

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI *Salvia* GENUSU ÜYELERİNİN *Acanthamoeba castellanii*
TEDAVİSİNDEKİ KULLANIM POTANSİYELLERİNİN ve
SİTOTOKSİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Enes AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Atalay SÖKMEN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu çalışma, jürimiz tarafından, Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan	Prof. Dr. M. Ali AKPINAR
Üye	Prof. Dr. Atalay SÖKMEN
Üye	Yrd. Doç. Dr. Bektaş TEPE

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen Öğretim Üyeleri'ne ait olduğunu onaylarım.

.../...../ 2008

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Prof.Dr. Hasan H. BAŞIBÜYÜK

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 05 / 01 / 1984 tarihli toplantısında kabul edilen ve daha sonra 30 / 12 / 1993 tarihinde C. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'nce hazırlanan ve yayınlanan "Yüksek Lisans ve Doktora Tez Yazım Kılavuzu" adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Özet	iii
Summary	v
Teşekkür	vii
Şekiller Dizini	viii
Tablolar Dizini	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Bitkilerin Biyolojik Aktivite Potansiyellerine Genel Bir Bakış	1
1.2. <i>Acanthamoeba castellani</i>	4
1.2.1. Dağılımı ve Biyolojisi	5
1.2.1.1. Dağılımı	5
1.2.1.2. Yaşam Döngüsü ve Biyolojisi	5
1.3. <i>Salvia</i> Türleri ve Biyolojik Aktiviteleri	6
1.4. Tezin Amacı	9
2. MATERYAL ve METOD	11
2.1. Bitkilerin toplanması ve adlandırılması	11
2.2. Polar metanol özütlerinin hazırlanması	11
2.3. Trofozoitler	12
2.4. Kistler	12
2.5. Deneysel Dizayn	12
2.6. <i>Salvia</i> türlerinin trofozoit safhasına etkilerinin tespit edilmesi	13
2.7. <i>Salvia</i> türlerinin kist safhasına etkilerinin tespit edilmesi	13
2.8. Primer epitel hücre kültürü	13
2.9. Agar difüzyon metodu	14
2.10. İstatistiksel analizler	15
3. BULGULAR	16
3.1. <i>S. staminea</i> Özütünün Biyolojik Aktiviteleri	16
3.1.1. Amoebisidal Aktivite	16
3.1.1.1. Trofozoitler üzerine etki	16
3.1.1.2. Kistler üzerine etki	19

3.1.2. Sitotoksik Aktivite	22
3.2. <i>S. caespitosa</i> Özütünün Biyolojik Aktiviteleri	22
3.2.1. Amoebisidal Aktivite	22
3.2.1.1. Trofozoitler üzerine etki	22
3.2.1.2. Kistler üzerine etki	26
3.2.2. Sitotoksik Aktivite	29
3.3. <i>S. tomentosa</i> , <i>S. virgata</i> ve <i>S. hypargeia</i> Özütlerinin Biyolojik Aktiviteleri	29
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	30
5. KAYNAKLAR	34

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI *Salvia* GENUSU ÜYELERİNİN *Acanthamoeba castellanii*
TEDAVİSİNDEKİ KULLANIM POTANSİYELLERİNİN ve SİTOTOKSİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Enes AYDIN

Cumhuriyet Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman

Prof. Dr. Atalay SÖKMEN

Amip kaynaklı keratit olguların tümüyle tedavi edilmesi bazı hastalarda oldukça zordur. Zira, aşılalmış tedavi yöntemlerine karşı kistler trofozoitlerden daha az duyarlıdır. Bu çalışmada *Salvia tomentosa*, *S. virgata*, *S. hypargeia*, *S. staminea* ve *S. caespitosa*'dan elde edilen metanol özütlerinin *Acanthamoeba castellanii* üzerindeki *in-vitro* etkinliği ve ayrıca kornea hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Amoebisidal aktivitenin belirlenebilmesi için, 1.0 mg/ml'den 32.0 mg/ml'ya kadar değişen derişimlerde hazırlanan *Salvia* özütlerinin *Acanthamoeba* trofozoitleri ve kistleri üzerindeki etkisi *in vitro* test edilmiştir. *Salvia* türlerinin kornea hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitelerinin tespiti için ise agar diffüzyon yöntemi uygulanmıştır. Testlerden elde edilen sonuçlara göre, *Salvia tomentosa*, *S. virgata* ve *S. hypargeia* herhangi bir amoebisidal aktivite göstermemiştir. Diğer taraftan, *S. caespitosa* ile karşılatılacak olursa, *S. staminea*, *A. castellanii* üzerinde kayda değer bir amoebisidal aktivite sergilemiştir. *S. staminea* metanol özütü ayrıca, kültürdeki hücreler üzerinde 16.0 mg/ml konsantrasyonda sitotoksik etki göstermemiştir. Sonuç olarak, *S. staminea*'dan elde edilen metanol özütünün, *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilecek yeni ve alternatif bir doğal ürün

olduğu düşünülebilir. Ancak, bu özütün biyolojik etkinliğinin doğrulanması için daha ileri düzeyde *in vivo* test sistemlerine ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Acanthamoeba castellani*, *Salvia tomentosa*, *Salvia virgata*, *Salvia hypargeia*, *Salvia staminea*, *Salvia caespitosa*, Amoebisidal etki, Sitotoksik etki.

SUMMARY**M. Sc.****INVESTIGATION OF THE USAGE POTENTIALS OF SOME *Salvia*
SPECIES ON THE TREATMENT OF *Acanthamoeba castellanii*
AND THEIR CYTOTOXIC ACTIVITIES****Enes AYDIN****Cumhuriyet University****Graduate School of Natural and****Applied Sciences****Department of Biology****Supervisor****Prof. Dr. Atalay SÖKMEN**

Amoebic keratitis is difficult to treat, without total efficacy in some patients because of cysts which is less susceptible than trophozoites to the usual treatments. We investigated here the *in vitro* effectiveness of methanolic extracts of *Salvia tomentosa*, *S. virgata*, *S. hypargeia*, *S. staminea* and *S. caespitosa* against *Acanthamoeba castellanii* and also cytotoxicity on corneal cells *in vitro*. In the first case, the effect of *Salvia* species with the concentrations ranging between from 1.0 to 32.0 mg/ml on the proliferation of *A. castellanii* trophozoites and cysts were examined *in vitro*. For the determination of cytotoxicity of *Salvia* species on corneal cells, agar diffusion tests were performed. According to the results obtained from the tests, *Salvia tomentosa*, *S. virgata* and *S. hypargeia* did not show any amoebicidal activity. On the other hand, *S. staminea* showed remarkable amoebicidal effect on *A. castellanii* when compared to *S. caespitosa*. In the case of the cytotoxic activity, methanolic extract of *S. staminea* showed no cytotoxicity for the cells in the concentration of 16.0 mg/ml. As a result, methanolic extract of *S. staminea* could be concluded as a new an alternative natural agent against *Acanthamoeba*. On the other

hand, it still needs to be further evaluated by *in vivo* test systems to confirm its biological effect.

Key words: *Acanthamoeba castellani*, *Salvia tomentosa*, *Salvia virgata*, *Salvia hypargeia*, *Salvia staminea*, *Salvia caespitosa*, Amoebicidal effect, Cytotoxic effect.

TEŞEKKÜR

Bu alıőmanın sŸrdŸrŸlmesi konusunda yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Atalay SÖKMEN'e teőekkŸrlerimi sunarım. Diğer yandan amoebisidal aktivite tayini ve sitotoksik aktiviteleri gerçekleőtirmem sırasında bana yardımcı olan Dr. ZŸbeyde AKIN-POLAT'a ve Yrd. Doç. Dr. Bektaş TEPE'ye teőekkŸrlerimi sunarım.

ŒEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Œekil 1.1. *Acanthamoeba*, *Balamuthia* ve *Naegleria*
cinsi amiplerin sınıflandırılması

4

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 3.1. <i>S. staminea</i> özütünün, <i>A. castellani</i> trofozoitleri üzerine etkisi	18
Tablo 3.2. <i>S. staminea</i> özütünün, <i>A. castellani</i> kistleri üzerine etkisi	21
Tablo 3.3. <i>S. caespitosa</i> özütünün, <i>A. castellani</i> trofozoitleri üzerine etkisi	25
Tablo 3.4. <i>S. caespitosa</i> özütünün, <i>A. castellani</i> kistleri üzerine etkisi	28

1. GİRİŞ

1.1. Bitkilerin Biyolojik Aktivite Potansiyellerine Genel Bir Bakış

Bitkiler, insanoğlunun temel besin gereksinimlerini karşılayabilmesi için gereken primer metabolitlerin (karbohidrat, protein ve yağlar) ana kaynağıdır. Besinsel önemi çok büyük olan bu bileşiklerden başka diğer bazı yararlı maddeler de bitkilerden sağlanmaktadır. Besin ve enerji sağlama gibi yaşamsal değerler taşımamakla birlikte, başta ilaç sanayi olmak üzere, kimya, besin, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli ve yeri doldurulamaz bazı kimyasallar bitkilerden elde edilmektedir. Bu kimyasallara genel olarak “sekonder metabolitler” adı verilmektedir (Cox, 1990).

Bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin tedavi amacıyla kullanılması bilim adamları için uzun zamandan beri ilgi çekici bir çalışma alanı olmuştur. Burada, halk arasında “kocakarı ilaçları” olarak bilinen bitkilerden yeni ilaçlar geliştirilmesinde, etnofarmakoloji biliminin önemli katkısı olmuştur. Vinkristin, vinblastin, rezerpin, kinin ve hatta aspirin, ekonomik ve sağlık açısından bugünkü önemlerini bu araştırmalara borçludurlar (Cox, 1990).

Tıbbi bitkilerin yetiştirilmesi, farmakognozi'nin gelişmesine paralel olarak artmıştır. 19. yüzyıl sonlarına doğru kimya alanında büyük ilerlemeler kaydedilmesi nedeniyle tıbbi bitkilerin yetiştirilmesi gerilemiş, ancak 1. Dünya Savaşı'ndan sonra tekrar ivme kazanmıştır. Ancak 1920'li yıllarda başlayan ve 1950'li yıllarda doruk noktasına ulaşan sentetik ilaçların geliştirilmesi ve mikroorganizmalar kullanılarak özellikle antibiyotiklerin mayalama yoluyla üretimi, tıbbi bitkilerin dünya ticaret hacmindeki payını önemli ölçüde azaltmıştır. Diğer taraftan sentetik katkı maddelerinin mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilerinin ortaya çıkması ile birlikte; et, süt, meyve, sebze, deniz ürünleri ve meşrubat sektörlerinde doğal ürünlere duyulan talep tekrar artmıştır (Fowler, 1982).

Günümüzde dünya nüfusunun çoğunluğu için bitkiler, ilaç hammaddesi olarak kullanılmaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde nüfusun % 80'i sağlık gereksinimlerini ilk etapta geleneksel tıbbi bitkilerden sağlamaktadır. Dünya nüfusunun % 80'inin gelişmekte olan ülkelerde yaşadığı düşünülürse

toplam dünya nüfusunun % 64'ü bitkileri tedavi amaçlı kullanmaktadır (Farnsworth, 1990). Gelişmiş ülkelerde reçete ile satılan ilaçların yaklaşık % 25'i bitkisel kökenli kimyasallardır (örneğin; Passiflora, Zinco v.b.).

Gelişmiş ülkelerde HIV başta olmak üzere birçok virüs, bakteri ve diğer hastalık yapıcı etkenlere karşı antiviral ve antimikrobiyal etkili yeni kimyasalların saptanması için doğal kaynaklara başvurulmakta ve bu kaynakların başında bitkiler gelmektedir. Örneğin; A.B.D.'de Ulusal Kanser Enstitüsü bünyesinde bitkilerin antibakteriyel ve antiviral özelliklerini araştırmak amacı ile Kuzey ve Güney Amerika'da bitki örtüsü incelenmekte ve bu maksatla yılda 4500 bitki örneğini inceleyecek bir program dahilinde araştırmalar yapılmaktadır (Levingstone ve Zamora, 1983; Alice ve ark., 1991). Yine çeşitli araştırma enstitüleri de dünyanın çeşitli bölgelerinde, özellikle tropikal bölgelerde, bu tür araştırmalara önem vermektedir (Pacheco ve ark., 1993). Diğer taraftan, geleneksel olarak bitkilerle tedavinin yaygın olduğu Çin ve diğer uzak doğu ülkelerinde bulunan endemik bitkiler de bu kapsam dahilinde değerlendirilmektedir (Nagai ve Tada, 1987).

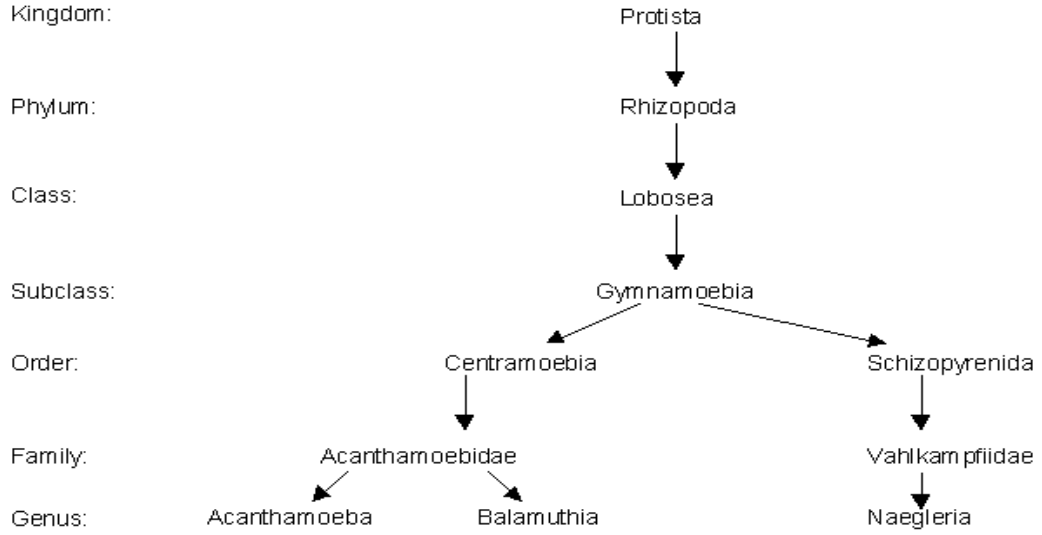
Bitkilerle yapılan bu çalışmalarda hiç kuşkusuz geleneksel kültür içeriği kadar, çalışılan coğrafi bölgenin bitkisel zenginliği de önemlidir. Dolayısı ile ilk planda tropik bitkilerin yoğun ve çok çeşitli olduğu bölgeler önem kazanmaktadır. Bununla beraber, Türkiye gibi coğrafi ve kültürel zenginliği olan bölgelerde de bu tartışmalar büyük öneme sahiptir. Doğu ile Batı arasında coğrafi bir köprü konumunda bulunan Anadolu'da tarih boyunca çeşitli medeniyetlerin yerleşmesi, gerek doğudan ve gerekse batıdan birçok kavmin bölgeye yerleşmesi büyük bir kültür mirasını da beraberinde getirmiştir. Bu mirasta elbette bitkilerle tedavi unsuru önemli bir yer tutmaktadır (Nagai ve Tada, 1987).

Bitkilerin, yukarıda değinilen antimikrobiyal potansiyellerinin yanı sıra başka bir çok biyolojik potansiyelleri bulunmaktadır. Bunların başlıcaları; analjezik, anksiyolitik, anti-depresan, anti-inflamatuvar, anti-kolinesteraz, anti-oksidan, amoebisidal, anti-leishmanial, anti-platelet, anti-proliferatif, pro-apoptotik, akıl hastalıkları, diyabet, karaciğer koruyucu, HIV-1 integraz inhibitör aktiviteleridir.

Son yıllarda bitkilerde elde edilen bileşiklerin amoebisidal aktivitelerinin olduğuna dair ilgi çekici veriler yayınlanmaktadır. Özellikle *Acanthamoeba* türleri üzerinde yapılan çalışmalar bunların başlıcalarıdır. *Acanthamoeba*, merkezi sinir sisteminde oluşan ölümcül bir hastalık olan granülamatöz amebik ensefalit (GAE) ve gözlerde ağrılı ve tehlikeli bir hastalık olan amebik keratit (AK) hastalıklarının temelinde yatan unsurdur (Martinez ve Janitschke, 1985). Bu türler ayrıca; vücudun çeşitli bölgelerinde nodüllerin oluşumuna, artirit'e ve rino-sinüzit gibi hastalıklara da yol açmaktadırlar. AIDS hastaları da dahil olmak üzere immün sistemi baskılanmış kişiler (örneğin; uzun süreli kortikosteroid içeren ilaçlar kullanmak zorunda olan hastalar v.b.), *Acanthamoeba* enfeksiyonlarına karşı daha açık hale gelirler (Dunand ve ark., 1997; Gulet ve ark., 1979; Torno ve ark., 2000). Günümüzde metronidazol ve emetin en sık kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçların genellikle uzun dönem kullanımı gerekmektedir. Ancak kullanıma bağlı olarak toksik etiler ortaya çıkabilmekte veya mikroorganizmalarda bu ilaçlara karşı direnç oluşabilmektedir (Cervantes, 1972; Albach ve ark., 1978; Samarawickrema ve ark., 1997). Bu nedenle yeni, etkili ve daha güvenilir ilaçların geliştirilmesi için acilen yeni kaynaklara ihtiyaç duyulmaktadır. Tıbbi bitkilerin bu amaçla taranması yeni aktif bileşenlerin bulunması için en etkili yoldur.

1.2. *Acanthamoeba castellani*

Acanthamoeba cinsi amipler, ilk kez 1930 yılında Castellani tarafından, *Cryptococcus pararoseus* kültürlerinde bulunmuş ve tanımlamıştır. Daha sonra bu cinsin sınıflandırılması, 1931 yılında Volkonsky tarafından yapılmış, fakat gerçek sınıflandırma son yıllarda yapılan araştırmalar sonucu ortaya konmuştur (John, 1998). *Acanthamoeba* cinsinin en son sınıflandırması Şekil 1'de verilmektedir. Buna göre *Acanthamoeba* cinsi, Acanthamoebidae ailesi, Centramoebida takımı, Lobose sınıfı, Rhizopoda şubesi (filumu) içinde yer almaktadır (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003). Son yıllarda 16S-rRNA genlerinin moleküler analizi yapılmış, bu çalışmalar sonucunda *Balamuthia* cinsi, Leptomyxidae familyasından, Acanthamoebidae ailesine transfer edilmiştir (Amaral Zettler ve ark., 2000).



Şekil 1.1. *Acanthamoeba*, *Balamuthia* ve *Naegleria* cinsi amiplerin sınıflandırılması (Marciano-Cabral ve Cabral, 2003).

Acanthamoeba cinsinin ayrımı en kolay, bu cinse özgü olan, trofozoitler üzerindeki, acanthapoda adı verilen, diken şeklindeki yüzey çıkıntıları ile yapılır (John, 1998; Saygı ve ark., 2000). Morfolojik kriterler kullanarak tür düzeyinde ayırım yapmak çok zordur. *Acanthamoeba* türleri, kist büyüklüğü ve şekline göre üç morfolojik gruba ayrılırlar: Grup I'deki türler, diğer gruptaki türlerle kıyaslandığında oldukça büyük kistlere sahiptir. Ektokistle, endokist arasında oldukça belirgin bir şekilde görülen açıklık vardır ve yıldız şeklindeki endokist, uçlardan ektokistle bağlantılıdır. Grup II'deki türlerin ektokisleri buruşuk bir görünümde iken endokist yıldız, poligon, üçgen veya oval şekilde olabilir. Grup III'deki türlerin kistleri küçüktür, kist duvarı ince ve düz bir yapıdadır, ektokist düz çeperi ile endokisti çevreler. Ektokistle, endokist arasındaki mesafe çok azdır (Illingworth ve Cook, 1998; John, 1998; Marciano-Cabral ve Cabral, 2003).

1.2.1. Dağılımı ve Biyolojisi

1.2.1.1. Dağılımı

Acanthamoeba türleri çevrede yaygın olarak bulunan protozoonlar arasındadır. Dünyada çok geniş bir dağılım gösterirler. Toprakta, çamurdan, havadan, kaplıcalardan, deniz suyundan, yüzme havuzlarından, lağımlardan, hava

temizleme ünitelerinden, çeşme ve şişe sularından, diş tedavi ünitelerinden, kontakt lenslerden, lens saklama kaplarından, lens temizleme solüsyonlarından, bakteri ve mantar kültürlerinden, memeli hücre kültürlerinden izole edilmişlerdir (Dağcı ve ark., 2001; Gray ve ark., 1995; John ve Howard, 1995; John ve Howard, 1996; Larkin ve ark., 1990). Bunun yanı sıra, bu tür amipler bitkilerden, balık, amfibi, sürüngen ve memeliler grubundaki hayvanlardan, sağlıklı görünen insanların nazal mukoza ve torakslarından, infekte beyin ve akciğer dokusundan, immunbaskın kişilerin deri lezyonlarından ve keratitli hastaların korneal dokusundan izole edilmiştir (De Jonckheere ve Michel, 1988; Dykova ve ark., 1999; Kong ve ark., 2000).

1.2.1.2. Yaşam Döngüsü ve Biyolojisi

Acanthamoeba cinsi amiplerin yaşam döngüsünde iki dönem ayırt edilir: Birincisi, aktif olarak beslenen, büyüyen, çoğalan ve hareket eden trofozoit formu, ikincisi ise, dış çevre koşullarına daha dayanıklı olan kist formudur. *Acanthamoeba* türleri, insan vücudunda başta merkezi sinir sistemi (MSS) ve göz olmak üzere deri, akciğer, mukoza ve toraksta yerleşebilirler. Bu cins amipler, dokuda hem trofozoit, hem de kist halinde bulunurlar. Buna karşın *Naegleria* cinsi amipler dokuda sadece trofozoit formunda bulunurlar (John, 1998; Saygı ve Polat 2003). Şekil 3'de *Acanthamoeba* türlerinin yaşam döngüsü ve insanda oluşturduğu infeksiyon görülmektedir (John, 1993).

Trofozoit Formu: *Acanthamoeba* trofozoitlerinin büyüklükleri 25-56 µm arasında değişiklik gösterir ve genellikle yavaş olan hareketlerini, parmak şeklinde olan lopopod ve akantopod (*acanthopodium*) denilen dikensi yalancı ayaklar ile sağlarlar. Besinleri, genellikle çevrede bulunan bakteri, alg ve mantarlardır, bu partikül halindeki besinleri fagositoz ile alırlar. Bunun yanında sıvı ortamda erimiş halde bulunan besinleri de pinositoz ile alarak beslenebilirler (John, 1998).

Acanthamoeba türlerinin hücresel organizasyonları elektron mikroskobu çalışmaları ile ortaya konmuştur. Organeller, tipik bir büyük ökaryotik hücredeki gibidir. *Acanthamoeba* trofozoitlerinde düzgün ve kıvrımlı endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, serbest ribozomlar, besin vakuelleri, mitokondria, ve

mikrotubuller bulunur. Trofozoitteki sitoplazmik içerik, üç tabakalı bir plazma membranı ile çevrilidir. Sitoplazmada, hücrenin su içeriğini kontrol altında tutan kontraktıl vakuoller bulunur. Tek olan çekirdekte, büyük ve merkezi bir çekirdekcik mevcuttur. Genellikle, tek çekirdekli olmasına rağmen, sıvı haldeki kültürlerde bulunan trofozoitler çok çekirdekli olabilir. Üreme, eşeysiz olarak, ikiye bölünmeyle olur (Saygı, 2002).

Kist Formu: Tek çekirdekli ve yuvarlak olan kistlerin, çeperleri endokist ve ektokist denilen çift tabakadan meydana gelir. Genellikle dış tabaka hafifçe kıvrık, iç tabaka polihedral bir görünümündedir. Büyüklüğü 13-20 µm arasında değişiklik gösterir. Kistler dezenfektanlara, kloro, antibiyotiklere karşı dirençlidir. Düşük sıcaklıklarda (0-2°C) canlı kalırlar. Çevre koşulları uygun olduğunda, kistlerden trofozoitler çıkar. *Acanthamoeba* türlerinin kist morfolojisi, agar plakları üzerinden bile kolayca ayırt edilir (John, 1998).

1.3. *Salvia* Türleri ve Biyolojik Aktiviteleri

Salvia cinsi dünyada yaklaşık 900 tür ile temsil edilmektedir (Könemann, 1999). Ülkemizde 89 *Salvia* türü ve toplamda 94 taksonu bulunmaktadır. Bu bitkilerin 45'i bu flora için endemiktir ve endemizm oranı yaklaşık % 45'dir. Genellikle adaçayı olarak bilinirler. Yüksek ya da kısa boylu, çok veya az dallanan, yaprak veya çiçekleri farklı olan bitkilerdir. Genellikle 50–100 cm arasında boylanır. Tek veya çok yıllıktır (Davis, 1968–1984). En iyi bilinen tür, *Salvia officinallis* tıbbi adaçayı olarak satılmaktadır. Kökeni ve yayılış alanı Akdeniz çevresidir. Uçucu yağı % 15 sineol içermektedir. *Salvia* cinsine ait bazı bitkilerin de antimikrobiyal ve özellikle antioksidan özellikleri aydınlatılmış, ancak tıbbi veya ticari kullanımları sınırlı kalmıştır (Weng ve Wang, 2000; Yıldırım ve ark. 2000).

Bu genusa *Salvia* isminin verilmesinin amacı ise “*Salvia*” kelimesinin kökeninin “*salveo*” yani kurtarma, tedavi etme anlamı taşıdığındandır. *Salvia* türleri zihinsel tedavi, sinir bozuklukları, cinsel zayıflık, romatizma, ateşli hastalıklar, terleme gibi hastalıklarda tedavi edici ajanlar olarak kullanılmıştır (Watt ve Breyer-Brandwijk, 1962; Baricevic ve ark., 1996).

Pek çok *Salvia* türü ve bunlardan elde edilen fitokimyasallar, çok sayıda test sisteminde önemli antioksidan aktiviteler sergilemiştir (Dorman ve Deans, 1995; Hohmann ve ark., 1999; Lu ve Foo, 2001). Buna ilave olarak, bu cinse ait türler halk arasında tedavi edici özelliğinden dolayı yaygın kullanıma sahiptir ve yapılan araştırmalar bu bitkilerin biyolojik aktivitelerinden sorumlu pek çok aktif bileşeni tanımlamayı başarmıştır (Bayrak ve Akgul, 1987). Diğer yandan, bazı *Salvia* türleri ise besin katkı maddesi ve çay olarak da tüketilmektedir. (Chalchat ve ark., 1998).

Literatürde *Salvia* türlerine ait çok sayıda biyolojik aktivite rapor edilmiştir. *Salvia officinallis*; antiseptik, antringent, spazm giderici gibi pek çok tıbbi kullanım alanını içeren uzun bir listeye sahiptir. Ayrıca bazı *Salvia* türlerinin de antikanser, anti-inflammatuar ve antibakteriyel özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (Ulubelen ve ark., 2001). *Salvia miltiorrhiza* (Danshen) kardiovasküler hastalıkların tedavisi için kullanılan iyi bilinen geleneksel bir Çin tıp bitkisidir (Chen ve ark., 2001; Zhao ve ark., 2005). Bazı *Salvia* türlerinin (*S. officinallis*, *S. lavandulaefolia*, *S. miltiorrhiza*) depresyon, uykusuzluk ve hafıza düzensizlikleri üzerine yararlı etkileri göze çarpmaktadır (Howes ve ark., 2003; Perry ve ark., 2000a,b). Bazı çalışmalar Alzheimer hastalığının tedavisi ile ilgili olarak *S. lavandulaefolia* kullanımını bilimsel olarak kanıtlamaktadır. Bu tedavilerin merkezinde sözkonusu bitkilerin uçucu yağlarının aktiviteleri dikkate değerdir (Perry ve ark., 2000a,b; Savalev ve ark., 2003). Antibiyotiklerin keşfinden önce, *Salvia* türleri veremli hastalara bitkisel çaylar olarak verilmekte ve kronik bronşit tedavisi için bitkisel karışımlarda *Salvia* türleri önemli bir rol oynamakta idi.

Yapılan literatür çalışmaları doğrultusunda *Salvia* cinsine ait birçok bitki türünün antioksidan aktivitesi tespit edilmiştir. *S. hispanica* (Reyes-Caudillo ve ark., 2008), *S. miltiorrhiza* (Lin-Lin Tian ve ark., 2008) *S. virgata*, *S. staminea*, *S. verbenaca* (Tepe, 2008), *S. verticillata* subsp. *verticillata* ve *S. verticillata* subsp. *amasiaca* (Tepe ve ark., 2007), *S. caespitosa* (endemik), *S. hypargeia* (endemik), *S. euphratica* subsp. *euphratica* (endemik), *S. sclarea*, *S. candidissima*, *S. aethiopsis* (Tepe ve ark., 2006) antioksidan aktivitesi çalışılmış türlerdir.

S. tomentosa, gövdesi 1 m'ye kadar uzayabilen, çok yıllık ve yarı çalimsı bir bitkidir. Genellikle *Pinus brutia*, *P. nigra* ve *Quercus pubescens* ormanlarının altlarında yayılış gösterir. 90–2000 m arasında yetişmekle beraber, 4.-8. bazen 9. aylarda çiçeklenme gösterir. Akdeniz bitkisi olup ülkemizde; İstanbul, Bursa, Zonguldak, Sinop, Ordu, Gümüşhane, Trabzon, İzmir, Kütahya, Eskişehir, Maraş, Antalya, Isparta, Konya, Adana ve Hatay'da yetişir (Davis, 1968–1984). Literatür taramaları sonucunda *S. tomentosa*'dan elde edilen uçucu yağın kimyasal kompozisyonu ve antimikrobiyal aktivitesine ilişkin yalnızca bir rapora rastlanmıştır (Haznedaroğlu ve ark., 2001). Bunun yanı sıra Nagy ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada *S. tomentosa*'dan elde edilen diterpenoidler rapor edilmiştir.

Salvia virgata, doğal olarak doğu Akdeniz ülkelerinde Kıbrıs, Balkanlar ve Orta Asya da yetişmektedir. Yapraklar ovat ve lanseolat olmakla beraber kenarları tırtıklıdır. Çiçekler hazirandan ayından ekim ayına kadar koyu menekşe rengindedir. Aynı yıl çiçeklenme olduğundan yayılma tohumla sağlanır. *S. nemorosa*'ya benzer fakat kısadır. Güneşli bölgeleri sever (Davis, 1968–1984).

Yapılan literatür araştırmaları sonucunda bu türden elde edilen özüt ve uçucu yağların antioksidan (Nickavar ve ark., 2007; Koşar ve ark., 2006; 2007; 2008), antimikrobiyal (Altun ve ark., 2007; Akkol ve ark., 2008) anti-inflamatuar (Küpeli ve ark., 2007) aktivitelerinin araştırıldığı tespit edilmiştir.

Salvia hypargeia, endemik bir türdür. Bazal yapraklar kümelenmiş durumdadır ve kışın kar altında bu yapraklar ölmektedir. Bu yapraklar genç iken aşağıya doğru kıvrıktır. Gövde ve çiçekler haziran ayından eylül ayına kadar üretilir. Çiçekler lavanta mavisi, mor ve beyazdır. Yayılma tohum ile sağlanmaktadır. Kış aylarında -10 dereceye kadar dayanabilmektedir.

Literatürde bu tür ile ilgili yapılmış nispeten az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu bağlamda, *S. hypargeia*'nın antioksidan (Tepe ve ark., 2006) ve sitotoksik (Topçu ve ark., 2008; Ulubelen ve ark., 1999) aktivitelerinin çalışıldığına dair raporlar mevcuttur. Diğer yandan bu türün uçucu yağ içeriğinin (Demirci ve ark., 2003) ve yağ asidi kompozisyonunun (Azcan ve ark., 2004; Bağcı ve ark., 2004) belirlenmesine yönelik bazı çalışmalara ulaşılmıştır.

Yapılan kapsamlı literatür araştırması sonucunda *Salvia staminea* ile ilgili yalnızca üç rapora rastlanmıştır. Bunlardan bir tanesinde sözü edilen türün metanol özütünün antioksidan aktivitesi belirlenmiştir (Tepe, 2008). Bir diğer çalışmada ise *S. staminea*'nın yağ asidi kompozisyonu araştırılmıştır (Bağcı ve ark., 2004). Diğer çalışmada ise bu türün di- ve triterpenlerinin sitotoksik aktiviteleri belirlenmiştir (Topçu ve ark., 2003).

S. caespitosa ise literatür kayıtlarına göre en az çalışılmış olan türlerden birisidir. Bu türün yalnızca antioksidan aktivitesinin (Tepe ve ark., 2006) ve antibakteriyal diterpenlerinin (Ulubelen ve ark., 2001) aydınlatıldığını görülmektedir.

Yukarıda verilen kapsamlı literatür araştırması sonuçlarından da görülebileceği gibi, çalışma konusu olarak belirlenen bitkilerden hiçbirisinin teze konu olan aktivitesi (anti-parazitik aktivite) daha önceden çalışılmamıştır.

1.4. Tezin Amacı

Dünyada pek çok ülke (A.B.D., Çin v.b.), sentetik bileşiklerin kullanımı sonucunda yaşanan sıkıntıların ve önemli yan etkilerin aşılması için bitkisel potansiyelin açığa çıkarılmasına büyük önem vermektedir. Uzun yıllardır halk arasında tedavi amacıyla kullanılan bitkiler, yakın zamana kadar ülkelerin değerlendirilmeyen alternatif kaynakları olmuştur. Ülkemizde de bitkisel bileşenlerin biyolojik aktivite potansiyellerinin ortaya çıkarılması fikri neredeyse 1990'lı yılların başına rastlamaktadır. Ülkemizin bitkisel zenginlik açısından sahip olduğu eşsiz konum göz önüne alındığında, bu tarihten sonra yapılan tüm bilimsel araştırmalar, alanında yapılmış özgün çalışmalar olarak değerlendirilmiştir. Ancak 1000'in üzerinde endemik bitki türüne ev sahipliği yapmakta olan Türkiye'nin, aydınlatılmayı bekleyen pek çok bitkisel türü bulunmaktadır. Bu noktadan hareketle, bu çalışmadan elde edilecek verilerin, ülkemizin bitkisel kaynak kullanımına önemli ölçüde katkıda bulunması beklenmektedir.

Diğer yandan, yıllar boyunca gerek antimikrobiyal ve gerekse amoebisidal etkileri klinik olarak kanıtlanmış çeşitli ilaçların (metronidazol, streptomycin, sefalosporin grubu antibiyotikler v.b.) uzun süreli kullanımları neticesinde görülen

yan etkileri, bilimsel platformun da ötesinde önemli bir toplumsal sorun haline gelmiştir. Bu çalışmada özellikle bitkisel kaynak kullanımına ilave olarak, değerlendirilen bitki türlerinin sitotoksik aktivitelerinin de aydınlatılması ile birlikte, enfeksiyonların tedavisinde kullanılacak fitokimyasalların maksimum dozları da belirlenebilecektir. Bu ve benzeri çalışmalardan elde edilecek olan bulgular, farmasötik endüstrileri için hayati önem taşımaktadır.

Burada değerlendirilecek olan bitkisel özütlerin daha ayrıntılı ve moleküler düzeyde araştırılması, aktiviteden sorumlu kimyasalların tespiti, bu kimyasalların moleküler modifikasyon mekanizmaları yolu ile aktivitelerinin artırılarak muhtemel yan etkilerinin en aza indirilmesi konuları, ileride yapılacak çalışmalara temel oluşturacak niteliktedir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Bitkilerin toplanması ve adlandırılması

Tez kapsamındaki bitkilerin buldukları lokaliteler saptandıktan sonra ilgili lokalitelerden bitkisel materyaller toplandı. Bitkilerin adlandırılması işlemleri Yrd. Doç. Dr. H. Aşkın AKPULAT tarafından gerçekleştirildi. Teşhis edilen türlerin örnekleri Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda mevcuttur. Çalışmada yararlanılan bitkilerin adları ve toplandıkları lokaliteler aşağıda verilmiştir.

Salvia tomentosa

Osmaniye-Düziçi, Söğütlügöl yaylası mevki, orman içi, 1000m, 30.07.2006, (AA 5850)

Salvia caespitosa

Topçuyeniköy, Hafik, Sivas; 05.07.2004 (AA3393)

Salvia hypargeia

Gürün-Kangal yol ayırımı, Sivas; 05.07.2004 (AA3410)

Salvia virgata

Kardaşlar tepesi, Sivas; 15.07.2006, (AA 5858)

Salvia staminea

Kardaşlar tepesi, Sivas; 15.07.2006, (AA 5859)

2.2. Polar metanol özütlerinin hazırlanması

Serin ve doğrudan güneş ışığı almayan bir ortamda kurutulan bitkilerin her birinden 100'er g'lık örnekler alınarak blender yardımıyla öğütüldü. Ardından örnekler Soxhlet aparatında 60 °C'de 6 saat süresince metanol ile özütlendi. Elde edilen özüt, vakum altında evapore edilerek metanol uzaklaştırıldı ve kalan özüt kloroform ve su ile fraksiyonlandı. Su (polar) özütü -70 °C'de dondurularak liyofilize edildi. Ardından testlerin yapılmasına kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı (Sokmen ve ark., 1999).

2.3. Trofozoitler

Acanthamoeba castellanii 1BU suşlarının vejetatif formları 10 ml PPYG ortamı içeren (proteaz peptone, maya özütü ve glukoz) 25 cm² çapındaki erlenlerdeki aksenik kültürlerden elde edildi ve 37°C'de tutuldu (Walochnik ve ark., 2000; Schuster, 2002). Üssel artış safhasındaki trofozoitler (72-96. saatler arası), 500 g'de 10 dakika boyunca santrifüjlenerek derişimleri artırıldı. Steril Neff solüsyonu içerisinde 2 defa yıkanan amip, hemasitometre yardımı ile sayılarak Neff solüsyonu (1.2g NaCl, 0.4g MgSO₄·H₂O, 0.4g CaCl₂·2H₂O, 1.42g Na₂HPO₄, 1.36g KHPO₄ 100 ml distile su içerisinde) içerisinde final konsantrasyonu 8x10⁵ amip/ml (95.0% trofozoit) olacak şekilde ayarlandı ve bu işlemin ardından hemen testlere başlandı.

2.4. Kistler

Kültürler 6 hafta süre ile erlenler içerisinde inkübe edilerek kistler hazırlandı. Hasat işlemi yine yukarıda belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Karşılaştırmalı deneylerde, en azından % 85 oranında kist içeren kültürler kullanıldı. Ardından kistler hasat edildi ve steril Neff solüsyonu içerisinde yıkanarak final konsantrasyonu 8x10⁵ kist/ml olacak şekilde ayarlandı.

2.5. Deneysel Dizayn

Deneysel, 96 kuyucuklu steril plaklar içerisinde gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğa, 100 µl kalibre edilmiş trofozoit ve kist solüsyonu eklendi ve amip hücrelerinin kuyucuk yüzeyine yapışmalarının engellenmesi için 30 dakika dinlenmeye bırakıldı. Daha sonra tuz solüsyonu uzaklaştırıldı ve her bir kolonun 4'er kuyucuğuna 100 µl test çözeltisi eklenerek ağızları kapatıldı ve 37°C'de, 1., 3., 6., 12., 24., 48. ve 72. saatler süresince % 5.0 oranında atmosferik CO₂ içeren ortamda inkübe edildi. Aynı süreç, Neff solüsyonu içerisinde sadece parazitlerin bulunduğu control grubu için de uygulandı. Tüm testler dört tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

2.6. *Salvia* türlerinin trofozoit safhasına etkilerinin tespit edilmesi

37°C’de inkübasyon sürecinin ardından, doku kültürü kaplarının tabanına tutunmuş olan trofozoitler dikkatli bir şekilde steril bir spatula yardımıyla kaldırıldı. Daha sonra örnekler pipetaj yapılarak 1 dakika süre ile karıştırıldı ve her bir test ve kontrol kuyucuğu % 0.3 oranında 0.1 ml metilen mavisi bulunan ortamda sayıldı. Suşların ilavesinden 10 dakika sonra canlı (*viable*) ve ölü (*non-viable*) trofozoitler hemositometre yardımıyla tespit edildi. Örneklerin her biri için 100’den fazla *A. castellanii* trofozoiti değerlendirildi.

2.7. *Salvia* türlerinin kist safhasına etkilerinin tespit edilmesi

Her bir inkübasyon periyodunun ardından, her bir test ve kontrol kuyucuğunun sayılabilmesi için 0.1 ml test çözeltisi, % 0.3 oranında 0.1 ml metilen mavisi bulunan ortama aktarıldı. Suş ilavesinden 2 dakika sonra canlı (*viable*) ve ölü (*non-viable*) kistler hemositometre yardımıyla tespit edildi. Örneklerin her biri için 100’den fazla *A. castellanii* kisti değerlendirildi. Canlı kist içermeyen kültür ortamlarından elde edilen sonuçların doğrulanması amacıyla bu aşamada ilave bir test daha uygulandı. Canlılığının tespit edilebilmesi için kistler, her bir inkübasyon periyodundan sonra üzerine *Escherichia coli* ekimi gerçekleştirilmiş olan agar plaklarına (*non-nutrient* besi ortamı) inoküle edildi. Kültür plakları, 14 gün boyunca 30°C’de inkübe edildi. Amip gelişimi, faz-kontrast mikroskobu ile günlük gözlemlendi (Schuster, 2002).

2.8. Primer epitel hücre kültürü

Bu aşamada Yeni Zelanda beyaz tavşanlarının sağlıklı gözlerine limbal biyopsi uygulandı. Kornea epitel dokusu, providon iyodin ile steril edildi ve epitel hücreleri içeren 1-2 mm kalınlığında bir limbal doku ve kornea stromasının bir kısmı lamellar keratostomi yoluyla kesilerek limbal kökten ayrıldı. Doku örnekleri 10-15 dakika süresince havada kurutuldu ve eşit miktarlarda Hams F-12 ve N-2- hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic asit (HEPES) ile tamponlanmış ve % 5 oranında Nu-Serum (Collaborative Research Inc., Bedford Park, Mass.), ml’de 50 ug Gentacin (GIBCO), ml’de 5.0 ug insülin (Collaborative

Research) ve ml'de 10 ng epidermal büyüme faktörü (Collaborative Research) ile zenginleştirilmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO Laboratories, Grand Island, N.Y.) içeren primer kültür ortamı ile kaplandı. Plaklar, 37 °C'de, % 5 oranında CO₂ bulunan ortamda inkübe edildi. Ortam, haftada 3 kez düzenli olarak alt kültür yapıldı.

2.9. Agar difüzyon metodu

Bu metod uluslar arası standartlara göre gerçekleştirildi (International Standard ISO 7405, 1977). Kısaca kültürler, % 0.25 tripsin çözeltisi kullanılarak hasat edildi. Stok kültürler, 1×10^6 hücre/petri plağı yoğunluğunda olacak şekilde 35 mm çapındaki petri plaklarına ekildi ve haftada bir alt kültür yapıldı. Hücresel tabaka oluşumunun ardından besi ortamı, % 1.5 oranında agaroz içeren ortam ile değiştirildi. Agar sıvılaştırıldıktan sonra hücreler vital nötral kırmızı ile boyandı. Deneysel süreç boyunca hücreler, foto-aktivasyonun neden olabileceği hücresel zararın önlenmesi amacıyla ışıktan korundu. Deneysel çözeltiler, 6 mm çapında steril Whatman filtre kağıtları kullanılarak uygulandı. Her bir *Salvia* türü için dört tekrarlı plaklar ve pozitif ve negatif kontrol materyallerini içeren 4'er ilave Petri plağı hazırlandı. Negatif kontrol olarak DMEM kullanılırken, saf fenol pozitif kontrol olarak kullanıldı. 37 °C'de 24 saatlik bekleme periyodunun sonrasında hücre yanıtları, inverted mikroskop gözlemlerine dayalı olarak tespit edildi. Bu çalışmada hücre lizisi şu şekilde değerlendirildi:

0 = hücre lizisi yok

1 = % 20'den az hücre lizisi

2 = % 40 hücre lizisi

3 = % 40'dan fazla hücre lizisi

4 = % 60-80 arası hücre lizisi

5 = % 80'den fazla hücre lizisi

Ardından sitotoksisite aşağıdaki gibi sınıflandırıldı;

0-0.5 = sitotoksik değil

0.6-1.9 = ılımlı sitotoksik

2.0-3.9 = orta derecede sitotoksik

4.0-5.0 = önemli derecede sitotoksik

2.10. İstatistiksel analizler

Veriler, aritmetik ortalama ve standart sapma şeklinde verildi. Bunun için ANOVA ve Tukey testleri uygulandı. $p < 0.05$ durumunda veriler anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Materyal ve Metod kısmında ayrıntılı olarak verilen özütleme yöntemleri ile *S. tomentosa*, *S. virgata*, *S. hypargeia*, *S. staminea*, ve *S. caespitosa*'dan polar metanol özütleri elde edilmiş ve bu özütlerin amoebisidal ve sitotoksik aktiviteleri belirlenmiştir. Yapılan testler sonucunda *S. tomentosa*, *S. virgata* ve *S. hypargeia* özütlerinde herhangi bir aktivite bulgusuna rastlanmamıştır. *S. staminea* ve *S. caespitosa* özütlerinin sözü edilen biyolojik aktiviteleri, aşağıda alt başlıklar halinde verilmiştir.

3.1. *S. staminea* Özütünün Biyolojik Aktiviteleri

3.1.1. Amoebisidal Aktivite

3.1.1.1. Trofozoitler üzerine etki

S. staminea'dan elde edilen polar-metanol özütünün, *A. castellani* trofozoitleri üzerine etkisine ilişkin veriler Tablo 3.1'de verilmiştir.

1.0, 2.0 ve 4.0 mg/ml derişimlerde uygulanan *S. staminea* özütleri, ilk 24 saat içerisinde ortamda bulunan *A. castellani* trofozoitlerinin *tamamını* bertaraf edememiştir. Ancak bu derişim değerlerinde 24. saatten sonra ortamda trofozoit gözlemlenmemiştir.

8.0 mg/ml özüt derişiminin denendiği durumda ise 0 - 12. saatler arasında trofoziot gözlenirken, bu noktadan sonra trofozoitlerin tamamı ölmüştür. 16.0 mg/ml'lik derişim, 6. saatten sonra ortamdaki tüm trofozoitlerin ölmesi yönünde etki gösterirken, denen en yüksek derişim olan 32.0 mg/ml'de ise trofozoitler yalnızca 0-3. saatler arasında canlılıklarını sürdürebilmişlerdir.

Tabloda sunulan verilerin, istatistiksel açıdan daha tutarlı yorumlanabilmesi için Bölüm 2'de belirtilen testlere uygulanmıştır. Tablo içindeki her sütun istatistiksel açıdan kendi içinde değerlendirilmiştir.

İlk saat dikkate alındığında, 16.0 ve 32.0 mg/ml'lik derişim değerlerinin uygulandığı testlerden elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan birbirlerinden farklı değildir ($P>0.05$). Ancak bu periyot içerisinde, kontrol uygulaması da dahil olmak üzere, 1.0 - 8.0 mg/ml arasında denenen tüm derişimlerden elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan birbirlerinden farklıdır ($P<0.05$).

Deneme sürecinin 3. saati dikkate alındığında ise, 8.0 - 32.0 mg/ml'lik derişimlerin varlığında saptanan trofozoit sayıları arasında istatistiksel açıdan fark bulunmamaktadır ($P>0.05$). Ancak 1.0 – 4.0 mg/ml'lik özüt değerlerinin varlığında tespit edilen trofozoit sayıları, istatistiksel açıdan farklılık göstermektedir ($P<0.05$).

6. saat süresince 16.0 ve 8.0 mg/ml'lik derişimlerin varlığında tespit edilen trofozoit sayıları arasında istatistiksel açıdan fark bulunmamıştır ($P>0.05$). Ancak kontrol parametresi de dahil olmak üzere, 1.0 – 4.0 mg/ml'lik özüt değerlerinin varlığında tespit edilen trofozoit sayıları, istatistiksel açıdan farklılık göstermektedir ($P<0.05$).

Deneyin 12. saatinde, 32.0 ve 16.0 mg/ml'lik derişimlerin varlığında trofozoit saptanmamıştır. 4.0 ve 8.0 mg/ml'lik derişimlerin varlığında gözlemlenen trofozoit sayıları istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır ($P>0.05$). Ancak 1.0 ve 2.0 mg/ml'lik derişimlerin varlığında saptanan trofozoit sayıları istatistiksel olarak farklıdır ($P<0.05$).

Deneyin 24. saatinde ise 8.0 – 32.0 mg/ml'lik derişimlerin varlığında trofozoit tespit edilmemiştir. 2.0 ve 4.0 mg/ml'lik özüt derişimlerinin varlığında tespit edilen trofozoit sayıları istatistiksel açıdan birbirinden farklı değildir ($P>0.05$). Ancak 1.0 mg/ml'lik özüt derişim varlığında tespit edilen trofozoit sayısı, 2.0 ve 4.0 mg/ml'lik derişim değerlerinden elde edilen sayılarından farklıdır ($P<0.05$).

Deneyin 48 ve 72. saatlerinde, hiçbir özüt derişiminde canlı trofozoit tespit edilememiştir.

Tablo 3.1. *S. staminea* özütünün, *A. castellani* trofozoitleri üzerine etkisi¹

<i>S. staminea</i> özütü (mg/ml)	Ölçüm zamanı (saat)						
	1	3	6	12	24	48	72
32	21.00 ± 1.30 ^a	16.20 ± 1.65 ^a	0	0	0	0	0
16	24.20 ± 1.49 ^a	18.60 ± 0.87 ^a	15.00 ± 1.58 ^a	0	0	0	0
8	33.65 ± 1.73 ^b	21.14 ± 1.77 ^a	17.60 ± 0.87 ^a	14.60 ± 1.60 ^a	0	0	0
4	41.49 ± 1.19 ^c	32.19 ± 1.66 ^b	23.40 ± 1.43 ^b	17.20 ± 0.86 ^a	14.40 ± 1.28 ^a	0	0
2	54.56 ± 1.94 ^d	45.33 ± 1.56 ^c	34.00 ± 1.41 ^c	23.00 ± 1.64 ^b	17.00 ± 1.89 ^a	0	0
1	68.40 ± 1.24 ^e	54.20 ± 1.49 ^d	43.20 ± 1.49 ^d	33.20 ± 1.39 ^c	22.80 ± 1.71 ^b	0	0
Kontrol	80.00 ± 7.90 ^f	80.00 ± 7.90 ^e	80.00 ± 11.70 ^e	78.00 ± 11.40 ^d	76.00 ± 4.60 ^c	76.00 ± 5.80	74.00 ± 5.80

¹ Veriler üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunlarda aynı harflerle belirtilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir.

3.1.1.2. Kistler üzerine etki

S. staminea'dan elde edilen polar-metanol özütünün, *A. castellani* kistleri üzerine etkisine ilişkin veriler Tablo 3.2'de verilmiştir. Beklendiği üzere bitkisel özüt, kistler üzerinde trofozoitlere oranla daha zayıf aktivite göstermiştir.

Tablo 3.2'den de görülebileceği üzere, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/ml derişimlerde uygulanan *S. staminea* özütleri, deneysel sürecin tamamı göz önüne alındığında ortamdaki kistlerin tümü yok edilememiştir. Ancak deneysel sürecin ilk saati içerisinde ortamdaki canlı kist sayısı 58.20 – 78.20 arasında değişim gösterirken, 72. saat sonunda bu sayı 10.80 – 29.40 civarına düşmüştür.

8.0 mg/ml özüt derişiminin denendiği durumda ise 0 - 48. saatler arasında ortamdaki kistlerin tamamı bertaraf edilememiştir. Ancak ilk saat içerisinde 72.00 \pm 0.70 olan kist sayısı 48. saatte 10.20 \pm 1.15'e gerilemiştir. Bu derişim değerinde 48. saatten sonra canlı kist gözlenmemiştir.

16.0 mg/ml'lik derişim, 24. saatten sonra ortamdaki ortamdaki tüm kistlerin etkisiz hale getirilmesi yönünde etki göstermiştir. İnkübasyonun başladığı ilk saat içerisinde 69.00 \pm 0.70 olan canlı kist sayısı, 24. saate ulaşıldığında 10.00 \pm 1.14 olarak belirlenmiştir.

En yüksek derişim olan 32.0 mg/ml'de ise kistler yalnızca 0-12. saatler arasında canlılıklarını sürdürebilmişlerdir. Ancak bu periyot içerisinde de inkübasyon süresi artışına paralel olarak sayısal bir azalma eğilimi içerisinde olmuşlardır. İlk saat içerisinde tespit edilen canlı kist sayısı 58.20 \pm 2.39 iken bu sayı 12. saatte 9.20 \pm 1.15'e düşmüştür. Bu derişim değerinde, 12. saatten sonra ortamda canlı kist gözlemlenmemiştir.

Tablo 3.2 içindeki her sütun istatistiksel açıdan kendi içinde değerlendirilmiştir.

İlk saat dikkate alındığında, 8.0 ve 16.0 mg/ml'lik derişim değerlerinden elde edilen veriler istatistiksel açıdan birbirlerinden farklı değillerdir ($P>0.05$). Benzer durum 1.0-4.0 mg/ml özüt derişimlerinin uygulandığı durumlar için de geçerlidir ($P>0.05$). Ancak 32.0 mg/ml derişimin uygulandığı denemeden elde edilen veriler, istatistiksel olarak diğerlerinden farklıdır ($P<0.05$).

Deneysel sürecin 3. saati dikkate alındığında, 1.0-4.0 mg/ml derişimlerin varlığında tespit edilen sonuçların istatistiksel olarak birbirlerinden farklılık göstermediğı görölmektedir ($P>0.05$). Ancak kontrol uygulaması da dahil olmak üzere, 8.0-32.0 mg/ml derişimlerdeki özütlerin varlığında elde edilen sayısal değerler istatistiksel açıdan birbirlerinden farklıdır ($P<0.05$).

6. saat süresince yalnızca 1.0 ve 2.0 mg/ml derişimlerin varlığında belirlenen sonuçlar istatistiksel açıdan benzer bulunmuştur ($P>0.05$). Bu aşamada, kontrol uygulaması da dahil olmak üzere elde edilen tüm sonuçlar istatistiksel olarak birbirlerinden farklıdır ($P<0.05$).

Deneysel sürecin 12.-72. saatleri içerisinde elde edilen veriler göz önünde bulundurulacak olursa, her sütun içerisinde tespit edilen tüm değerler birbirlerinden istatistiksel olarak farklılık göstermektedir ($P<0.05$).

Tablo 3.2. *S. staminea* özütünün, *A. castellani* kistleri üzerine etkisi¹

<i>S. staminea</i> özütü (mg/ml)	Ölçüm zamanı (saat)							
	1	3	6	12	24	48	72	
32	58.20 ± 2.39 ^a	36.40 ± 4.36 ^a	18.40 ± 4.36 ^a	9.20 ± 1.15 ^a	0	0	0	
16	69.00 ± 0.70 ^b	55.00 ± 1.78 ^b	33.20 ± 3.18 ^b	17.00 ± 1.87 ^b	10.00 ± 1.14 ^a	0	0	
8	72.00 ± 0.70 ^b	62.80 ± 0.86 ^c	48.20 ± 2.41 ^c	29.40 ± 3.26 ^c	17.40 ± 1.93 ^b	10.20 ± 1.15 ^a	0	
4	75.20 ± 0.96 ^c	73.60 ± 1.02 ^d	64.00 ± 1.30 ^d	39.60 ± 3.15 ^d	29.60 ± 3.35 ^c	17.60 ± 1.96 ^b	10.80 ± 1.01 ^a	
2	75.60 ± 2.53 ^c	74.80 ± 0.86 ^d	73.40 ± 1.07 ^e	48.40 ± 2.83 ^e	40.20 ± 3.02 ^d	29.20 ± 3.39 ^c	18.40 ± 2.11 ^b	
1	78.20 ± 1.80 ^c	76.60 ± 0.74 ^d	75.60 ± 0.92 ^e	58.40 ± 2.83 ^f	48.80 ± 2.59 ^e	39.60 ± 3.15 ^d	29.40 ± 3.04 ^c	
Kontrol	80.00 ± 7.90 ^d	80.00 ± 7.90 ^e	80.00 ± 11.70 ^f	78.00 ± 11.40 ^g	76.00 ± 4.60 ^f	76.00 ± 3.30 ^e	74.00 ± 3.10 ^d	

¹ Veriler üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunlarda aynı harflerle belirtilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir.

3.1.2. Sitotoksik aktivite

S. staminea'dan elde edilen polar metanol özütünün, epitel hücre kültürü üzerinde sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bu özüt, 32.00 mg/ml derişimde *ılımlı sitotoksik* aktiviteye sahip bulunmuştur. 16.00 mg/ml derişimde ise kültürdeki hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki meydana getirmemiştir.

3.2. *S. caespitosa* Özütünün Biyolojik Aktiviteleri

3.2.1. Amoebisidal Aktivite

3.2.1.1. Trofozoitler üzerine etki

S. caespitosa'dan elde edilen polar-metanol özütünün, *A. castellani* trofozoitleri üzerine etkisine ilişkin veriler Tablo 3.3'de verilmiştir. Bu bitkinin özütleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, *S. staminea*'ya göre daha zayıf aktivite sergilendiğini ortaya koymaktadır.

Tablo 3.2'den de görülebileceği üzere, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg/ml derişimlerde uygulanan *S. caespitosa* özütleri, deneysel sürecin tamamı göz önüne alındığında ortamdaki trofozoitlerin tümü yok edilememiştir. Ancak deneysel sürecin ilk saati içerisinde ortamdaki canlı trofozoit sayısı 75.80 – 77.20 arasında değişim gösterirken, 72. saat sonunda bu sayı 17.40 – 28.40 civarına düşmüştür.

8.0 mg/ml özüt derişiminin denendiği durumda ise 0 - 48. saatler arasında ortamdaki trofozoitlerin tamamı yok edilememiştir. Ancak ilk saat içerisinde 74.20 ± 1.68 olan trofozoit sayısı 48. saatte 18.20 ± 1.06'ya gerilemiştir. Bu derişim değerinde 48. saatten sonra canlı trofozoit gözlenmemiştir.

16.0 mg/ml'lik derişim, 12. saatten sonra ortamdaki ortamdaki tüm trofozoitlerin etkisiz hale getirilmesi yönünde etki göstermiştir. İnkübasyonun başladığı ilk saat içerisinde 71.80 ± 1.77 olan canlı trofozoit sayısı, 24. saate ulaşıldığında 23.60 ± 2.83 olarak belirlenmiştir.

En yüksek derişim olan 32.0 mg/ml'de ise trofozoitler yalnızca 0-6. saatler arasında canlılıklarını sürdürebilmişlerdir. Ancak bu periyot içerisinde de inkübasyon süresi artışına paralel olarak sayısal bir azalma eğilimi içerisinde olmuşlardır. İlk saat içerisinde tespit edilen canlı trofozoit sayısı 69.20 ± 2.35 iken

bu sayı 6. saatte 23.00 ± 3.00 'a düşmüştür. Bu derişim değeriinde, 6. saatten sonra ortamda canlı trofozoit gözlemlenmemiştir.

Tablo 3.3'deki her sütun istatistiksel açıdan kendi içinde değerlendirilmiştir.

İlk saat dikkate alındığında, 16.0 ve 32.0 mg/ml'lik derişim değeri varlığında tespit edilen veriler istatistiksel açıdan birbirlerinden farklı değildir ($P>0.05$). Diğer yandan, benzer durum 1.0-8.0 mg/ml'lik derişimlerin varlığında elde edilen sonuçlar için de geçerlidir. Sözü edilen bu değeriin hiçbirisi istatistiksel açıdan farklı değildir ($P>0.05$). Ancak kontrol uygulamasından elde edilen sonuçlar bitkisel özütlerden elde edilen sonuçlara göre istatistiksel olarak farklıdır ($P<0.05$).

Deneyssel sürecin 3. saati dikkate alındığında, 16.0 ve 32.0 mg/ml derişim değeriinde elde edilen sonuçların istatistiksel açıdan farklı olmadığı görülecektir ($P>0.05$). Ancak kontrol uygulaması da dahil olmak üzere 1.0-8.0 mg/ml'lik derişim değeri varlığında elde edilen sonuçların tamamı istatistiksel açıdan birbirlerinden farklıdır ($P<0.05$).

İstatistiksel olarak 3. saate gözlemlenen durumun benzeri bir durum da 6. saatte tespit edilmiştir. Bu aşamada, 16.0 ve 32.0 mg/ml derişim değeriinde elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan farklı değildir ($P>0.05$). Diğer yandan 1.0-8.0 mg/ml'lik derişim değeri varlığında elde edilen sonuçların tamamı istatistiksel açıdan birbirlerinden farklıdır ($P<0.05$).

12. saat içerisinde 32.0 mg/ml derişimde canlı trofozoit gözlemlenmemiştir. Bu aşamada, 8.0 ve 16.0 mg/ml derişim değeriinde elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan farklı değildir ($P>0.05$). Ancak 1.0-4.0 mg/ml'lik derişim değeri varlığında elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan birbirlerinden farklıdır ($P<0.05$).

24. saatte ise 16.0 ve 32.0 mg/ml derişimlerde canlı trofozoit tespit edilmemiştir. 4.0 ve 8.0 mg/ml derişim değeriinde elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan farklı değildir ($P>0.05$). Ancak 1.0-2.0 mg/ml'lik derişim değeri varlığında elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan birbirlerinden farklıdır ($P<0.05$).

Deneysel sürecin 48. saatinde de 24. saattekine benzer şekilde 16.0 ve 32.0 mg/ml derişimlerde canlı trofozoit tespit edilmemiştir. Burada da 4.0 ve 8.0 mg/ml derişim değerlerinde elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan farklı değildir ($P>0.05$). Ancak 1.0-2.0 mg/ml'lik derişim değerleri varlığında elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan birbirlerinden farklıdır ($P<0.05$).

Deneysel sürecin son aşamasında (72. saat) 8.0-32.0 mg/ml'lik özüt derişimlerinin varlığında canlı trofozoit tespit edilemezken, 2.0 ve 4.0 mg/ml derişim değerlerinde elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan farklı bulunmamıştır ($P>0.05$). Ancak 1.0 mg/ml özüt derişimi varlığında tespit edilen sonuçlar kontrol uygulamasından elde edilenler ile istatistiksel açıdan farklı bulunmuştur.

Tablo 3.3. *S. caespitosa* özütünün, *A. castellani* trofozoitleri üzerine etkisi ¹

<i>S. caespitosa</i> özütü (mg/ml)	Ölçüm zamanı (saat)						
	1	3	6	12	24	48	72
32	69.20 ± 2.35 ^a	44.00 ± 4.23 ^a	23.00 ± 3.00 ^a	0	0	0	0
16	71.80 ± 1.77 ^a	46.20 ± 4.22 ^a	29.00 ± 1.87 ^a	23.40 ± 2.83 ^a	0	0	0
8	74.20 ± 1.68 ^b	51.00 ± 3.53 ^b	45.00 ± 1.70 ^b	29.20 ± 2.08 ^a	23.60 ± 3.07 ^a	18.20 ± 1.06 ^a	0
4	75.80 ± 1.52 ^b	62.00 ± 1.70 ^c	56.60 ± 0.50 ^c	45.40 ± 1.63 ^b	29.00 ± 5.24 ^a	23.20 ± 3.16 ^a	17.40 ± 1.07 ^a
2	77.20 ± 1.20 ^b	68.40 ± 0.50 ^d	65.00 ± 0.70 ^d	56.00 ± 0.70 ^c	43.40 ± 1.36 ^b	28.40 ± 2.29 ^b	23.00 ± 2.54 ^a
1	76.80 ± 1.77 ^b	76.00 ± 1.22 ^e	74.00 ± 1.87 ^e	64.80 ± 0.86 ^d	55.20 ± 0.86 ^c	44.60 ± 1.56 ^c	28.40 ± 2.56 ^b
Kontrol	80.00 ± 7.90 ^c	80.00 ± 7.90 ^f	80.00 ± 11.70 ^f	78.00 ± 11.40 ^e	76.00 ± 4.60 ^d	76.00 ± 5.80 ^d	74.00 ± 5.80 ^c

¹ Veriler üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunlarda aynı harflerle belirtilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir.

3.2.1.2. Kistler üzerine etki

S. caespitosa'dan elde edilen polar-metanol özütünün, *A. castellani* kistleri üzerine etkisine ilişkin veriler Tablo 3.4'de verilmiştir. Burada da beklendiği üzere, özütün kistlere karşı gösterdiği aktivite, trofozoitlere karşı gösterilenlere göre daha zayıf olmuştur.

Tablo 3.4'den de görülebileceği üzere, 1.0, 2.0, 4.0 ve 8.0 mg/ml derişimlerde uygulanan *S. caespitosa* özütleri, deneysel sürecin tamamı göz önüne alındığında ortamdaki kistlerin tümü yok edilememiştir. Ancak deneysel sürecin ilk saati içerisinde ortamdaki canlı kist sayısı 69.40 – 78.20 arasında değişim gösterirken, 72. saat sonunda bu sayı 10.60 – 40.00 civarına düşmüştür.

16.0 mg/ml özüt derişiminin denendiği durumda ise 0 - 48. saatler arasında ortamdaki kistlerin tamamı yok edilememiştir. Ancak ilk saat içerisinde 72.80 ± 0.86 olan trofozoit sayısı 48. saatte 9.60 ± 1.36 'ya gerilemiştir. Bu derişim değerinde 48. saatten sonra canlı kist gözlenmemiştir.

En yüksek derişim olan 32.0 mg/ml'de ise kistler yalnızca 0-24. saatler arasında canlılıklarını sürdürebilmişlerdir. Ancak bu periyot içerisinde de inkübasyon süresi artışına paralel olarak sayısal bir azalma eğilimi içerisinde olmuşlardır. İlk saat içerisinde tespit edilen canlı kist sayısı 69.40 ± 0.74 iken bu sayı 24. saatte 10.20 ± 1.15 'e düşmüştür. Bu derişim değerinde, 24. saatten sonra ortamda canlı kist gözlemlenmemiştir.

Tablo 3.4'deki her sütun istatistiksel açıdan kendi içinde değerlendirilmiştir.

İlk saat dikkate alındığında, 2.0 - 32.0 mg/ml'lik derişim değerleri varlığında tespit edilen veriler istatistiksel açıdan birbirlerinden farklı değillerdir ($P>0.05$). Diğer yandan, benzer durum 1.0 mg/ml'lik derişim varlığında elde edilen sonuç ve kontrol uygulaması arasında da söz konusudur ($P>0.05$).

Deneysel sürecin 3. saati dikkate alındığında, 32.0 mg/ml derişim değerinde elde edilen sonucun istatistiksel açıdan diğerlerinden farklı olduğu görülecektir ($P>0.05$). Ancak 2.0 – 16.0 mg/ml özüt derişimlerinin varlığında elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan farklı değillerdir ($P>0.05$). Aynı durum 1.0 mg/ml derişim varlığında tespit edilen sonuç ile kontrol uygulaması arasında da söz konusudur ($P>0.05$).

6. saatte dikkate alındığında ise 1.0 – 4.0 mg/ml'lik özüt derişimlerinin varlığında tespit edilen sonuçların istatistiksel açıdan birbirinden farklı olmadıkları görülecektir ($P>0.05$). Ancak bu saat içerisinde saptanan diğer tüm sonuçlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0.05$).

6. saatteki duruma benzer durum 12. saat için de geçerlidir. Deneysel sürecin bu aşamasında 1.0 – 4.0 mg/ml'lik özüt derişimlerinin varlığında tespit edilen sonuçlar istatistiksel açıdan birbirinden farklı değillerdir ($P>0.05$). Ancak bu saat içerisinde saptanan diğer tüm sonuçlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0.05$).

24. saatte elde edilen tüm sonuçlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0.05$).

Deneysel sürecin 48. saatinde 32.0 mg/ml derişim varlığında ortamda canlı kist tespit edilmemiştir. Bu aşamada elde edilen diğer tüm sonuçlar istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur ($P<0.05$).

Deneysel sürecin son aşamasında ise 16.0 ve 32.0 mg/ml derişimler varlığında ortamda canlı kist bulunamamıştır. Bu aşamada elde edilen diğer tüm sonuçlar istatistiksel olarak birbirinden farklı bulunmuştur ($P<0.05$).

Tablo 3.4. *S. caespitosa* özütünün, *A. castellani* kistleri üzerine etkisi¹

	Ölçüm zamanı (saat)						
	1	3	6	12	24	48	72
32	69.40 ± 0.74 ^a	58.60 ± 2.58 ^a	37.40 ± 4.36 ^a	18.80 ± 2.05 ^a	10.20 ± 1.15 ^a	0	0
16	72.80 ± 0.86 ^a	69.40 ± 0.92 ^b	56.20 ± 1.78 ^b	33.80 ± 3.42 ^b	17.60 ± 1.74 ^b	9.60 ± 1.36 ^a	0
8	74.00 ± 0.70 ^a	72.60 ± 0.67 ^b	63.40 ± 0.92 ^c	48.20 ± 2.63 ^c	29.80 ± 3.02 ^c	17.40 ± 1.93 ^b	10.60 ± 1.36 ^a
4	74.60 ± 0.50 ^a	73.60 ± 0.92 ^b	71.80 ± 1.31 ^d	64.20 ± 1.31 ^d	39.60 ± 3.15 ^d	29.40 ± 3.26 ^c	17.60 ± 1.96 ^b
2	75.80 ± 1.80 ^a	74.00 ± 0.54 ^b	70.00 ± 1.14 ^d	62.40 ± 0.50 ^d	48.40 ± 2.83 ^e	40.40 ± 3.10 ^d	29.80 ± 3.21 ^c
1	78.20 ± 2.17 ^b	78.20 ± 2.17 ^c	73.80 ± 1.68 ^d	66.40 ± 2.29 ^d	56.40 ± 2.54 ^f	49.00 ± 2.66 ^e	40.00 ± 3.08 ^d
Kontrol	80.00 ± 7.90 ^b	80.00 ± 7.90 ^c	80.00 ± 11.70 ^e	78.00 ± 11.40 ^e	76.00 ± 4.60 ^e	76.00 ± 3.30 ^f	74.00 ± 3.10 ^e

¹ Veriler üç tekrarın ortalamasıdır. Aynı sütunlarda aynı harflerle belirtilen veriler 0.05 olasılık düzeyinde birbirinden farklı değildir.

3.2.2. *Sitotoksik aktivite*

S. caespitosa'dan elde edilen polar metanol özütünün, epitel hücre kültürü üzerinde sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bu özüt, 32.00 mg/ml derişimde kültürdeki hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki meydana getirmemiştir.

3.3. *S. tomentosa, S. virgata ve S. hypargeia* Özütlerinin Biyolojik Aktiviteleri

Bu kısmın başlangıcında da belirtildiği üzere, yapılan aktivite testleri sonucunda *S. tomentosa, S. virgata* ve *S. hypargeia* özütlerinin *A. castellani* trofozoitleri ve kistleri üzerinde herhangi bir öldürücü etkisi gözlemlenmemiştir. Ancak bu özütlerin sitotoksik aktiviteleri aşağıdaki gibi tespit edilmiştir.

S. tomentosa özütü epitel hücre kültürü üzerinde 32.0 mg/ml derişimde *orta dereceli* toksik etki gösterirken 16.0 mg/ml derişimde bu etki *ılımlı sitotoksik* olarak belirlenmiştir. Bu özüt, 8.0 mg/ml derişimde kültürdeki hücreler üzerinde toksik etki göstermemiştir.

S. virgata özütü ise, materyal ve metod kısmında belirtilen toksik etki skalasına göre, 32.0 mg/ml derişimde *ılımlı sitotoksik* etkide bulunurken, 16.0 mg/ml derişimde herhangi bir toksik etki göstermemiştir.

S. hypargeia ise 32.0 mg/ml derişimde *orta dereceli sitotoksik*ite göstermiştir. Sözü edilen özüt, 16.0 mg/ml derişimde *ılımlı sitotoksik* etki gösterirken, 8.0 mg/ml derişimde kültürdeki hücreler üzerinde toksik etki oluşturmamıştır.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tablolar içinde sunulan verilerden de görülebileceği gibi, *A. castellani*'ye ait canlı trofozoitlerin sayısı bitkisel özütlerin artan konsantrasyonlarına bağlı olarak azalma göstermiştir. Canlı trofozoit sayısındaki azalmayı, bitkisel özüte maruz bırakma süresindeki artış da doğrudan etkilemiştir. Beklendiği üzere, *A. castellani* trofozoitlerinin özütlere duyarlılığı kistlerden daha fazla olmuştur.

Çalışmanın giriş kısmında da bahsedildiği üzere, bitkisel kimyasalların gerek ilaç endüstrilerinde gerekse modern tıpta kullanılması yönünde giderek artan bir eğilim söz konusudur. Bu olguda özellikle son yıllarda yapılan çalışmaların büyük payı bulunmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen ümit vaat edici sonuçlar, bitkisel kimyasalların, bu alanlarda, gelecekte kullanılması muhtemel aday bileşenler olmalarını mümkün kılmaktadır. Bu bağlamda *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının tedavisinde de klasik klinik yöntemlerin uygulanması sırasında karşılaşılan yetersizliklerin ortadan kaldırılması için bitkisel kimyasalların değerlendirilmesine doğru bir yönelim söz konusudur.

Acanthamoeba enfeksiyonlarında tıbbi tedavilerin kullanılması yoluyla iyileşme sağlanması halen zor görünmektedir. Çünkü antiprotozoal ilaçlar bazı anatomik bölgelerde tamamen etkisiz kalmaktadır. *Acanthamoeba* keratitisi hastalığının lokal (bölgesel) tedavisinde kullanılan ilaçlara ilişkin çok sayıda çalışma yayınlanmıştır. Ancak genelde, katyonik dezenfektanlar (tek başına veya birlikte kullanılan biyoguanidler-klorheksidin ve polihekzametilen biyoguanid) veya hastalığın sistemik tedavisinde kullanılan ajanlar antimikrobiyal tedaviler için pek uygun görünmemektedir. Bunun da ötesinde, bazı anti-ameobik ilaçlar yalnızca amoebastatik etki göstermekte ve hastalığın tedavisi için kullanılan moleküller konak hücreler için toksik olabilmektedir. Ayrıca, bu tür tedaviler uzun süreli uygulandıklarında hasta tarafından iyi tolere edilememektedir. Bir başka önemli sorun ise bu tür enfeksiyonlarda kullanılan ilaçlara zamanla mikroorganizmalar tarafından geliştirilen dirençliliktir. Özellikle ilaçların uzun süreli kullanımlarına bağlı olarak ortaya çıkan dirençlilik durumlarında, amip öldürücü etkiye sahip yeni moleküllerin kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır (Fiori ve ark., 2006).

Acanthamoeba türlerinin neden olduğu enfeksiyonlarda çok sayıda ilaç (katyonik antiseptikler ve makrolid grubu antibiyotikler) hem *in-vitro* hem de *in-vivo*

şartlar altında denenmiş ve çeşitli derecelerde etkili oldukları tespit edilmiştir (Lloyd *ve ark.*, 2001; Radford *ve ark.*, 1998; Duguid *ve ark.*, 1997). Diğer yandan bu tip ilaçların başarısız olduğu bazı durumlarda ortaya konulmuştur (Mattana *ve ark.*, 2004). Bu tür tedaviler genelde parazitin kistik evresinde çok zayıf bir etkiye sahip olmaktadır. Yapılan *in-vivo* çalışmalarda, hastaların yalnızca yarısında etkinlik sağlanabilmiştir. Ayrıca bu hastalardan birinden elde edilen *Acanthamoeba* izolatlarında propamidin'e karşı dirençlilik geliştiği tespit edilmiştir (Ficker *ve ark.*, 1990). Klorhekzidin'in tek başına kullanıldığı terapilerde başarı elde edilmiştir. Klorhekzidin (% 0.02), polihekzametilen biyoguanid'e kıyasla daha az toksik olduğu için hekimler arasında kısmen kabul görmüştür (Kosrirukvongs *ve ark.*, 1999). Yapılan araştırmalar sonucunda parazitin kistik evresinde daha fazla problemler yaşandığı tespit edildiği için, amip öldürücü etkisinin yanı sıra aynı zamanda kist öldürücü aktiviteye sahip moleküllerin bulunması gerekmektedir. Bu açıdan bakıldığında, *S. staminea* özütünün, *A. castellani* kistleri üzerinde etkili bir kist öldürücü aktivite ortaya koyduğu söylenebilir.

Dikkat edilecek olursa, bu çalışmada incelenen *Salvia* türlerinin polar metanol özütleri kullanılmıştır. Bunun iki önemli nedeni bulunmaktadır. Birincisi, amoebisidal aktivite tayininde kullanılan deneysel ortamın polar özellikte olmasıdır. Dolayısıyla, test edilecek bileşenlerin bu ortamda çözünür durumda bulunmaları için yine polar özellikte olmaları gerekmektedir. İkinci önemli nedeni ise, biyolojik aktivite gösteren bitkisel kimyasalların polariteleri ile aktivite potansiyelleri arasında doğrudan bir ilişki bulunmasıdır. Özellikle polar bileşenler, hedef hücre zarlarından, bu tarz maddeleri spesifik olarak taşıyan proteinler yoluyla hücre içerisine alınmakta ve etkinlik göstermektedirler. Ancak non-polar özellikte bileşenler, gerek hücreler arası sıvı ortamda ve gerekse hücre içi sıvı ortamlarda çözünürlüklerinde yaşanan sorunlar nedeniyle beklenen etkiyi gösterememektedirler (Ulubelen *ve Topcu*, 1998).

Salvia cinsine ait türlerin, sahip oldukları fitokimyasal bileşenlerden dolayı oldukça ilgi çekici aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir. Bu bileşenler arasında diterpenoidler, triterpenoidler, flavonoidler ve diğer fenolik bileşikler bulunmaktadır. Antik çağlardan bu yana, *Salvia* türleri oldukça iyi bilinmekte ve halk arasında anti-bakteriyal (Ulubelen *ve ark.*, 2001), anti-tüberkülozis (Ulubelen *ve ark.*, 1994), antiviral, sitotoksik (Topçu *ve Ulubelen*, 1999; Topçu *ve ark.*, 2003), kardiyovasküler

(Ulubelen *ve ark.*, 2002; Ulubelen, 2003), karaciğer koruyucu (Zhou *ve ark.*, 2005) ve diğer bazı özelliklerinde dolayı kullanılmışlardır. Bu türler aynı zamanda baharat olarak kullanılmışlar ve antioksidan özelliklerinden dolayı et ve peynir gibi besinlerin bozulmalara karşı korunmaları amacıyla kullanılmışlardır (Daniela, 1993). Fenolik bileşikler, diyet uygulamaları açısından zorunlu olmayan maddelerdir. Ancak bu bileşiklerin arterosklerozis (damar sertliği) ve kanser oluşumlarını engellediği yönünde ciddi bulgular söz konusudur. Ayrıca bitkisel özütlerin fenolik içeriği ile antioksidan aktiviteleri arasında kuvvetli bir ilişki söz konusudur (Velioglu *ve ark.*, 1998).

Yapılan detaylı literatür araştırmaları sonucunda bitkisel özüt ve/veya uçucu yağların amoebisidal aktivitelerinin tespiti yönünde gerçekleştirilen araştırmaların sayısı sınırlı olup, bu sebeple aktiviteden sorumlu bileşenlerin tespit veya etki mekanizmaları hakkında çok az şey bilinmektedir. Ancak fenolik bileşiklerin, kimyasal yapılarından dolayı güçlü biyolojik aktivitelere sahip oldukları çoğu araştırmacı tarafından kabul görmüş bir gerçektir. Bu bileşikler arasında özellikle *Salvia* türlerinde yaygın olarak bulunan fenolik asitler başta (salvianolik asit, ve rozmarinik asit) gelmektedir.

Fenolik asitlerin biyolojik aktivitelerine dair literatürde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Anti-inflamatuar, anti-mutajen, anti-bakteriyal, anti-oksidan ve antiviral aktiviteler bunlar arasında sayılabilir (Parnham *ve Kesselring*, 1985; Deans *ve Svoboda*, 1989; Exarchou *ve ark.*, 2002; Güllüce *ve ark.*, 2003). Özellikle fenolik asitler bakımından zengin olan bitkisel özütlerden Herpes simplex kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde yararlandığı rapor edilmektedir (Parnham *ve Kesselring*, 1985). Anti-inflamatuar aktivitenin, lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimlerinin inhibe edilmesi sonucunda ortaya çıktığı öne sürülmektedir. Fenolik asitlerin ayrıca kansere karşı koruyucu bir etki sergiledikleri de bilinmektedir. Ayrıca bu bileşikler, kozmetik endüstrilerinde kullanılan pek çok bitkinin aktivitelerinden de sorumludur (D'Amelio, 1999).

Bilimsel yollarla elde edilen bitkisel özütler ile (örneğin, soxhlet aparatı ile elde edilen) alternatif tıpta doğrudan kullanılan bitkilerin içerik açısından birbirinin aynı olmadığı yönünde bazı spekülasyonlar mevcuttur. Bu nedenle biyolojik aktivite

gösteren bileşiklerin, daha hassas yöntemlerle izole edilmesi gerekmektedir. Bu sayede bileşenlerin biyolojik aktiviteleri de artırılabilir.

Yaptığımız literatür araştırması sonuçlarına göre, bu çalışma, *A. castellani*'ye karşı *Salvia* türlerinin aktivitelerinin incelendiği ilk çalışmadır. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, *S. staminea*'dan elde edilen metanol özütü *Acanthamoeba* trofozoitleri ve kistleri üzerinde diğer *Salvia* türlerinden daha etkili olmuştur. Diğer yandan, bu özüt 16.00 mg/ml konsantrasyonda kültürdeki kornea epitel hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik aktivite göstermemiştir. Bu sonuçlara dayalı olarak, kontrollü şartlar altında *S. staminea*'dan elde edilen metanol özütünün *Acanthamoeba* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabileceği söylenebilir. Ancak, özütün yan etkilerinin ve etkinliğinin kesin olarak açığa çıkarılabilmesi için daha ileri düzeyde *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

5. KAYNAKLAR

- Akkol, E.K., Goger, F., Kosar, M. (2008).** Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. Food Chemistry, 108: 942-949.
- Albach, R.A., Booden, T., Boonlayangoor, P. (1978).** *Entamoeba histolytica* – Autoradiographic analysis of nuclear sites of RNA synthesis. Experimental Parasitology, 42: 248-259.
- Alice, C. B., Vargas, V. M. F. C., Silva, G. A. A. B., De Siqueira, N. C. S., Schapoval, E. E. S., Gleye, J., Henriques, J. A. P., Henriques, A. T. (1991).** Screening of plants used in south Brazilian folk medicine. J. Ethnopharmacology, 35: 165-171.
- Altun, M., Unal, M., Kocagoz, T. (2007).** Essential oil compositions and antimicrobial activity of *Salvia* species. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 10: 251-258.
- Amaral Zettler, L.A., Nerad, T.A., O’Kelly, C.J., Peglar, M.T., Gillevet, P.M., Silberman, J.D., Sogin, M.L. (2000).** A molecular reassessment of the *Leptomyxid amoeba*. Protista, 151: 275-282.
- Azcan, N., Ertan, A., Demirci, B., Baser, K.H.C. (2004).** Fatty acid composition of seed oils of twelve *Salvia* species growing in Turkey. Chemistry of Natural Compounds, 40: 218-221.
- Bagci, E., Vural, M., Dirmenci, T., Bruehl, L., Aitzetmuller, K. (2004).** Fatty acid and tocochromanol patterns of some *Salvia* L. species. Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences, 59: 305-309.
- Bayrak, A., Akgül, A. (1987).** Composition of essential oils from Turkish *Salvia* species. Phytochemistry, 26: 846-847.
- Cervantes, L.F. (1972).** Medical treatment of amebiasis. Archivos de Investigacion Medica, Suppl-2: 415-426.
- Chalchat, J.C., Michet, A., Pasquier, B. (1998).** Study of clones of *Salvia officinalis* L. yields and chemical composition of essential oil. Flavour and Fragrance Journal, 13: 68-70.

- Chen, X.G., Li, Y., Yan, C.H., Li, L.N., Han, R. (2001).** Cancer chemopreventive activities of S-3-1, a synthetic derivative of tanshinone. *J Asian Nat Prod Res.*, 3: 63–75.
- Cox, P. A. (1990).** Ethnopharmacology and the search for new drugs. In *Bioactive Compounds from Plants*, CIBA Foundation Symposium 154., pp. 40-55. Chichester, New York Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons.
- D'Amelio, F.S. (1999).** *Botanicals, A Phytocosmetic Desk Reference*. CRC Press, London, pp. 361.
- De Jonckheere, J.F., Michel, R. (1988).** Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. *Parasitol Research*, 74: 314-316.
- Dağcı, H., Gül, S., Emre, S., Türk, M., Sönmez, G., Tünger, A., Yağcı, A. (2001).** Planlı değişimli yumuşak kontakt lenslerin *Acanthamoeba* ve bakteriyel kontaminasyon yönünden değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi*, 15: 357-362.
- Daniela, T. (1993).** *Salvia officinalis* L. Part I. Botanic characteristics, composition, use and cultivation. *Ceskoslovenska Farmacie*, 42: 111–116.
- Davis, P.H. (Ed.) (1965-1984).** *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Cilt: 7. University Press, Edinurgh.
- Deans, S.G., Svoboda, K.P. (1989).** Antibacterial activity of summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil and its constituents. *Journal of Horticultural Science*, 64: 205-210.
- Demirci, B., Baser, K.H.C., Yildiz, B., Bahcecioglu, Z. (2003).** Composition of the essential oils of six endemic *Salvia* spp. from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 18: 116-121.
- Dorman, H. J. D., Deans, S. G. (2000).** Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.
- Duguid, I. G., Dart, J. K., Morlet, N. (1997).** Outcome of *Acanthamoeba* keratitis treated with polyhexamethyl biguanide and propamidine. *Ophthalmology*, 104: 1587–1592.

- Dunand, V.A., Hammer, S.M., Rossi, R., Poulin, M., Albrecht, M.A., Doweiko, J.P., DeGirolami, P.C., Coakley, E., Piessens, E., Wanke, C.A. (1997).** Parasitic sinusitis and otitis in patients infected with human immunodeficiency virus: report of five cases and review. *Clinical Infectious Diseases*, 25: 267–272.
- Dykova, I., Lom, J., Schroeder-Diedrich, J.M., Booton, G.C., Byers, T.J. (1999).** *Acanthamoeba* strains isolated from organs of freshwater fishes. *Journal of Parasitology*, 85: 1106-1113.
- Exarchou, V., Nenadis, N., Tsimidou, M., Gerothanassis, I.P., Troganis, A., Boskou, D. (2002).** Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. *J. Agric. Food. Chem.*, 50: 5294-5299.
- Farnsworth, N. R. (1990).** The role of the ethnopharmacology in drug development. In *Bioactive Compounds from Plants*, CIBA Foundation Symposium 154., pp. 2-21. Chichester, New York Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley & Sons.
- Ficker, L., Seal, D., Warhurst, D., Wright, P. (1990).** *Acanthamoeba* keratitis-resistance to medical therapy. *Eye*, 4: 835-838.
- Fiori, P. L., Mattana, A., Dessi, D., Conti, S., Magliani, W., Polonelli, L. (2006).** *In vitro* acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 891-898.
- Fowler, M. W. (1982).** Substrate utilisation by plant cell cultures. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 32: 338-346.
- Gray, T.B., Cursons, R.T.M., Sherwan, J.F., Rose, P.R. (1995).** *Acanthamoeba*, bacterial and fungal contamination of contact lens storage cases. *British Journal of Ophthalmology*, 79: 601-605.
- Gullett, J., Mills, J., Hadley, K., Podemski, B., Pitts, L., Gelber, R. (1979).** Disseminated granulomatous acanthamoeba infection presenting as an unusual skin lesion. *American Journal of Medicine*, 67: 891–896.
- Güllüce, M., Sokmen, M., Daferera, D., Agar, G., Özkan, H., Kartal, N., Polissiou, M., Sokmen, A., Şahin, F. (2003).** In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 3958-3965.

- Hohmann, J., Zupko, I., Redei, D., Csanyi, M., Falkay, G., Mathe, I., Janicsak, G. (1999).** Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis*, and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. *Planta Medica*, 65: 576–578.
- Illingworth, C.D., Cook, S.D. (1998).** *Acanthamoeba* keratitis. *Surv Ophthalmol*, 42: 493-508.
- International Standard ISO 7405 (1997).** Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – Test Methods for Dental Materials. Geneva: International Organization for Standardization.
- John, D.T. (1993).** Opportunistically pathogenic free-living amebae. *Parasitic Protozoa*, 2nd edn, vol 3, eds Kreier JP, Baker JR, Academic Press, San Diego, 143-246.
- John, D.T. (1998).** Opportunistic Amoebae. “Topley & Wilson’s Microbiology and Microbial Infections” içinde. 9th ed. Vol. 5. Edward Arnold Ltd. London. Pp. 179-192.
- John, D.T., Howard, M.J. (1995).** Seasonal distribution of pathogenic free-living amebae in Oklahoma waters. *Parasitol Research*, 81: 193-201.
- John, D.T., Howard, M.J. (1996).** Techniques for isolating thermotolerant and pathogenic free-living amebae. *Folia Parasitology*, 43: 267-271.
- Kong, H.H., Kim, T.H., Chung, D.I.. (2000).** Purification and characterization of a secretory serine proteinase of *Acanthamoeba healyi* isolated from GAE. *Journal of Parasitology*, 86: 12-17.
- Kosar, M., Goger, F., Baser, K.H.C. (2006).** Composition and antioxidant activities of *Salvia halophila* and *S. virgata* from Turkey. *Planta Medica*, 72: 977.
- Kosar, M., Goger, F., Baser, K.H.C. (2007).** Free radical scavenging compounds in *Salvia halophila* Hedge and *S. virgata* Jacq. extracts using a postcolumn derivatization method. *Planta Medica*, 73: 977-978.
- Kosar, M., Goger, F., Baser, K.H.C. (2008).** In vitro antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 2369-2374.

- Kosrirukvongs, P., Wanachiwanawin, D., Visvesvara, G. S. (1999).** Treatment of *Acanthamoeba* keratitis with chlorhexidine. *Ophthalmology*, 106: 798-802.
- Könemann, (1999).** Botanica. Gordon Cheers Publication, Hong Kong.
- Kupeli, E., Goger, F., Kosar, M. (2007).** Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey. *Planta Medica*, 73: 836.
- Larkin, D.F.P., Kilvington, S., Easty, D.L. (1990).** Contamination of contact lens storage cases by *Acanthamoeba* and bacteria. *British Journal of Ophthalmology*, 74: 133-135.
- Levingstone, R., Zamora, R. (1983).** Medicine trees of the tropics. *Unasylva*, 35: 7-10.
- Lin-Lin, Tian, Wang, X.J., Sun, Y.N. (2008).** Salvianolic acid B, an antioxidant from *Salvia miltiorrhiza*, prevents 6-hydroxydopamine induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40: 409-422.
- Lloyd, D., Turner, N. A., Khunkitti, W. (2001).** Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48: 11-16.
- Lu, Y., Foo, L. Y. (2001).** Salvianolic acid L. a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis*. *Tetrahedron Letters*, 42: 8223–8225.
- Marciano-Cabral, F., Cabral, G. (2003).** *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Reviews*, 12: 273-307.
- Martinez, A.J., Janitschke, K. (1985).** *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism: a review. *Infection* 13: 251–256.
- Mattana, A., Biancu, G., Alberti, L. (2004).** In vitro evaluation of the effectiveness of the macrolide rokitamycin and chlorpromazine against *Acanthamoeba castellanii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 4520–4527.
- Nagai, M., Tada, M. (1987).** Antimicrobial Compounds, Chinesin I and II from flowers of *Hypericum chinense* L. *Chemistry Letters*: 1337-1340.
- Nagy, G., Gunther, G., Mathe, I. (1999).** Diterpenoids from *Salvia glutinosa*, *S. austriaca*, *S. tomentosa* and *S. verticillata* roots. *Phytochemistry*, 52: 1105-1109.

- Nickavar, B., Kamalinejad, M., Izadpanah, H. (2007).** In vitro free radical scavenging activity of five *Salvia* species. *Pakistan Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 20: 291-294.
- Pacheco, P., Sierra, J., Schmedahrschmann, G., Potter, C. W., Jones, B. M., Moshref, M. (1993).** Antiviral Activity of Chilean Medicinal Plant Extracts. *Phytotherapy Research*, 7: 415-418.
- Parnham, M.J., Kesselring, K. (1985).** Rosmarinic acid. *Drugs of the Future*, 10: 756-757.
- Perry, N., Howes, M.J., Houghton, P., Perry, E. (2000a).** Why sage may be a wise remedy: effects of *Salvia* on the nervous system. In: Kintzios, editor. Sage. The genus *Salvia*. The Netherlands: Harwood Academic Publishers; p. 207– 32.
- Perry, N.S.L., Houghton, P.J., Theobald, A., Jenner, P., Perry, E.K. (2000b).** In-vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by *Salvia lavandulaefolia* essential oil and constituent terpenes. *J Pharm Pharmacol.*, 52: 895– 902.
- Radford, C. F., Lehmann, O. J., Dart, J. K. G. (1998).** *Acanthamoeba* keratitis: multicentre survey in England 1992-6. *British Journal of Ophthalmology*, 82: 1387-1392.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., Valdivia-Lopez, M.A. (2008).** Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107: 656-663.
- Samarawickrema, N.A., Brown, D.M., Upcroft, J.A. (1997).** Involvement of superoxide dismutase and pyruvate : ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40: 833-840.
- Savelev, S., Okello, E., Perry, N.S.L., Wilkins, R.M., Perry, E.K. (2003).** Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 75: 661–668.
- Saygi, G. (2002).** Temel Tıbbi Parazitoloji. II. Baskı. Es-Form Ofset Ltd Şti. Sivas.

- Saygi, G., Akın, Z., Tecer, H. (2000).** Sivas'ta toprak ve termal su örneklerinden *Acanthamoeba* ve *Naegleria* türlerinin soyutulması. Türkiye Parazitolojisi Dergisi, 24: 237-242.
- Saygi, G., Polat, Z. (2003).** Özgür yaşayan amipler ve neden oldukları parazitozlar (Primer amibik meningoensefalitis-Granülomatöz amibik ensefalitis-Keratit). CÜ Tıp Fakültesi Dergisi, 25: 140-149.
- Schuster, F.L. (2002).** Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clinical Microbiology 15: 342-354.
- Sokmen, A., Jones, B.M., Erturk, M. (1999).** The *in vitro* antibacterial activity of Turkish plants. Journal of Ethnopharmacology, 67: 79-86.
- 38.
- Tepe, B. (2008).** Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *S. staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *S. verbenaceae* (L.) from Turkey. Bioresource Technology, 99: 1584-1588.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A. (2006).** Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. Food Chemistry, 95: 200-204.
- Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H.A., Aydın, E. (2007).** Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. Food Chemistry, 100: 985-989.
- Topcu, G., Altiner, E.N., Gozcu, S., Halfon, B., Aydogmus, Z., Pezzuto, J.M., Zhou, B.N., Kingston, D.G.I. (2003).** Studies on di- and triterpenoids from *Salvia staminea* with cytotoxic activity. Planta Medica, 69: 464-467.
- Topcu, G., Turkmen, Z., Schilling, J.K., Kingston, D.G.I., Pezzuto, J.M., Ulubelen, A. (2008).** Cytotoxic activity of some anatolian *Salvia* extracts and isolated abietane diterpenoids. Pharmaceutical Biology, 46: 180-184.
- Topcu, G., Ulubelen, A. (1999).** Terpenoids from *Salvia kronenburgii*. Journal of Natural Products, 62: 1605-1608.
- Torno, M.S., Babapour, R., Gurevitch, A., Witt, M.D. (2000).** Cutaneous acanthamoebiasis in AIDS. J Am Acad Dermatol 42: 351-354.

- Ulubelen, A. (2003).** Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. *Phytochemistry*, 64: 395–399.
- Ulubelen, A., Topcu, G., Lotter, H., Wagner, H., Eris, C. (1994).** Triterpenoids from the aerial parts of *Salvia montbretii*. *Phytochemistry*, 36: 413-416.
- Ulubelen, A., Topcu, G., Chai, H.B., Pezzuto, J.M. (1999).** Cytotoxic activity of diterpenoids isolated from *Salvia hypargeia*. *Pharmaceutical Biology*, 37: 148-151.
- Ulubelen, A., Oksuz, S., Topcu, G., Goren, A. C., Voelter, W. (2001).** Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia blepharochlaena*. *Journal of Natural Products* 64: 549-551.
- Ulubelen, A., Oksuz, S., Topcu, G., Goren, A.C., Bozok-Johansson, C., Celik, C., Kokdil, G., Voelter, W. (2001).** A new antibacterial diterpene from the roots of *Salvia caespitosa*. *Natural Product Letters*, 15: 307-314.
- Ulubelen, A., Birman, H., Oksuz, S., Topcu, G., Kolak, U., Barla, A. (2002).** Cardioactive Diterpenes from *Salvia eriophora*. *Planta Medica*, 68: 818–821.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. D. (1998).** Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4113–4117.
- Walochnik, J., Obwaller, A., Aspöck, H. (2000).** Correlations between morphological, molecular biological, and physiological characteristics in clinical and nonclinical isolates of *Acanthamoeba* spp. *Applied Environmental Microbiology* 66: 4408-4413.
- Weng, X. C., Wang, W. (2000).** Antioxidant Activity of Compounds Isolated from *Salvia plebeia*. *Food Chemistry*, 71: 489-493.
- Yıldırım, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A. A., Algur, Ö. F., Bilaloğlu, V. (2000).** Comparison of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Tilia (*Tilia argentea*-Desf Ex DC), Sage (*Salvia triloba* L.) and Black Tea (*Camellia sinensis*) Extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 5030-5034.