

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDEMİK *DORYSTOECHAS HASTATA* BOISS. & HELDR. EX BENTHAM  
UÇUCU YAĞININ BAZI *ACANTHAMOEBA* TÜRLERİ ÜZERİNE AMEBİSİD  
ETKİSİ

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Damla MADENCİOĞLU

İZMİR

2014



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDEMİK *DORYSTOECHAS HASTATA* BOISS. & HELDR. EX BENTHAM  
UÇUCU YAĞININ BAZI *ACANTHAMOEBIA* TÜRLERİ ÜZERİNE AMEBİSİD  
ETKİSİ

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Ecz. Damla MADENCİOĞLU

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Bintuğ ÖZTÜRK

İZMİR

2014

**DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ**

**(Adı Soyadı)**

**(İmza)**

**Başkan** : Yrd. Doç. Dr. Bintuğ ÖZTÜRK .....

**Üye** : Prof. Dr. Hüsniye KAYALAR .....

**Üye** : Yrd. Doç. Dr. Şura BAYKAN EREL .....

Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih: .....

## Önsöz

*Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'ndaki tüm değerli öğretim üyesi hocalarıma, öğrettikleri kıymetli bilgiler, kurdukları güzel iletişim ve sağladıkları keyifli çalışma ortamı için çok teşekkür ederim. Böyle bir anabilim dalında lisansüstü eğitim almış almaktan dolayı çok mutluyum.*

*Eğitimim ve tez çalışmam süresince bana bilgi ve deneyimleri ile yardımcı olan, sabrını, anlayışını ve hoşgörüsünü eksik etmeyen tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Bintuğ ÖZTÜRK'e çok teşekkür ederim. Kendisi sadece yüksek lisans boyunca değil, fakültenin başından beri danışmak istediğim her konuda bana yardımcı olmuş ve o değerli fikirlerini ve zamanını benimle paylaşmıştır.*

*Tez çalışmam için gerekli araştırma materyalinin toplama aşamasındaki yardımları nedeniyle Yrd. Doç. Dr. Şura BAYKAN EREL'e ve Doç. Dr.Serdar ŞENOL'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.*

*“Türkiye Uçucu Yağ Bitkileri Veri Tabanı” projesini hayata geçirmemizde kritik rol oynayan ve bu veri tabanının ortaya çıkması sürecinde sunduğu rehberlik, bilgi, emek ve ne zaman kapısını çalsam benden her konuda esirgemediği yardımlar için Öğr. Gör. Dr. Mehmet Ali EGE'ye de şükranlarımı sunarım.*

*Bana tez çalışmam için Anabilim Dallarının kapısını açan ve keyifli bir çalışma ortamı sağlayan başta Prof. Dr. Songül BAYRAM DELİBAŞ olmak üzere 9 Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca 9 Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yapmakta olan ve tez çalışmam sırasında benden bilgi, yardım ve arkadaşlığını esirgemeyen Ceren ERGÜDEN'e de çok teşekkür ederim.*

*Tez çalışmam sürecinde gerek yanımda olan, gerek uzaktan yardım ve destekte bulunan, bana moral, ilgi ve sevgi veren tüm dostlarıma en içten teşekkürlerimi sunuyorum.*

*En büyük teŖekkürüm ise hayatım boyunca hep yanımda olan, maddi-manevi her türlü desteğin en iyisini ve sonsuz sevgilerini veren, onlarsız bir hayat düşünemediğim canım aileme. İyi ki varsınız.*

*Bu çalışma Ege Üniversitesi Araştırma Fonu (Proje No:13-ECZ-020), Bilimsel Araştırma Projesi olarak kabul edilmiş ve desteklenmiştir. Katkıları için E.Ü. Rektörlüğü'ne, E.Ü. Eczacılık Fakültesi Dekanlığı'na ve E.Ü. Eczacılık Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teŖekkürü bir borç biliriz.*

*İzmir-2014*

*Damla Madencioğlu*

## ÖZET

### ENDEMİK *DORYSTOECHAS HASTATA* BOISS. & HELDR. EX BENTHAM UÇUCU YAĞININ BAZI *ACANTHAMOEBA* TÜRLERİ ÜZERİNE AMEBİSİD ETKİSİ

*Acanthamoeba* türleri çevrede yaygın olarak bulunan ve *Acanthamoeba* keratiti, granülomatöz amibik enfeksiyon, kutanöz acanthamoebiasis gibi önemli hastalıklara yol açan özgür yaşayan amip türlerinden biridir. *Acanthamoeba* türlerinin yol açtığı bu hastalıklara karşı erken dönemde uygulanan kombine tedaviler bulunmasına rağmen, tedavide kullanılan bu ilaçların ciddi yan etkilerinden dolayı ve istenilen aktivite ve selektiviteye sahip olmamalarından dolayı tedavi için yeni ilaç araştırmalarına gidilmiştir. Bu kapsamda içerdikleri pek çok madde grupları nedeniyle yüksek ilaç hammaddesi potansiyeline sahip bitkisel kaynaklardan yararlanmaya karar verilmiştir. Çalışmamızda da bu amaçla yurdumuzda monotipik endemik bir cins ve tür olan *Dorystoechas hastata* Boiss. & Heldr. Ex Bentham uçucu yağı kullanılmıştır.

Neo-clevenger tipi distilasyon düzeneğinde, Avrupa Farmakopesi'ne göre yapılan distilasyonla elde ettiğimiz ve gaz kromatografisi yardımıyla bileşiklerini saptadığımız uçucu yağımızın *Acanthamoeba* üzerinde amebisid etkisi denenmiştir. *Acanthamoeba castellanii* trofozoitlerine karşı *Dorystoechas hastata* uçucu yağının farklı dilüsyonlarıyla 3 tekrarlı olarak yaptığımız bu çalışma sonunda uçucu yağın 40 µg/ml dozu her saatte %100 letal etkili bulunurken, 20 µg/ml dozu da 48. ve 72. saatlerde %100 letal etkili bulunarak anlamlı sonuçlar vermişlerdir.

Anahtar kelimeler: *Dorystoechas hastata*; uçucu yağ; *Acanthamoeba*; amebisid etki.

## ABSTRACT

### THE ESSENTIAL OIL OF ENDEMIC *DORYSTOECHAS HASTATA* BOISS. & HELDR. EX BENTHAM'S AMEBICID EFFECT ON *ACANTHAMOEBA* SPECIES

*Acanthamoeba* species are one of the free-living amoeba which are commonly found in the environment and causes serious diseases such as *Acanthamoeba* keratitis, granulomatous amoebic infection, cutaneous acanthamoebiasis. Although there are combined treatments against *Acanthamoeba* at an early stage of the disease, these agents in the treatment have severe side effects and do not have desired activity and selectivity, so new drug researches began. Because of the plant sources have many groups of substances, they have high potential as pharmaceutical raw materials, so in this scope we decided to take advantage from that. In our study, to this purpose, essential oil of the *Dorystoechas hastata* Boiss. & Heldr. Ex Bentham which is monotypic genus and species in our country, was used.

The essential oil was obtained in Neo-Clevenger-type distillation apparatus, accordance with European standards, and compounds were identified with the aid of gas chromatography, then amebicid effect of the essential oil on *Acanthamoeba* was tried. In the 3 repetitive study which was done with *Dorystoechas hastata* essential oil against the trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*, the essential oil gave significant results and 40 µg/ml dose of the essential oil was found 100% lethal in all hours and 20 µg/ml dose of the essential oil was found 100% lethal in 48 and 72 hours.

Keywords: *Dorystoechas hastata*; essential oil; *Acanthamoeba*; amebicide effect.



## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	I
ÖZET.....	III
ABSTRACT .....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Endemizm.....	4
2.1.1 Yurdumuzda Endemizm ve Endemik Bitkiler .....	6
2.2 Lamiaceae (Labiatae, Ballıbabagiller) Familyası .....	8
2.3 <i>Dorystoechas hastata</i> .....	10
2.3.1 Taksonomik Bilgileri .....	10
2.3.2 <i>Dorystoechas</i> Tür Tayin Anahtarı .....	11
2.3.3 Genel Bilgiler.....	11
2.3.4 Morfolojik ve Anatomik Özellikleri .....	12
2.3.5 <i>Dorystoechas hastata</i> ile Daha Önce Yapılan Çalışmalar .....	14
2.4 Uçucu Yağlar.....	15
2.4.1 Uçucu Yağların Tanımı ve Özellikleri .....	15
2.4.2 Uçucu Yağların Yapısındaki Bileşikler .....	16
2.4.2.1 Terpenler.....	17
2.4.2.1.1 Monoterpenler .....	18
2.4.2.1.2 Seskiterpenler .....	21
2.4.2.2 Diğer Bileşikler.....	23
2.4.3 Uçucu Yağların Etkileri.....	24
2.4.4 Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri .....	25
2.4.4.1 Distilasyon Yöntemi .....	25
2.4.4.1.1 Su Distilasyonu .....	26
2.4.4.1.2 Su Buharı Distilasyonu .....	26
2.4.4.1.3 Buhar Distilasyonu.....	26
2.4.4.1.4 Vakum Distilasyonu .....	27
2.4.4.1.5 Kuru Distilasyon .....	27
2.4.4.1.6 Hidrodifüzyon.....	27
2.4.4.2 Ekstraksiyon Yöntemi .....	28
2.4.4.2.1 Organik Çözücülerle Ekstraksiyon.....	28
2.4.4.2.2 Sabit Yağ ile Ekstraksiyon.....	28
2.4.4.2.3 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon) .....	29
2.4.4.2.4 Mikrodalga Ekstraksiyonu .....	29

2.4.4.2.5	Sıkıştırılmış Çözücü Ekstraksiyonu .....	30
2.4.4.2.6	Katı-Faz Mikroekstraksiyon (SPME (Solid Phase Microextraction)).....	30
2.4.4.2.7	Çok Yönlü Ekstraksiyon Yöntemleri .....	31
2.4.4.3	Mekanik Yöntem .....	31
2.5	Kromatografi .....	32
2.5.1	Gaz Kromatografisi.....	34
2.6	Veri Tabanları .....	36
2.7	<i>Acanthamoeba sp.</i> .....	39
2.7.1	Giriş .....	39
2.7.2	Tanım ve Sistemik .....	39
2.7.3	Dağılım .....	41
2.7.4	Yaşam Döngüsü ve Morfolojisi .....	42
2.7.5	<i>Acanthamoeba</i> 'nın Neden Olduğu Hastalıklar .....	44
2.7.5.1	<i>Acanthamoeba Keratiti</i> .....	44
2.7.5.2	Granüloamatöz Amibik Ensefalit (GAE) .....	46
2.7.5.3	Kutanöz <i>Acanthamoebiasis</i> .....	48
2.7.5.4	AIDS'li Hastalarda <i>Acanthamoeba</i> İnfeksiyonu .....	49
2.7.6	<i>Acanthamoeba</i> 'ya Karşı Bitkiler Kullanılarak Yapılan Etki Çalışmaları	49
3	GEREÇ VE YÖNTEM.....	52
3.1	<i>Dorystoechas hastata</i> Uçucu Yağının Elde Edilmesi.....	52
3.1.1	Bitki Materyalinin Hazırlanması.....	52
3.1.2	Uçucu Yağın Eldesi .....	53
3.2	Uçucu Yağın Nitel ve Nicel Analizleri.....	54
3.2.1	GC ve GC-MS Yöntemi .....	54
3.3	Uçucu Yağın <i>Acanthamoeba</i> Paraziti Üzerinde Amebisid Etkisinin Denenmesi.....	56
3.3.1	Deneylerde Kullanılacak <i>Acanthamoeba castellanii</i> Suşunun Elde Edilmesi .....	56
3.3.2	Çalışmanın <i>In-vitro</i> Aşaması .....	56
3.3.3	Deneysel Tasarım .....	56
3.4	Türkiye Uçucu Yağ Bitkileri Veri Tabanı Oluşturulması .....	58
3.4.1	Veri Tabanına Girilecek Verilerin Hazırlanması.....	58
3.4.2	Veri Tabanı Oluşturulması .....	59
3.4.2.1	İlişkisel Veri Tabanı Sistemi .....	59
3.4.2.2	Veri Giriş Yüzünün Hazırlanması.....	59
4	BULGULAR .....	61
4.1	<i>Dorystoechas hastata</i> Uçucu Yağı Eldesi .....	61
4.2	<i>Dorystoechas hastata</i> Uçucu Yağı GC, GC-MS Analizi .....	62
4.3	Uçucu Yağın <i>Acanthamoeba</i> Paraziti Üzerindeki Amebisid Etkisi.....	64
4.4	Türkiye Uçucu Yağ Bitkileri Veri Tabanı .....	66

5	TARTIŞMA.....	68
6	SONUÇ VE ÖNERİLER .....	71
7	KAYNAKLAR .....	72
	ÖZGEÇMİŞ .....	78

## Şekiller Dizini

<b>Şekil 1:</b> Türkiye'nin Fitocoğrafik Bölgeleri (18) .....	7
<b>Şekil 2:</b> Yurdumuzun Endemik Bitkiler Açısından Önemli Yörelere (19).....	7
<b>Şekil 3:</b> Lamiaceae (Labiatae) Çiçeği. <b>a:</b> alt labellum; <b>b:</b> üst labellum; <b>ç:</b> çiçeğin boyuna kesiti; <b>k:</b> kaliks; <b>o:</b> ovaryum; <b>st:</b> stilus; <b>stg:</b> stigma (23) .....	9
<b>Şekil 4:</b> <i>Dorystoechas hastata</i> Boiss. et. Heldr. ex Bentham (Fotoğraf: Bintuğ Öztürk) .....	10
<b>Şekil 5:</b> <i>Dorystoechas hastata</i> 'nın Genel Görünüşü (24).....	13
<b>Şekil 6:</b> <b>a:</b> <i>Dorystoechas hastata</i> yaprak ön yüz, <b>b:</b> Yaprak arka yüz, <b>c:</b> Kaliks, <b>d:</b> Kaliks disleri, <b>e:</b> Çiçek, <b>f:</b> Korolla ve korollaya birlesik stamenler, <b>g:</b> Ginobazik stilus ve ovuller (24) .....	13
<b>Şekil 7:</b> <i>Dorystoechas hastata</i> 'nın Yayılış Alanları (24) .....	14
<b>Şekil 8:</b> İzopren Molekülü (C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ) (41) .....	17
<b>Şekil 9:</b> Karbon Sayısına Göre Terpenler (41) .....	18
<b>Şekil 10:</b> Asiklik Monoterpenler (45) .....	19
<b>Şekil 11:</b> Asiklik Monoterpenlerin Oksijenli Türevleri (45) .....	19
<b>Şekil 12:</b> Monosiklik Monoterpenler (45) .....	20
<b>Şekil 13:</b> Monosiklik Monoterpenlerin Oksijenli Türevleri (45).....	20
<b>Şekil 14:</b> Bisiklik Monoterpenler (45).....	21
<b>Şekil 15:</b> Bisiklik Monoterpenlerin Oksijenli Türevleri (45).....	21
<b>Şekil 16:</b> Seskiterpenler (45) .....	22
<b>Şekil 17:</b> Seskiterpenlerin Oksijenli Türevleri (45) .....	22
<b>Şekil 18:</b> Mekanizmalara Göre Hareketli ve Hareketsiz Fazların Durumu (41).....	33
<b>Şekil 19:</b> Gaz Kromatografisi Bölümleri (41) .....	35
<b>Şekil 20:</b> Veri Tabanı Görseli (54).....	37
<b>Şekil 21:</b> Serbest Yaşayan Amiplerin Sınıflandırılması (3).....	40
<b>Şekil 22:</b> Bilinen <i>Acanthamoeba</i> Genotipleri ve Onların İnsandaki Hastalıklarıyla İlişkisi (3).....	40
<b>Şekil 23:</b> <i>Acanthamoeba</i> 'nın Çevredeki Dağılımı (57).....	41
<b>Şekil 24:</b> <i>Acanthamoeba</i> Trofozoit ve Kist Formları ve Birbirlerine Dönüşümleri (3) 43	
<b>Şekil 25:</b> <i>Acanthamoeba</i> Türlerinin Yaşam Döngüsü ve İnsanda Oluşturduğu İnfeksiyon (59).....	43
<b>Şekil 26:</b> Neo-Clevenger Tipi Distilasyon Düzenegi ve Balon İçindeki Bitkimiz <i>Dorystoechas hastata</i> (Fotoğraf: Damla Madencioğlu).....	53
<b>Şekil 27:</b> Kombine Çalışan GC-MS, GC-FID ve Otomatik Örnekleyici Sistemi (FABAL: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı) (Fotoğraf: Bintuğ Öztürk) .....	54
<b>Şekil 28:</b> 96 Kuyucuklu Steril Kültür Plağı (Fotoğraf: Damla Madencioğlu).....	57
<b>Şekil 29:</b> Thoma Lamı ve Mikroskopta İncelenmek Üzere Preparatımız (Fotoğraf: Damla Madencioğlu) .....	58
<b>Şekil 30:</b> Türkiye Uçucu Yağ Bitkileri Veri Tabanı-İlişkisel Veri Tabanı Sistemi .....	59

<b>Şekil 31:</b> Türkiye Uçucu Yağ Bitkileri Veri Tabanı-Veri Giriş Ara Yüzünün Tasarım Ekranı.....	60
<b>Şekil 32:</b> <i>Dorystoechas hastata</i> Uçucu Yağı (Fotoğraf: Damla Madencioğlu) .....	61
<b>Şekil 33:</b> <i>Dorystoechas hastata</i> Uçucu Yağının Gaz Kromatogramı.....	62
<b>Şekil 34:</b> C8-C20 Alkan Karışımları .....	63
<b>Şekil 35:</b> Uçucu Yağ Bileşiklerinin Tanımlanmasında Kullanılan Aritmetik İndis Hesap Tablosu .....	63
<b>Şekil 36:</b> <i>Dorystoechas hastata</i> Uçucu Yağının Bileşimi .....	64
<b>Şekil 37:</b> Ölü ve Canlı <i>Acanthamoeba castellanii</i> Trofozoitlerinin Mikroskop Görüntüsü (Fotoğraf: Damla Madencioğlu).....	65
<b>Şekil 38:</b> <i>Acanthamoeba castellanii</i> Trofozoitlerinin 3 Tekrarlı Çalışma Sonundaki % Canlılık Oranlarının Ortalaması .....	65
<b>Şekil 39:</b> Türkiye Uçucu Yağ Bitkileri Veri Tabanı Literatür Veri Giriş Yüzü .....	66
<b>Şekil 40:</b> Veri Tabanının Son Kullanıcı Yüzü .....	67
<b>Şekil 41:</b> Başer ve Meriçli uçucu yağ bileşenleri tablosu .....	68

## Kısaltmalar Listesi

<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>GHz</b>	Gigahertz
<b>SPME</b>	Solid Phase Microextraction
<b>GC</b>	Gas Chromatography
<b>GC-MS</b>	Gas Chromatography- Mass Spectrometry
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography
<b>RT</b>	Retention Time
<b>GAE</b>	Granülomatöz Amibik Ensefalit
<b>AK</b>	<i>Acanthamoeba</i> Keratiti
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus
<b>BOS</b>	Beyin Omurilik Sıvısı
<b>AIDS</b>	Acquired Immune Deficiency Syndrome
<b>MMS</b>	Merkezi Sinir Sistemi
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>İZEF</b>	İzmir Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
<b>KI</b>	Kovats Indis
<b>RI</b>	Retention Indis
<b>AI</b>	Aritmetic Indis
<b>DEÜ</b>	Dokuz Eylül Üniversitesi
<b>PYG</b>	Peptone Yeast extract Glucose
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit

# 1 GİRİŞ

Toprak ve tatlı sularda özgür yaşayan amipler insanlarda ve hayvanlarda ölümcül parazitlere neden olmaktadır. *Acanthamoeba* türleri de çevrede yaygın olarak bulunan ve önemli hastalıklara yol açan özgür yaşayan amip türlerinden biridir (1). *Acanthamoeba*'nın yaşam döngüsünde iki formu vardır: Trofozoit ve kist formu. *Acanthamoeba*'nın her iki formu da insan vücuduna erişebilir ve hastalık yapabilir. Vücuda kontakt lenslerle temas, kesikler, cilt yaraları ve solunum gibi pek çok yolla giren *Acanthamoeba* türleri gözde, deride ve sinir sisteminde ciddi enfeksiyonlara yol açmaktadırlar (2,3).

*Acanthamoeba* türleri, gözde "*Acanthamoeba keratiti*"ne, beyin ve omurilikte "granülatöz amibik enfeksiyon"a, deride "kutanöz acanthamoebiasis"e ve AIDS hastaları gibi bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde de yaygın enfeksiyona yol açar (3). *Acanthamoeba* keratitinde kontakt lens kullanımı ana risk faktörü olarak düşünülmektedir ve özellikle son zamanlarda yaygınlaşan kontakt lens kullanımıyla birlikte bu hastalığın tedavisi iyice değer kazanmıştır (2).

*Acanthamoeba* enfeksiyonlarında genel tedavi olarak hastalığın erken dönemlerinde kombine ilaç tedavisi uygulanarak hasta tedavi edilmeye çalışılır. Fakat bu ilaç tedavileri ciddi yan etkiler içermektedirler ve özellikle sinir sistemi enfeksiyonlarında tedavi çoğu zaman hastanın ölümüyle sonuçlanır. Ayrıca *Acanthamoeba*'nın enfeksiyon alanından eradikasyonu zordur çünkü olumsuz koşullar altında *Acanthamoeba*'lar kendini kese içine alarak trofozoit formundan kist formuna dönüşür. Kist formları da kendilerini anti-amip ilaçlara karşı dayanıklı hale getiren çift katmanlı duvara sahip olmalarından dolayı tedavi daha az etkili olur. Bu yüzden de hastalığın ilerleyen dönemlerinde majör terapötik ajanlar etkisiz kalır.

*Acanthamoeba* enfeksiyonlarında uygulanmakta olan çok başarılı bir kemoterapi olmamasından dolayı, tedavinin hastalar tarafından devamlılığını kolaylaştıracak daha aktif ilaçlar ve dinamik tedavilerin geliştirilmesi gerekmektedir (4,5). Bu yüzden de yüksek yapılı bitkiler ve mikrobiyal organizmalar yeni tedavi yolları bulmak adına araştırılmaktadırlar.

Çok eski zamanlardan beri geleneksel tedavilerde kullanılan doğal ürünler, yalnızca geleneksel ya da etnik tedavilerin kaynağı değildir, ayrıca taşıdıkları çok çeşitli madde gruplarından dolayı pek çok yeni ilaç hammaddesi potansiyeline de sahiptirler. Bu hammadde potansiyelini değerlendirmek adına bu konuda araştırmalar yapılması da yüksek aktivite ve seçiciliğe sahip yeni moleküllerin keşfedilmesi açısından çok değerlidir.

Özellikle de günümüzde pek çok paraziter hastalığın tedavisi için yalnızca birkaç ilaç bulunmasından ve yeterli özgünlüğe sahip ilaçlar bulunmamasından ötürü yeni antiparaziter ilaç araştırmaları yapılmaktadır. Bu araştırmalarda bitkisel kaynaklı alkaloidler, terpenler ve fenolik bileşiklerin sürpriz etki ve selektiviteye sahip antiparaziter etkili madde grupları olduğu görülmüştür (6). Buradan yola çıkılarak pek çok bitki ekstresi ve uçucu yağı *Acanthamoeba*'ya karşı denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır (4,5,7,-13,15).

*Acanthamoeba*'ya karşı bitki uçucu yağları kullanılarak yapılan bir etki çalışmasında *Pterocaulon polystachyum* uçucu yağı *Acanthamoeba polyphaga* trofozoitlerine karşı denenmiş ve 10 ve 20 mg/ml dozlarında %100 letal etkili bulunmuştur (7).

*Acanthamoeba*'ya karşı yapılan bir diğer uçucu yağ çalışmasında da *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, *Croton isabelli* uçucu yağları *Acanthamoeba polyphaga* trofozoitlerine karşı denenmiş, en çok amebisidal etki *Croton ericoides*'te görülürken, en az etki de *Croton isabelli* uçucu yağında görülmüştür. Fakat aynı zamanda bu 3 uçucu yağ kornea hücrelerinde sitotoksik etki göstermiştir (8).

Uçucu yağlar kullanılarak yapılan bir başka etki denemesinde de *Piper hispidinervum* uçucu yağı *Acanthamoeba polyphaga* trofozoitlerine karşı denenmiş ve uçucu yağın 0.5 mg/ml dozu %100 letal etkili bulunmuştur. Ayrıca yapılan



testlerde uçucu yağın 0.25 mg/ml doza kadar memeli hücrelerine sitotoksik etkili olmadığı görülmüştür (9).

Bazı bitki uçucu yağlarının antiprotozoal aktivitesine bakılan başka bir çalışmada ise, 16'sı Lamiaceae, 7'si Verbenaceae, 4'ü Asteraceae, 3'ü Piperaceae, 2'si Annonaceae familyalarından olan ve geri kalan bitki türlerinin de her biri bir familyaya ait olacak şekilde toplam 42 bitki türünün uçucu yağlarının antiprotozoal aktivitesine bakılmış ve etkili bulunmuşlardır (14).

Uçucu yağların antiprotozoal bir ajan olarak denendiği bir diğer çalışmada ise, *Citrus sinensis* (orange), *Citrofortunella mitis* (syn. *Citrus microcarpa*, *calamansi*), *Citrus poonensis* (ponkan), *Citrus reticulata* (dalandan), *Eucalyptus citriodora* (eucalyptus), *Zingiber officinale* (ginger), *Cananga odorata* (ilang-ilang), *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Pandanus sp.* (pandan) and *Mentha piperita* (peppermint) uçucu yağlarının *Acanthamoeba* türlerinin trofozoitlerine karşı antiprotozoal aktivitesine bakılmıştır. *Cymbopogon winterianus*, *Citrus reticulata* ve *Citrus poonensis* %100 antiprotozoal aktivite gösterirken, *Pandanus sp.* ve *Zingiber officinale* uçucu yağları ise *Acanthamoeba* türleri üzerinde letal etki göstermemiştir (15).

Bu çalışmamızda, gerek daha önce *Acanthamoeba*'ya karşı bitki uçucu yağlarıyla yapılmış etki denemelerine dayanarak, gerekse uçucu yağların başta terpenik maddeler olmak üzere antiparaziter etki sağlayabilecek pek çok potansiyel bileşiğe sahip olması nedeniyle, *Dorystoechas hastata* uçucu yağının *Acanthamoeba* üzerinde amebisid etkisinin denenmesi değerli bulunmuştur.

Ayrıca bu çalışma kapsamında uçucu yağlar ile ilgili literatür taraması yaparken, uçucu yağların pek çok çalışmada kullanılması nedeniyle, uçucu yağlarla ilgili literatürlerin derli toplu bir arada bulunması ve bu literatür bilgilerine hızlıca erişilmesi adına, taradığımız literatürleri bir veri tabanına aktararak "**Türkiye Uçucu Yağ Bitkileri Veri Tabanı**"nın oluşturulması da ek bir amaç edinilmiştir.

## 2 GENEL BİLGİLER

Bu bölüm Endemizm, Lamiaceae Familyası, *Dorystoechas hastata*, Uçucu Yağlar, Kromatografi, Veri Tabanları ve *Acanthamoeba* olarak 7 ana başlık altında incelenecektir.

### 2.1 Endemizm

Yunanca *endemos* kelimesi yerli, o yere ait anlamı taşır.

Endemizm, bir canlının dar bir alanda bulunması olayıdır. Diğer bir deyişle dar yayılış (stenokori) durumudur. Endemik bitki de sınırları belli, dar bir alanda bulunan bitkidir (16). Aslında endemik bir canlının bulunduğu alan illa dar olmak zorunda değildir, geniş de olabilir. Ancak önemli olan söz konusu bitki ya da hayvan türünün yayılışının belirli bir bölgeyi ilgilendirmesidir (17).

Endemik türlerin dar yayılışlarının genelde 2 nedeni vardır (16):

- 1) Jeolojik devirlerde geniş yayılış alanı olan bir bitkinin, daha sonra çevre koşullarının değişmesi ile büyük oranda ortadan kalkması ve bu bitki türünden kalan bireylerin sığınabildikleri çok özel çevre koşullarında varlıklarını devam ettirmesidir. Böyle türler "paleoendemik", "konservatif endemik" ya da "relikt endemik" olarak isimlendirilir.
- 2) Yeni tür oluşmasıdır. Bu türler henüz yayılış aşamasında oldukları için yayılış alanları dardır. Böyle türler de "neoendemik" ya da "progressif endemik" olarak isimlendirilirler.

Endemiklerin sınıflandırılması konusunda Favarger ve Contandriopulus'un 1961 yılında yaptıkları sınıflandırma en çok kabul edilen sınıflandırmalardan biridir. Bu sınıflandırmaya göre endemikler 4 gruba ayrılır (16):

- 1) Paleoendemikler
- 2) Şizoendemikler
- 3) Patroendemikler
- 4) Apoendemikler

**1) Paleoendemikler:** Sistematik olarak izole olmuş, atasal taksonları ve köken buldukları alanla ilişkileri kesilmiş taksonlardır. Bu endemiklere en iyi örnek monotipik cinslerdir. Paleoendemiklerin bugünkü buldukları yer, ilk ortaya çıktıkları yer olmayıp, jeolojik devirlerdeki daha geniş bir alanın günümüzde kalan son alanıdır.

**2) Şizoendemikler:** Şizoendemikler ortak orjinli olup, kardeş veya aynı ebeveynden ortaya çıkan akraba taksonlardır. Büyük olasılıkla da bunlar, yaklaşık aynı zamanda oluşmuşlardır. Tür veya cins düzeyinde olabilirler.

**3) Patroendemikler:** Kendileri diploid olan ve poliploid yoluyla komşu bölgelerde yeni taksonlar oluşturan endemiklerdir. Atasal takson daha dar yayılışlıyken, yeni oluşan taksonlar daha geniş yayılışlıdır.

**4) Apoendemikler:** Patroendemiklerin aksine, atasal bir taksondan oluşmuş endemik taksonlardır. Şizoendemiklerden farklı olarak, büyük çoğunlukla poliploid yolu ile oluşmuşlardır. Yani ani tür oluşumu söz konusudur.

Endemikler genel olarak gelişigüzel dağılım gösterirler fakat bazı yerlerde daha çok yoğunlaşmışlardır. Bu yoğunlaşma da bazı habitatların özel yapılarının yüksek farklılaşma göstermesi sonucu ve oluşan bazı taksonların yayılışlarındaki engellerden dolayı olmaktadır. Dağlar ve subalpin bölgeler, adalar, psammofitik habitatlar, kayalar, kaya çatlakları, halofitik habitatlar, bu yoğunlaşmanın görüldüğü endemiklerce zengin olan alanlardır. Alpin bölgeler, bataklıklar ve çöller ise endemikler açısından fakir alanlardır.

Endemizm gerektiğinde incelendiği zaman, evrim, biyocoğrafya, bitki tarihi ve tür oluşumları konusunda önemli bilgiler sağlayabilmektedir. Ayrıca endemik taksonların araştırılması ile alan parçalanmaları, göçler gibi birçok bitki coğrafyası problemlerinin çözümüne önemli katkılar sağlanabilmektedir. Özellikle

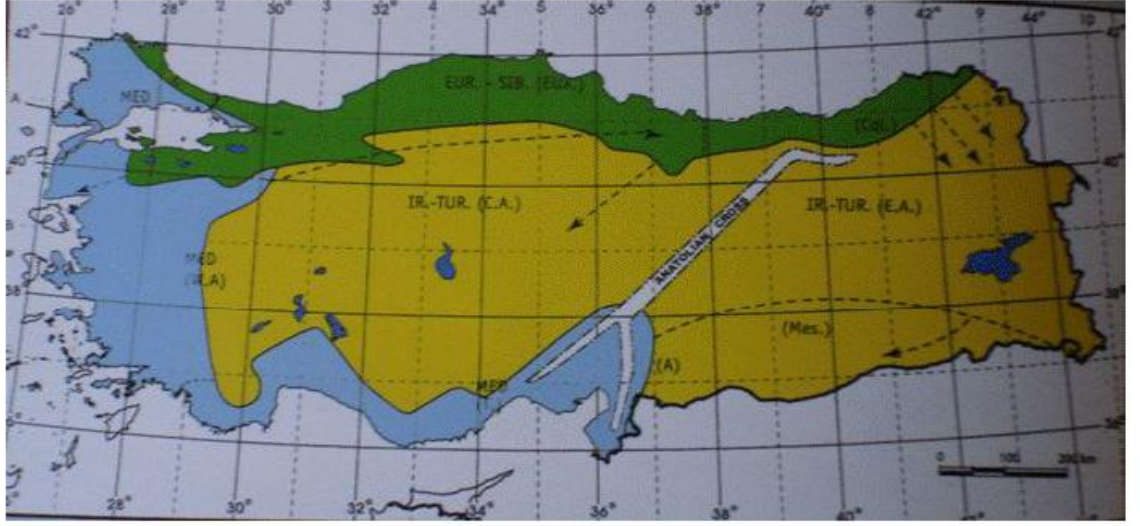
paleoendemikler, flora orjinleri ve eski jeolojik devirlere ait bilgilerin elde edilmesinde çok önemlidir (16).

### **2.1.1 Yurdumuzda Endemizm ve Endemik Bitkiler**

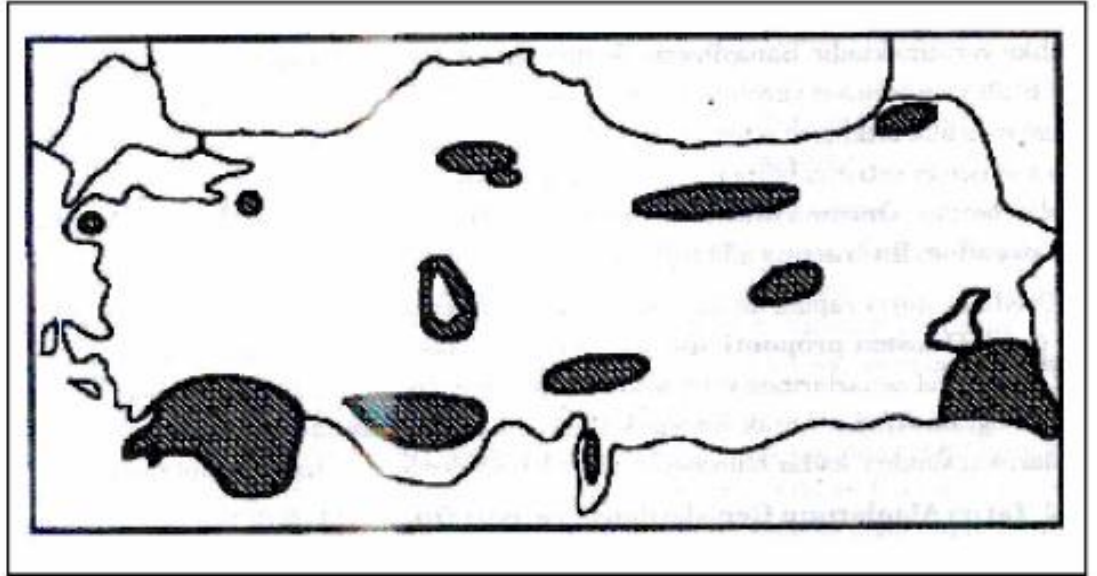
Türkiye, iklim ve toprak özellikleri bakımından farklılıklar gösteren coğrafi bölgelere sahip olması, Asya ve Avrupa kıtalarının kesişiminde bulunması, iki önemli Vavilov gen merkezinin (Akdeniz ve Yakın Doğu) kesişiminde bulunması, üç tarafının denizlerle çevrili olması, üç önemli fitocoğrafik bölgeyi (Avrupa-Sibirya, İran-Turan ve Akdeniz) (Şekil 1) barındırması nedeniyle bitki çeşitliliği bakımından dünyada önemli bir yere sahiptir (18). Son yapılan teşhislerin de eklenmesiyle birlikte ülkemizde 12000'in üzerinde bitki taksonu bulunduğu ortaya çıkmıştır (17,18). Türkiye bitki çeşitliliğinde olduğu gibi endemizm bakımından da dünyada önemli bir yere sahiptir. Türkiye kendisinden 15 kat büyük yüz ölçümüne sahip olan Avrupa kıtasıyla karşılaştırıldığında, bu zenginliğimiz daha iyi anlaşılmaktadır (18). Nitekim Avrupa ülkeleri arasında en çok endemik türü sahip olan ülke 800 endemik tür ile Yunanistan iken, ülkemizdeki endemik tür sayısı 3000'den fazladır ve endemizm oranı %34,4'tür (17,18).

Türkiye'de 63 familyada endemik bitkiler bulunmaktadır. Yurdumuzda tamamı endemik olan hiçbir familya yokken, 15 tane endemik cins vardır. En çok endemik tür, sahip olduğu 126 cinsten 40'ünün endemik tür içermesiyle Asteraceae familyasında bulunmaktadır.

Yurdumuzda İran-Turan bölgesi taksonca en zengin bölge olup, endemik bitkilerin sayısal oranı da bu bölgede çok yüksektir. İran-Turan bölgesini Akdeniz, onu da Avrupa-Sibirya bölgesi izlemektedir. Yurdumuzun 3 flora bölgesinin birbirine geçiş bölgelerinde de endemik bitki sayısı oldukça yüksektir. Ayrıca İç Anadolu ve Doğu Anadolu'yu birbirinden ayıran ve "Anadolu Çaprazı" olarak isimlendirilen dağ sıraları da endemik bitkiler açısından zengindir (16).



Şekil 1: Türkiye'nin Fitocoğrafik Bölgeleri (18)



Şekil 2: Yurdumuzun Endemik Bitkiler Açısından Önemli Yörelere (19)

## 2.2 Lamiaceae (Labiatae, Ballıbabagiller) Familyası

Lamiaceae familyası çoğunlukla güzel kokulu olan, tek veya çok yıllık otsu, nadiren çalı ya da ağaç şeklindeki bitkilerdir (20). Kuzey yarımkürede ve özellikle Akdeniz bölgesinde yayılış gösterirler (21).

Lamiaceae kozmopolit bir familyadır, yaklaşık 200 cins ve 3000 kadar tür içerir. Ülkemizde de 45 cins ve 546'dan fazla türü vardır (20). Familyanın endemizm oranı da %44,2 olarak belirtilmiştir (22).

Lamiaceae familyasındaki bitkilerde gövde ve dallar 4 köşelidir ve bu özellik familya için karakteristiktir (23). Bu familyanın önemli özelliklerinden birisi de gövdelerinde epidermis altında köşe kollenkiması ve uçucu yağ salgılayan tüylerin bulunmasıdır (21).

Yapraklar basit ya da bileşik yapıdadır, stipulasızdır ve karşılıklı ya da dairesel dizilişlidir (20).

Taşıyıcı yaprakların koltuklarından gelişen çiçekler, kimoza ya da rasemus durumunda toplanmıştır, erdişidir ve zigomorf simetriye sahiptir (20,21).

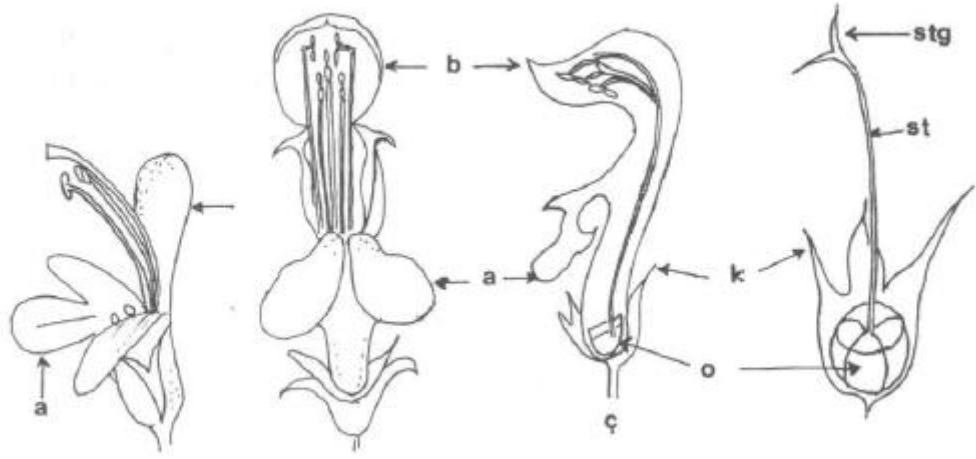
Kaliks 5 sepalli, 2 dudaklıdır. Korolla 5 petalli, tabanda tüpsü, üstte 2 dudaklıdır. Üst dudak 2, alt dudak 3 petalin birleşmesi ile oluşmuştur (21).

Stamenler genellikle didinamdır (20). Bunun dışında bazı türlerde filamentleri eşit boyda 4 stamen bulunurken, bazı türlerde de 2 stamen bulunur (23).

Pistil 1 tanedir. Ovaryum üst durumlu, 2 karpelli, 4 gözlüdür ve her gözde 1 ovül bulunur. Ovaryumun plesantasyonu bazal ya da eksenseldir. Stilus ginobaziktir (20).

Meyve 4 nukstan meydana gelir ve şizokarp tiptedir.

Familyanın genel çiçek formülü:  $z.K_{(5)}.C_{(5)}.A_4.G_{(2)}$  (23).



**Şekil 3:** Lamiaceae (Labiatae) Çiçeği. **a:**alt labellum; **b:**üst labellum; **ç:**çiçeğin boyuna kesiti; **k:**kaliks; **o:**ovaryum; **st:**stilus; **stg:**stigma (23)

Lamiaceae familyası aromatik bitki bakımından en zengin familyalardan biridir. Bu familyaya ait bitkilerin çoğu antik çağlardan bu yana halk ilacı olarak çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu yönüyle antibakteriyel aktiviteye sahip olan bitkilerin bakteriyel kaynaklı insan, hayvan, bitki hastalıklarının kontrolünde etkili olabileceği bildirilmektedir. Lamiaceae familyasına ait cinsler özellikle sahip oldukları terpenik maddeler (mono, di, triterpenler), flavonoidler, iridoitler ve tanenler nedeniyle önemli fizyolojik aktivitelere sahip bitkileri içermektedir (22). Bu familyadan, familya üyelerinin çoğunun içerdiği uçucu yağlardan dolayı farmakolojide, eczacılıkta, parfüm ve kozmetik sanayinde yararlanır. Ayrıca familya üyeleri baharat ve süs bitkisi olarak da kullanılır (20,21).

## 2.3 *Dorystoechas hastata*



Şekil 4: *Dorystoechas hastata* Boiss. et. Heldr. ex Bentham (Fotoğraf: Bintuğ Öztürk)

### 2.3.1 Taksonomik Bilgileri

Alem : Plantae

Şube : Angiospermae

Sınıf : Dicotyledone

Alt Sınıf: Asteridae

Takım : Lamiales

Familya: Lamiaceae

Cins : *Dorystoechas* Boiss. & Heldr. ex Bentham corr. Bentham

Tür : *Dorystoechas hastata* Boiss. & Heldr. ex Bentham (24,25).



### 2.3.2 *Dorystoechas* Tür Tayin Anahtarı

1. Çiçeklerde verimli stamen sayısı 4 veya çiçekler dişi 6  
\* Fertil stamen sayısı 2(-3), üst çift yok veya çok farklılaşmış (kıyaslama: *Micromeria cymuligera* 2
2. Anterlerin konnektifleri filamente oturduğu yere kadar uzamış ve parçalara (teka) ayrılmış.  
*Salvia*  
\* Konnektif kısa, filamente oturduğu yere kadar ayrılmamış. 3
3. Bir veya çok yıllık otsu bitkiler, aromatik kokulu veya kokusuz bitkiler 5  
\* Çalimsı, aromatik kokulu bitkiler 4
4. Yapraklar linear, herdem yeşil. Çanak üst dudağı tam. *Rosmarinus*  
\* Yapraklar mızrak şeklinde, yazları yeşil. Çanak üst dudağı 3 loplu.

***Dorystoechas hastata***

(26).

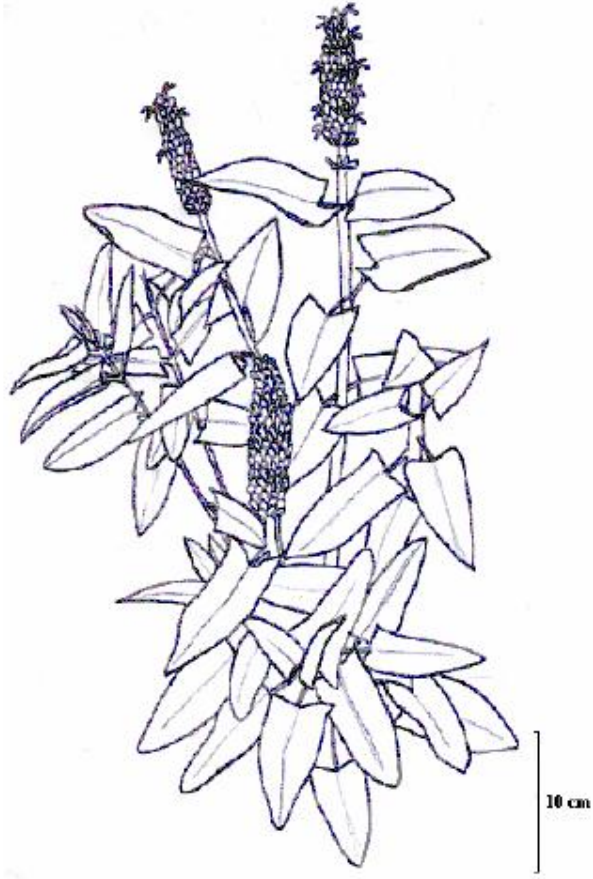
### 2.3.3 Genel Bilgiler

*Dorystoechas hastata* Boiss. & Heldr. ex Benth, Lamiaceae familyasına ait, Antalya'ya endemik, tersiyer relikt monotipik bir bitkidir. Bu tür sadece Termessos Milli Parkı'nda koruma altındadır ancak kötü koşullar altında ve çimlenme zorluğuyla birlikte başka lokalitelerde de yaşamaktadır. Antalya ve çevresinde "çalba çayı" olarak bilinen bu bitkinin taze ve kurutulmuş yaprakları, yöre halkı tarafından soğuk algınlığı ve grip tedavisinde kullanılmaktadır (27). Bu bitkiden elde edilen droglar, sadece yöresel kullanımı olan droglardır ve İstanbul aktarlarında satılmamaktadır (28).

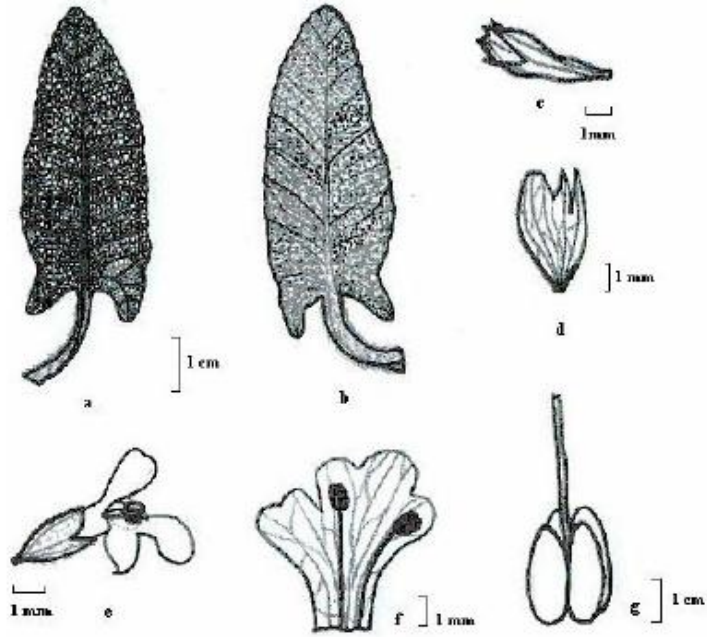
Lamiaceae familyasındaki pek çok bitki dağ çayı olarak isimlendirilir, fakat *Dorystoechas hastata* 1999 yılında Baytop tarafından "Gerçek Çalba" olarak kabul edilmiştir (27). Daha sonra da "Devren Kekiği" olarak yeni bir isim verilmiştir (29).

### 2.3.4 Morfolojik ve Anatomik Özellikleri

*Dorystoechas hastata* tüm kısımlarında güçlü bir şekilde aromatik, 40-100 cm uzunluğunda, odunsu bir çalıdır. Ergenlikte çok sayıda sesil bezleri ile yoğun tüylü, salgı organları bazen kısa baş şeklindedir. Yaprakları mızrak şeklinde, hastattır, 2.8-7.5\*1.5-3 cm boyundadır, çok sayıda sesil bezlerine sahiptir, buruşuktur, saplıdır (Şekil 6). Yaprak sapı 1-3.6 cm'dir. Çiçek durumu, ince, dik, silindirik başak şeklindedir; yalancı çevrel çiçek durumu hemen hemen sıktır; çiçekler biseksüel, bazen erkek verimsizdir. Başak 6-17 cm'dir ve meyve zamanında uzamaz, yalancı çevrel çiçek durumu 10-25 çiçeklidir; meyve durumu sert ve sonraki mevsime kadar kalıcıdır. Çiçek sapları 1 mm boyundadır. Kaliks eksen üzerinde yatıktır, yoğun olarak salgı organsız kıllı, nadiren baş şeklinde salgı organlıdır; 2 dudaklı, dudaklar hemen hemen eşit, tüpsü-çansı şekildedir, 8-11 damarlıdır, birbirine yaklaşan dudaklarla meyvedeki büyüme ağzı kapatır; üst dudak 3 dişli, alt 2 dişlidir, diş 1.5 mm'dir. Korolla beyazdır, 4-6 mm'dir; tüp şeklinde ve hemen hemen kalikse eşittir; 2 dudaklıdır, üst dudak genelde net bir şekilde 2 eşit parçalıdır, 3 loblu alt dudaktan daha kısadır; iki dudak da sesil bezleri taşır. Stamenler 2 tane, nadiren 3 tanedir, daha nadiren dışarı uzamıştır, anterler tepede kıvrılarak birleşmiştir, teka yayılmıştır; verimsiz stamenler genelde yoktur; tabla kırmızıdır, stilus 2 lobludur. Meyve nuks tipidir; 2.5\*1 mm, tüysüz, 3 köşeli, doğrusal-dikdörtgensi, düz, pürüzsüz, tepede gagalıdır. Çiçeklenme 5.-7. Aylarda olur; kayalar ve frigana etrafında, 650-2000 m yükseklikte bulunur. Endemik olup, Doğu Akdeniz elementidir. Antalya ilinde nadir değildir fakat orayla sınırlıdır (30). *Dorystoechas hastata*'nın yayılış alanları şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 5: *Dorystoechas hastata*'nın Genel Görünüşü (24)



Şekil 6: a: *Dorystoechas hastata* yaprak ön yüz, b: Yaprak arka yüz, c: Kaliks, d: Kaliks disleri, e: Çiçek, f: Korolla ve korollaya birlesik stamenler, g: Ginobazik stilus ve ovuller (24)



Şekil 7: *Dorystoechas hastata*'nın Yayılış Alanları (24)

### 2.3.5 *Dorystoechas hastata* ile Daha Önce Yapılan Çalışmalar

*Dorystoechas hastata* bitkisinden uçucu yağ eldesi ve analizi için daha önce yapılan çalışmalarda, elde edilen uçucu yağların  $\alpha$ -terpineol, kafur, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -fellandren, limonen, kamfen,  $\alpha$ -pinen, 1,8-sineol, borneol, guaiol ve karyofillen gibi bileşikleri içerdiği tespit edilmiştir (31,32). Lamiaceae familyasının çoğu üyelerinde olduğu gibi, *Dorystoechas hastata* uçucu yağı analizinde de ana bileşik 1,8-sineol olarak bulunmuştur (31).

*Dorystoechas hastata*'nın fitokimyasal incelemeleri sonucunda bitkinin yapraklarından karnosol ve rosmanol adlı diterpenlerin, luteolin, luteolin-7-glikozit ve 6-metoksiluteolin-7-glikozit gibi flavonoidlerin yanı sıra kafeik asit, klorojenik asit gibi fenolik asitlerin izole edildiği bildirilmiştir (33).

*Dorystoechas hastata* ile yapılan başka bir çalışmada da bitkinin köklerinden diterpenler ve norditerpenler tanımlanmıştır (34).

2004 yılında Kantarcı ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise *Dorystoechas hastata* uçucu yağının serbest radikal süpürücü, antioksidan ve antimikrobiyal etkileri olduğu görülmüştür (35).

Ayrıca 2008’de Karagözler ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma sonucunda bu türün doğal bir pirolin ve antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (36).

2011 yılında yapılan bir çalışmada ise *Dorystoechas hastata*’nın çeşitli fenolik bileşikleri içerdiği ve güçlü antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmüştür (37).

Başka bir çalışmada da *Dorystoechas hastata*’nın aksillar sürgün proliferasyonu yoluyla klonal çoğaltımı çalışılmıştır (27).

## 2.4 Uçucu Yağlar

### 2.4.1 Uçucu Yağların Tanımı ve Özellikleri

Uçucu yağlar, aromatik bitkiler tarafından sekonder metabolitler olarak oluşturulan, güçlü bir koku ile karakterize, uçucu, doğal, kompleks bileşiklerdir (38).

Uçucu yağlar oda sıcaklığında sıvı olan, kolaylıkla kristalleşebilen bileşiklerdir (39). Genellikle renksiz ya da açık sarı renklidirler fakat kırmızı ve mavi renkli uçucu yağlar da vardır. Örneğin; tarçın ve karanfil uçucu yağları kırmızı, papatya uçucu yağı mavi mürekkep rengindedir (39,40).

Uçucu yağlar açıkta bırakıldıkları zaman oda sıcaklığında bile buharlaşabildikleri için “uçucu yağ”, “eterik yağ”, güzel kokulu oldukları ve parfüm sanayinde kullanıldıkları için de “esans” olarak isimlendirilmişlerdir.

Uçucu yağlar su ile karışmadıkları ve su yüzeyinde tabaka oluşturdukları için “yağ” olarak anılırlar da sabit yağlardan farklıdır. Uçucu yağlar su buharı ile sürüklenebilir, süzgeç kağıdında leke bırakmazlarken, sabit yağlar su buharı ile sürüklenebilir ve süzgeç kağıdına damlatıldığında kalıcı, yağlı bir leke bırakırlar. Ayrıca uçucu yağlar sulu alkollerde çözünürken, sabit yağlar sulu alkollerde çözünemezler.

Uçucu yağ taşıyan bitkiler çoğunlukla sıcak iklim bölgelerinde yetişmektedirler. Türkiye’de de Akdeniz bölgesi uçucu yağ taşıyan bitkiler bakımından zengin bir bölgedir (40).

Uçucu yağları içeren bitki familyaları Lamiaceae, Apiaceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, Cupressaceae, Iridaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Poaceae, Rosaceae, Rutaceae, Zingiberaceae olarak sayılabilir (40,41,42).

Uçucu yağlar bitkinin tüm organlarında veya bitkinin belirli bir organında, bazen de bir organın belirli dokularında da bulunabilmektedir. Bitkilerin bulunduğu familyalara göre salgı tüylerinde, salgı ceplerinde, salgı kanallarında, salgı hücrelerinde ve nadiren parankima dokusu içinde yayılmış olarak bulunurlar (41).

Uçucu yağlar ışık ve hava karşısında zamanla oksitlenebilirler, reçineleşebilirler ve renkleri koyulaşabilir. Bu yüzden serin ve kuru bir yerde, ağzı sıkıca kapalı bir şekilde ve özellikle dolu olarak, renkli şişelerde saklanmalıdır.

Uçucu yağlar yüksek kırılma indeksine sahiptir ve optikçe aktiftirler. Uçucu yağların polarize ışığı spesifik çevirmeleri uçucu yağın tanınmasında önemli özelliklerden biridir. Eğer uçucu yağın kırılma indeksinde ve polarize ışığı çevirme derecesinde herhangi bir değişiklik varsa, bu değişim uçucu yağın saflığının bozulduğunun bir göstergesidir (40).

Uçucu yağlar tarçın ve karanfil uçucu yağları hariç sudan hafiftirler (41). Petrol eteri, benzen, eter, etanol gibi organik çözücülerde ve yağlarda çok çözünürler, suda az çözünürler. Aslında uçucu yağlar kural olarak su ile karışmayan maddeler olsa da, kokularının suya geçmesine yetecek kadar suda çözünürler. Aromatik sular da bu özellikten yararlanarak hazırlanır (40,41).

#### **2.4.2 Uçucu Yağların Yapısındaki Bileşikler**

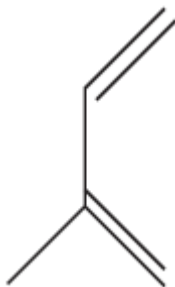
Günümüzde uçucu yağların yapısında 2000’den fazla kimyasal bileşiğin bulunduğu gösterilmiş olup, bunların % 90’ı terpenik maddelerden oluşmuştur. Yapılarında bugün 150’den fazla monoterpen, 1000 kadar seskiterpen ile diterpenler bulunmuştur (43). Ayrıca bitkiler aleminde doğal olarak ve yaygın şekilde bulunan

terpenoitler de uçucu yağların temel bileşiklerini oluşturmaktadır. Terpenoitler, terpenik hidrokarbonların alkol, aldehit, keton, fenolik ester, eter, asit ve esterler gibi oksijenlenmiş türevleridir (44). Uçucu yağların kendisine has kokusu ve tadı da terpenlerin oksitlenmesi ile oluşan bu oksijenli türevlerden ileri gelir (43). Yani uçucu yağlarda en çok mono-, seski- ve diterpenler ile bunların oksijenli türevleri olan terpenoitler mevcuttur denilebilir (41). Bunların yanında alkoller (benzil alkol, sinnamik alkol, sitronellol), organik asitler (asetik asit, benzoik asit, sinnamik asit), fenoller (karvakrol, kativol, timol), ketonlar (kafur, karvon, pulegon), aldehitler (benzaldehit, sinnamik aldehit, sitral), esterler (benzil benzoat, bornil asetat, geranil asetat), fenol esterleri (anetol, öjenol, safrol), ve diğer bileşikler (sülfür, nitrojen, kumarin) bulunmaktadır (43).

#### 2.4.2.1 Terpenler

Terpenler, doğal ürünlerin en yaygın gruplarından biridir. Bitkilerde ve hayvanlarda birçok farklı işlevleri bulunurken gıdalarda da aroma bileşenleri olarak önemlidirler. Örneğin turuncgiller, tarçın ve diğer baharat aromaları birkaç terpen ile karakterize edilir. Limonen ve sitral (her ikisi de limonda bulunur), kafur, pinen (çam ağaçları), öjenol (karanfil), anetol, timol, geraniol (gül) ve mentol en yaygın bilinen terpenlerdir (45).

Kimyasal anlamda terpenler, 5 karbonlu izopren birimlerinin iki veya daha fazlasının birleşmesiyle oluşan moleküllerdir (38,45). İzopren molekülü şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8: İzopren Molekülü (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>) (41)

Terpenlerin sınıflandırılması sahip oldukları izopren iskeleti sayısına bakılarak yapılır. Mono-, seski-, di-, ve sesterpenler baş-kuyruk şeklinde bağlanmış izoprenlerden meydana gelirken, triterpenler iki C15 ve karotenoidler (tetraterpenler) iki C20 biriminin kafa-kafaya bağlanarak oluşturdukları yapılardır (45). Karbon sayısına göre terpenler şekil 9’da gösterilmiştir.

n	Adı	Bulunuşu
10	Monoterpen	Uçucu yağlar
15	Seskiterpen	Uçucu yağlar, reçineler
20	Diterpen	Reçineler, acı maddeler
25	Sesterterpenler	Reçineler, acı maddeler
30	Triterpenler	Reçineler, acı maddeler
40	Tetraterpenler	Yeşil dokular, kökler, meyveler
100 -	Politerpenler	Lateksler, kökler

**Şekil 9:** Karbon Sayısına Göre Terpenler (41)

#### 2.4.2.1.1 Monoterpenler

İki izopren molekülünden meydana gelmiş, 10 karbonlu terpenlerdir.

Günümüzde tabiatta varlığı bilinen ve yüksek bitkilerden izole edilen monoterpenlerin sayısı 1000’in üzerindedir. Ayrıca algler, deniz canlıları, böcekler ve bazı omurgalı hayvanlarda da monoterpenlere rastlanmaktadır (41). Bugün uçucu yağlarda da 150’den fazla monoterpen bulunmuştur (45). Parfümlerde ve gıda tatlandırıcılarında yaygın olarak kullanılan monoterpenlerin, antibakteriyel, antifungal ve antikanser etkilerinin olduğu bilinmekte, farmasötik endüstrisindeki önemleri de gün geçtikçe artmaktadır (41).

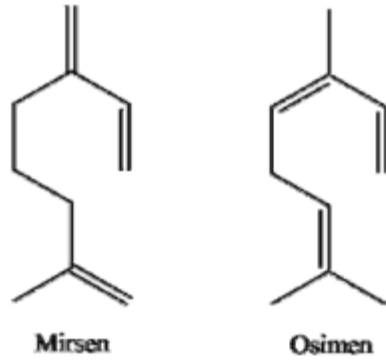


Monoterpenler yapılarına göre üç grupta incelenebilirler (41):

- 1) Asiklik veya linear yapıda (örn: sitral, geraniol)
- 2) Monosiklik yapıda olanlar (örn: mentol, limonen)
- 3) Bisiklik yapıda olanlar (örn:  $\alpha$ -pinen)

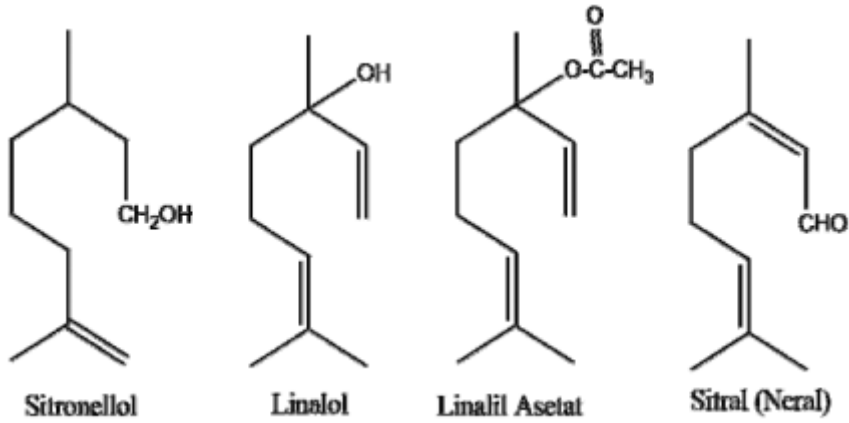
### 1) Asiklik monoterpener

Asiklik monoterpener üç çift bağ içerirler (45) (Şekil 10).



Şekil 10: Asiklik Monoterpenler (45)

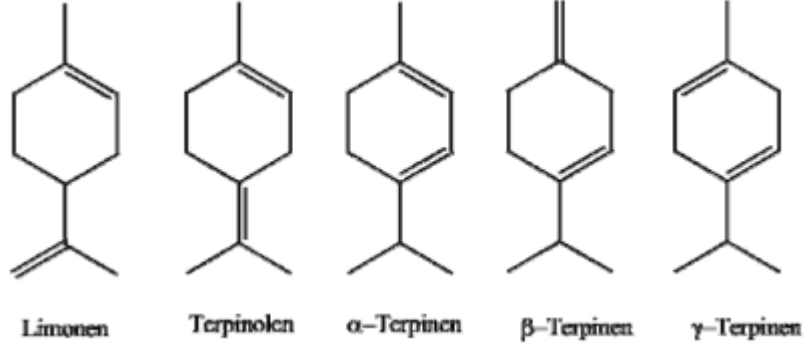
Asiklik monoterpenerin alkol, ester veya aldehit grubu taşıyan oksijenli türevleri bulunur (45) (Şekil 11).



Şekil 11: Asiklik Monoterpenlerin Oksijenli Türevleri (45)

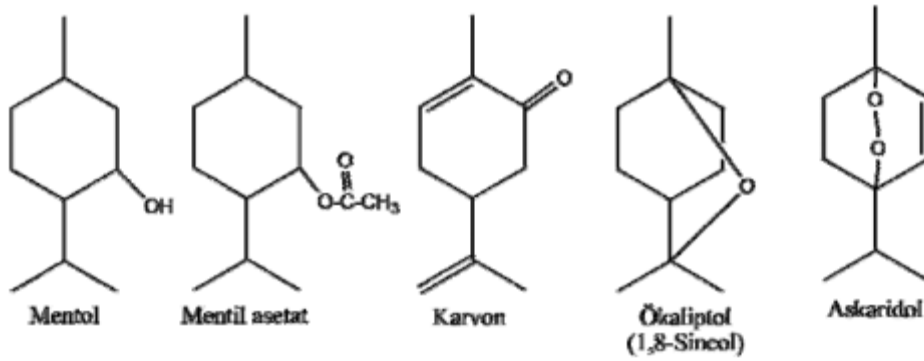
## 2) Monosiklik monoterpenler

Monosiklik monoterpenlerde iki çift bağ bulunur (45) (Şekil 12).



Şekil 12: Monosiklik Monoterpenler (45)

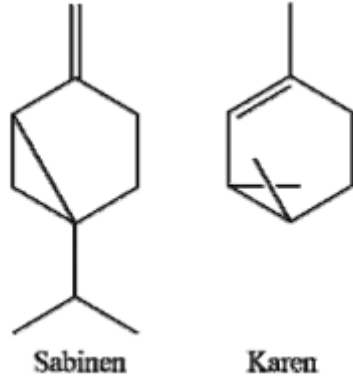
Monosiklik monoterpenlerin oksijenli türevleri alkol, ester, keton, epoksit ve peroksit grubu taşıyabilirler (45) (Şekil 13).



Şekil 13: Monosiklik Monoterpenlerin Oksijenli Türevleri (45)

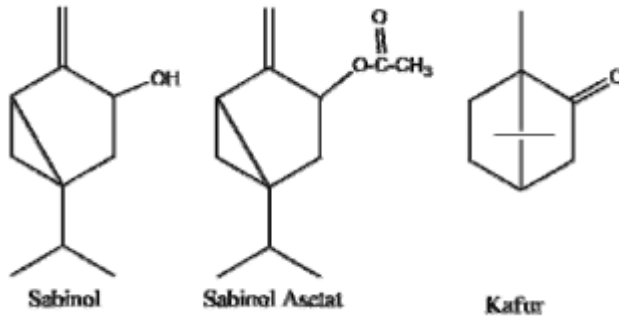
## 3) Bisiklik monoterpenler

Bisiklik monoterpenler 1 çift bağ içerirler (45) (Şekil 14).



Şekil 14: Bisiklik Monoterpenler (45)

Bisiklik monoterpenlerin alkol, ester veya ketonlu türevleri bulunur (45) (Şekil 15).



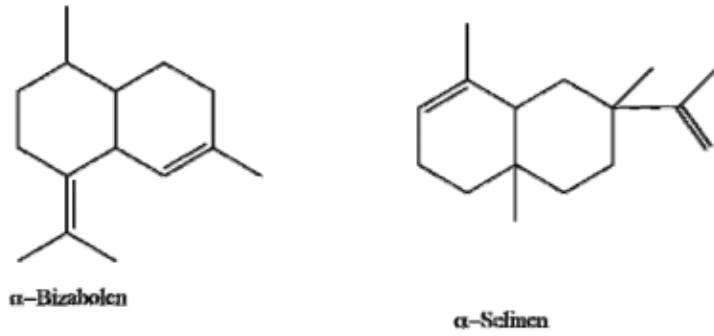
Şekil 15: Bisiklik Monoterpenlerin Oksijenli Türevleri (45)

#### 2.4.2.1.2 Seskiterpenler

Seskiterpenler de asiklik, monosiklik, bisiklik ve trisiklik yapılarına göre alt gruplara ayrılırlar. Bugün uçucu yağlarda 1000 kadar seskiterpen bağlantılı türevler bulunmaktadır. Seskiterpenlere örnek olarak Bisabolol, Kamazulen, Farnesol verilebilir (45).

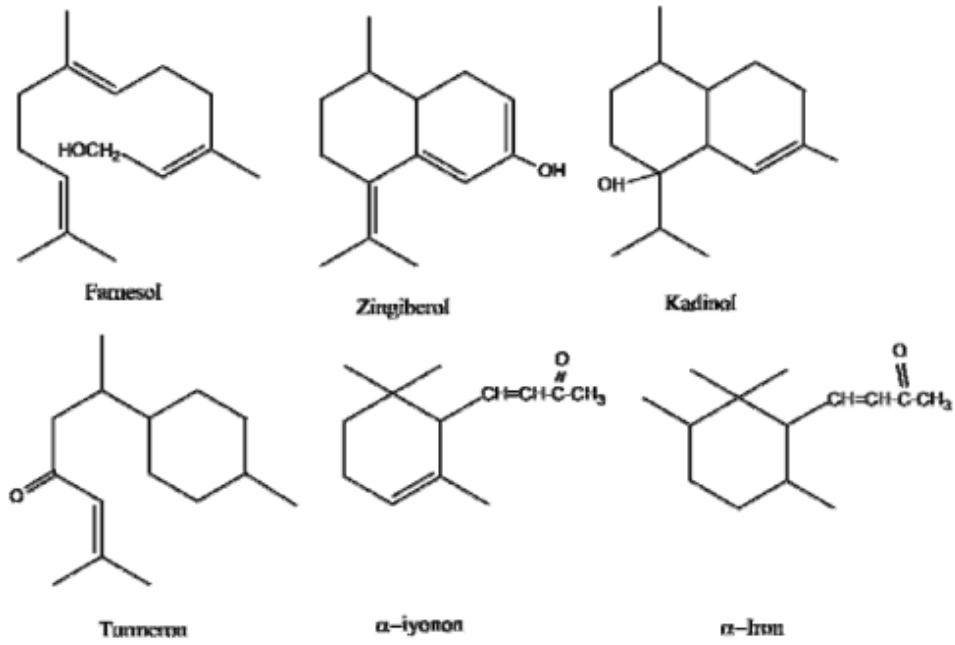
Daha çok uçucu yağların bileşiminde bulunan seskiterpenler, uçucu yağlar dışında özellikle Asteraceae familyasının karakteristik (Santonin, Germakranolit gibi) bileşikleridir. Antitümör, antilösemik, sitotoksik ve antimikrobiyal aktiviteleri

bilinmektedir. Aktivitenin  $\alpha,\beta$ -doymamış- $\gamma$ -lakton halkasından kaynaklandığı düşünülmektedir (41). Seskiterpenler şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16: Seskiterpenler (45)

Seskiterpenlerin oksijenli türevleri yaygın olarak bulunur (45) (Şekil 17).



Şekil 17: Seskiterpenlerin Oksijenli Türevleri (45)

#### 2.4.2.2 Diğer Bileşikler

**Alkoller:** Alifatik hidrokarbonların hidroksi süstitüe türevleri bileşiklerdir. Alkoller, ya ana hidrokarbon isminin sonuna *-ol* eki ya da *hidroksi* öneki ya da hidrokarbonun alkil isminin sonuna *alkol* kelimesi getirilerek üç ayrı şekilde isimlendirilirler. Alkoller, OH grubunun bağlı olduğu karbon atomunda bulunan alkil sayısına göre *primer*, *sekonder* ve *tersiyer* olarak sınıflandırılırlar (46,47,48).

Metanol, Etanol, İzopropil alkol, Gliserol, Kolesterol, Tokoferol (Vit E), Kortizol, Retinol (Vit A) alkol yapısındaki bileşiklerdir (46).

**Fenoller:** Aromatik hidrokarbonların hidroksi süstitüe türevleri bileşiklerdir. Alkollerin ve fenollerin bazı özellikleri benzer olmasına karşın, genel olarak bu bileşiklerin kimyasal özellikleri oldukça farklıdır. Fenoller suda asit özelliği gösterirken, alkoller göstermezler. Buna karşılık fenoller ester oluşturmaları açısından alkollerle benzerler (47).

Bir çok doğal maddenin yapısında fenolik grup bulunmaktadır. Örneğin; katekol, rezorsinol, vanilya, timol, krezol, adrenalin gibi. Mikroorganizmalar için toksik olduğundan antiseptik ve dezenfektan olarak yaygın kullanımı vardır (46).

**Organik asitler:** Organik asitler(Karboksilik asitler), aynı karbon atomu üzerinde, hem bir karbonil (C=O) hem de bir hidroksil grubuna sahip bileşiklerdir. Türemiş oldukları hidrokarbonun adının sonuna *-oik* eki getirilerek isimlendirilirler. Primer alkollerin ya da aldehitlerin yükseltgenmesiyle elde edilebilirler. Karboksilik asitler doğada geniş bir şekilde serbest asit veya esterleri halinde dağılmışlardır. Birçokları tuzları halinde izole edilebildiklerinden eskiden beri bilinmektedir. Karıncaların salgısında bulunan formik asit, sirkeye ekşi tadını veren asetik asit, bozulmuş tereyağındaki bütirik asit önemli karboksilli asitlerinden bazılarıdır (46,48).

**Aldehitler:** Yapılarında karbonil grubu bulunan organik bileşiklerden, karbonil grubuna bir hidrojenin bağlı olduğu bileşiklerdir. Aldehit grubu molekülün ucunda bulunur yani moleküldeki birinci karbondur. İsimlendirme *aldehit* kelimesi eklenerek veya *-al* eki getirilerek yapılır. CH<sub>3</sub>CHO asetaldehit/ethanal gibi (46).

Aldehitler genel olarak yüksek sıcaklıklarda alkollerin dehidrojenasyonundan elde edilebilirler, aldehit adı da buradan gelmektedir. Ayrıca birincil alkollerin yükseltgenmesi de aldehitleri verir. Aldehitler yapılarındaki karbonil grubu sebebiyle birçok reaksiyona kolaylıkla katılabilirler. Kolayca yükseltgenerek karboksilli asitleri, indirgenerek primer alkollerini verirler (48).

**Ketonlar:** Merkezdeki karbon atomuna çift bağla bağlanmış bir oksijen(karbonil) ve aynı karbona bağlanmış iki karbon atomundan oluşan bileşiklerdir. Bu iki karbon atomu alifatik veya aromatik bir bileşiğe ait olabilir. İsimlendirme *keton* kelimesi eklenerek veya *-on* eki getirilerek yapılır. Örneğin; aseton gibi (46).

Ketonlar, yapılarındaki karbonil grubunda hidrojen bulunmadığı için yükseltgenmezler. İndirgendiklerinde ise sekonder alkollerini oluştururlar (48).

**Esterler:** Esterler, karboksilli asitlerle alkollerin bir denge tepkimesinde oluşturdukları bileşiklerdir. Esterin adlandırılmasında onu oluşturan alkolden gelen alkil grubu ve ardından karboksilik asitten gelen alkanoat grubu kullanılır. Örneğin, metanol ve butirik arasındaki tepkimeden metil butirat adlı ester oluşur (46,48).

Katı ve sıvı yağlar, yağ asitlerinin gliserinle oluşturduğu esterlerdir. Örneğin; zeytinyağı, gliserin ve oleik asit esteridir. Çoğu esterin kendine has bir kokusu vardır. Molekül ağırlığı küçük olan esterler, meyvelerde bulunmakta olup onların hoş kokularını oluştururlar (48).

### 2.4.3 Uçucu Yağların Etkileri

Uçucu yağlar, aromatik bitkiler tarafından sekonder metabolitler olarak oluşturulan, güçlü bir koku ile karakterize, uçucu, doğal, kompleks bileşiklerdir. Uçucu yağ bitkileri taşıdıkları başta terpenik bileşikler olmak üzere pek çok bileşik nedeniyle potansiyel antibakteriyel, antifungal, antioksidan, antiparaziter etkilere sahiptirler (29,49). Uçucu yağların bunların dışında antiseptik, antiviral, insektisit vb. bilinen etkileri vardır. Bu etkiler ve kokusundan dolayı gıdaların korunmasında,

antimikrobiyal, analjezik, sedatif, anti-inflamatuar, spazmolitik ve lokal anestezi tedavilerde kullanılırlar.

Uçucu yağlar doğada bitkilerin korunmasında da antibakteriyel, antiviral, antifungal, insektisit ajanlar olarak önemli rol oynarlar. Aynı zamanda otçul hayvanların iştahını azaltarak bitkilerin korunmasına yardımcı olurlar. Ayrıca polen ve tohumların dağılması için bazı böcekleri çekmeye de yardımcı olurlar (38).

Bunlara ek olarak antiromatizmal, öksürük kesici, idrar söktürücü, dezenfektan vb. etkilere de sahiptirler (45).

## **2.4.4 Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri**

1300'lü yılların başında İspanya ve Fransa'da uçucu yağ elde etmek için distilasyon metodu geliştirilmiştir. 1550'li yıllara gelindiğinde de farklı ihtiyaçlara cevap verebilmek amacıyla yeni teknikler uygulanmaya başlanmıştır. Günümüzde ise hem klasik distilasyon yöntemleri hem de ileri teknolojiyi kullanan modern yöntemler uçucu yağ eldesi için kullanılmaktadır (39).

Uçucu yağ eldesi için uygulanan yöntem, bitkinin ısıya dayanıklılığı gibi bitkinin durumuyla ve distilasyon koşulları gibi çeşitli koşullarla bağlantılıdır (40,41). Uçucu yağlar bitkilerden elde edilirken miktarları, bileşenlerin özellikleri ve uçucu yağ elde edilecek bitki kısmına göre değişik şekillerde elde edilir (43).

### **2.4.4.1 Distilasyon Yöntemi**

Uçucu yağların su buharı ile sürüklenebilme özelliğinden yararlanılarak gerçekleştirilen bir ayırma işlemidir (44). Bitki materyallerindeki bütün uçucu maddeler önce buharlaştırıp sonrasında yoğunlaştırılarak ayrılır. Bu yöntem uçucu yağın kolay veren bitkiler için uygulanır, ucuz ve kolaydır. Genellikle bitkinin çiçekleri doğrudan, yaprakları hafif ufalandıktan sonra, kökleri vs. ise küçük parçalara ayrıldıktan sonra distile edilirler. Bitkiler çok ince toz haline getirilmemelidir (43).

#### Distilasyon yöntemleri (39,43,44):

- Su Distilasyonu
- Su Buharı Distilasyonu
- Buhar Distilasyonu
- Vakum Distilasyonu
- Kuru Distilasyon
- Hidrodifüzyon

##### **2.4.4.1.1 Su Distilasyonu**

Bu yöntem kurutulmuş olan ve kaynatılmakla bozulmayan bitkisel materyal ile çalışılıyorsa seçilir (40).

Kuru bitki materyali distilasyon aygıtı içinde sıcak su ile kaynatılır. Kaynama sonucunda oluşan buhar ile sürüklenen uçucu yağ soğutucuda yoğunlaştırılarak bir kaptan toplanır. Kaptan su ve yağ tabakası ayrılır ve uçucu yağ alınır. Uçucu yağ üretiminde geleneksel olarak kullanılan imbikler ve laboratuvar tipi Clevenger aygıtı bu yöntem için kullanılır (43).

##### **2.4.4.1.2 Su Buharı Distilasyonu**

Bu yöntem hem kuru hem de taze bitki materyaline uygulanabilir. Isıdan bozulan madde varlığında uygulanan bir yöntemdir (40).

Su buharı distilasyonunda başka bir yerde elde edilen su buharı bir boru yardımıyla su-drog karışımı içine yöneltilir. Böylece yüksek ısı ile parçalanma olasılığı ortadan kalkmış olur. Su buharı ile sürüklenerek soğutucu ünitesine gelen uçucu yağlar yoğunlaşarak toplama kabında birikir (40,43).

##### **2.4.4.1.3 Buhar Distilasyonu**

Taze bitki materyaline uygulanan bir yöntemdir. Bitki taze olduğundan yeterince su taşır, bu yüzden bu yöntemde su ile maserasyona bırakma gereği yoktur (40).



Bu yöntemde cam kap içerisine yerleştirilen taze bitki materyaline basınç yardımıyla buhar uygulanır, yağ damlacıkları buharla beraber sürüklenerek toplama kabına gelir ve yağ burada yoğunlaştırılarak sudan ayrıştırılır (39).

#### **2.4.4.1.4 Vakum Distilasyonu**

Bazı kaynama noktaları yüksek bileşikler elde etmek amacıyla sıcaklığı arttırmak yerine basıncı düşürerek yapılan distilasyondur. Basınç bir kez bileşiğin buhar basıncının altına indirildiği zaman kaynama ve distilasyon işlemi başlamaktadır (39).

#### **2.4.4.1.5 Kuru Distilasyon**

Özel imbiclerde genellikle odun gibi kuru materyale uygulanan bir yöntemdir. *Pirojenasyon* adını alan yüksek sıcaklıkta kuru ısıtma uygulanması işlemi uygulanır ve doğal olmayan, bozulma ürünlerinden oluşan bir ürün elde edilir (44).

#### **2.4.4.1.6 Hidrodifüzyon**

Bitkisel dokulardaki uçucu yağların bir kısmı yüzeyde bulunur, bir kısmı da iç kısımlarda bulunur. Yüzeğe yakın yerlerdeki uçucu yağlar buharla kolayca alınabilir fakat yüzeğe yakın olmayan bölgelerdeki uçucu yağlar ancak difüzyon işleminden sonra yüzeğe ulaşır.

Hidrodifüzyon işlemi endüstride buharın bitkisel materyal dolu kazana üstten verilmesi ve alttan çıkan buharın yoğunlaştırılması şeklinde, normal buhar distilasyonunun tersi olarak uygulanır.

Bu yöntemin, kazanın yüklenmesi boşaltılması sırasında kullanım kolaylığı, distilasyon süresinin kısa olması, harcanan buhar miktarının az olması dolayısıyla daha az masraflı olması, reflaks olayının gerçekleşmemesinden dolayı yağ bileşiklerinin hidrolize uğramaması gibi pek çok avantajları vardır (43). Bu yöntemle elde edilen uçucu yağ miktarı da yüksektir fakat suda çözünen maddelerin ya da sabit yağların uçucu yağa geçmesinden dolayı endüstriyel kullanım olarak yaygın değildir (44).

#### **2.4.4.2 Ekstraksiyon Yöntemi**

Ekstraksiyon, bitkisel materyalden çözücüler yardımıyla etken maddelerin çekip çıkarılması işlemidir (43).

Ekstraksiyon yöntemleri geleneksel ve yeni metotlar olmak üzere iki gruba ayrılabilir (39).

##### Geleneksel Metotlar:

- Organik çözücülerle ekstraksiyon
- Sabit yağ ile ekstraksiyon

##### Yeni metotlar:

- Süperkritik sıvı ekstraksiyonu (Sıvılaştırılmış gazlarla ekstraksiyon)
- Mikrodalga ekstraksiyonu
- Sıkıştırılmış çözücü ekstraksiyonu
- Katı-faz mikroekstraksiyon

#### **2.4.4.2.1 Organik Çözücülerle Ekstraksiyon**

Bitkisel materyal, benzen, hekzan, petrol eteri, kloroform gibi uçucu yağ kolaylıkla çözebilen kaynama noktası düşük organik çözücülerle eritilir. Daha sonra organik çözücü alçak basınçta uçurulur ve bu uçurmadan sonra içinde bir miktar yabancı madde (sabit yağ, boya maddeleri, mum vs.) içeren uçucu yağ elde edilir. Konkret adı verilen bu karışım önce alkolle muamele edilir, daha sonra vakum distilasyonu ile alkol uçurulur. Böylece absolü (absolute) adı verilen, pahalı ve kullanılması kolay bir uçucu yağ elde edilmiş olur (43).

#### **2.4.4.2.2 Sabit Yağ ile Ekstraksiyon**

Uçucu yağ miktarının az olduğu ve diğer distilasyon yöntemlerinin uygun olmadığı durumlarda kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde kokusuz, yumuşak bir sabit yağ karışımı, ince bir yüzeye ya da cam levha üzerine yayılır. Bitkisel materyal bu yağ üzerine serilir ve bir süre temasta bırakılır. Zamanla uçucu yağ sabit yağa geçer. Sabit yağ alabildiği kadar kokulu madde absorbe edince, bulunduğu yüzeyden kazınır ve etanol ile tüketilir. Etanollü ekstreden mumlar ve diğer maddelerin

soğukta çöktürülmesinden sonra etanol alçak basınçta uçurulur. “Anfloraj” adını alan bu yöntem, eskiden parfüm ve pomat hazırlanmasında oldukça yararlanılan bir yöntem olarak bilinmektedir (40,43,44).

#### **2.4.4.2.3 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (Sıvılaştırılmış Gazlarla Ekstraksiyon)**

Süperkritik akışkan özelliği gösteren maddelerin çözücü olarak kullanılmasıyla yapılan bir çözücü ekstraksiyonudur (39).

Süperkritik akışkan, kritik sıcaklık ve kritik basınç noktasının üzerine (süperkritik evre bölgesine) çıkan ve sıvı özellik gösteren gazdır (39,43). Süperkritik akışkan bu kritik noktada termofiziksel özellikler bakımından sıvı ve gaz arasındadır. Sıvı çözücülerin sahip olduğu çözme gücüyle birçok maddeyi çözebilirken aynı zamanda gazlara yakın difüzyon katsayısı özelliğiyle de çözünen bir maddeyi hızlı bir şekilde yaymaktadır (39).

Süperkritik ekstraksiyonda amonyak, etilen, toluen ve CO<sub>2</sub> (karbondioksit) genel olarak amaca uygunluk gösterir (43). Ancak kolayca bulunabilmesi, maliyetinin düşük ve saflık oranının yüksek olması, kullanımının kolay ve çevre etkisinin minimum olması nedeniyle CO<sub>2</sub>, süperkritik sıvı ekstraksiyonunda kullanılan çözücüler arasında başta gelmektedir (39). 1869 yılında Andrews tarafından keşfedilen CO<sub>2</sub>'nin süperkritik noktası 73 kg/cm<sup>2</sup> atm basınç, 31°C sıcaklıktır (39,43).

Bu yöntem yüksek basınçlı ekstraksiyon kabı içinde sıvılaştırılmış gazın kritik noktası yakınlarındaki sirkülasyonunu içerir. Ekstre, basıncın değiştirilmesi ile veya tamamen buharlaştırma ile çözücü gazdan ayrılır. Geri kazanılan gaz sıkıştırılarak yeniden kullanılabilir. Bu üretim sisteminin kurulmasının maliyeti yüksek olduğundan ancak pahalı ürünlerin eldesinde kullanılabilir (43).

#### **2.4.4.2.4 Mikrodalga Ekstraksiyonu**

Mikrodalga ışınları yardımıyla yapılan ekstraksiyondur. Bu ekstraksiyon iki farklı sistemle gerçekleştirilmektedir. En yaygın sistem, sıcaklık ve basınç kontrol edilebilen kapalı bir kap içerisinde yapılan kapalı sistem ekstraksiyonudur. Diğer yöntem ise atmosferik basınç altında açık kap içerisinde gerçekleştirilmektedir.

Mikrodalgalar 0.3-300 GHz (Gigahertz) aralığında değişen elektromanyetik radyasyonlardır ve genellikle doğal ürünlerde ekstraksiyon 2.5-75 GHz'de gerçekleştirilmektedir.

Bu yöntemin avantajı, ekstraksiyon süresinin ve kullanılan çözücü miktarının büyük oranda az olmasıdır. Bu yöntemle bitkilerdeki polifenoller ve lignanlar ayrıştırılabilmektedir (39).

#### **2.4.4.2.5 Sıkıştırılmış Çözücü Ekstraksiyonu**

Klasik ekstraksiyon yöntemlerine alternatif olarak geliştirilen, ekstraksiyon süresi, çözücü tüketimi, verim ve tekrarlanabilirlik gibi avantajları bulunan bir yöntemdir. Yüksek basınç ve sıcaklıkta organik çözücüler kullanılarak yöntemin etkinliği arttırılmaktadır. Sıcaklığın artması, ekstraksiyonun kinetiğini hızlandırırken, yükseltelen basınç çözücüyü sıvı halde tutarak güvenli ve hızlı bir ekstraksiyon sağlamaktadır. Ayrıca yüksek basınç, çözücünün, deney materyalinin iç kısımlarına kadar nüfuz etmesine de olanak sağlamaktadır (39).

#### **2.4.4.2.6 Katı-Faz Mikroekstraksiyon (SPME (Solid Phase Microextraction))**

Katı faz mikroekstraksiyon, basit, hızlı, ekonomik ve çözümsüz bir ekstraksiyon yöntemi olup, örnek hazırlama, ekstrakte etme, konsantre hale getirme gibi birçok işlemi tek bir basamağa indirgeyen çok yönlü bir tekniktir. İzolasyon esnasında uçucu ve yarı uçucu komponentlerin dilüsyonuna yol açmadan GC (Gas Chromatography)'nin enjeksiyon bloğuna yerleştirilerek uçucu bileşiklerin tanımlanmasını sağlamaktadır.

Bir SPME ünitesi; bir enjektör, katı faz ile kaplı bir fiber ve fiber üzerinde hidrofobik ve hidrofilik karakterde destek materyalinden meydana gelir.

Bu teknik, SPME fiber üzerine uçucu ve yarı uçucu maddelerin adsorpsiyonu ve maddelerin GC enjeksiyon portuna yerleştirilen SPME fiberden termal olarak GC kolonuna desorpsiyonu ilkesine dayanmaktadır (50).

Bu teknik ayrıca, HPLC (high performance liquid chromatography)'de de uygulanmaktadır (39).

#### **2.4.4.2.7 Çok Yönlü Ekstraksiyon Yöntemleri**

Bu yöntem, 1964 yılında Likens ve Nickerson tarafından ortaya konulmuştur. Bu yöntemde hem zaman hem de harcanan kimyasal miktarı bakımından ciddi azalmalar söz konusudur. Yöntemin çalışma prensibine göre örnek, çok yönlü ekstraksiyon aparatının sol tarafına su dolu cam balonun içerisine konularak kaynatılmaktadır. Uçucular, buharla distile olarak sol kolondan yukarıya doğru hareket ederken aynı zamanda çok yönlü ekstraksiyon aparatının sağ tarafındaki çözücüde buharlaştırılmaktadır. Ekstraksiyon işlemi aparatın üst kısmında yer alan soğutucunun cidarlarında su ve çözücü buharının yoğunlaşmasıyla gerçekleşmektedir. Yoğunlaşan su ve çözücü tekrar buldukları cam balonlara dönmekte, su ve çözücü kısmı ayrı ayrı yoğunlaştırılarak uçucu bileşikler elde edilmektedir.

Çok yönlü ekstraksiyon yöntemini etkileyen çeşitli parametreler vardır. Bu parametrelerin başında da kullanılan çözücü türü gelmektedir. Yoğunluğu sudan ağır veya hafif farklı farklı çözücülerle yapılan denemeler sonunda diklormetanın en iyi çözücü olduğu görülmüştür. Diğer bir faktör ise polar çözücülerin geri kazanımını artırmak amacıyla örneğe katılan tuzlardır. Başka bir önemli parametre de distilasyon-ekstraksiyon süresidir. Maksimum verim çoğunlukla 30-45. dakikalarda gerçekleşmekle birlikte genel bir kural olarak işlem 1-2 saat sürmektedir (39).

#### **2.4.4.3 Mekanik Yöntem**

Bazı droglardan elde edilmek istenen uçucu yağlar distilasyon yöntemleri ile bozunmaktadırlar. Bu uçucu yağların elde edilmesi için sıkma ya da benzeri mekanik yöntemlerden yararlanılır (40). Bu yöntem genel olarak portakal, limon, bergamot ve mandalina gibi turunçgil meyve kabuklarından uçucu yağ elde edilmesinde uygundur (43).

Bu yöntemle narenciye kabukları iç çeperi keskin ve çıkıntılı olan bir kaseinin içinde yuvarlanarak ya da süngerler arasında sıkılarak uçucu yağ taşıyan salgı ceplerinin parçalanması sağlanır (40). Süngerden sıkılarak alınan ya da kaseden

alınan sıvılar (usareler) genelde berrak olmadıkları için santrifüj edildikten sonra uçucu yağ elde edilir. Bu şekilde soğuk presle uçucu yağ elde edilmiş olur (40,43).

## 2.5 Kromatografi

Kromatografi, karışım halinde bulunan maddelerin birbirinden ayrılmasında kullanılan analitik bir tekniktir. Kelime olarak renk bilgisi anlamına gelen kromatografi, ilk kez renkli bileşiklerin ayrımında kullanıldığından bu ismi almıştır. Kromatografi, başlıca saflaştırma ve karşılaştırma amaçlarıyla kullanılmaktadır. Kromatografi işleminde, karışımda bulunan maddeler, birbiri ile karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılarak başlangıçta bulduklarından farklı bölge ya da fazlarda toplanırlar.

Bu fazlar;

- Hareketli faz (mobil ya da sürükleyici faz)

- Hareketsiz faz (stasyoner ya da durucu faz)

olarak isimlendirilir. Hareketli ve hareketsiz fazlar; katı, sıvı, gaz gibi farklı fiziksel hallerde olabilirler.

Maddelerin ayrımları, karışımdaki maddelerin çoğunun hareketli ve hareketsiz fazlara afinitelerinin farklı olma özelliğinden yararlanarak gerçekleşir.

Kromatografide karışımdaki maddelerin ayrımı dört mekanizmaya göre gerçekleşir.

Bu mekanizmalar şunlardır (Şekil 18):

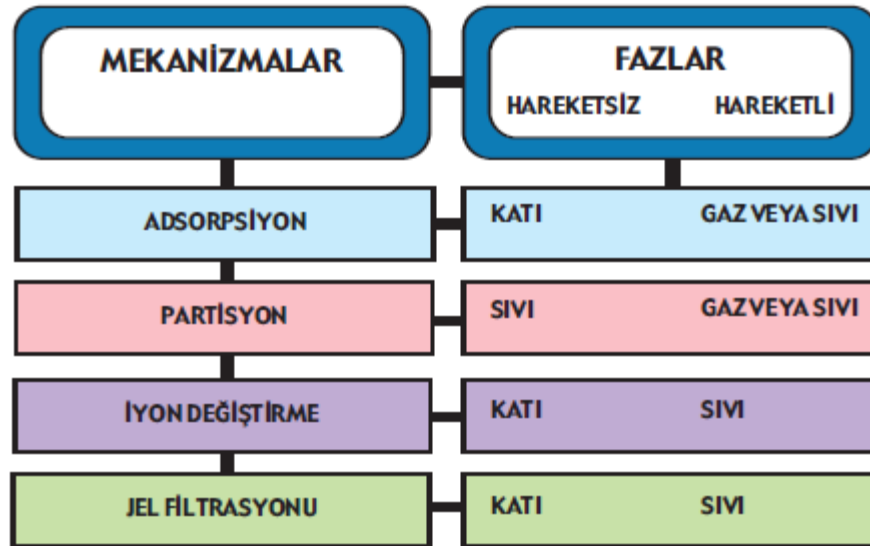
1- Adsorbsiyon

2- Partisyon

3- İyon değiştirme (iyon değişimi)

4- Jel geçirgenliği (jel filtrasyonu)

- 1) **Adsorbsiyon;** gaz, sıvı veya çözünmüş maddelerin bir adsorbanın yüzeyinde tutunması olayıdır.
- 2) **Partisyon;** karışımdaki maddelerin birden fazla çözücü içerisinde çözünürlükleri oranında dağılması olayıdır.
- 3) **İyon değiştirme;** benzer yüklü iyonların geri döndürülebilir bir şekilde yer değiştirmesi olayıdır (Cl<sup>-</sup> ile Br<sup>-</sup> gibi)
- 4) **Jel geçirgenliği;** Karışımdaki maddelerin molekül büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlayan bir ayırma tekniğidir.



**Şekil 18:** Mekanizmalara Göre Hareketli ve Hareketsiz Fazların Durumu (41)

Kromatografik teknikler kapalı sütun kromatografisi ve açık sütun kromatografisi olmak üzere başlıca iki başlık altında sınıflandırılabilir.

**1. Kapalı Sütun Kromatografisi:** Hareketsiz faz bir sütun içine yerleştirilmiştir. Hareketli faz karışımdaki maddelerin uygulandığı sütunun üst kısmından ilave edilir. Hareketli fazın sürükleyici etkisiyle karışımdaki maddeler sürüklenir ve ayrılan maddeler sütunun alt ucundan fraksiyonlar halinde toplanır. Kapalı sütun

kromatografisi teknikleri, hareketli fazın sıvı veya gaz olması durumuna göre sıvı kromatografisi ve gaz kromatografisi olarak ikiye ayrılır.

- **Sıvı Kromatografisi:** Sütun kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, orta basınçlı sıvı kromatografisi, iyon değişimi kromatografisi, jel kromatografisi bu grupta yer alır.

- **Gaz Kromatografisi:** Gaz-katı kromatografisi ve gaz-sıvı kromatografisi de bu grupta yer alır.

**2. Açık Sütun Kromatografisi:** Hareketsiz faz düz bir yüzey üzerindedir. Hareketli faz bu yüzeyin bir ucundan uygulandığında kapiler etkiyle hareketsiz faz boyunca ilerler bu sırada karışımdaki maddeleri de beraberinde sürükler. Kağıt kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi açık sütun kromatografisi teknikleri içerisinde yer alır (41).

### 2.5.1 Gaz Kromatografisi

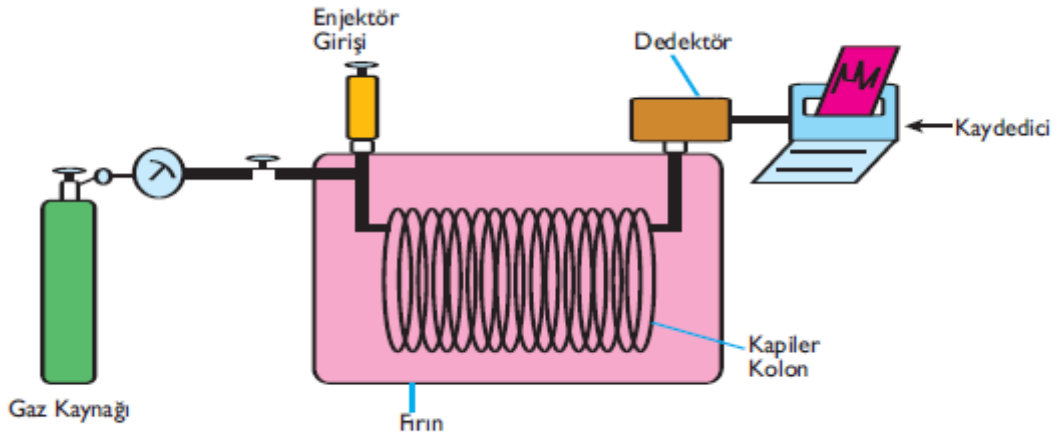
Hareketli fazı gaz olan ve taşıyıcı gaz olarak isimlendirilen, hareketsiz fazı da katı ya da sıvı olan kromatografik tekniktir. Hareketsiz fazın katı olması durumunda gaz-katı kromatografisi, sıvı olması durumunda ise gaz-sıvı kromatografisi olarak isimlendirilir. Ancak günümüzde gaz kromatografisi denildiğinde gaz-sıvı kromatografisi anlaşılmaktadır. Buradaki hareketsiz faz porlu katı destek madde (Kizelgur, ateş tuğlası gibi adsorban özellikte bir madde) etrafına kaplanmış, yüksek sıcaklıkta buharlaşmayan bir sıvıdır (Apiezon yağları, polietilen glikol, silikon yağları gibi).

Gaz kromatografisinde sadece partiyon mekanizması rol oynar. Bu teknik yüksek sıcaklıklarda (400°C'ye kadar) bozunmadan buharlaşabilen maddelerin ayrılmasında kullanılır. Uçucu olmayan maddeler ise kimyasal reaksiyonla (ör: yağ asitlerinin metillenmesi) uçucu hale getirildikten sonra gaz kromatografisi ile analiz edilebilirler.



Sistem başlıca şu kısımlardan oluşur (Şekil 19):

- Taşıyıcı gaz kaynağı,
- Ayrımı yapılacak karışımın kolona verildiği enjektör girişi (enjeksiyon alanı),
- Ayrımın gerçekleştiği kolon,
- Kolonun içinde yer aldığı bir fırın,
- Kolondan çıkan maddelerin dedekte edildiği bir dedektör sistemi,
- Ayrılan maddelerin pik olarak kaydedildiği bir kaydedici.



**Şekil 19:** Gaz Kromatografisi Bölümleri (41)

Gaz kromatografisi sistemlerinde kullanılacak taşıyıcı gaz, inert, saf, kolay bulunabilir, ucuz ve dedektör sistemine uygun olmalıdır. Gaz kromatografisi sistemlerinde taşıyıcı gaz olarak en fazla azot kullanılırken, hidrojen, helyum, argon gibi gazlar da kullanılmaktadır.

Gaz kromatografisi sistemlerinde kullanılan kolonlar, cam ya da paslanmaz çelikten yapılmış dolgu ve kapiler kolon olmak üzere iki tiptir. Dolgu kolonlar kapiler kolonlara göre daha kısa ve geniş çaplı kolonlar olduğundan daha iyi ayrımlar için kapiler kolonlar tercih edilmektedir. Kolonlar düz, U şeklinde ya da uzunluğundan dolayı yer kaplamaması için spiral şeklinde olabilirler. Kapiler

kolonlarda hareketsiz faz kolon iç çeperlerine film şeklinde kaplanır, destek madde kullanılmaz.

Gaz kromatografisi sisteminde, uygun bir çözücüde çözülmüş haldeki madde karışımı, fırın içindeki kolona enjeksiyon alanından enjekte edilir. Karışımdaki maddeler fırının ısıyla taşıyıcı gazla beraber sürüklenir ve partiyon mekanizmasına göre gaz ve sıvı faz arasında dağılır. Hareketli faz ile daha fazla sürüklenme eğiliminde olan maddeler hızlı bir şekilde kolonda ilerleyip kolonu terk ederlerken, hareketsiz fazda tutunma eğiliminde olan maddeler ise daha geç kolonu terk ederler. Bu şekilde karışımdaki maddelerin ayrımı gerçekleşir. Kolonu terk eden maddeler dedektör vasıtasıyla tespit edilirler. Ayrılıp dedektörde tespit edilen maddelere ait sonuçlar bir kaydedici yardımıyla pik şeklinde kaydedilir. Maddenin kolona girişi (enjeksiyon) ve çıkışı (kayıt) arasında kalan süreye Tutunma zamanı=  $R_t$  (Retention time) denir. Maddenin  $R_t$  değeri, aynı şartlar sağlandığında (aynı sıcaklık programı, aynı gaz akışı vs.) değişiklik göstermez. Bu özellikten yararlanılarak karışımdaki maddelerin  $R_t$  değerleri standart maddelere ait  $R_t$  değerleri ile karşılaştırılarak maddenin tanımlanması mümkün olur.

Gaz kromatografisi sistemlerinde çok çeşitli dedektörler kullanılır. Alev İyonlaşma Dedektörü, Isı İletken Dedektör ve Elektron Yakalama Dedektörü gibi dedektörler kullanılabileceği gibi bunların dışında Kütle Spektrometrisi de günümüzde dedektör olarak kullanılmaktadır. Kütle Spektrometrisi'nin dedektör olarak kullanılması durumunda, kolondan çıkan her bir bileşiğin kütle spektrumunu alınmakta ve kütle spektrumlarının bulunduğu kitap ya da kütüphanelerden yararlanılarak spektrumların karşılaştırılması ile bileşiklerin tanımlanması mümkün olmaktadır (41).

## 2.6 Veri Tabanları

Bilgi artışıyla birlikte bilgisayarda bilgi depolama ve bilgiye erişim konularında yeni yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur. Veri tabanları; büyük miktardaki bilgileri depolamada geleneksel yöntem olan "dosya-işlem sistemine" alternatif olarak

geliştirilen birbirleriyle ilişkili bilgilerin depolandığı alanlardır (51). Farklı bir ifade olarak veri tabanı, bir kütüphanenin hem mükemmel bir indeks sistemi, hem de kütüphanenin kendisi olarak düşünülebilir (52) (Şekil 20).

Veri tabanı, en geniş anlamıyla; “birbiriyle ilişkili verilerin tekrara yer vermeden, çok amaçlı kullanımına olanak sağlayacak şekilde depolanması” olarak tanımlanabilir. Eldeki çok sayıdaki bilginin belirli bir düzen içinde saklandığı bu sistem eldeki bilginin özelliklerine göre çeşitlilik gösterebilmektedir. Akademik ve çok özel durumlar haricinde İlişkisel Veri Tabanı Sistemleri kullanılmaktadır. İlişkisel Veri Tabanı Sistemleri (Relational Database Management Systems-RDMS), günümüzde en çok kullanılan sistem olarak bilinmektedir. Bu sistemde, birbirleri ile anahtarlar aracılığı ile bağlı tablolar bulunmaktadır. İlişkisel veri tabanı sistemlerinin en önemli özelliği, sistem içinde bilgi tekrarı olmaması olarak bilinmektedir. Verilerin küçük tablolara bölünmesi olarak adlandırılan bu işleme normalizasyon denmektedir (53).

İlişkisel Veri Tabanı Sistemleri veri tabanlarının yapısını düzenler. Bu özellik sayesinde şu işlemleri yapmak olasıdır:

- Verilerin doğru ve etkin biçimde saklanmasını sağlar.
- İlişkisel bütünlük kuralı (database integrity) sağlar.
- Değişiklik kayıtları sayesinde, sistem çöktüğünde verileri kurtarmayı sağlar (52).

Veri tabanları, veri tabanı yönetim sistemleri aracılığıyla oluşturulur ve yönetilir. Bu sistemlere; Microsoft Access, MySQL, IBM DB2, Informix, Microsoft SQL Server, PostgreSQL, Oracle, Interbase ve Sysbase örnek olarak verilebilir (51).



Şekil 20:. Veri Tabanı Görseli (54)

## Veri Tabanı Türleri

1) Paylaşmalı Veri Tabanları (Distiributed Databases): Birden fazla fiziksel ortamda depolanan veri tabanlarına paylaşımlı veri tabanı denir. Bir veri tabanının paylaşımının iki temel yolu vardır. Birinci yol, merkezi veri tabanını kısımlara ayırmaktır. Böylece her uzak işlemci kendi yerel alanına hizmet etmek için gerekli veriye sahip olur. İkinci yolda ise merkezi veri tabanı tüm uzak noktalara kopyalanır.

2) Nesne Ağırlıklı Veri Tabanları (Object-Oriented Databases): Çizimlerin, grafiklerin, imajların, fotoğrafların, seslerin ve tüm hareketli video gösterimlerinin otomatik olarak canlandırılacak ve paylaşılacak nesnelere depolayan veri tabanıdır. Bu veri tabanı finans ve pazarlama alanında kullanılır. Nedeni; finans ve pazarlamanın ekonomik koşullardaki değişimlerine en uygun cevap veren depolama sisteminin nesne ağırlıklı veri tabanı olmasıdır.

3) Hiper Medya Veri Tabanları (Hypermedia Databases): Kullanıcının modülden modüle geçmek için kendi yolunu kendi seçebildiği veri tabanlarıdır. Bilgi şeması önceden belirlenmiş organizasyon şemasını gerektirmez. Her modül ve modülle diğer veri tabanları modülleri arasındaki bağlantılar ekranda gösterilebilir.

4) Çok Boyutlu Veri Analizi: Bu analiz kullanıcının aynı veriyi çok farklı boyutlarıyla görmesini sağlar. Örneğin Orta Anadolu, Ege, Marmara bölgelerinde somun, civata, sıhhi tesisat ve vida gibi dört farklı ürün satan bir işletme bunların fiili satışlarını görmek için kullanabilir.

5) Veri Bankaları: İşletmedeki tüm personelin beklentilerine uygun, bütünsel, güncel ve tarihi verileri depolayan veri tabanı yazılımlarına *veri bankaları* denir. İç ve dış kaynaklardan duruma göre anlık, saatlik, günlük, haftalık veya aylık olarak derlenen veriler veri bankasında kopyalanır. Bu veriler girişimin değişik birimlerdeki yönetim açımlarında kolayca kullanılabilir şekilde standartlaştırılır ve bütünsel yapılır. Girişimdeki herkes veri bankasına girebilir ama değişiklik yapamazlar (52).

## **2.7 *Acanthamoeba sp.***

### **2.7.1 Giriş**

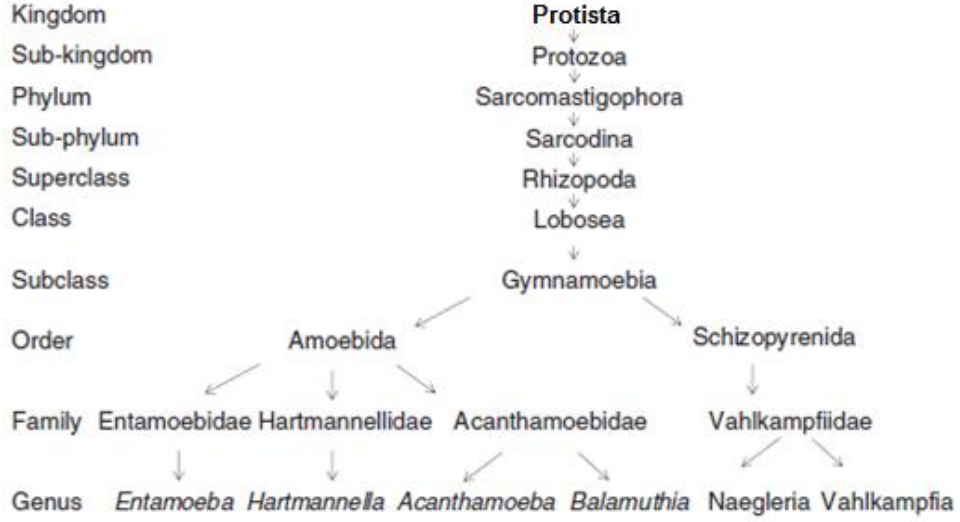
Yıllar öncesinden başlayarak protozoologların ilgi odağı olan tatlı ve tuzlu sularda özgür yaşayan amipler, farklı cins ve türlerinin insanlarda ve hayvanlarda neden oldukları, ölümcül seyreden parazitözler nedeniyle 1960'lı yıllardan itibaren tıp ve veterinerlik alanlarının da çalışma konusu haline gelmiştir.

Özgür yaşayan bu amipler istemli ya da fırsatçı parazit olarak da tanımlanmışlardır ve bugünkü bilgilerimize göre 3 cins içinde yer almaktadırlar: *Naegleria*, *Balamuthia* ve *Acanthamoeba* cinsleri. Bu cinslerde insanda patojen olan tür sayısı *Naegleria* ve *Balamuthia* cinslerinde birer tane, *Acanthamoeba* cinsinde ise birden fazla tür olarak saptanmıştır (1).

### **2.7.2 Tanım ve Sistematik**

*Acanthamoeba sp.* çevrede geniş dağılıma sahip, fırsatçı, özgür yaşayan bir amiptir (3).

*Acanthamoeba* ilk olarak 1930 yılında Castellani tarafından *Cryptococcus pararoseus* mantarının kültüründe saptanıp tanımlanmıştır (2,55). Saptanan bu *Acanthamoeba* ilk olarak *Hartmannella* sınıfına yerleştirilmiştir ve *Hartmannella* ile karıştırılmıştır. Daha sonra acanthapodiaların varlığı ve kist şekillerinden yararlanılarak *Acanthamoeba* ve *Hartmannella*'nın ayrımı yapılmıştır. Sawyer ve Griffin'in 1975 yılında Acanthamoebidae familyasını kurmasıyla ve Page'in 1988 yılında *Hartmannella*'yı Hartmannellidae familyasına yerleştirilmesiyle sınıflandırma son şeklini almıştır (Şekil 21) (3,55).



**Şekil 21:** Serbest Yaşayan Amiplerin Sınıflandırılması (3)

Günümüzde *Acanthamoeba*'nın tür sayısı morfolojik özelliklerine göre 24 olarak tanımlanmıştır. Ancak son zamanlarda yapılan genetik çalışmalarda *Acanthamoeba* türleri moleküler olarak 18S rDNA analizine göre 15 genotipte (T1-15) tekrar sınıflandırılmıştır ve tür sayısının daha az olduğu belirtilmiştir. Tüm dünyada olguların en sık T4 genotipine ait olduğu bilinmekle birlikte daha nadir olarak T2, T3, T5, T6 ve T11 genotipleriyle oluştuğu bildirilmiştir (56). *Acanthamoeba* genotipleri ve hastalıklarla ilişkisi şekil 22'de gösterilmiştir.

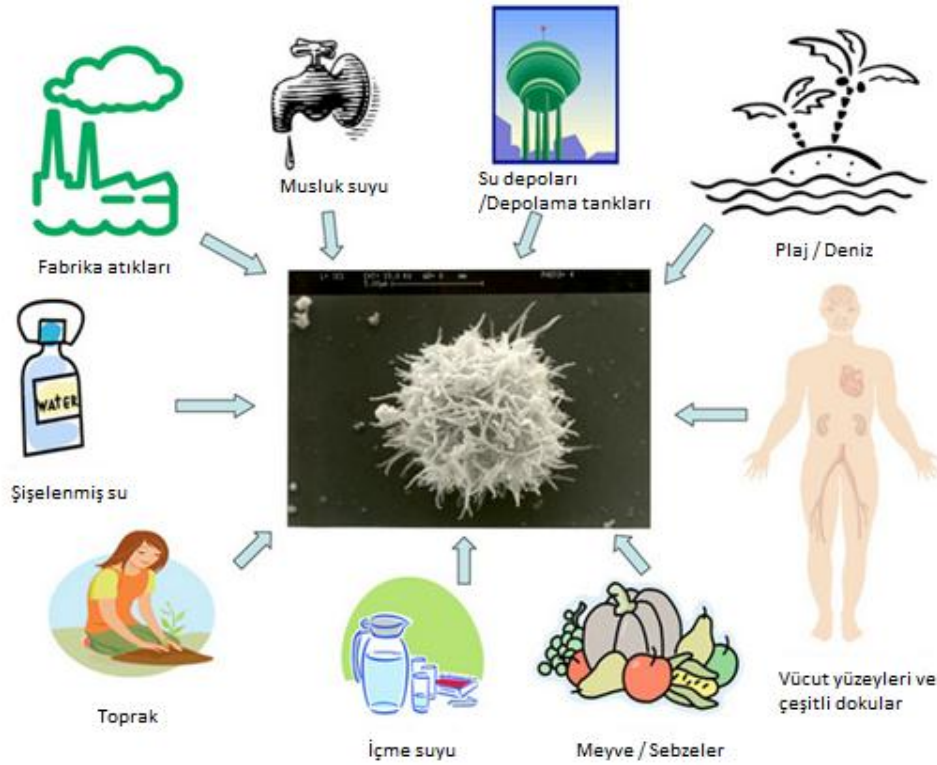
<i>Acanthamoeba</i> genotipleri	İnsan-hastalık ilişkisi	
T1	Encephalitis	
†T2a	Keratitis	*Bu genotip iki hastalıkla birden ilişkilendirilmiştir.
†T2b-ccap1501/3c-a-like sequences	NA	
T3	Keratitis	
T4*	Encephalitis, keratitis	NA: Henüz bir hastalıkla ilişkilendirilmemiştir.
T5	NA	
T6	Keratitis	
T7	NA	T2 genotipinin T2a ve T2b olmak üzere ikiye bölünmesi Maghsood ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür. (2005)
T8	NA	
T9	NA	
T10	Encephalitis	
T11	Keratitis	
T12	Encephalitis	
T13	NA	
T14	NA	
T15	NA	

**Şekil 22:** Bilinen *Acanthamoeba* Genotipleri ve Onların İnsandaki Hastalıklarıyla İlişkisi (3)

### 2.7.3 Dağılım

*Acanthamoeba* türleri çevrede yaygın olarak bulunan protozoalar arasındadır. Bu türler dünya çapında geniş bir dağılım gösterirler. *Acanthamoeba* türleri topraktan, tozdan, havadan, doğal ve işlenmiş sulardan, deniz suyundan, yüzme havuzlarından, kanalizasyondan, klima ünitelerinden, evlerdeki musluk sularından, içme suyu arıtma tesislerinden, şişe sularından, diş tedavi ünitelerinden, hastaneler ve diyaliz ünitelerinden, bakteriyel kontaminasyona sahip lensler ve lens kaplarından, mayalardan ve memeli hücre kültürlerinden izole edilmişlerdir (Şekil 23).

*Acanthamoeba* türleri ayrıca bitkilerden, balık, amfibi, sürüngen ve memeli grubundaki hayvanlardan, sağlıklı görünen insanların burun mukozası ve boğazlarından, enfekte beyin ve akciğer dokusundan, bağışıklık sistemi baskılanmış hastaların deri lezyonlarından ve keratitli hastaların kornea dokusundan izole edilmiştir (2).



Şekil 23: *Acanthamoeba*'nın Çevredeki Dağılımı (57)

## 2.7.4 Yaşam Döngüsü ve Morfolojisi

*Acanthamoeba*'nın yaşam döngüsünde iki evre vardır: Aktif olarak bölünebilen, beslenebilen "trofozoit formu" ve hareketsiz, dirençli "kist formu"(2,3).

Trofozoit ve kist formunun boyutları farklı türler arasında değişiklik gösterir. Hem trofozoit hem de kist formu büyük, yoğun, merkezi konumda bir çekirdekçiğe sahip tek bir çekirdek ile karakterizedir (55). Trofozoit form olumsuz çevre koşullarında ya da sert koşullara maruz kalma sonucu hücre farklılaşmasıyla çift duvarlı kist forma dönüşür (2,55,58). Çevre koşulları uygun olduğunda da kistlerden trofozoitler ortaya çıkar (3) (Şekil 24).

*Acanthamoeba* türlerinin yaşam döngüsü ve insanda oluşturduğu infeksiyon şekil 25'te gösterilmiştir.

### Trofozoit formu:

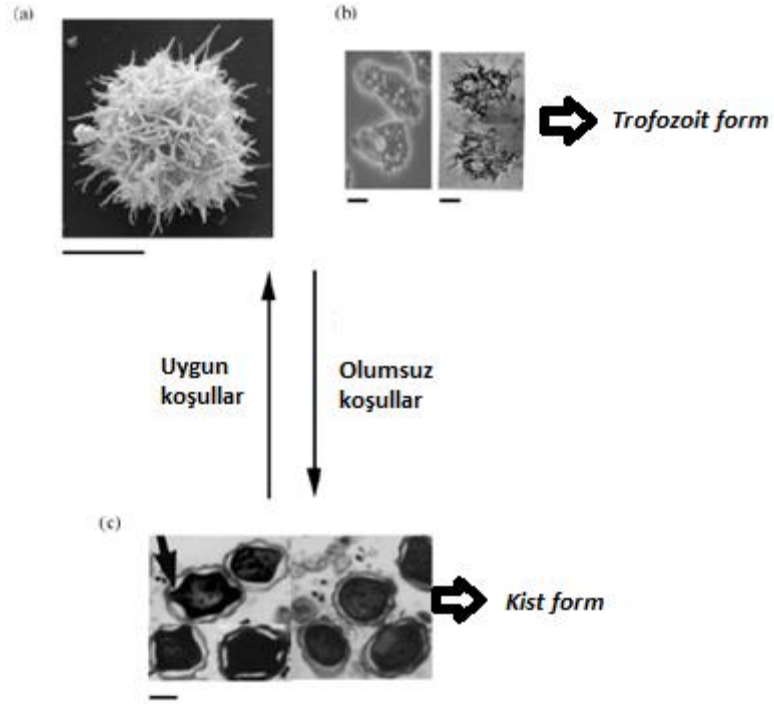
*Acanthamoeba* trofozoitlerinin çapları 12-35 µm arasında değişiklik gösterir. *Acanthamoeba* trofozoitleri ortamındaki bakteri, yosun, maya, küçük organik parçacıklar ile beslenir. Ayrıca ortamdaki sıvı besinleri pinositoz yoluyla alıp da beslenebilirler (2,3). Trofozoitler uygun koşullar altında (gıda temini, nötr pH, ~30°C ve 50-80 mOsmol) mitoz bölünme yaparak çoğalırlar (58).

Trofozoitler kendi yüzeylerinde acanthopodia olarak bilinen omurga benzeri yapılar sergilerler. Acanthopodialar yüzeylere tutunmada, hücre hareketlerinde ve av yakalamada önemlidir (3).

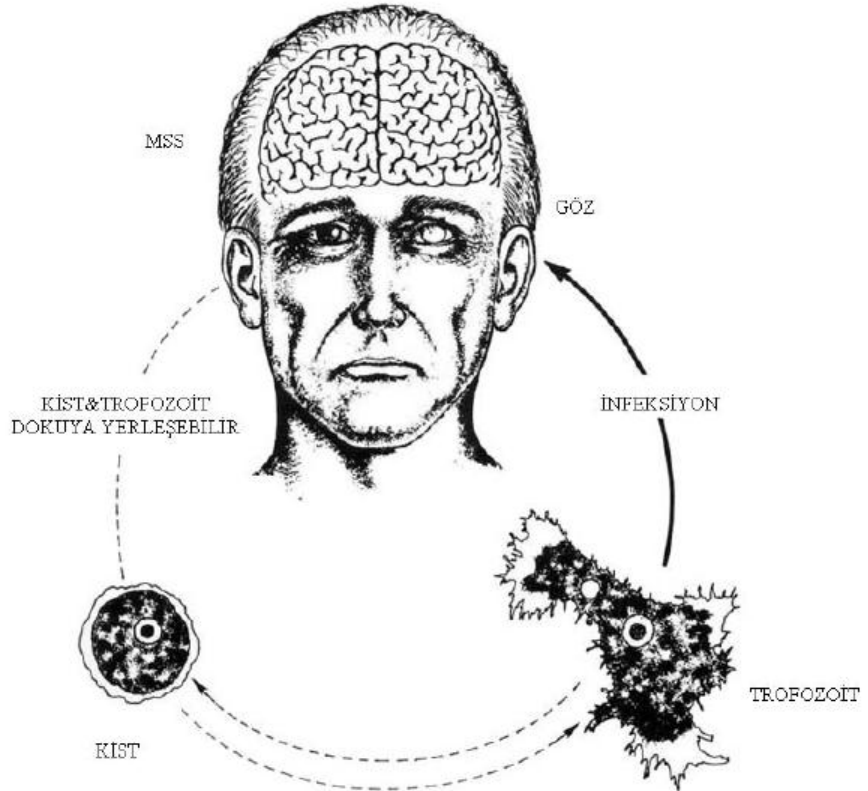
### Kist formu:

*Acanthamoeba* kistlerinin çapları da 5-20 µm arasında, farklı türler ve genotiplere göre değişiklik gösterir. Kistler hava yoluyla taşınarak çevrede *Acanthamoeba*'nın yayılmasına ve bu patojenlerin uygun konaklara taşınmasına yardımcı olurlar. Birçok çalışma kistlerin uzun seneler boyunca patojenitesini sürdürerek canlı kalabildiğini göstermiştir (3). Kistler düşük sıcaklıklarda (0-2°C) canlı kalabilirler ve dezenfektanlara, klora ve antibiyotiklere karşı dirençlidirler (2).





Şekil 24: *Acanthamoeba* Trofozoit ve Kist Formları ve Birbirlerine Dönüşümleri (3)



Şekil 25: *Acanthamoeba* Türlerinin Yaşam Döngüsü ve İnsanda Oluşturduğu İnfeksiyon (59)

## 2.7.5 *Acanthamoeba*'nın Neden Olduğu Hastalıklar

### 2.7.5.1 *Acanthamoeba Keratiti*

*Acanthamoeba keratiti* (AK), ağrılı, ilerleyici, görme sağlığını tehdit eden korneal bir hastalıktır (2). Bu hastalık *Acanthamoeba* türleri tarafından korneada oluşturulan bir enfeksiyondur ve hızlıca tedavi edilmediği takdirde korneada ülserasyon, görme kaybı hatta körlük ve enükleasyon ile sonlanabilir (56).

*Acanthamoeba keratiti* ilk olarak 1974 yılında Nagington tarafından İngiltere'de keşfedilmiştir ve önemli bir oküler mikrobik enfeksiyon olarak kabul edilmiştir (3). 1980'lerin ortalarında kontakt lens kullanımının artışı ve kötü lens hijyeniyle ilişkili olarak *Acanthamoeba keratiti* salgını meydana gelmiştir ve 1980'lerden sonra bu hastalığın insidansında önemli bir artış görülmüştür (2,56).

A. castellanii, A. polyphaga, A. hatchetti, A. culbertsoni, A. rhyodes, A. griffini, A. quina, ve A. lugdunensis türlerini içeren pek çok *Acanthamoeba* türünün *Acanthamoeba keratiti*ne yol açtığı bildirilmiştir.

*Acanthamoeba keratiti*, granümatöz amibik ensefalit (GAE) ya da kutanöz acanthamoebiasis gibi bağışıklığı zayıf insanlarda görülen hastalıkların aksine, bağışıklığı tamamlanmış, sağlıklı kişilerde görülen bir hastalıktır. Bununla birlikte bu bireyler koruyucu bir bağışıklık geliştiremezler ve enfeksiyon tekrar oluşabilir (2).

*Acanthamoeba keratiti* korneanın amiplerle direkt teması sonucu gelişmektedir (1). Bu hastalık kontakt lens kullanmayan bireylerde de görülebmesine rağmen, çoğunlukla kontakt lens kullanımıyla ilişkilendirilmiştir (58). AK oluşumundaki ana risk faktörünün kontakt lens kullanımı olduğu düşünülmektedir (2). Genel olarak kontakt lens kullanımıyla AK oluşması süreci, lenslerin zamanından fazla kullanılması, kişisel hijyen eksikliği, kontakt lenslerin uygun olmayan temizliği, kontakt lenslerdeki biofilm şekli, kontamine sulara maruz kalma gibi faktörleri içeren çok faktörlü bir süreçtir (58). Ayrıca kontakt lens kullanımının dışında, korneal travma ve kontamine suya maruz kalma da AK oluşumu ile ilişkilendirilebilir (2).

### AK semptomları (2):

- Göz ağrısı
- Gözde kızarıklık
- Gözde yaşarma/sulanma
- Işığa karşı hassasiyet
- Bulanık görme
- Göz kapağında ödem, göz kapağının düşmesi
- Kornea içi halka oluşumu
- Gevşek kornea epiteli
- Gözün saydam olmaması
- Batma, yanma şikayeti
- Korneadaki beyaz görünümde olan leke

### Tanı:

AK'nin tanısı oldukça zordur, problemlidir ve genellikle bakteriyel, viral ya da fungal keratitlerle karıştırılıp yanlış teşhis edilebilir (58). Yanlış tanı sonrasında uygulanacak olan anti-viral, anti-fungal veya anti-bakteriyel tedavi de hastanın kliniğini gölgeleyebilir ve tedavide gecikmelere neden olabilir (2). AK, özellikle de *Herpes simplex* keratiti ile karıştırılır (1). Kontakt lens kullanımı sırasındaki dayanılmaz baş ağrısı bu enfeksiyonun güçlü bir göstergesidir ve *Herpes simplex* ile bu şekilde ayırt edilebilir (1,58).

Tanı için korneal veya konjuktival sürüntü örnekleri uygun değildir. Doku kesitlerindeki kist ve trofozoitlerin tanımlanmasında korneal kazıntı ve korneal biyopsi örnekleri kullanılır. Kültür için, korneal kazıntıdan elde edilen materyal, *E.coli* içeren besleyici olmayan agar üzerine yerleştirilebilir ya da sıvı bir ortam içine aşılanabilir (2).

### Tedavi:

AK tanısı zor konulduğu için tedavide sıklıkla gecikmeler görülebilir ve *Acanthamoeba* enfeksiyonu görmenin tamamen kaybıyla sonuçlanabilir. Eğer enfeksiyon erken fark edilirse etkenin sadece epiteli işgal etme olasılığı yüksek olur.

Ama eğer *Acanthamoeba* enfeksiyonu erken tedavi edilmeden ilerlerse organizmalar korneal bölgenin derin tabakalarını işgal eder. Bu durumda tedavi aylarca devam edebilir hatta 1 yıl ve daha fazla da sürebilir. Ayrıca kistlerin pek çok ilaca dirençli olması nedeniyle hastalığın nüksü açısından hastalar takip edilmelidir. Tedavi başarısızlıkları da sıklıkla rapor edilmektedir. Bu başarısızlıkların da ilaçların ajana zayıf nüfuzu, tedavi süresinin yetersiz kalışı ve kazanılmış bağışıklıktan dolayı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca pek çok terapötik ajan özellikle *Acanthamoeba* korneanın altındaki dokuları işgal ettiğinde, enfeksiyonun geç döneminde etkili değildir (2).

AK tedavisi medikal veya cerrahi yöntemlerle yapılmaktadır (56). Günümüzde etkili tedavi rejimi biguanidler (polihekzametilen biguanid ya da klorheksidin diglukonat) ile diamidinlerin (propamidin izetionat ya da heksamidin) birlikte kullanıldığı topikal tedavidir (56,58). Ayrıca bir bakteri de enfeksiyonla ilişkilendiriliyorsa, neomisin ya da kloramfenikol gibi bir antibiyotığın de tedaviye eklenmesi önerilmiştir (58).

#### **2.7.5.2 Granülomatöz Amibik Ensefalit (GAE)**

GAE nadir görülen bir enfeksiyondur ama neredeyse her zaman ölümcüldür (3,58). İnsanlarda ilk defa açık bir şekilde tanımlanan granülomatöz amibik ensefalit, 1972'de Jager ve Stamm tarafından gözlenmiştir (3).

GAE, kronik, uzun süren, yavaş ilerleyen, akciğerleri de kapsayan MSS enfeksiyonu ile karakterize bir hastalıktır. Serolojik laboratuvar tanılarında bazı *Acanthamoeba* türlerinin GAE ile ilişkili olduğu görülmüştür. *Acanthamoeba* enfeksiyonları için kuluçka süresi bilinmemektedir ve klinik bulguları saptamak için birkaç hafta ya da ay gerekli olabilir.

GAE genellikle maligniteler, sistemik lupus eritematoz, diyabet, böbrek yetmezliği, siroz, tüberküloz, deri ülseri, HIV (Human Immunodeficiency Virus) enfeksiyonu, Hodgkin hastalığı gibi altta yatan bazı hastalıklara sahip bireylerle ilişkilendirilir. Ayrıca alkolizm, ilaç bağımlılığı, steroid tedavisi, kanser kemoterapisi, radyoterapi ve organ nakli gibi durumlar da bireyi GAE'ye yatkın hale getiren faktörlerdir. *Acanthamoeba* tarafından oluşturulan GAE enfeksiyonu bağışıklık

sistemini baskılayan ve zayıflatan koşullarla ilişkilendirilse de immün sistemi kuvvetli çocuk ve yetişkinlerde de görülmüştür.

Enfeksiyonun vücuda girişinin nazal yollar ve akciğerlerden solunum yoluyla ya da deri yoluyla olduğu düşünülmektedir (2). Solunum yoluyla vücuda giren *Acanthamoeba* kan damarlarını istila eder ve kan yoluyla yayılarak, kan-beyin bariyerini de aşarak MSS'ye ulaşır (58).

GAE semptomları (2):

- Baş ağrısı
- Konfüzyon
- Bulantı
- Kusma
- Ateş
- Uyuşukluk
- Boyun tutulması
- Fokal nörolojik defisit
- Artmış kraniyal basınç belirtileri

Tanı:

Hastalığın nadir görülmesi ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonuna yol açan diğer patojenlerin yaygın olması ve semptomların karmaşıklığı nedeniyle GAE'nin tanısı problemlidir (3). Tanı, BOS (Beyin omurilik sıvısı) ve/veya infekte dokularda etkeni görmek, besiyerlerinde üretmek ya da serolojik deneylerin uygulanması ile yapılır. Ancak son yıllardaki görüşlere göre maalesef BOS'ta *Acanthamoeba*'yı görmek zordur (1).

Tedavi:

GAE için önerilen mevcut bir tedavi yoktur ve maalesef çoğu vakada tanı öldükten sonra otopsiyle konulmuştur. Bu da antiamebisid ajanların *Acanthamoeba*'ya karşı düşük duyarlılık göstermesinden ve de en önemlisi bu bileşiklerin kan-beyin engelini aşmada yetersiz kalmasından kaynaklanmaktadır. Mevcut terapötik ajanlar ketokonazol, flukonazol, sülfadiazin, pentamidin izetionat,

amfoterisin B, itrakonazol ya da rifampinin kombinasyonlarını içermektedir. Bu ajanlar özgür yaşayan amiplerin neden oldukları merkezi sinir sistemi enfeksiyonuna karşı etkili olabilirler ancak ciddi yan etkileri vardır. Son yapılan çalışmalarda alkilfosfokolin bileşiklerinin *Acanthamoeba*'ya benzer kan beyin engelini geçme özellikleri sergilediği için tedavide değerli olabileceği düşünülmüştür. Ancak bu bileşiklerin başarısının değerlendirilmesi, uygulama yöntemlerinin geliştirilmesi ve *Acanthamoeba* üzerindeki kesin etkisinin belirlenmesi için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ve de bu hastalıkta tedaviye rağmen, kurtulan bireylerde görme bozukluğu ve işitme güçlüğü gelişebilir (3).

### **2.7.5.3 Kutanöz Acanthamoebiasis**

Kutanöz acanthamoebiasis, genelde AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) hastalarında MSS (Merkezi sinir sistemi) tutulumu ile birlikte ya da tek başına görülen, sert eritamatöz nodüller veya deri ülserleriyle karakterize olan bir hastalıktır. Bu hastalık ayrıca HIV olmayan amebik ensefalitli hastalarda, organ nakli için immünsupresif tedavi gören hastalarda ya da immün sistem rahatsızlığına sahip bireylerde de rapor edilmiştir (2). Sağlıklı bireylerde nadir görülen ve kendini sınırlayan kutanöz acanthamoebiasis, merkezi sinir sisteminin tutulumu gerçekleştiği zaman haftalar içinde ölüme neden olur (3). Kutanöz acanthamoebiasisin erken belirtisi sert papülonodüllerin meydana gelmesidir. Bu papülonodüller, irinli bir materyal toplayarak daha sonra iyileşmeyen sert ülserlere dönüşür. Kutanöz lezyonların histopatolojik incelenmesi sonucunda, nekroz odağı çevresinde, inflamatuvar hücreler, vaskülit, trofozoitler ve kistlerin bulunduğu gösterilmiştir (2).

#### **Tanı:**

Kutanöz acanthamoebiasisde tanı materyali olarak, lezyondan alınan biyopsi materyali kullanılmaktadır. Bu materyal, üzerine bakteri sürülmüş besleyici değeri olmayan agar ortamına ekilerek, amip üremesinin olup olmadığı takip edilir. Histopatolojik tanıda, biyopsi materyali, hematoksilen-eozin, periyodik asit-şif, kalkoflor beyazı gibi boyalarla boyanarak amip varlığı araştırılabilir. Buna ek olarak,

PCR (Polymerase Chain Reaction), RFLP (restriction fragment length polymorphism), gibi moleküler metodlar ile immünokimyasal yöntemler de tanıda kullanılabilir (2).

#### Tedavi:

Henüz kesin olarak önerilen bir tedavi yoktur, fakat İtrakonazol, 5-florositozin, Ketokonazol ve Klorheksidin'in topikal uygulamaları değerli olabilir (3).

#### **2.7.5.4 AIDS'li Hastalarda *Acanthamoeba* İnfeksiyonu**

AIDS'li bir kişideki *Acanthamoeba* enfeksiyonu ilk kez 1986 yılında bildirilmiştir. Bu yıldan sonra, AIDS'li kişilerde artan sayıda yaygın *Acanthamoeba* enfeksiyonu rapor edilmiştir. Bu olguların çoğunda da teşhis otopsi ile konulmuştur. HIV, insanın immün sistemini baskılayan bir virüs olduğundan, AIDS'li kişilerde enfeksiyonun diğer organ ve dokulara yayılması sık görülen bir durumdur. AIDS'li kişilerde hastalık çok hızlı ilerler ve birçok hastada nörolojik semptomların görülmesinden bir ay veya daha kısa süre sonra ölüm gerçekleşir. HIV pozitif bireylerde *Acanthamoeba* enfeksiyonunun diğer yaygın belirtileri de kronik sinüzit, otit, sinüs lezyonları ve deri ülserlerindeki *Acanthamoeba* organizmaları varlığında oluşan kutanöz lezyonlardır. Bunun yanında bu hastalarda, *Acanthamoeba* cinsi amiplerin etken olduğu lökositoklastik vaskülit, amebik osteomyelit ve endofithalmi olguları bildirilmiştir (2).

#### **2.7.6 *Acanthamoeba*'ya Karşı Bitkiler Kullanılarak Yapılan Etki Çalışmaları**

*Acanthamoeba*'ya karşı bitkiler kullanılarak yapılan bir etki çalışmasında, Türkiye'deki 4 *Allium* cinsinin metanolik ekstresinin *Acanthamoeba castellanii* trofozoit ve kistleri üzerindeki amebisidal ve sistisidal etkisi denenmiştir. *Allium scrodoprosu*m türünün metanolik ekstresi etkili bulunmuştur ve ayrıca *Allium scrodoprosu*m'un 32 mg/ml'lik dozu korneal epitelyumun kültürleri üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir. Buradan da *Allium scrodoprosu*m'un metanolik ekstresinin *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisinde uygulanabileceği ortaya konmuştur (10).

Bir diğer çalışmada sarımsağın (*Allium sativum*) metanolik ekstresinin *Acanthamoeba castellanii* trofozoit ve kistleri üzerindeki amebisidal etkisi ve kornea hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi denenmiştir. Sarımsağın metanolik ekstresi *Acanthamoeba*'ya karşı etkili bulunurken, 3.90 mg/ml'den daha az dozlarda da kornea hücrelerine sitotoksik etki göstermemiştir (11).

Başka bir çalışmada *Arachis hypogaea L.*, *Curcuma longa L.* ve *Pancreaticum maritimum L.* bitkilerinin etanol ekstrelerinin *Acanthamoeba castellanii* kistlerine karşı *in vitro* amebisidal aktivitesi denenmiştir. 4 bitki de *Acanthamoeba* kistlerine karşı etkili bulunmuştur (12).

Diğer bir çalışmada da *Origanum syriacum* ve *Origanum laevigatum* bitkilerinin metanolik ekstrelerinin *Acanthamoeba castellanii* kist ve trofozoitlerine karşı *in vitro* amebisidal aktivitesi denenmiştir. İki bitki de *Acanthamoeba*'ya karşı etkili bulunmuştur ve *Acanthamoeba* tedavisinde kullanılabilir potansiyel terapötik ilaç olarak görülmektedirler (4).

Başka bir *Acanthamoeba* alışmasında, *Salvia staminea* ve *Salvia caespitosa'nın* metanolik ekstrelerinin *Acanthamoeba castellanii* kist ve trofozoitlerine karşı *in vitro* amebisidal etki çalışması ve kornea üzerinde sitotoksik etki çalışması yapılmıştır. Çalışma sonunda *Salvia staminea'nın* metanolik ekstresi dikkate değer bir amebisidal etki göstermiştir ve ayrıca *Salvia staminea'nın* 16 mg/ml'lik dozu kornea hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermemiştir. Buradan *Salvia staminea*, *Acanthamoeba*'ya karşı kullanılabilir yeni bir terapötik ajan olarak düşünülebilir (13).

*Acanthamoeba castellanii*'ye karşı yapılan başka bir çalışmada da *Pterocaulon polystachyum*'un topraküstü kısımlarından elde edilen ham ekstrenin hekzan, diklorometan, metanol fraksiyonları *Acanthamoeba castellanii* trofozoitlerine karşı denenmiş ve etkili bulunmuştur (5). Ayrıca *Pterocaulon polystachyum* ile yapılan başka bir *Acanthamoeba* alışmasında da *Pterocaulon polystachyum* uçucu yağı *Acanthamoeba polyphaga* trofozoitlerine karşı denenmiş ve 10 ve 20 mg/ml dozlarında %100 letal etkili bulunmuştur (7).



*Acanthamoeba*'ya karşı yapılan bir diğer uçucu yağ çalışmasında da *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, *Croton isabelli* uçucu yağları *Acanthamoeba polyphaga* trofozoitlerine karşı denenmiş, en çok amebisidal etki *Croton ericoides*'te görülürken, en az etki de *Croton isabelli* uçucu yağında görülmüştür. Fakat aynı zamanda bu 3 uçucu yağ kornea hücrelerinde sitotoksik etki göstermiştir (8).

Uçucu yağların antiprotozoal bir ajan olarak denendiği bir diğer çalışmada ise, *Citrus sinensis* (orange), *Citrofortunella mitis* (syn. *Citrus microcarpa*, *calamansi*), *Citrus poonensis* (ponkan), *Citrus reticulata* (dalandan), *Eucalyptus citriodora* (eucalyptus), *Zingiber officinale* (ginger), *Cananga odorata* (ilang-ilang), *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Pandanus sp.* (pandan) and *Mentha piperita* (peppermint) uçucu yağlarının *Acanthamoeba* türlerinin trofozoitlerine karşı antiprotozoal aktivitesine bakılmıştır. *Cymbopogon winterianus*, *Citrus reticulata* ve *Citrus poonensis* %100 antiprotozoal aktivite gösterirken, *Pandanus sp.* ve *Zingiber officinale* uçucu yağları ise *Acanthamoeba* türleri üzerinde letal etki göstermemiştir (15).

Ayrıca bazı bitki uçucu yağlarının *Acanthamoeba* türleri dışındaki antiprotozoal aktivitelerinin değerlendirildiği bir çalışmada ise, 16'sı Lamiaceae, 7'si Verbenaceae, 4'ü Asteraceae, 3'ü Piperaceae, 2'si Annonaceae familyalarından olan ve geri kalan bitki türlerinin de her biri bir familyaya ait olacak şekilde toplam 42 bitki türünün uçucu yağlarının antiprotozoal aktivitesine bakılmış ve etkili bulunmuşlardır. Etkili uçucu yağlarda ana bileşik olarak Timol 8 türde bulunurken, onu 4'er türde ana bileşik olarak bulunan Öjenol ve Terpinen-4-ol, onları da 3 türde ana bileşik olarak bulunan Karvakrol ve 2 türde ana bileşik olarak bulunan Kafur takip etmiştir (14).

*Acanthamoeba*'ya karşı yapılan bu etki deneme çalışmaları sonunda kullanılan bitkisel kaynakların çoğunun terapötik ajan olarak değerlendirilme potansiyeli yüksek bulunmuştur. Ancak bu ajanların biyolojik etkinliğini doğrulamak, tam etkinlik ve yan etkilerin tanımlanması için daha fazla *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 3 GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1 *Dorystoechas hastata* Uçucu Yağının Elde Edilmesi

#### 3.1.1 Bitki Materyalinin Hazırlanması

Araştırma materyalimizin toprak üstü kısımları, Kasım 2013'te, Antalya, Kemer, Tahtalıdağ, teleferik istasyonu çevresi, 300 m'den toplanmıştır.

Bitkinin teşhisi tayin anahtarları esas alınarak yapılmış, EGE ve İZEF (İzmir Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi) herbaryumlarındaki örneklerle karşılaştırılmıştır.

Morfolojik çalışmalarda kullanılmak amacıyla araştırma için kullanılan bitkilerin herbaryumları yapılmıştır. Bu örnekler İZEF herbaryumunda 5549 numaralarıyla kayıtlıdır.

Materyalimiz fanlı kurutma dolaplarında, gölgede kurutulmuştur. Kurutma sırasında araştırma materyalleri sıklıkla ters yüz edilerek kurutmanın hızlı ve etkin olması sağlanmıştır.

Bitki materyalimiz uçucu yağ eldesinde kullanılacak zamana kadar mukavva kutu içerisinde muhafaza edilmiştir.

### 3.1.2 Uçucu Yağın Eldesi



**Şekil 26:** Neo-Clevenger Tipi Distilasyon Düzeneği ve Balon İçindeki Bitkimiz *Dorystoechas hastata* (Fotoğraf: Damla Madencioğlu)

#### Neo-Clevenger Tipi Distilasyon Düzeneği ile Su Distilasyonu:

El ile parçalayarak distilasyona hazır hale getirdiğimiz kuru bitkisel materyalimizden uçucu yağ eldesi için, Avrupa Farmakopesi'nde kayıtlı olan uçucu yağ distilasyon metoduna göre, Neo-Clevenger tipi distilasyon düzeneği (Şekil 26) kullanılmıştır. Her seferinde 100 g kuru araştırma materyali, 2 lt'lik balona konarak, 1 lt su ilavesiyle uçucu yağın tükendiğinin göstergesi olan bulanık su akışı bitinceye kadar, 3 saat süreyle distillenmiştir. Düzeneğin yapısı gereği, bir taraftan uçucu yağ izolasyonu yapılırken, diğer taraftan izole edilen uçucu yağın, ml cinsinden miktarı belirlenmiştir. Bu sayede her distilasyonun sonunda kullanılan bitkisel materyal miktarı (g) ve elde edilen uçucu yağ miktarı (ml) üzerinden % uçucu yağ verimi ml/g cinsinden hesaplanmıştır. Uçucu yağlar susuz sodyum sülfatla muamele edilerek eser miktarda içerebileceği suyundan arındırılmış, analiz zamanına kadar koyu renkli viallerde +4°C'de karanlıkta saklanmışlardır (60).

## 3.2 Uçucu Yağın Nitel ve Nicel Analizleri

### 3.2.1 GC ve GC-MS Yöntemi



**Şekil 27:** Kombine Çalışan GC-MS, GC-FID ve Otomatik Örnekleyici Sistemi (FABAL: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı) (Fotoğraf: Bintuğ Öztürk)

Uçucu yağların kimyasal içerikleri ve bunların görece bollukları gaz kromatografisi (GC) ve gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC/MS) sistemleri ile belirlenmiştir.

GC-MS analizleri; “Thermo Scientific Trace GC Ultra” gaz kromatografisine kombine bağlı “Thermo Scientific DSQ II” kütle dedektörü ve “Thermo TR-Wax” kapiller kolon (60 m x 0.32 mm i.d.; film kalınlığı 0.25  $\mu\text{m}$ ) ile yapılmıştır. GC-MS tanımlamasında, iyonizasyon enerjisi 70 eV olan elektron iyonizasyon sistemi ile, taşıyıcı gaz olarak 1 ml/dk akış hızında helyum kullanılmıştır. Fırın sıcaklığı 70°C’den 210°C’ye 7°C/dk olacak şekilde programlanmış, detektör sıcaklığı ise 230°C’ye ayarlanmıştır. Uçucu yağ örneği 1/100, h/h oranında n-hegzan ile seyreltilmiş ve 1.0

µl olarak “Thermo Scientific TriPlus” autosampler ile split modunda, enjektör sıcaklığı 200°C, split akışı 50 ml/dk, split oranı 50 olacak şekilde enjekte edilmiştir (61).

Uçucu yağ bileşenlerinin nitel analizleri; ana bileşiklerinin ticari standartlarının alıkonma süreleriyle, araştırma örneklerine ait bileşiklerin alıkonma sürelerinin karşılaştırılması, alkan karışımındaki bileşiklerin alıkonma süreleri yardımıyla hesaplanan, uçucu yağ bileşiklerinin aritmetik indislerin, Adams’ın indis listesiyle karşılaştırılması ve GC-MS analizlerinden elde edilecek kütle spektrumlarının, “Xcalibur” yazılımında yer alan kütle veri tabanları ile karşılaştırılması yoluyla yapılmıştır (62). Uçucu yağların nicel analizleri ise üç tekrar şeklinde GC-MS analiz sonuçlarına göre yapılmış olup, incelenen pik altında kalan alanın toplam piklerin alanına oranı şeklinde, “Qromquest” yazılımı yardımıyla hesaplanmış ve yapılan üç enjeksiyonun ortalaması alınarak kaydedilmiştir (63).

Bileşiklerin indislerinin genellikle KI (Kovats Indis) yada RI (Retention Indis) adlarıyla bilinen logaritmik bir formülle hesaplandığı literatürde kayıtlıdır. Ancak aşağıda belirtilmiş logaritmik olmayan ve benzer bir yolla hesaplanan AI (Aritmetic Indis) değerlerinin, KI değerlerine oranla daha sağlıklı sonuçlar verdiği Van den Dool ve Kratz tarafından kaydedilmiştir. Bu nedenle alanında bir otorite sayılan Adams’ın yeni kitabında indis listesi AI şeklinde hazırlanmıştır. Bu bilgi ışığında bizim çalışmamızda da, uçucu yağ bileşenlerimizin indis hesaplarını aşağıda verilen AI formülüne göre gerçekleştirilmiştir.

$$AI(x) = 100 P_z + 100 [(RT(x) - RT(P_z)) / (RT(P_{z-1}) - RT(P_z))]$$

$$AI(x) = 100 \times \text{önceki bileşiğin karbon sayısı} + 100 \times \frac{(\text{bilinmeyen bileşiğin alıkonma zamanı} - \text{önceki bileşiğin alıkonma zamanı})}{(\text{sonraki bileşiğin alıkonma zamanı} - \text{önceki bileşiğin alıkonma zamanı})}$$

Tablolarda sunulan AI değerleri Adams’ın kitabında yer alan listedeki değerlerle bire bir çakışmasa da, söz konusu bileşiklerin geliş sıraları, alıkonma süreleri titizlikle kontrol edilmiştir. AI değerlerindeki farklılıkların, kullanılan kolon ve metottaki farklılıklardan olabileceği değerlendirilmiş, bu durum kütle spektrumlarını içeren “Xcalibur” yazılımında bulunan kütle kütüphanesinin içerdiği yüzlerce literatür tarafından teyit edilmektedir (62).

### 3.3 Uçucu Yağın *Acanthamoeba* Paraziti Üzerinde Amebisid Etkisinin Denenmesi

#### 3.3.1 Deneylerde Kullanılacak *Acanthamoeba castellanii* Suşunun Elde Edilmesi

2005 yılında Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Hastanesi'ne gelen bir hastanın kornea kazıntısından elde edilen ve DEÜ Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı'nda *in vitro* pasajları devam ettirilen, PCR ve sekans analizi sonucu *Acanthamoeba castellanii* T4 suşu olduğu belirlenen parazit kullanılmıştır (64).

#### 3.3.2 Çalışmanın *In-vitro* Aşaması

##### PYG (Peptone Yeast extract Glucose) Besiyerinin Hazırlanması

- ❖ %1.5 Glikoz ➤ 1.5 g
- ❖ %0.75 Pepton ➤ 0.75 g
- ❖ %0.75 Maya ➤ 0.75 g
- Ekstraktı
- ❖ Distile su ➤ 100 ml

- Malzemeler 100 ml distile suda eritildikten sonra hacmi 1000 ml'ye tamamlanmıştır.
- 121°C'de 1 saat otoklavlandıktan sonra 4°C'de saklanmak üzere dolaba konmuştur. 4°C'de 6 aya kadar saklanabilmektedir.

#### 3.3.3 Deneysel Tasarım

Deneyler, 96 kuyucuklu steril kültür plaklarında (Şekil 28) gerçekleştirilmiştir.

Kuyucuklara DMSO (Dimetil Sülfoksit) içerisinde seyreltilerek hazırlanmış 40, 20, 10, 5, 2.5, ve 1.25 µg/ml dilüsyonlarda 100 µl uçucu yağ konmuştur.

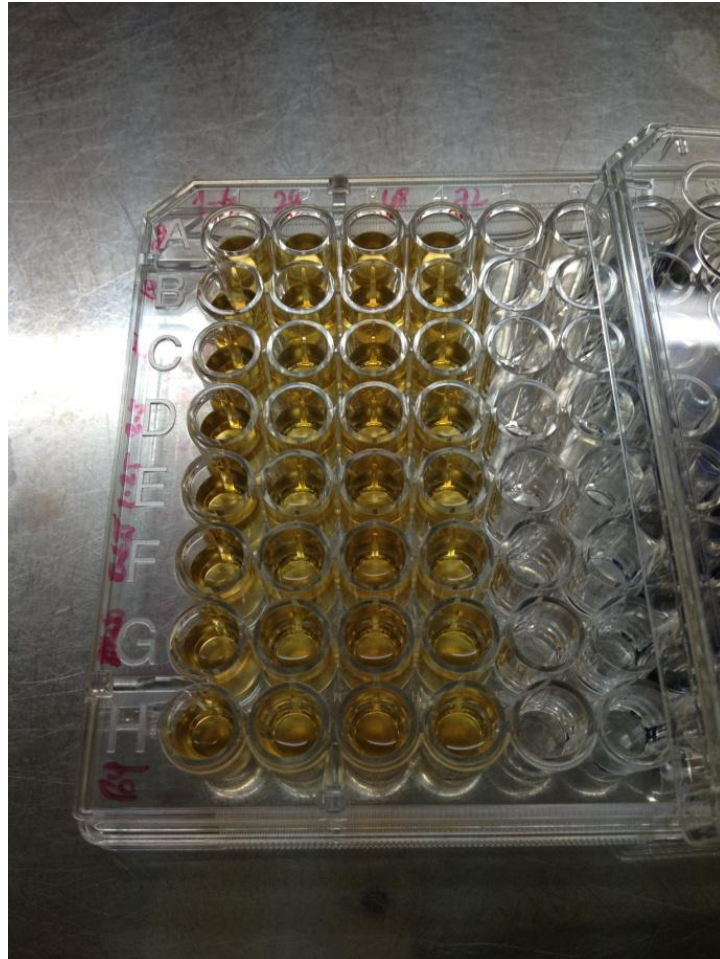
Amiplerin trofozoitlerinin ürediği PYG kültüründen 5 ml alınmış, 3 dakika boyunca 2.000 rpm'de santrifüj edilmiştir, daha sonra süpernatant kısım atılıp, trofozoitlerin bulunduğu çökelti PYG besiyeri ile iki kere yıkanmıştır.

Amipler  $1.6 \times 10^4$  trofozoit/ml olacak şekilde PYG besiyeri ile seyreltilmiştir.

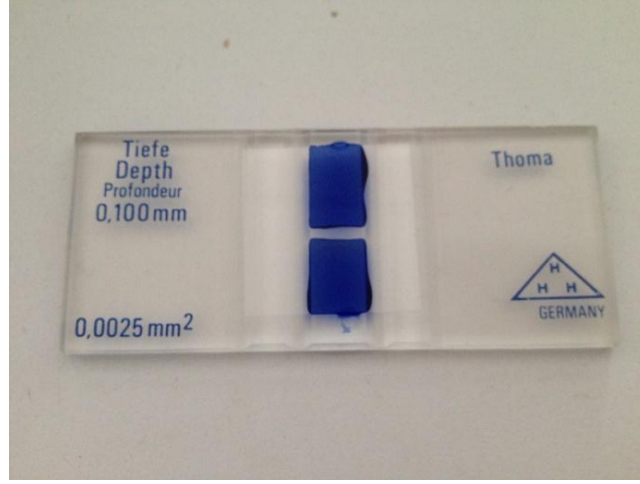
İçerisinde farklı dilüsyonlarda uçucu yağ bulunan kuyucuklara 100'er µl kalibre edilmiş trofozoit solüsyonu eklenerek ağızları kapatılmış ve 1., 6., 24., 48. ve 72. saatlerde amiplerin canlılığı metilen mavisi kullanılarak thoma lamında (Şekil 29) değerlendirilmiştir.

DMSO ve PYG ile hazırlanan kuyucuklar ise kontrol amaçlı olarak kullanılmıştır.

Test üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.



**Şekil 28:** 96 Kuyucuklu Steril Kültür Plağı (Fotoğraf: Damla Madencioğlu)



**Şekil 29:** Thoma Lamı ve Mikroskopta İncelenmek Üzere Preparatımız (Fotoğraf: Damla Madencioğlu)

### **3.4 Türkiye Uçucu Yağ Bitkileri Veri Tabanı Oluşturulması**

#### **3.4.1 Veri Tabanına Girilecek Verilerin Hazırlanması**

Çalışmamızın amacı Türkiye’de şu ana kadar uçucu yağ çalışması yapılmış bitkilerle ilgili literatürleri tarayarak ve bir veri tabanına aktararak, Türkiye’deki bitkilerin hangilerinin uçucu yağ çalışmasının yapıldığına ve bu çalışmaların ayrıntılarına dair bilgileri derlemektir. Uçucu yağlarla ilgili literatürlerdeki bilgilerin veri tabanına aktarımı tamamlandıktan sonra da bu veri tabanını uzaktan hizmet sunabilir hale getirmektir. Bu amaca yönelik olarak, Öğr. Gör. Mehmet Ali Ege tarafından hazırlanan uçucu yağ bitkileri veri tabanından yararlanılmıştır. Literatür taramamız kapsamında da Sciencedirect, Pubmed gibi çeşitli bilimsel veri tabanlarından ve bazı bildiri kitaplarından yararlanılmıştır. Halen devam etmekte olan literatür tarama çalışmamızda şu ana kadar Türkiye’deki uçucu yağ bitkileri hakkında yaklaşık 600 literatür taranmıştır. Bu 600 literatürdeki veri tabanına aktarmak üzere belirlenen bazı bilgiler (bitkinin uçucu yağ elde edilen kısmı, bitkinin lokalitesi, uçucu yağ bileşenleri vb.) ve literatürlerin özet kısımları veri tabanına aktarılmıştır. Devam eden literatür taramamız kapsamında yeni bulunan literatürlerdeki bilgiler de ilerleyen zamanlarda veri tabanına aktarılarak veri tabanının tamamlanması planlanmaktadır.

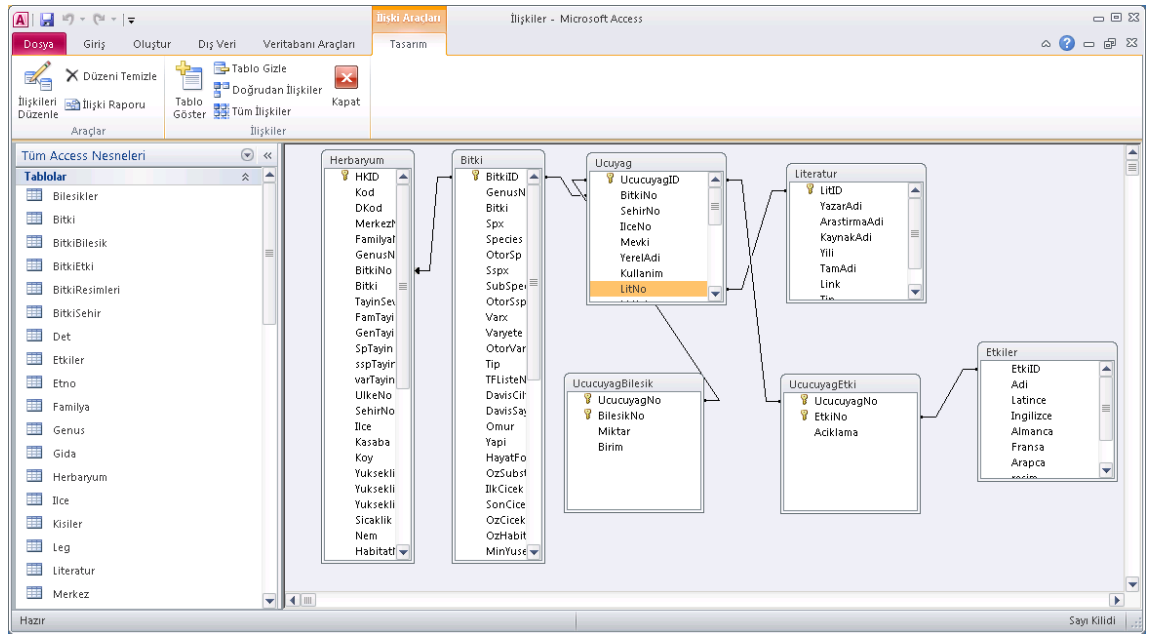


### 3.4.2 Veri Tabanı Oluşturulması

Hazırlanacak veri tabanı için gerekli olan üç temel uygulama ve bunların sınırları belirlenmiştir. Bu uygulamalar sırasıyla; “İlişkisel Veri Tabanı Sistemi”, verilerin kaydedileceği bir “Veri Giriş Yüzü” ve bir de kaydedilen verilerin sunulup sorgulanabileceği bir “Son Kullanıcı Yüzü” şeklinde planlanmıştır.

#### 3.4.2.1 İlişkisel Veri Tabanı Sistemi

Veri tabanına girilecek literatürler hazırlandıktan sonra, veri tabanında yer alacak bilgilerin birbirleri ile olan ilişkileri de “Microsoft Ofis 2010 - Access” yazılımı kullanılarak, Şekil 30’da sunulan şekilde kurulmuştur.

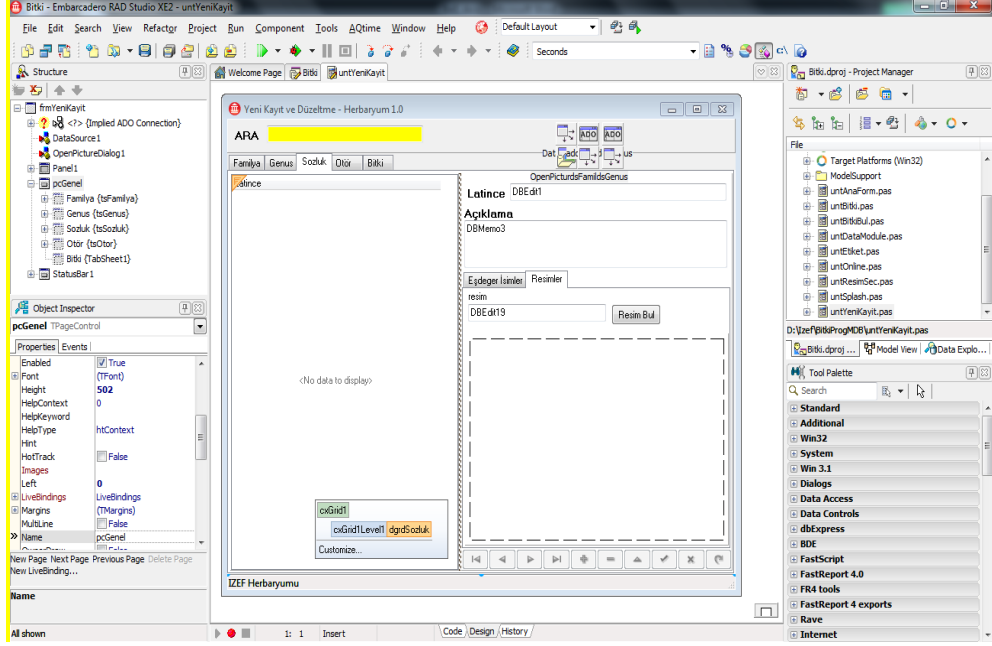


Şekil 30: Türkiye Uçucu Yağ Bitkileri Veri Tabanı-İlişkisel Veri Tabanı Sistemi

#### 3.4.2.2 Veri Giriş Yüzünün Hazırlanması

Veri giriş yüzü; kaydedilecek veri miktarı ve kayıt sırasında kullanılacak ara yüzün tasarımı göz önünde tutulup, “Embarcadero Delphi XE2” ve “Access” yazılımları kullanılarak hazırlanmıştır.

Türkiye uçucu yağ bitkileri veri tabanı veri giriş ara yüzünün tasarım ekranı şekil 31’de gösterilmiştir.



Şekil 31: Türkiye Uçucu Yağ Bitkileri Veri Tabanı-Veri Giriş Ara Yüzünün Tasarım Ekranı

“Türkiye Uçucu Yağ Bitkileri Veri Tabanı”nın gelecekte geliştirilerek zenginleştirilebilmesinin yanı sıra, ilişkiler tablosu üzerinde yapılacak geliştirme çalışmalarıyla, farklı sorgulama fonksiyonları eklemek de mümkün olabilecektir. Taranan literatürlerdeki ana veriler tamamlanan boş veri tabanı yazılımına aktarılarak planladığımız “Türkiye Uçucu Yağ Bitkileri Veri Tabanı” oluşturulmuştur. Henüz tam olarak tamamlanmayan literatür tarama çalışmamız tamamlandıktan ve gerekli düzenlemeler yapıldıktan sonra da veri tabanı kullanıma sunulacaktır.

Böylece, başta Farmasötik Botanikçiler ve Farmakognozlar olmak üzere uçucu yağ alanındaki çalışmaları merak eden tüm bilim insanlarının, Türkiye’deki uçucu yağ bitkileri hakkında yapılan çalışmalara bilgisayar aracılığıyla hızlı ve güncellenebilir şekilde erişebilmesi mümkün olacaktır.

## 4 BULGULAR

### 4.1 *Dorystoechas hastata* Uçucu Yağı Eldesi

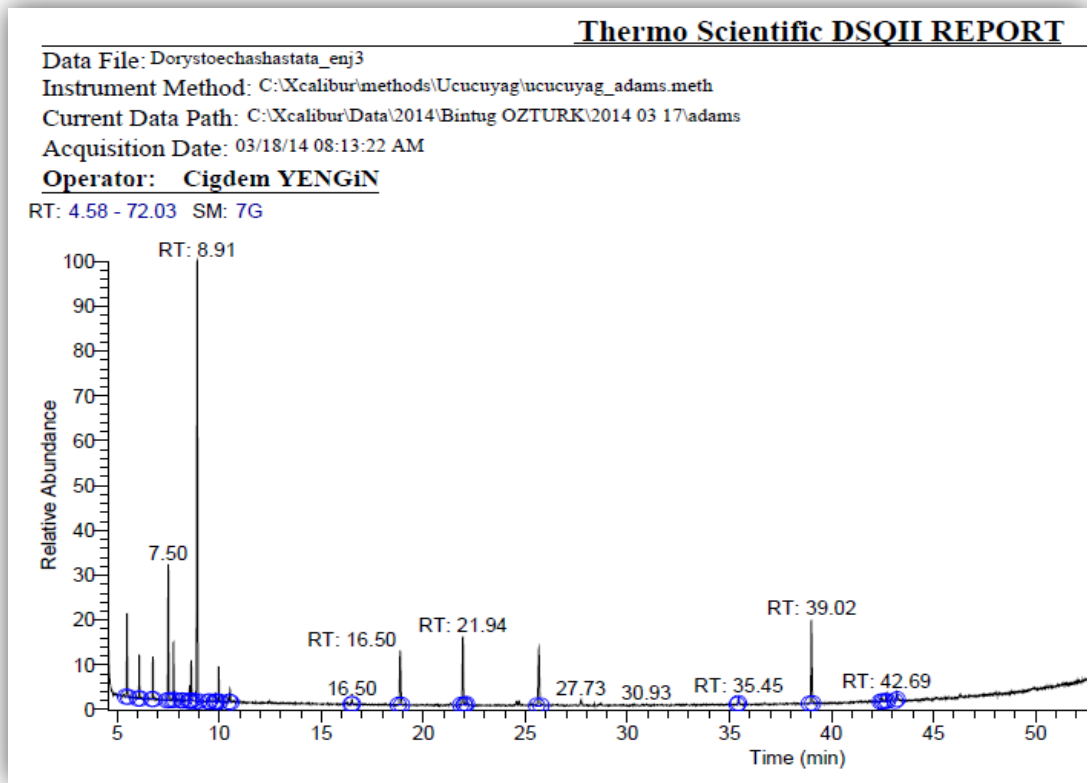
Neo-Clevenger tipi distilasyon düzeneğinde 3 saat boyunca yapılan distilasyon sonrasında % 1,8 ml/g oranında uçucu yağ (Şekil 32) elde edilmiştir.



Şekil 32: *Dorystoechas hastata* Uçucu Yağı (Fotoğraf: Damla Madencioğlu)

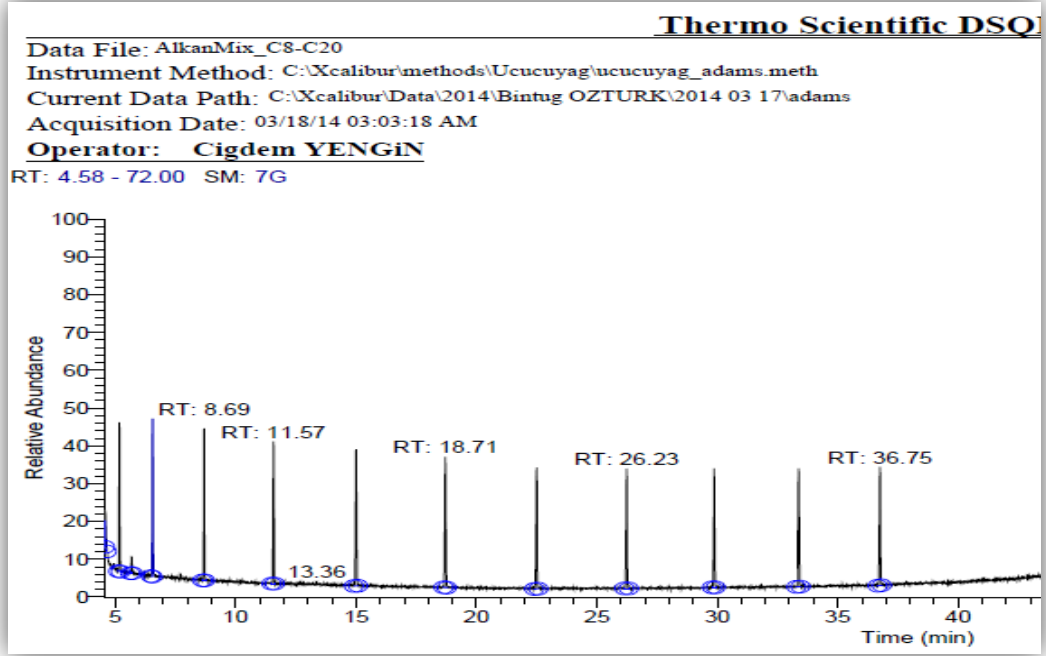
## 4.2 *Dorystoechas hastata* Uçucu Yağı GC, GC-MS Analizi

Gaz kromatografisi sonucu *Dorystoechas hastata* uçucu yağının ve n-alkan karışımının kromatogramları şekil 33 ve şekil 34’de verilmiştir. Şekil 33’deki uçucu yağ kromatogramı yardımıyla *Dorystoechas hastata* uçucu yağındaki bileşikler belirlenirken, Şekil 34’deki n-alkan karışımına ait kromatogram ise uçucu yağ bileşenlerinin AI değerlerini hesaplamak amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 33: *Dorystoechas hastata* Uçucu Yağının Gaz Kromatogramı

Yapılan GC ve GC-MS analizlerinde, uçucu yağın % 91.65 'ini oluşturan 16 pik tanımlanarak Şekil 36’da verilmiştir. Bu analizlerde ana bileşikler ve görece yüzde miktarları 1,8-sineol (% 33.25), Delta-3-karen (% 9.16) ve Guaiol (% 8.12) olarak saptanmıştır.



**Şekil 34:** C8-C20 Alkan Karışımları

RT	Madde	Aritmetik İndis	C önceki	C önceki RT	C sonraki	C sonraki RT	Tanımlama	Adams AI
5,48	Trisiklen	1022,3022	10	5,17	11	6,56	MS, AI	921
6,08	Kamfen	1065,4676	10	5,17	11	6,56	MS, AI	946
6,74	Sabinen	1108,4507	11	6,56	12	8,69	MS, AI	969
7,5	Delta-3-karen	1144,1315	11	6,56	12	8,69	MS, AI	1008
7,76	$\beta$ -pinen	1156,338	11	6,56	12	8,69	MS	974
8,55	(Z)- $\beta$ -osimen	1193,4272	11	6,56	12	8,69	MS	1032
8,63	D-limonen	1197,1831	11	6,56	12	8,69	MS, AI	1024
8,91	1,8-sineol	1207,6389	12	8,69	13	11,57	MS, AI	1026
9,97	(E)- $\beta$ -osimen	1244,4444	12	8,69	13	11,57	MS, AI	1044
10,53	p-simen	1263,8889	12	8,69	13	11,57	MS, AI	1020
18,87	Kafur	1504,2328	15	18,71	16	22,49	MS	1141
21,94	Karyofillen	1585,4497	15	18,71	16	22,49	MS, AI	1417
22,12	Terpinen-4-ol	1590,2116	15	18,71	16	22,49	MS	1174
25,66	Borneol	1684,7594	16	22,49	17	26,23	MS	1165
35,45	Karyofillen oksit	1961,4243	19	33,38	20	36,75	MS, AI	1582
39,02	Guaiol	2035,5799	20	36,75	22	43,13	MS, AI	1600

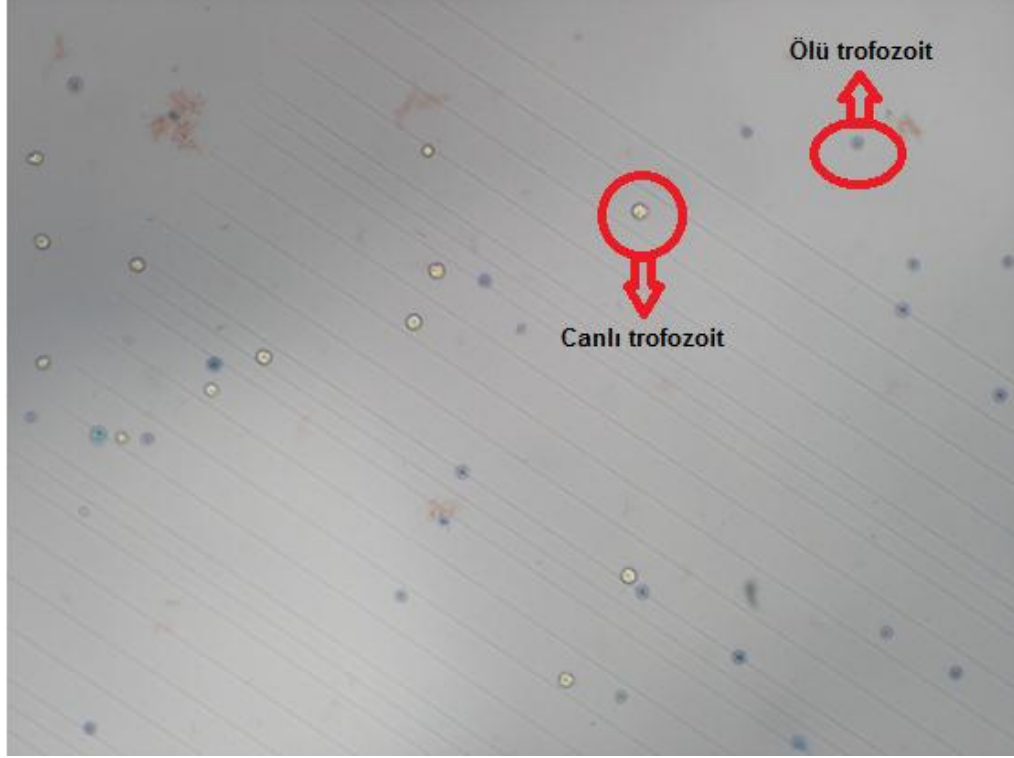
**Şekil 35:** Uçucu Yağ Bileşiklerinin Tanımlanmasında Kullanılan Aritmetik İndis Hesap Tablosu

No	RT	Aritmetik İndis	Bileşik	%	Tanımlama
1	5.48	1022,3022	Trisiklen	5.13	MS,AI
2	6.08	1065,4676	Kamfen	2.83	MS,AI
3	6.74	1108,4507	Sabinen	2.80	MS,AI
4	7.50	1144,1315	<b>Delta 3-karen</b>	9.19	MS,AI
5	7.76	1156,338	$\beta$ -pinen	3.08	MS
6	8.55	1193,4272	(Z)- $\beta$ -osimen	1.15	MS
7	8.63	1197,1831	D-limonen	2.90	MS,AI
8	8.91	1207,6389	<b>1,8-sineol</b>	33.33	MS,AI
9	9.97	1244,4444	(E)- $\beta$ -osimen	2.55	MS,AI
10	10.53	1263,8889	p-Simen	0.95	MS,AI
11	18.87	1504,2328	Kafur	5.42	MS
12	21.94	1585,4497	Karyofillen	6.56	MS,AI
13	22.12	1590,2116	Terpinen-4-ol	0.54	MS
14	25.66	1684,7594	Borneol	6.57	MS
15	35.45	1961,4243	Karyofillen oksit	0.46	MS,AI
16	39.02	2035,5799	<b>Guaiol</b>	8.19	MS,AI
			<b>Toplam</b>	<b>% 91,65</b>	

**Şekil 36:** *Dorystoechas hastata* Uçucu Yağının Bileşimi

### 4.3 Uçucu Yağın *Acanthamoeba* Paraziti Üzerindeki Amebisid Etkisi

*Dorystoechas hastata* uçucu yağının *Acanthamoeba castellanii* trofozoitleri üzerindeki amebisid etkisi için, DMSO içerisinde seyreltilerek hazırlanmış farklı dilüsyonlardaki uçucu yağlar metilen mavisiyle boyanarak thoma lamında incelenmiştir. 1., 6., 24., 48. ve 72. saatlerde mikroskopta canlı ve ölü amipleri (Şekil 37) sayarak gerçekleştirdiğimiz 3 tekrarlı çalışma sonunda, trofozoitlerin % canlılık oranlarının konsantrasyon ve saate göre değerlendirilmesi Şekil 38'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre *Dorystoechas hastata* uçucu yağı 40, 20, 10 ve 5  $\mu\text{g/ml}$  dozlarında %50 ve daha fazla oranda letal etki göstermiştir. Hatta 40  $\mu\text{g/ml}$  dozu her saatte %100 letal etkili bulunurken, 20  $\mu\text{g/ml}$  dozu da 48. ve 72. Saatlerde %100 letal etkili bulunarak anlamlı sonuçlar vermişlerdir.



**Şekil 37:** Ölü ve Canlı *Acanthamoeba castellanii* Trofozoitlerinin Mikroskop Görüntüsü (Fotoğraf: Damla Madencioğlu)

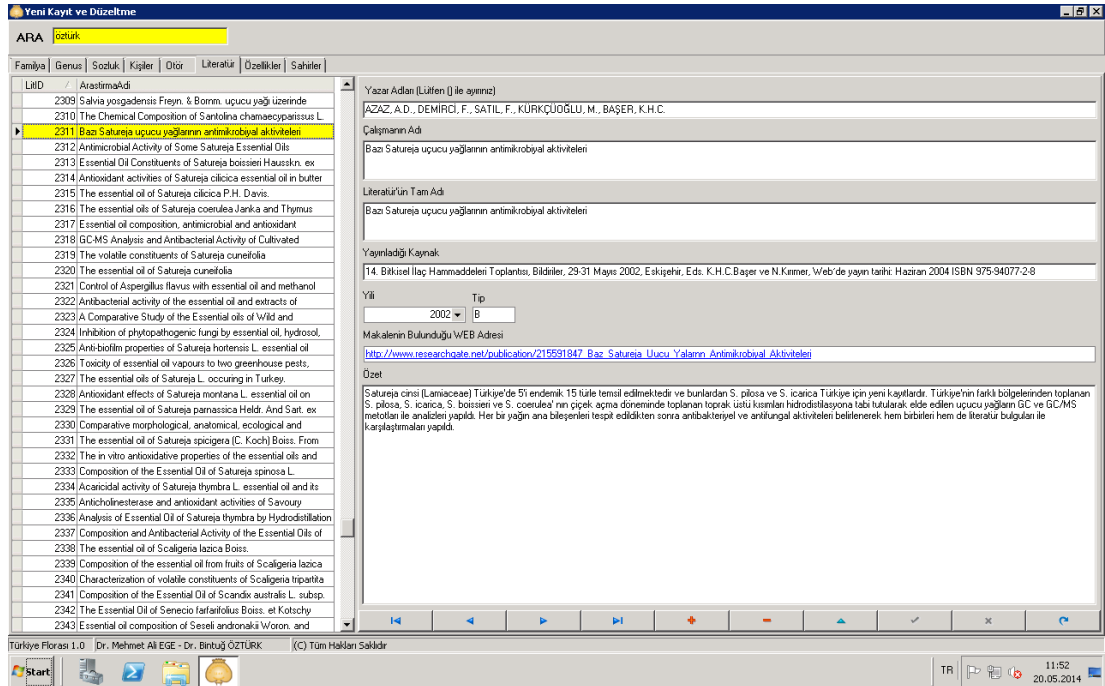
		Ortalama				
		1. saat	6. saat	24. saat	48. saat	72. saat
%canlilik	40 $\mu\text{g/ml}$	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0
	20 $\mu\text{g/ml}$	16,1	7,8	11,6	0,0	0,0
	10 $\mu\text{g/ml}$	34,7	17,5	23,1	11,1	7,8
	5 $\mu\text{g/ml}$	69,6	47,4	58,4	44,0	47,5
	2.5 $\mu\text{g/ml}$	89,4	89,4	87,0	79,9	66,0
	1.25 $\mu\text{g/ml}$	86,6	85,2	92,0	91,8	95,5
	%2 DMSO	89,9	94,9	91,1	91,9	96,8
	Besiyeri	95,7	94,6	95,7	100,0	95,5

**Şekil 38:** *Acanthamoeba castellanii* Trofozoitlerinin 3 Tekrarlı Çalışma Sonundaki % Canlılık Oranlarının Ortalaması

## 4.4 Türkiye Uçucu Yağ Bitkileri Veri Tabanı

Veri tabanı için kullanılacak bilgi kaynağı olarak taranan literatürler sonrasında, bilgilerin hazırlanan veri tabanına aktarılmasıyla yazılım tamamlanmıştır. Bu değerli bilgilerin bir yazılım yardımıyla sayısal hale getirilmesi ve şifre ile internetten indirilebilir olması, hedefleyip hazırladığımız çağdaş bilgi kaynağının önde gelen nitelikleri arasında yer almaktadır. Ve hazırladığımız bu yazılım Türkiye uçucu yağ bitkileri adına yapılmış derli toplu, kapsamlı ilk yazılımdır. Bir ilk adım olarak ortaya konan bu yazılım tabii ki geliştirilebilir, hızlı güncellenebilir olma niteliklerine de sahiptir. İçeriğinin zenginleşebilmesine ilaveten fonksiyonel olarak da geliştirilmiş sürümleri bu ilk adımı takiben gelecek yıllarda hazırlanabilecektir.

Şekil 39'da veri giriş yüzünü sunduğumuz ekrandan, taradığımız literatürlerdeki veriler, veri tabanına kaydedilmiştir. Son kullanıcı yüzünde de veri giriş yüzündeki veri ilişkileri aynen korunmuş, kontrol düğmeleri kaldırılmış ve kullanım kolaylığına yönelik bazı tasarımsal unsurlar eklenmiştir.



Şekil 39: Türkiye Uçucu Yağ Bitkileri Veri Tabanı Literatür Veri Giriş Yüzü



Türkiye Florası 2.0 Beta

İçeri

Arama Kriteri: Ad No

Sehir: Gaziantep İlçe: LitNo: 1901

Mevki: Gaziantep, Işklar köyü, Sof Dağı, 1000 m.

Yerel Adı:

Yılan çiçeği

Bileşik	%Miktar	Birim
1,8-cineole	26,1000003	
?-terpineol	9,30000019	
bisabolol ve türevle	6,59999990	

Etki:

- Antinflammatory
- Antimicrobial
- Antibacterial
- Anticandidal
- Analgesic
- Antinociceptive

Toplama tarihi: Haziran 2002

Çiçek  Dal uçları

Yaprak  Gövde

Toprak üstü  Odun

Kabuk  Kök

Meyve  Yumur

Tohum  Reçine

Balsam

Türkiye Florası 2.0 Beta Dr. Mehmet Ali EGE - Dr. Bintağ ÖZTÜRK (C) Tüm Hakları Saklıdır

Şekil 40: Veri Tabanının Son Kullanıcı Yüzü

## 5 TARTIŞMA

Bileşikler	Başer	Meriçli & Meriçli	
	Yüzde Miktarları* (min-max)	Yaprak	Çiçek
borneol	7.29 <sup>5</sup> -26.14 <sup>2</sup>	0.3	0.2
1,8-sineol	5.93 <sup>3</sup> -23.58 <sup>2</sup>	1.2	4.1
α-pinen	2.79 <sup>5</sup> -23.12 <sup>3</sup>	5.2	5.4
guaiol	5.14 <sup>3</sup> -19.37 <sup>5</sup>	-	-
kafur	1.92 <sup>3</sup> -17.30 <sup>4</sup>	14.6	12.5
β-pinen	2.11 <sup>4</sup> -15.73 <sup>3</sup>	2.9	2.7
mirsen	0.79 <sup>3</sup> -13.28 <sup>2</sup>	-	-
β-karyofillen	1.48 <sup>2</sup> -10.62 <sup>4</sup>	0.5	0.4
kamfen	2.17 <sup>5</sup> -9.75 <sup>4</sup>	5.9	5.6
bornil asetat	1.35 <sup>4</sup> -6.26 <sup>5</sup>	4.5	8.2
limonen	2.04 <sup>3</sup> -5.59 <sup>4</sup>	6.6	5.4
delta-3-karen	0.13 <sup>3</sup> -5.49 <sup>4</sup>	0.2	0.4
α-terpineol	-	20.4	21.1
terpinen-4-ol	-	11.0	11.3
α-fellandren	0.00 <sup>1,3</sup> -0.21 <sup>2</sup>	1.6	3.1
linalol	0.06 <sup>3</sup> -0.74 <sup>4</sup>	9.1	9.3
izoborneol	-	3.4	2.4

\* Üstyazı bitki kısımlarını belirtir: 1-Çiçekli yapraklı dalları-Buhar distilasyonu  
2-Çiçekli yapraklı dalları-Su distilasyonu, 3-Çiçekli başak, 4-Yaprak, 5-Odunsu kök

**Şekil 41:** Başer ve Meriçli uçucu yağ bileşenleri tablosu

*Dorystoechas hastata* bitkisiyle daha önce yapılan uçucu yağ eldesi ve analizi çalışmalarında elde edilen analiz sonuçlarıyla (Şekil 41), kendi uçucu yağ çalışmamızın analiz sonuçlarını kıyasladığımız zaman kafur, terpinen-4-ol, limonen, kamfen, 1,8-sineol, borneol, guaiol, karyofillen, β-pinen gibi uçucu yağ bileşenleri ortak bulunmuş, ana bileşikler de 1,8-sineol, guaiol, borneol olarak Başer'in çalışmasındaki ana bileşiklerle aynı bulunmuş ve çalışma sonuçlarının paralellik gösterdiği görülmüştür (31,32).

*Acanthamoeba*'ya karşı yeni ilaç araştırmaları sırasında *Pterocaulon polystachyum*, *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, *Croton isabelli*, *Piper hispidinervum* bitkilerinin uçucu yağları *Acanthamoeba* trofozoitlerine karşı etki denemelerinde kullanılmış ve belirli dozlarda letal etkili bulunmuşlardı.

*Dorystoechas hastata* uçucu yağının *Acanthamoeba* trofozoitlerine karşı amebisid etkisi de tarafımızdan denenip etkili bulunmuştur.

Buradan yola çıkılarak etki çalışmalarında kullanılan bitkilerin uçucu yağlarının ana bileşenlerinin kıyaslanarak amebisid etkide yüksek oranda etkili bileşiğin saptanabilmesi amaçlanmıştır.

*Acanthamoeba polyphaga* trofozoitlerine karşı denenen ve 10 ve 20 mg/ml dozlarında %100 letal etkili bulunan *Pterocaulon polystachyum* uçucu yağının ana bileşenleri; E-seskilavandulil asetat (%43.8), E-seskilavandulil (%17.3) ve  $\beta$ -karyofillen (%10)'dir (7).

*Acanthamoeba polyphaga* trofozoitlerine karşı denenen, *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, *Croton isabelli* uçucu yağlarından en çok amebisidal etki gösteren *Croton ericoides* uçucu yağının ana bileşenleri;  $\beta$ -pinen (%39),  $\beta$ -karyofillen (%8.1) ve Linalol (%7.6), en az etki gösteren *Croton isabelli* uçucu yağının ana bileşenleri; Bisiklogermakren (%48.9),  $\beta$ -karyofillen (%14.3) ve Germakren-D (%12.6)'dir. *Croton pallidulus* uçucu yağının ana bileşenleri de Terpinen-4-ol (%13.6),  $\beta$ -karyofillen (%11.5), Tau-kadinol (%7.8) ve Germakren-D (%7.6)'dir (8).

Bir diğer etki çalışmasında *Acanthamoeba polyphaga* trofozoitlerine karşı denenen ve 0.5 mg/ml dozu %100 letal etkili bulunan *Piper hispidinervum* uçucu yağının ana bileşenleri de; Safrol (%85.08) ve Terpinolen (%5.40)'dir (9).

*Acanthamoeba castellanii* trofozoitlerine karşı amebisid etki çalışmasında kullandığımız ve 40  $\mu$ g/ml dozu her saatte, 20  $\mu$ g/ml dozu da 48. ve 72. Saatlerde %100 letal etkili bulunan *Dorystoechas hastata* uçucu yağının ana bileşenleri de 1,8-sineol (%33.25), Delta-3-karen (%9.16), Guaiol (%8.12), Borneol (%6.57), Karyofillen (%6.56) olarak saptanmıştır.

Bu sonuçlara göre *Acanthamoeba* trofozoitlerine karşı amebisid etki denemelerinde kullanılan uçucu yağların bileşenleri arasında amebisid etkide yüksek oranda etkili bileşiği saptayabilmek adına bir ilişki kurulamamıştır. Uçucu yağların bileşenleri arasında genel olarak  $\beta$ -karyofillen'in ortak olarak bulunduğu görülmüştür fakat bu amebisid etkideki rolünü saptamak adına yeterli değildir.

Ayrıca, 16'sı Lamiaceae, 7'si Verbenaceae, 4'ü Asteraceae, 3'ü Piperaceae, 2'si Annonaceae familyalarından olan ve geri kalan bitki türlerinin de her biri bir familyaya ait olacak şekilde toplam 42 bitki türünün uçucu yağlarının *Acanthamoeba* türleri dışındaki antiprotozoal aktivitesine bakılmış ve etkili bulunduğu görülmüştü. Bu çalışmadaki uçucu yağların ana bileşenleri, 8 türde Timol, 4'er türde Öjenol ve Terpinen-4-ol, 3 türde Karvakrol ve 2 türde Kafur'dur (14).

Buradan yola çıkılarak da antiprotozoal aktivitede yüksek oranda rolü olan bileşiği saptayabilmek adına bir ilişki kurulamamıştır.

Uçucu yağların antiprotozoal bir ajan olarak denendiği bir diğer çalışmada ise, *Citrus sinensis* (orange), *Citrofortunella mitis* (syn. *Citrus microcarpa*, *calamansi*), *Citrus poonensis* (ponkan), *Citrus reticulata* (dalandan), *Eucalyptus citriodora* (eucalyptus), *Zingiber officinale* (ginger), *Cananga odorata* (ilang-ilang), *Cymbopogon winterianus* (citronella), *Pandanus sp.* (pandan) and *Mentha piperita* (peppermint) uçucu yağlarının *Acanthamoeba* türlerinin trofozoitlerine karşı antiprotozoal aktivitesine bakılmış, *Cymbopogon winterianus*, *Citrus reticulata* ve *Citrus poonensis* uçucu yağları %100 antiprotozoal aktivite gösterirken, *Pandanus sp.* ve *Zingiber officinale* uçucu yağları ise *Acanthamoeba* türleri üzerinde letal etki göstermemiştir. Bu farklılığın sebebi de, çeşitli aktif bileşiklerin bazılarının arasında olan sinerjistik etki ve hasat zamanının, uçucu yağ bileşenlerini ve biyolojik aktivitenin gücünü etkilemesi olarak düşünüldüğü bildirilmiştir (15).

Bu yorumlamadan yola çıkılarak, uçucu yağların aktivite çalışmalarında yalnız ana bileşiklerin değil, çeşitli aktif bileşiklerin sinerjistik etkileşimleri, hasat zamanı gibi farklı faktörlerin de önemli olduğu görülmüştür.

## 6 SONUÇ VE ÖNERİLER

*Acanthamoeba* türlerinin yol açtığı hastalıklara karşı, eldeki mevcut tedavilerin istenilen aktivite ve selektiviteye sahip olmamasından ve yan etkilerinden dolayı yeni ilaç araştırmaları yapılmaktadır. Özellikle de son yıllarda yaygın lens kullanımına bağlı olarak artan *Acanthamoeba* keratitine karşı yeni ilaç arayışları hız kazanmıştır. Bu kapsamda da içerdikleri pek çok madde grupları nedeniyle yüksek ilaç hammaddesi potansiyeline sahip bitkisel kaynaklardan yararlanılmaktadır.

Türkiye de sahip olduğu biyoçeşitlilik ve yüksek endemizm oranı ile ilaç araştırmalarında kullanılabilir çok fazla bitkisel kaynağa sahiptir. Bu zenginlikten yararlanılarak *Acanthamoeba*'ya karşı Türkiye'de monotipik endemik bir cins ve tür olan *Dorystoechas hastata* bitkisinin uçucu yağı tarafımızdan denenmiştir.

*Acanthamoeba castellanii* trofozoitlerine karşı *Dorystoechas hastata* uçucu yağı ile yapılan amebisid etki deneme çalışması sonunda *Dorystoechas hastata* uçucu yağının terapötik etki değeri olduğu görülmüştür. Ancak biyolojik etkinliğin doğrulanması, tam etkinlik ve yan etkilerin tanımlanması için sitotoksik etki çalışmalarına ve daha fazla *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 7 KAYNAKLAR

1. Saygı G, Polat Z. Özgür Yaşayan Amipler ve Neden Oldukları Parazitler (Primer Amibik Meningoensefalit - Granülomatöz Amibik Ensefalit – Keratit). C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 2003; 25(3): 140-149.
2. Cabral FM, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. Clin. Microbiol. Rev. 2003; 16(2): 273-307.
3. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev 2006; 30: 564-595.
4. Değerli S, Tepe B, Çeliksöz A, Berk Ş, Malatyalı E. In vitro amoebicidal activity of *Origanum syriacum* and *Origanum laevigatum* on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites. Experimental Parasitology 2012; 131: 20-24.
5. Ródio C, da Rocha Vianna D, Kowalski KP, Panatieri LF, von Poser G, Rott MB. In vitro evaluation of the amoebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. Parasitol Res. 2008; 104: 191-194.
6. Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL. Natural products as antiparasitic drugs. Parasitol Res. 2003; 90: 55-62.
7. Sauter IP, dos Santos JC, Apel MA, Cibulski SP, Roehe PM, von Poser GL, Rott MB. Amoebicidal activity and chemical composition of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) essential oil. Parasitol Res. 2011; 109(5): 1367-1371.
8. Vunda SL, Sauter IP, Cibulski SP, Roehe PM, Bordignon SA, Rott MB, Apel MA, von Poser GL. Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton*

- pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. Parasitol Res. 2012; 111(3): 961-966.
9. Sauter IP, Rossa GE, Lucas AM, Cibulski SP, Roehe, PM, da Silva LA, Rott MB, Vargas RM, Cassel E, von Poser GL. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. Industrial Crops and Products 2012; 40: 292-295.
  10. Akin Polat Z, Vural A, Tepe B, Çetin A. In vitro amoebicidal activity of four *Allium* species on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells. Parasitol Res. 2007; 101: 397-402.
  11. Akin Polat Z, Vural A, Ozan F, Tepe B, Özçelik S, Çetin A. In Vitro Evaluation of the Amoebicidal Activity of Garlic (*Allium sativum*) Extract on *Acanthamoeba castellanii* and its Cytotoxic Potential on Corneal Cells. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics 2008; 24: 8-14.
  12. El-Sayed NM, İsmail KA, Ahmed SA, Hetta MH. In vitro amoebicidal activity of ethanol extracts of *Arachis hypogaea* L., *Curcuma longa* L. and *Panocratium maritimum* L. on *Acanthamoeba castellanii* cysts. Parasitol Res. 2012; 110: 1985-1992.
  13. Göze İ, Alim A, Dağ Ş, Tepe B, Akin Polat Z. 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 2009; 25(4): 293-298.
  14. Pérez Gema S, Ramos-López MA, Sánchez-Miranda E, Fresán-Orozco MC, Pérez-Ramos J. Antiprotozoa activity of some essential oils. Journal of Medicinal Plants Research 2012; 6(15): 2901-2908.
  15. Mojica ER, Deocaris CC, Endriga MA. Essential Oils As Anti-protozoal Agents. Philippine Journal of Crop Science 2004; 29(3): 41-43.
  16. Seçmen Ö. Türkiye Florası. İzmir, Bornova: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Teksirler Serisi No: 120; 2012.
  17. Avcı M. Çeşitlilik ve Endemizm Açısından Türkiye'nin Bitki Örtüsü. İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü Coğrafya Dergisi 2005; 13: 27-55.

18. Uyanık M, Kara ŞM, Gürbüz B, Özgen Y. Türkiye’de Bitki Çeşitliliği ve Endemizm. Ekoloji Sempozyumu, Tekirdağ, 2013.
19. Kaya Y, Aksakal Ö. Endemik Bitkilerin Dünya ve Türkiye’deki Dağılımı. Erzincan Eğitim Fakültesi Dergisi 2005; 7(1): 85-99.
20. Seçmen Ö, Gemici Y, Görk G, Bekat L, Leblebici E. Tohumlu Bitkiler Sistematigi. İzmir, Bornova: Ege Üniversitesi Yayınları Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 116; 2011.
21. Zeybek U, Zeybek N. Farmasötik Botanik: Kapalı Tohumlu Bitkiler Sistematigi ve Önemli Maddeleri. İzmir, Bornova: Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 3; 2002.
22. Kızıkeçili Ö. *Salvia crypthanta* montbret & auchr ex bentham ve *Salvia pomifera* L. Türlerinin Metanol, Etanol Ekstrelerinin ve Uçucu Yağlarının Antibakteriyel, Antifungal ve Antitüberküloz Aktivitelerinin Tayini. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Temmuz 2007.
23. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. Farmasötik Botanik. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No: 93; 2007.
24. Yılmaz G. *Dorystoechas hastata*’nın (Lamiaceae) biyolojik ve ekolojik özellikleri. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir 2006.
25. Cronquist, A. Evolution and Classification of Flowering Plants. New York: The New York Botanic garden ; 1968 & 1988. ( 1st & 2nd edn).
26. Sauer E, Zeybek N, Zeybek U, Saygıner B. İletim Demetli Bitkilerin Tayin Anahtarları-Batı ve Güneybatı Anadolu Bölgesi. İzmir, Bornova ; 1996.
27. Erdağ BB, Emek YC, Aydoğan SK. Clonal propagation of *Dorystoechas hastata* via axillary shoot proliferation. Turk J Bot 2010; 34: 233-240.
28. Baytop T. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul: Nobel yayınları; 1999.
29. Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babaç MT, editors. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). 1<sup>st</sup> ed. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını; 2012.



30. Davis PH. Flora of Turkey and The East Aegean Island. England: Edinburg University Press; 1982.
31. Başer KHC. Composition of the Essential Oil of *Dorystoechas hastata*, A Monotypic Endemic from Turkey. J.Essent.Oil.Res. 1992; 4: 369-374.
32. Meriçli F, Meriçli AH. The Essential Oil of *Dorystoechas hastata*. Planta Medica 1986; (6): 506.
33. Venturella P, Venturella G, Marino ML, Meriçli AH, şubukçu B. Phytochemical Investigation of the Labiatae *Dorystoechas hastata*. Giorn.Bot.Ital., 1988; 122: 291-294.
34. Ulubelen A, Meriçli AH, Meriçli F. Diterpenes and Norditerpenes from the Roots of *Dorystoechas hastata*. Pharmazie 2004; 59(4): 301-303.
35. Kantarcı G, Öztürk B, Karabay Yavaşoğlu NÜ, Konyalıoğlu S. Endemik *Dorystoechas hastata* Boiss. & Heldr. Ex Bentham Uçucu Yağının Antimikrobiyal, DPPH Serbest Radikal Süpürücü ve Antioksidan Etkileri Üzerine Araştırmalar, 18.Bitkisel İlaç Hammadeleri Toplantısı, Poster Bildiri, 2008.
36. Karagözler AA, Erdağ B, Emek YC, Uygun DA. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. Food Chemistry 2008; 111: 400-407.
37. Erkan N, Akgönen S, Ovat S, Göksel G, Ayrancı E. Phenolic compounds profile and antioxidant activity of *Dorystoechas hastata* L. Boiss et Heldr. Food Research International 2011; 44: 3013-3020.
38. Bakkalı F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology 2008; 46: 446-475.
39. Kılıç A. Uçucu yağ elde etme yöntemleri. Bartın Orman Fakóltesi Dergisi 2008; 13: 37-45.
40. Tanker M, Tanker N. Farmakognozi Cilt 2. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakóltesi Yayını No:65 ; 1990.
41. Kürkçüoğlu M, editor. Bitki Kimyası ve Analiz Yöntemleri. Eskişehir: T.C. Anadolu Üniversitesi Yayını No:2100; Eylül 2010.

42. Evren M, Tekgüler B. Uçucu Yağların Antimikrobiyel Özellikleri. Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR 2011; 3: 28-40. Available from: [www.mikrobiyoloji.org/pdf/702110304.pdf](http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702110304.pdf) .
43. Çelen S. Türkiye’de Yayılış Gösteren Dört *Thymus* Türünün Uçucu Yağ Bileşimleri, Antibakteriyel ve Antifungal Aktivite Özelliklerinin Belirlenmesi. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, Haziran 2006.
44. Başer KHC, Gülbaba AG, Azcan N, Kara M, Kırimer N, Kürkçüoğlu M et.al. Türkiye’de yetiştirilen bazı okaliptüs (*Eucalyptus*) türlerinin uçucu yağ verim ve bileşimlerinin ve üretim teknolojilerinin belirlenmesi. Orman Bakanlığı Yayın No: 084, DOA Yayın No: 11, Tarsus.
45. Umay A. *Lavandula stoechas*, *Melissa officinalis* ve *Tribulus terrestris* Bitkilerinin Kimyasal İçeriklerinin Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Adana 2007.
46. Karagül H, editor. Hücre Kimyası. Eskişehir: T.C. Anadolu Üniversitesi Yayını No: 2377; Eylül 2011.
47. Berber H. Organik Kimya II; Heteroatom İçeren Organik Bileşikler. Eskişehir: İlköğretim Öğretmenliği Lisans Tamamlama Programı, Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayını, Cilt 2, Ünite 16; 1999.
48. Mortimer CE. Modern Üniversite Kimyası. İstanbul: Çağlayan Basımevi; 1993.
49. Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. Antioxidant Activity of Essential Oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2013; 61: 10835-10847
50. Ayhan Z, Döş A. Gıdalarda Katı Faz Mikroekstraksiyon Tekniği ile Flavor Analizi. Gıda 2004; 29(2): 169-175.
51. Alp S, Özdemir S, Kilitçi A. Veritabanı Yönetim Sistemleri. İstanbul: Türkmen Kitabevi ; 2011.
52. [http://www.dijitalders.com/index.php?sa=pdf\\_yap&ino=2378](http://www.dijitalders.com/index.php?sa=pdf_yap&ino=2378)
53. Meloni JM. PHP ve MySQL ve Apache. İstanbul : Alfa Basım Yayın Dağıtım Ltd. Şti. ; 2008.
54. <http://www.bilgius.com/iliskisel-veri-tabani/>

55. Visvesvara GS. Classification of *Acanthamoeba*. Reviews of Infectious Diseases 1991; 13: 369-372.
56. Ertabaklar H, Dayanır V, Apaydın P, Ertuğ S, Walochnik J. Olgu Sunumu: *Acanthamoeba Keratiti*. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2009; 33 (4): 283-285.
57. <http://www.caister.com/supplementary/acanthamoeba/a5.html>
58. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasites & Vectors 2012; 5: 6.
59. Kreier JP, Baker JR, editors. Parasitic Protozoa. 2nd edn, vol 3. San Diego: Academic Press, 1993; 143-246.
60. Anonymous. European Pharmacopoeia. 3rd Ed., Strasbourg, France: Consil of Europa; 1996. p. 121.
61. Ulukanlı Z, Karabörklü S, Öztürk B, Çenet B, Balçılar M. Chemical Composition, Antibacterial and Insecticidal Activities of the Essential Oil from the *Pistacia terebinthus* L. Spp. Palaestina (Boiss.) (Anacardiaceae). Journal of Food Processing and Preservation 2014; 38: 815-822.
62. Adams RP. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. 4th Ed. Allured Business Media, Carol Stream, IL.; 2009.
63. Öztürk B, Konyalıoğlu S, Kantarcı G, Çetinkol D. İzmir yöresindeki yabani *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas* taksonundan elde edilen uçucu yağın bileşimi, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan kapasitesi. Anadolu J. AARI. 2005; 15: 61-72.
64. Özkoç S, Tuncay S, Delibaş SB, Akisu Ç, Özbek Z, Durak İ et.al. Identification of *Acanthamoeba* genotype T4 and *Paravahlkampfia* sp. from two clinical samples. Journal of Medical Microbiology 2008; 57: 392-396.

## Özgeçmiş

19.09.1989 tarihinde Muğla'da doğdum. 1994 yılında Muğla'da Dalyan Naciye Tınaztepe İlköğretim Okulu'nda başladığım ilköğretim eğitimimi 2003 yılında tamamladım. 2003 yılında İzmir Özel Fatih Fen Lisesi'nde yatılı olarak lise eğitimime başladım, 2007 yılında mezun oldum. Aynı sene Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ni kazanıp lisans eğitimime başladım. 2012 senesinde 'İngilizce-Türkçe Botanik Terimleri Sözlüğü' adlı lisans bitirme tezimle mezun olduğum üniversitemde aynı sene Farmasötik Botanik alanında yüksek lisansa başladım. Halen daha Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'nda lisansüstü eğitimime devam etmekteyim. Bekarım.

*e-posta:* damla\_madencioglu@hotmail.com