melissa officinalis* ve *Satureja cuneifolia* bitkilerinden metanolla özütler elde etmişlerdir. *S. cuneifolia*'nın *A. castellanii* trofozoitleri ve kistleri üzerine daha etkili amoebisidal aktivitesinin bulunduğunu bildirmişlerdir. *Teucrium chamaedrys* ve *Teucrium polium*'un amoebik aktivitesini araştıran Tepe ve ark., (2011), *T. chamaedrys*'in *Teucrium polium*'a göre *A. castellanii* trofozoitleri ve kistleri üzerine daha güçlü amoebisidal etkinliğinin olduğunu belirtmişlerdir. Değerli ve ark., (2012), *A. castellanii* trofozoitleri ve kistleri üzerine *Origanum laevigatum* ve *Origanum syriacum* bitkilerinin metanol özütlerinin amoebisidal aktivitesini araştırdıkları çalışmada *O. syriacum*'un en etkili amoebisidal aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Sunulan çalışmada ise, *B. oleracea* var. *viridis* ve *S. excelsa* bitkileri ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki etanol özütlerinin *A. castellani* trofozoitleri üzerine amoebisidal aktivitesi incelenmiştir. *B. oleracea* var. *viridis* etanol özütlerinin *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde amoebisidal etkisinin *S. excelsa* 'nın etanol özütüne göre daha etkili olduğu gözlenmiştir.

Metanol dışında farklı çözücüler kullanılarak hazırlanan birçok araştırmalar mevcuttur. Propolisden elde edilen etanol özütünün, *A. castellanii* trofozoitleri ve kistleri üzerine in vitro amoebisidal etkinliği Topalkara ve ark., (2007); *Pterocaulon polystachyum*'un metanol, diklorometan ve hekzan özütlerinin *A. castellanii*'ye karşı amoebik etkisi Rodio ve ark., (2008) tarafından araştırılmıştır. Araştırmaya göre hekzan ile hazırlanmış bitki özütünün en güçlü amoebisidal etkinlik gösterdiği belirtilmiştir.

Değerli ve ark., (2011a), *Inula oculus-christi* ve *Pastinaca armenea* bitkilerinden deiyonize su ile özütler elde etmişlerdir. Bu bitki özütlerinin *A. castellanii*'ye karşı in vitro amoebisidal aktivitesini araştırmışlardır. *Inula oculus-christi*'nin, kistler ve trofozoitler üzerinde en etkili amoebisidal aktiviteyi gösterdiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da Değerli ve arkadaşlarının (2011a) çalışmalarına benzer olarak etanol ile *B. oleracea* var. *viridis* ve *S. excelsa* bitkilerinin özütleri elde edildikten sonra stok konsantrasyon hazırlama sırasında steril distile su kullanılmıştır. Kontrol grubunu oluşturan sadece distile su ile hazırlanan özütlerin *Acanthamoeba* trofozoitlerinde 72. saatin sonuna kadar herhangi bir hücre ölümünün gözlenmemesi steril distile suyunun diğer bir çok çözücüye göre daha güvenli olduğunu göstermiştir.

Nagwa ve ark., (2011), *Curcuma longa*, *Arachis hypogaea* ve *Pancreatium maritimum* etanol ile bitki özütleri hazırlamışlardır. Bu özütlerin *A. castellanii* kistleri üzerinde in vitro amoebisidal aktivitesini araştırdıkları çalışmada *C. longa*, *A. hypogaea*, ve *P. maritimum*'un üçünün de etanol özütlerinin *Acanthamoeba* kistlerine karşı klorheksidin'den çok daha güçlü aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Dhokkar, *Chemlali Tataouine*, *Toffehi*, *Zarrazi* ve *Limouni* olarak bilinen Tunus'ta farklı 5 zeytin ağacının yaprakları kullanılarak Sifaoui ve ark.(2013) tarafından

etanol, metanol ve her ikisinin karışımından oluşan bitki özütlerinin *A. castellanii* üzerinde amoebisidal aktivitesi araştırılmıştır. Tüm bitki özütleri içerisinde *Dhokkar* yaprağından elde edilen metanol özütünün en etkili amoebisidal aktivitesinin olduğu belirtilmiştir.

AK hastasından izole edilen *A. castellanii* kistleri üzerine *Helianthemum lippii* 'nin metanol ve etil asetat özütlerinin amoebisidal aktiviteleri Badria ve ark., (2014) tarafından araştırılmıştır. Her iki özüt arasından etil asetat bitki özütünün en güçlü amoebik etki gösterdiği vurgulanmıştır. Derda ve ark. (2015), kloroform, alkol ve deiyonize su ile hazırlanan *Artemisia annua* özütlerini *Acanthamoeba* hastalıklarında antibiyotiklerle beraber kullanarak kombine tedavi protokolleri oluşturmuşlardır. Bu protokolleri in vivo olarak test ettiklerinde kloroform özütlerinin diğer özütlere oranla daha etkili amoebisidal aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Kurutulmuş *Lonicera japonica* çiçeklerinden elde edilen su, bütanol ve etil asetat bitki özütlerinin *Acanthamoeba triangularis* üzerinde in vitro amoebisidal etkisi Mahboob ve ark. (2016) tarafından araştırılmıştır. Etil asetat bitki özütünün en etkili amoebisidal aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir.

Dodangeh ve ark. (2017) tarafından su, alkol ve kloroform kullanılarak *Ziziphus vulgaris*'in bitki özütleri elde edilmiştir. Bu özütlerin *Acanthamoeba* kist ve trofozoitlerine karşı in vitro amoebisidal aktivitesini araştırmışlardır. Ayrıca fare peritoneal makrofajları üzerindeki sitotoksik aktivitelerini de incelemişlerdir. Kloroform kullanılarak yapılan bitki özütünün diğer özütlerden daha güçlü amoebisidal etki gösterdiğini ve hazırlanan tüm özütlerin herhangi bir sitotoksik aktiviteye sahip olmadıklarını bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada *S. excelsa* L ve *B. oleracea* var. *viridis* bitki özütlerinin etanol çözücüsü ile hazırlanan konsantrasyon serilerinin *Acanthamoeba* trofozoitlerine karşı in vitro etkilerinin karşılaştırması gerçekleştirilmiştir. *B. oleracea* var. *viridis* bitki özütlerinin *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde amoebisidal aktivitesinin *S. excelsa* özütüne göre daha etkili olduğu bulunmuştur. Kontrol gruplarında her dört saat boyunca (12., 24., 48.,ve 72.) herhangi bir hücre ölümüne rastlanılmaması *B. oleracea* var. *acephala* ve *S. excelsa* bitki özütleri hazırlanırken çözücü olarak etanolün kullanılması ve daha sonrasında konsantrasyon serileri oluşturulurken

distile suyun tercih edilmesinin doğru olduğu kanısına varılmıştır. Metanolün çözücü olarak kullanıldığı çalışmalarda özellikle son 72. saatte kontrol gruplarında az da olsa hücre ölümü gözlenmektedir. Bu durum metanolün kendisinin de kistler ve trofozoitler için sınırlı da olsa toksik etkiye sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Kaynak, 2017). Özütler hazırlanırken etanol veya metanol gibi çözücüler tamamen uzaklaştırdıktan sonra hazırlanan son konsantrasyonların steril distile su ile hazırlanması trofozoitler üzerinde çözücünün oluşturacağı lethal etkinin ortadan kalmasına yardımcı olabilir.

S. excelsa ve *B. oleracea* var. *viridis* bitki özütleri ile yapılan çalışmamızda *Acanthamoeba castellani* trofozoitleri üzerinde in-vitro olarak farklı ameobisidal etkinlikler gözlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan bu iki bitkinin de *A. castellani* trofozoitleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği, bu etkinin konsantrasyona bağlı olarak değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. *B. oleracea* var. *viridis* bitkisinin *Smilax excelsa*'ya oranla daha etkili amoebisidal aktivitesi olduğu ve bu bitkiden elde edilen özütün *Acanthamoeba* hastalıklarında tedavi amaçlı alternatif ürünler olarak değerlendirilebileceğini vurgulanmak isteriz. Aynı zamanda, çalışmada kullandığımız özütlerin etken madde tespiti ve biyolojik aktivitelerinin araştırılması aşamasında bu çalışmanın temel bir çalışma olabileceği düşünölmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bitkisel bazlı doğal ilaçlara ihtiyaç duyulmasının başlıca nedeni son dönemlerde sentetik bileşenli ilaçların kullanımı sonucunda insan sağlığında ortaya çıkan olumsuz etkilerdir.

Sunulan çalışmada *S. excelsa* L ve *B. oleracea* var. *viridis* bitkilerinden elde edilen etanol özütlerinin *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki yüzde (%) canlılık ve IC50 değerleri araştırılmıştır. *B. oleracea* var. *viridis* etanol özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki IC50 değeri 72. ve 48. saatlerde sırasıyla 9 ve 60 mg/ml; *S. excelsa* etanol özütünün ise 72. saatte 60 mg/ml olarak bulunmuştur. *B. oleracea* var. *viridis*'in 73 ve 36.5 mg/ml özütlerinin 72. saatte *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki % canlılık oranları sırasıyla 22.67 ± 0.33 ve 25 ± 0.58 olarak saptanmıştır. *S. excelsa*'nın 73 ve 36.5 mg/ml özütlerinin 72. saatte % canlılık oranları sırasıyla 46.33 ± 0.88 ve 56.33 ± 1.20 olarak bulunmuştur.

Yaptığımız çalışmada *S. excelsa* ve *B. oleracea* var. *viridis* etanol özütlerinin *A. castellanii* trofozoitleri üzerindeki lethal etkileri karşılaştırıldığında *B. oleracea* var. *viridis* bitkisinden elde edilen etanol özütünün *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde *S. excelsa*'ya göre daha etkili olduğu bulunmuştur. *B. oleracea* var. *viridis* özütünün 48. saatten sonra giderek artan lethal etki gösterdiği belirlenmiştir. Aynı durum *S. excelsa* özütü için de geçerlidir. Çalışmada artan özüt yoğunluğuyla doğru orantılı olarak *A. castellanii* trofozoitlerinde azalma gözlenmiştir.

Ulaştığımız kaynak bilgilere göre, *S. excelsa* ve *B. oleracea* var. *viridis* etanol özütlerinin *A. castellanii* trofozoitleri üzerinde anti-amoebik aktivitesini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Gerekli koşullar sağlandığında *S. excelsa* ve *B. oleracea* var. *viridis* özütlerinin *A. castellanii* parazitinin neden olduğu hastalıkların tedavisinde alternatif ilaç ya da başka ilaçlarla kombine olarak kullanılabilen yeni bir ürün olarak değerlendirilebileceği kanısına varılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda, etkili bulunan özüt konsantrasyonlarının memeli hücreleri için lethal ya da sitotoksik etkisinin olup olmadığının araştırılması, özütlerin etken maddelerinin nasıl bir etki mekanizmasına sahip olduğunun tespit edilmesi ve hayvanlarda toksisiteye neden olmadığını gösteren in vivo araştırmalarının yapılması gerektiğini öneririz.

6. KAYNAKLAR

- Abay, E. (2006). Bazı bitki ekstraktlarının antibakteriyal etkilerinin disk difüzyon yöntemiyle araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kars.
- Abduz, A., Abdul, A., Pakrashi, S. & Ghosh, D. (2012). Experimental parasitology evaluation of antileishmanial activity of South Indian medicinal plants against *Leishmania donovani*. *Exp Parasitol*, 132(2):180–4.
- Akçin, Ö. A., Kandemir, N. & Akçin, Y. (2004). A morphological and anatomical study on a medicinal and edible plant *Trachystemon orientalis* L. G.Don (Boraginaceae) in the Black Sea Region, Turkish Journal of Botany, 28: 435-442.
- Akyol, N., Aşçı, Z. & Kükner, S. (1996). *Acanthamoeba* keratitis: The first reported case from Turkey. *Ophthalmic Practice*, (2):46-48.
- Alıcı, E.H. (2012). Kaldirik (*Trachystemon orientalis*) bitkisinden polifenol oksidaz enziminin kısmi saflaştırılması ve karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Sakarya.
- Alotaibi, M.A. (2011). Interaction of Free-living protozoa with water-borne human pathogenic viruses and protection from disinfection. Yüksek Lisans Tezi, Leicester Üniversitesi, İngiltere.
- Anonim, (2017a). <http://www.gencziraat.com/Bahce-Bitkileri/Lahana-Yetistiriciligi-12.html>, 14.11.2017.
- Anonim, (2017b). <http://www.tubives.com>, 11.11.2017.
- Anonim, (2017c). <http://www.wikizero.org/index.php>, 11.11.2017.
- Anonim, (2017d). Kale, Collard, Cole 'Georgia' (*Brassica oleracea var. acephala*) <https://davesgarden.com/guides/pf/showimage/38999>, 11.11.2017.
- Anonim,(2017e). *Smilax excelsa* L. Diken ucu, <https://www.turkiyebitkileri.com/tr/foto%C4%9Fraf-galerisi/view-album/5648.html>, 10.11.2017.
- Anonim, (2012f). Melocan, (*Smilax excelsa*) <http://www.sifalibitkim.com/159.html> 08.11.2017.
- Anonim, (2017g). <http://dogalhayat.org/property/smilax-excelsa>, 08.11.2017.
- Anonim, (2018i). <http://imagger.pw/CDC-life-cycle-of-Isospora-belli-coccidia-t.html>. 05.01.2018
- Anonim, (2018i). <https://slideplayer.biz.tr/slide/11771750/> 12.02.2018

- Anonim, (2018j).<https://www.tohumdunyasi.com.tr/organik-kale-sebzesi-tohumu-kara-lahana> 07.03.2018
- Anonim, (2018k). <https://deskgram.org/explore/tags/melocan> .13.01.2018
- Arslan, İ. (2006). Denizli ve çevresinde doğal yayılış gösteren bazı adaçayı bitki türlerinin (*Salvia Fruticosa* Miller., *S. cedronella* Boiss. ve *S. chrysophylla* Stapf.) antistafilokokkal etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli.
- Aydın, E. (2008). Bazı *Salvia* genusu üyelerinin *Acanthamoeba castellanii* tedavisindeki kullanım potansiyelleri ve sitotoksik aktivitelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Sivas.
- Badria, F.A., Hetta, M.H., Sarhan, R.M. & Ezz El-Din, M.H. (2014). Lethal effects of *Helianthemum lippii* (L.) on *Acanthamoeba castellanii* cysts in vitro. *Korean J Parasitol*, 52(3): 243–249.
- Barker, J. & Brown, M.R. (1994). Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology*, 140:1253–1259
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S. & Telci, İ. (2010). Tıbbi ve aromatik bitkiler üretiminin artırılması olanakları. Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, 11– 15 Ocak 2010, Ankara.
- Berber, İ., Avşar, C., Çine, N., Bozkurt, N. & Elmas, E. (2013). Sinop'ta yetişen bazı bitkilerin metanolik ekstraktlarının antibakteriyal ve antifungal aktivitelerinin belirlenmesi. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi / Karaelmas Science and Engineering Journal*, 3(1): 10-16.
- Chawla, A., Armstrong, M. & Carley, F. (2014). *Acanthamoeba* keratitis an increasing incidence. *Contact Lens Anterior Eye*, (37): 120.
- Chu, D.M., Miles, H., Toney, D. & Ngyuen, C. (1998). Amebicidal activity of plant extracts from Southeast Asia on *Acanthamoeba* spp. *Parasitol Research*, 84(9):746–52. 74
- Davis, P.H. (1994). *Flora of Turkey and East Aegean Islands*. Cilt 1-9, University Press, Edinburg.
- Değerli, S., Berk, S., Malatyali, E. & Tepe, B. (2011a). Screening of the in vitro amoebicidal activities of *Pastinaca armenea* (Fisch., C.A.Mey.) and *Inula oculus-christi* (L.) on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Parasitol Research*, 110: 565–570.
- Değerli, S., Berk, S., Tepe, B. & Malatyali, E. (2011b). Amoebicidal activity of the rhizomes and aerial parts of *Allium sivasicum* on *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Research*, 111: 59–64.

- Değerli, S., Tepe, B., Çeliksöz, A. & Berk, S. (2012). In vitro amoebicidal activity of *Origanum syriacum* and *Origanum laevigatum* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Experimental Parasitology*, 131(1):20–24.
- De Almeida, I., Alviano, D.S., Vieira, D.P. & Alves, P.B. (2007). Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. *Parasitol Res*, 101(2):443-52.
- Derda, M., Hadas, E., Cholewinski, M., Skrzypczak, L., Grzondziel, A. & Wojtkowiak-Giera, A. (2015). *Artemisia annua* L. as a plant with potential use in the treatment of acanthamoebiasis. *Parasitol Research*, 115:1635–1639.
- Dodangeh, S., Niyiyati, M., Kamalinejad, M., Lorenzo-Morales, J., Haghghi, A. & Azargashb, E. (2017). The amoebicidal activity of *Ziziphus vulgaris* extract and its fractions on pathogenic *Acanthamoeba* trophozoites and cysts. *Tropical Biomedicine*, 34(1): 127-136.
- El-Sayed, N.M., Ismail, K.A., Ahmed, S.A. & Hetta, M.H. (2012). In vitro amoebicidal activity of ethanol extracts of *Arachis hypogaea* L., *Curcuma longa* L. and *Pancreaticum maritimum* L. on *Acanthamoeba castellanii* cysts. *Parasitol Research*, 110:1985–92.
- Ergüden, C. (2015). Uçucu yağların *acanthamoeba* spp. kist ve trofozoitleri üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.
- Ergüven, S. (2012). Kan ve doku protozoonlarına karşı kullanılan yeni ilaçlar, *Ankem Dergisi* 26(Ek 2):108-115.
- Ertabaklar, H., Dayanır, V., Apaydın, P., Ertuğ, S. & Walochnik, J. (2009). Olgu sunumu: *Acanthamoeba Keratiti*. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 33 (4): 283-285.
- Ertabaklar, H., Türk, M., Dayanır, V., Ertuğ, S. & Walochnik, J. (2007). *Acanthamoeba keratitis* due to *Acanthamoeba* genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. *Parasitol Research*, 100:241–246
- Ertabaklar, H., Türk, M., Dayanır, V., Ertuğ, S. & Walochnik, J. (2006). *Acanthamoeba keratitis* due to *Acanthamoeba* genotype T4 in a non-contact-lens wearer in Turkey. *Parasitol Research*, 100:241–246.
- Faydaoğlu, E. & Sürücüoğlu, M.S. (2011). Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi*, 11 (1): 52 – 67.
- Fiori, P.L., Mattana, A., Dessì, D. & Conti, S. (2006). In vitro acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide. *J. Antimicrob Chemother*, 57(5):891–898.
- Gardiner, P. (2000). Peppermint (*Mentha piperita*). Longwood Herbal Task Force and The Center for Holistic Pediatric Education and Research, 1–22.
- Gökpinar, S. & Aydenizöz, M. (2010). Göze yerleşen protozoonlar ve artropodlar. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 34 (2):137-144.

- Göze, I., Alim, A., Dağ, S., Tepe, B. & Polat, Z.A. (2009). *In vitro* amoebicidal activity of *Salvia staminea* and *Salvia caespitosa* on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 25(4):3–8.
- Gül, V. & Seçkin Dinler, S.B. (2016). Kumru (Ordu) yöresinde doğal olarak yetişen bazı tıbbi ve aromatik bitkiler. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 11 (1):146-156.
- Hafız, M.S., Salik, N. & Abdul, M. (2016). Methanolic extract of *Peganum harmala* exhibit potent activity against *Acanthamoeba castellanii* cysts and its encystment in vitro. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29 (6): 1993-1996.
- Hasenekoğlu, İ. & Yeşilyurt, S. (2007). Mikrobiyoloji. Atatürk Üniversitesi, 263-296, Erzurum.
- Horn, M. & Wagner, M. (2004). Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. *J Eukaryot Microbiol*, 51: 509–514
- Hussain, T., Arshad, M., Khan, S., Satar, H. & Qureshi, M.S. (2011). *In vitro* screening of methanol plant extracts for their antibacterial activity. *Pak. J. Bot.*, 43:531-538.
- Illingworth, C.D. & Cook, S.D. (1998). *Acanthamoeba* keratitis. *Surv. Ophthalmol*, 42: 493-508.
- Inbaneson, S.J., Ravikumar, S. & Suganthi, P. (2012). *In vitro* antiplasmodial effect of ethanolic extracts of traditional medicinal plant *Ocimum* species against *Plasmodium falciparum*. *Asian Pac J Trop Med.*, 5(2):103–106.
- Janovská, D., Kubíková, K. & Kokoška, L. (2003). Screening for antimicrobial activity of some medicinal plants species of traditional Chinese Medicine. *Czech J. Food Sci.*, 21:107-110.
- Jiménez-Arellanes, A., León-Díaz, R., Meckes, M., Tapia, A., Molina-Salinas, G. M., Luna-Herrera, J. & Yépez-Mulia, L. (2012). Antiprotozoal and antimycobacterial activities of pure compounds from *Aristolochia elegans* rhizomes. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7s
- John, D.T. (1998). Opportunistic amoebae. *Topley, Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9th ed. Vol. 5. Edward Arnold Ltd., London, UK, Pp. 179-192.
- John, D.T. (2005). Opportunistic Amebae. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 4022-36.
- Jonathan, R., Sharon, R., William, M.D., Ritterband, D.C., Yoder, J.S., Ayers, T., Shah, R.D., Samper, M.E., Shih, C.Y., Schmitz, A.D. & Brown, A. (2014). Clinical characteristic of *Acanthamoeba* keratitis infections in 28 states, 2008 to 2011. *Cornea*, (33):8-161.

- Kartal, M. (2004). Avrupa Birliği ÷lkelerinde tıbbi bitkisel ürünlerin ruhsatlandırılması: Turhan Baytop Anma Kitabı, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Yayın No: 81, İstanbul, 109-124.
- Kaynak, B. (2017). *Ornithogalum sigmoideum* ve *Trachystemon orientalis*' in *Acanthamoeba castellanii* Kistleri Ve Trofozoitleri Üzerine İn Vitro Amöbisidal Aktivitelerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ordu.
- Khan, N.A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol Rev.*, 30: 564-595.
- Khan, N.A., Naveed, A. & Timothy, A.P. (2002). Molecular tools for speciation and epidemiological studies of *Acanthamoeba*. *Current Microbiology*, 44: 444-449.
- Kobayashi, T., Higuchi-Watanabe, N., Shiraishi, A., Uno, T. & Ohashi, Y. (2015). Miraflow, soft contact lens cleaner: activity against *Acanthamoeba* spp. *Eye Contact Lens*, 41:4-240.
- Leder, K. & Weller, P.F. (2003). Antiparasitic agents, "Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Pfaller, M.A., Tenover, R.H. (eds): Manual of Clinical Microbiology" kitabında s. 2081-97 ASM Press, Washington.
- Liu, L.X. & Weller, P.F. (1996). Drug therapy: Antiparasitic drugs, *N Engl J Med*, 334(18):1178-84.
- Madencioğlu, D. (2014). Endemik *Dorystoechas hastata* boiss., heldr. ex bentham uçucu yağının bazı *Acanthamoeba* türleri üzerine amöbisid etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, İzmir.
- Mahboob, T., Azlan, A.M., Tan, T.C., Samudi, C., Sekaran, S.D., Nissapatorn, V. & Wiart, C. (2016). Anti-encystment and amoebicidal activity of *Lonicera japonica* Thunb. and its major constituent chlorogenic acid in vitro. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 9(9): 866–871.
- Maghsood, A.H., Sissons, J., Rezaian, M. & Nolder, D. (2005). *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *J Med Microbiol*, 54(8):755-759.
- Magnet, A., Henriques-Gil, N., Galván-Diaz, A.L. & Izquierdo, F. (2004). Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitol Research*, 113(8):2845–50.
- Malatyalı, E., Tepe, B., Degerli, S., Berk, S. & Akpulat, H.A. (2011a). *In vitro* amoebicidal activity of four *Peucedanum* species on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Parasitol Research*, 110:167–174.
- Malatyalı, E., Tepe, B., Degerli, S. & Berk, S. (2011b). *In vitro* amoebicidal activities of *Satureja cuneifolia* and *Melissa officinalis* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. *Parasitol Res.*, 110:2175–2180.
- Marciano-Cabral, F. & Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2): 273-307.

- Maregesi, S.M., Pieters, L., Ngassapa, O.D., Apers, S., Vingerhoets, R., Cos, P., Berghe, D.A. & Vlietinck, A.J. (2008). Screening of some Tanzanian medicinal plants from bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *J. Ethnopharmacol.*, 119:58-66.
- Markel, E.K., Voge, M. & Jhon, D.T. (1992). Medical parasitology. *WB Saunders Co Philadelphia*, (7):22-96.
- Matsuzaki, Y., Kakinoki, Y., Nakamura, M. & Nishihara, T. (2014). Lamiaceae peppermint oil with surfactant showing equal antifungal activity against *Candida albicans* to rosemary chemotype CINEOL. *Advances in Infectious Diseases*, 4:58–65.
- Mattana, A., Biancu, G., Alberti, L. & Accardo, A. (2004). *In vitro* evaluation of the effectiveness of the macrolide rokitamycin and chlorpromazine against *Acanthamoeba castellanii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(12):4520–4527.
- Mazur, T. & Hadaś, E. (1995). The duration of the cyst stage and the viability and virulence of *Acanthamoeba* isolates. *Trop Med Parasitol*, 46(2):106–8.
- Nagwa, M.E., Khadiga, A.I., Sabah, A., Ghany, A. & Mona, H.H. (2011). *In vitro* amoebicidal activity of ethanol extracts of *Arachis hypogaea* L., *Curcuma longa* L. and *Pancreatium maritimum* L. on *Acanthamoeba castellanii* cysts, *Parasitol Research*, 110:1985–1992.
- Nakisah, M.A., Ida Muryany, M.Y., Fatimah, H., Nor Fadilah, R., Zalilawati, M.R., Khamsah, S. & Habsah, M. (2010). Anti-amoebic properties of a Malaysian marine sponge *Aaptos* sp. on *Acanthamoeba castellanii*, *World J Microbiol Biotechnol*, 28:1237–1244.
- Njume, C., Afolayan, A.J. & Ndip, R.N. (2009). An overview of antimicrobial resistance and the future of medicinal plants in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.*, 3:685-699.
- Omana-Molina, M.A., Gonzalez-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., BernalEscobar, A., Duran-Diaz, A., Mendez-Cruz, A.R. & Martinez-Palomo, A. (2014). Silicone hydrogel contact lenses surface promote *Acanthamoeba castellanii* trophozoites adherence: qualitative and quantitative analysis. *Eye Contact Lens*, 40(3):132–139.
- Özcel, M.A. (2007). Tıbbi Parazit Hastalıkları Türkiye Parazitoloji Derneği Yayın No:22, S: 309-310.
- Özcel, M.A., Turgay, N., İnci, A. & Köroğlu, E. (2007). Tıbbi ve veteriner immunoparazitoloji. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, s: 93-97.
- Ozsoy, N., Can, A., Yanardağ, A. & Akey. N. (2008). Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts, *Elsevier*, 110(3): 571-583
- Pacella, E., Torre, G.L., Giusti, M. & Lombardi, A.M. (2013). Results of case-control studies support the association between contact lens use and *Acanthamoeba* keratitis. *Clin Ophthalmol.* 2013; 7:991-4.
- Page, M.A. & Mathers, W.D. (2013). *Acanthamoeba* keratitis: a 12-year experience covering a wide spectrum of presentations, diagnoses, and outcomes. *Journal of Ophthalmology*, 670242. *Parasitol Research*, 115(4):1705-9.

- Polat, Z.A., Özçelik, S., Vural, A. & Saygı, G. (2007a). Aksenik kültürlerde *Acanthamoeba* trofozoitleri üzerindeki gözlemler ve bunların farklı boyalarla boyanma özellikleri. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 31 (1): 7-13.
- Polat, Z.A., Tepe, B. & Vural, A. (2007b). *In vitro* effectiveness of *Thymus sipyleus* subsp. *sipyleus* var. *sipyleus* on *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potential on corneal cells. *Parasitol Res.*, 101 (6):1551–1555.
- Polat, Z.A., Vural, A., Tepe, B. & Çetin, A. (2007c). *In vitro* amoebicidal activity of four *Allium* species on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells. *Parasitol Res.*, 101:397-402.
- Radford, C.F., Lehmann, O.J. & Dart, J.K.G. (1998). *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England. *Br J Ophthalmol*, 82: 1387-1392.
- Rodio, C., Vianna, D.R., Kowalski, K.F., Panatieri, L.F., Poser, G.V. & Rott, M.B. (2008). *In vitro* evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitology Research* , 104(1): 191–194.
- Saygı, G. (2002). Temel Tıbbi Parazitoloji. II. Baskı. Esnaf Ofset Matbaası, Sivas.
- Saygı, G. & Polat, Z. (2003). Özgür yaşayan amipler ve neden oldukları parazitozlar (Primer Amibik Meningoensefalit - Granülomatöz Amibik Ensefalit – Keratit), Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 25 (3):140 – 149.
- Schuster, F.L. & Visvesvara, G.S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol*, 34: 1001–1027.
- Seal, D. (2003). *Acanthamoeba* keratitis update- incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. *Eye Contact Lenses*, (17):893905.
- Sekar, S. & Kandavel, D. (2010). Interaction of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) and endophytes with medicinal plants - new avenues for phytochemicals. *J. Phytology*, 2: 91-100.
- Siddiqui, R. & Khan, N.A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites, Vectors*, 5: 6.
- Sifaoui, I., Atteneri, L.A., Carmen, M.M.N., Chammem, N., Mejri, M., Jacob, L.M., Manef, A. & Piñero, J.E. (2013). Activity assessment of Tunisian olive leaf extracts against the trophozoite stage of *Acanthamoeba*. *Parasitol Res*, 112:2825–2829.
- Singh, B., Dutt, N., Kumar, D., Singh, S. & Mahajan, R. (2011). Taxonomy, ethnobotany and antimicrobial activity of *Croton bonplandianum*, *Euphorbia hirta* and *Phyllanthus fraternus*. *J. Adv. Develop. Res.*, 2:21-29.
- Society, T.R. (2014). Studies on pathogenic and non-pathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order amoebida. *Philosophical transactions of the royal society*, 259:435–76.
- Tepe, B., Malatyalı, E., Degerli, S. & Berk, S. (2011). *In vitro* amoebicidal activities of *Teucrium polium* and *T. chamaedrys* on *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts. *Parasitol Research*, 110:1773–1778.

- Topalkara, A., Vural, A., Polat, Z., Toker, M.I., Arici, M.K., Ozan, F. & Çetin, A. (2007). *In vitro* amoebicidal activity of Propolis on *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 23(1): 40-45.
- Vidal, F., Vidal, J.C., Gadelha, A.P.R. & Lopes, C.S. (2007). *Giardia lamblia*: The effects of extracts and fractions from *Mentha piperita* Lin. (Lamiaceae) on trophozoites. *Exp Parasitol*, 115(1):25-31.
- Visvesvara, G.S., Moura, H. & Schuster, F.L. (2007). Pathogenic and opportunistic Free-Living Amoeba: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology Medicine Microbiology*, 50:1-26.
- Winck, M.A.T., Caumo, K. & Rott, M.B. (2011). Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in rio grande do Sul, Brazil. *Curr Microbiol*, 63(5):464-469.
- Yang, Y.F., Matheson, M., Dart, J.K.G. & Cree, I.A. (2001). Persistence of *Acanthamoeba* antigen following *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol*. Mar 2001; 85(3): 277-280.
- Yünlü, Ö., Özçelik, S. & Arıcı, M.K. (2015). Göz kapaklarından ve konjunktivadan alınan sürüntü örneklerinde *Acanthamoeba* ve diğer serbest yaşayan amiplerin araştırılması. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 39: 194-199.
- Zahir, A.A., Rahuman, A.A., Bagavan, A., Santhoshkumar, T., Mohamed, R.R., Kamaraj, C. & Marimuthu, S. (2010). Evaluation of botanical extracts against *Haemaphysalis bispinosa* Neumann and *Hippobosca maculata* Leach. *Parasitology research*, 107(3): 585-592.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hami YEŞİLTAŞ
Doğum Yeri : Fatsa/ORDU
Doğum Tarihi : 18.10.1987
Yabancı Dili : İngilizce
E-mail : hamiesiltas@hotmail.com.com
İletişim Bilgileri : Ordu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/ Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	Pamukkale Üniversitesi	2005
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Ordu Üniversitesi	2017

İş Deneyimi:

Görev	Görev Yeri	Yıl
Yedek Subay	Türk Silahlı Kuvvetleri	2011
Mağaza Müdürü	Migros Türk Ticaret A.Ş	2012

Yayımlar:

- 1.
- 2.