

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI

138367

DERİ LEİSHMANİOSİS'İ ETKENLERİ ÜZERİNE,
ENDEMİK VE ENDEMİK OLMAYAN
BİTKİLERİN (ÖZÜTLERİNİN) ANTİLEİSHMANİAL
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Semra ÖZÇELİK

Uzm. Bio. Ahmet Duran ATAŞ

SİVAS - 2002



“Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05/01/1984 tarih ve 84/1 No’lu kararıyla kabul edilen tez yazma yönergesine göre hazırlanmıştır.”

TEŞEKKÜR

Yapmış olduğum tez çalışmalarım sırasında her türlü desteği sağlayan değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Semra ÖZÇELİK'e, Doç. Dr. Atalay SÖKMEN'e, yetişmemde emeği geçen tüm Hocalarıma, Şanlıurfa İl Sağlık Müdürlüğü Harrankapı Şark Çıbanı Teknisyeni Kadri BULUT'a, C. Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bölümü Vet. Hekim'i Yücel YALMAN ve Çalışanlarına, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Teknisyeni Ahmet ACAR'a, deneylerin yapılması ve tez yazımı aşamasında benimle birlikte tüm zahmetlere katlanan Kardeşim Abdullah ATAŞ'a, istatistiki değerlendirmelerde yardımcı olan Biyoistatistik Bölümünden Yrd. Doç. Dr. Ziyet ÇINAR'a, araştırmalarım sırasında katkıları ile desteklerini esirgemeyen Çalışma Arkadaşlarıma, C. Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı Çalışanlarına ve manevi desteklerini hiçbir zaman üzerimden eksik etmeyen sevgili Eşim, Çocuklarım ve Aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TEŞEKKÜR.....	3
İÇİNDEKİLER.....	4
GİRİŞ.....	5
GENEL BİLGİLER.....	8
GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
BULGULAR.....	36
TARTIŞMA.....	66
SONUÇ.....	90
ÖZET.....	92
SUMMARY.....	94
KAYNAKLAR.....	96

GİRİŞ

Şüphe yok ki, bitkiler biyolojik olarak aktif doğal ürünlerin iyi bir kaynağıdır. İnsanlar çok eski zamanlardan beri faydalı bitkilerle ilgilenmişlerdir. İnsan hastalıklarını tedavi etmek için fitoterapinin kullanımı çok uzun bir tarihi sürece dayanır. Günümüzde bu konudaki araştırmaların çokluğu konuya ilginin arttığının açık bir delilidir. Sentetik kimya alanında başarılmış birçok ilerlemeye rağmen, mevcut etkili ilaçların başlangıcı direkt veya indirekt olarak bitkiler alemiyle ilgilidir (82,88,92,110,113).

Etnofarmakoloji, tıbbi amaçlar için kültürel bir topluluk tarafından kullanılan bitkilerin bilimsel olarak araştırılmasıdır. Etnofarmakoloji, isimlendirilmiş bir disiplin olarak yenidir, fakat farklı kültürler arasında uzun süredir bilgi değişimiyle devam etmektedir. Böyle etnofarmakolojik bilgiler, bazı şirketler tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Amazon Ormanları kaynaklı bitki ürünleri, önemli bir ticari gelişim aşamasına gelmiştir (53,72,104).

İngiltere ve Kuzey Amerika’da, günümüzde reçete edilen ilaçların aktif içerikleri ilk önce yüksek yapılı bitkilerde belirlenmiştir. Son 20 yılda batı toplumlarında tıbbi bitkilere olan ilgi (doğal kozmetikler olarak bitkisel ürünlerin kullanımından, bitkilerin insanlardaki biyolojik aktivitesinin bilimsel olarak araştırılmasına) giderek artmaktadır (72,104).

Dünya nüfusunun yaklaşık %75-80’lik kısmı ya ilaç almaya güç yetirememekte, ya da hastalıkların tedavisi için ilaca ulaşamamaktadır. Gelişmekte olan ülkelerin her biri, ağırlıklı olarak bitkilerin kullanımına dayanan geleneksel tıbbın, yerli sistemine sahiptir. Birbirine zıt olarak, gelişmiş ülkelerdeki başlıca sentetik ilaçların yaygın bir şekilde kullanımı, bitkisel ilaçların kullanımını öldürmemiş; yenilenen bir ilgiyi doğurmuştur. Protozoal hastalıkların tedavisi için bitkilerin kullanımının, dünya çapında pekçok ülkede yaygınlaşarak kullanıldığı bildirilmektedir (72,93,104).

Yüksek yapılı bitkilerin antiprotozoal aktivitelerini belirlemek için, en kapsamlı araştırma 1947’de yayınlanmıştır. 600 türden hazırlanan ekstraktların, kuş sıtması etkenlerinden *P. gallinaceum*’u kullanarak civcivlerde, *P. cathemerium* ve *P. lophuræ*’yi kullanarak yavru ördeklerde, in vivo tedavi yetenekleri test edilmiştir (93).

Uluslararası alanda “*Bitkileri koruyarak, yaşamları koruyalım*” sloganıyla, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Mart 1988’de tıbbi bitkilerin korunmasına yönelik bir uluslararası dayanışma kararı alarak “*uluslararası işbirliği ve koordinasyon programları kurarak tıbbi bitkilerin korunması, gelecek nesillere yeteri miktarda bu bitkileri ulaştırmayı sağlamayı*” hedeflemiştir (130).

Tıbbi bitkilerin kullanımı, geleneksel ilaçların en yaygın formu olarak kabul edilmektedir. Tüm flora arasından, 35.000-70.000 türün tıbbi amaçlarla kullanıldığı tahmin edilmektedir. Bunlardan yaklaşık 5.000’i biomedikal araştırmalarda kullanılmıştır. Gelişmekte olan ülkelerde, bitkisel ilaçlar temel sağlık alanındaki önemli rolünü, özellikle de sağlık sigortasının sınırlı olduğu yerlerde, sürdürmektedir. Bitkisel ilaçlar, endüstrileşmiş ülkelerde de popüleritesini artırmaktadır. Ulusal sınırları aşarak genişleyen bu kullanımla birlikte, geleneksel tıp ve bitkisel ilaçların güvenli kullanımı, etkinliği ve kalite kontrolü; gerek bunları kullanan halk, gerekse de sağlık otoriteleri için önemli ilgi alanı oluşturmuştur (132).

Bitkisel ilaçlarla ilgili olarak belirli tanımlar ve bilimsel değerlendirmeler, WHO’nun hazırlamış olduğu The Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines ve Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials’da belirlenmiştir (132,135,136).

Tüm bu gelişmelerin ortasında, Dünya’daki çiçekli bitki türlerinin %10’undan daha azı ilaç potansiyeli için bilimsel olarak araştırılabilmiştir. Ancak diğer yanda yüksek yapılı bitkilerin yaklaşık 60.000 türünün 2050 yılına kadar yok olacağı da tahmin edilmektedir (72).

Dünya’da 800.000, Türkiye’de ise 9.000 civarında bitki türü bulunmaktadır. Gıda elde etmek için kullanılan türler 3.000 civarındadır. Dünyada gıda olarak kullanılan yabancı bitkilerin sayısı 10.000’in üzerindedir. WHO bitkisel ilaçların sayısını 1.900 olarak açıklamıştır. Halbuki tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin sayısı 20.000 kadardır. Bunlardan 600 kadarı da Türkiye’de yetişmektedir (25,53,69,72,88,104,107, 110,113,129).

Türkiye, (Avrupa kıtasının 12.000 türüyle kıyaslandığında) 9.000 çiçekli bitki türüyle tüm kıta Avrupa’sının en büyük florasına sahiptir. Doğu ve Batı arasında bir köprü görevi gören Anadolu, farklı yerlerden gelen farklı kavimler, farklı ırklar, din,

gelenek ve kültürleri bünyesinde bulundurmaktadır. Bu kültürel çeşitlilik ve floranın zenginliğinden dolayı, bu bölgede geleneksel tıbbın büyük bir birikimi vardır. Farklı zamanlarda, farklı bilim adamları tarafından küçük çaplı da olsa geleneksel bitkisel ilaçların araştırılmaları yapılmıştır, fakat yeterli değildir (26,32,46,52,70,88,107,110, 112,113,116,117,140).

Leishmania'lar intrasellüler parazitlerdir. Normal immün yanıt altında yaşayabilirler. Bir kez yerleşince elimine edilmeleri zordur. Kullanılan tedavinin dışında, çeşitli faktörler tedavinin sonucunu etkiler. İlerlemiş olgular tedaviye kötü cevap verir. Genetik faktörlerin etkisi ise pek bilinmemektedir. Altta yatan hastalıklar örneğin malnütrisyon, kemoterapiye cevabı önleyebilir. Hücrel immün yetmezlik de kemoterapinin etkisini azaltır ve relapslar sık görülür. Kemoterapide çok sayıda yeni yaklaşımlar denenmiştir. İmmünoterapinin (konvansiyonel kemoterapi ile birlikte) deneysel olarak visseral leishmaniosis ve kutanöz leishmaniosisde etkili olduğu gösterilmiştir (2,4,16-18,28,35,40,71,74-76,84,121-123).

Leishmaniosis tedavisi ile ilgili geçmişteki uygulamaları değerlendirdiğimizde, gelecekte bu hastalığın tedavisinde önemli sorunlarla karşılaşabileceğimizi söyleyebiliriz. Özellikle AIDS'li hastaların *Leishmania* infeksiyonları yeni tedavi rejimlerine gereksinim göstermektedir. Beş değerli antimon bileşiklerine (Sb^V) hızla gelişmekte olan direnç ülkemiz için de acil sorun oluşturmaya başlamıştır. Hastalığın endemik olduğu ülkelerde tedavi giderlerinin yüksek olması belki de en önemli engeli oluşturmaktadır (2,28,78).

Geleneksel tıptan yeni ilaçların keşfi, yeni bir olgu değildir. Dünya çapında, yüksek yapılı bitkilerden elde edilen klinik olarak faydalı 100'den fazla ilaç reçete edilmektedir. Reçete edilen ilaçların yaklaşık %25'inin içeriği yüksek yapılı bitkilerden elde edilen maddelerdir. Bunların geleneksel tıpta kullanımından dolayı, yaklaşık %74'ü ilaç şirketleri tarafından dikkate alınmıştır (28,53,72,104).

Çalışmamızda, bütün bu bilgilerin ışığı altında, elde edebildiğimiz bazı bitki özütlerinin antileishmanial etkisi, *Leishmania* promastigotları üzerine in vitro koşullarda denenerek; yurdumuz için ilaç eldesi yönünden tedavisi zor olan, deri leishmaniosisi'nin tedavisine yardımcı olabilecek yeni bitkisel kaynakların bulunup bulunamayacağı araştırılmak istenmiştir.

GENEL BİLGİLER

Leishmaniosis, *Leishmania* cinsi parazitik kamçılı protozoonların neden olduğu hastalığa verilen genel bir isim olup, klinik olarak Visceral Leishmaniosis (VL, İç Organlar Leishmaniosis'i veya Kala-Azar), Deri Leishmaniosis'i (CL, Cutaneous Leishmaniosis, Şark Çıbanı, Antep Çıbanı, Yıl Çıbanı, Yıl Yarası, Delhi Ülseri, Aleppo...) ve Mucocutaneous Leishmaniosis (MCL, Espundia) diye ayrılabilir (2,4,5,14,16,18,31,40,71,76,103,122).

Birçok ülkede kentleşme, tarımsal gelişmeye paralel göç hareketlerinin artması ve her geçen yıl HIV/AIDS'in yaygınlaşması nedeniyle leishmaniosisin hem bulaş yolları artmış, hem de yayılımı hız kazanmıştır. Her yıl yeni, 1-1,5 milyon deri leishmaniosis ve 500.000 visseral leishmaniosis olgusunun eklendiği, bu VL olgularının % 90'ının Bangladeş, Brezilya, Hindistan, Nepal ve Sudan'da görüldüğü rapor edilmiştir. Son yıllarda Avrupa'da AIDS/VL ikili enfeksiyonunun birlikteliği özellikle İspanya, İtalya, Fransa ve Portekiz gibi Akdeniz ülkelerinde yoğunlaşmakta ve bu ülkeler için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Yine visserotropik leishmaniosis gibi farklı klinikler ortaya çıkabilmektedir. Irak'ta Çöl Operasyonu'na katılan ABD'li askerlerde *L. tropica*'nın neden olduğu, yorgunluk, eklem romatizması ve ishal gibi belirtiler veren, spesifik olmayan ateşli bir çeşit visseral leishmaniosis gelişmiştir (11,25,38,84,103,133).

Ülkemizde Ege ve Akdeniz bölgelerinde (İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgelerimizde de görülmüştür) daha sık olmak üzere *L. infantum*'un etken olduğu visseral leishmaniosis ve *L. major*'un etken olduğu deri leishmaniosis; Güneydoğu Anadolu ve Doğu Akdeniz bölgelerinde ise *L. tropica*'nın etken olduğu deri leishmaniosis görülmektedir (5,40,103).

İç organlar leishmaniosis'i temelde bir zoonozdur. Çünkü bu parazitozun etkeninin rezervuar konağı köpek ve köpekgillerdir ve bu hayvanlardan insanlara bulaşma olabilmektedir. Fakat Hindistan'da rezervuar konak olmadığı için, o ülkedeki iç organlar leishmaniosis için zoonoz demek doğru değildir. Keza, kentsel bölgelerde de zoonoz özellik kaybolup, insandan insana tatarcıklarla bulaşma olabilmektedir (103).

Eski Dünya'da iç organlar leishmaniosis etkenleri *L. donovani* ve *L. infantum*'dur. Kutanöz leishmaniosis, *L. tropica*'nın deride retikülo endotelial sistem

hücrelerinde ve lenfoid dokuda parazitlenmesi sonucu dermal lezyonlarla ortaya çıkan bir hastalıktır. Parazit iç organlara geçmez. Ancak deney hayvanlarında yapılan çalışmalar etkenin iç organlarda da gelişebileceğini göstermiştir. Bazı araştırmacıların *L. tropica*'nın visseral leishmaniosis'e sebep olabileceği şeklindeki iddiaları, bu görüşü desteklemektedir. Eski dünyada deri leishmaniosis'i etkenleri *L. tropica* (Kuru tip), *L. major* (Yaş tip), *L. aethiopica* (Afrika KL) ve yine son yıllarda bu gruba dahil edilen *L. infantum*'dur (5,71).

Türkiye'de özellikle leishmaniosis'in taşınmasında önemli olan *Phlebotomus* türlerinin hangilerinin vektör olduğu konusu kesinlik kazanmamıştır. Ayrıca Ege bölgesi hariç hangi türlerin hangi bölgelerde yoğunluk kazandığı, mevsimsel aktiviteleri ve olası vektörlerin hangisi olduğu konusundaki bilgiler oldukça az olup, ülkemizdeki yayılışlarının saptanması üzerinde yapılan çalışmalar Akdeniz, Ege, İç Anadolu, Güney Doğu Anadolu bölgelerinde büyük ölçüde tamamlanmış ve toplam olarak 17 türün varlığı bildirilmiştir. Yurdumuz için önemli tatarcıklar *P. major*, *P. perniciosus*, *P. papatasi* ve *P. sergenti*'dir. *L. tropica* insandan insana *P. sergenti* ve *P. papatasi* ile bulaşır (34,103).

Yeni dünyada endemik ve sporadik karakterli VL etkeni *L. chagasi*'dir. *L. mexicana mexicana*, *L. mexicana amazonensis*, *L. mexicana venezuelensis*, *L. mexicana garnhami*, *L. mexicana pifanoi*'den oluşan beş alt türü bulunan ve dış kulak kıkırdağına yerleşen "Şiklero" etkeni olan *L. mexicana*, "Espundia" etkeni olan *L. braziliensis braziliensis*, "Orman piyanı" etkenleri *L. braziliensis guyanensis*, *L. braziliensis panamensis* ve "Uta" etkeni *L. peruviana* yeni dünyadaki mukokutanöz leishmaniosis etkenleridir. *L. braziliensis* ve *L. peruviana* grubu *Leishmania* türleri dudak, farinks, trakea, genital organlar ve kulağı tutarak deri-mukoza sınırında ülserler oluştururlar. Espundia'ya benzer bir klinik durum Habeşistan ve Sudan'da da görülmüştür. Fakat bu olguların etkeninin *L. tropica* olduğuna inanılmaktadır (17,47,74,134).

İnsanın kan ve dokularında yaşayan kamçılılar *Trypanosomatidae* ailesinin *Leishmania* ve *Trypanosoma* cinslerinde bulunmaktadır. Bunların evriminde biri omurgalı (memeli), öteki omurgasız (böcek) olarak iki konak ve amastigot, promastigot, epimastigot, tripomastigot şekillerinden birkaçı bulunmaktadır. Evrimlerinde eşeyli

üreme olmadığı için bu konaklar son veya ara konak olarak tanımlanamaz (5,14,31,71,76,103).

Leishmania türlerinin sınıflandırılmasında tam olarak ortak bir noktaya varılamasa da, Dünya Sağlık Örgütü'nce aşağıdaki şekilde sınıflandırma uygun görülmüştür :

Regnum	:	<i>Animalia</i>
Superphylum	:	<i>Protozoa</i>
Phylum	:	<i>Sarcomastigophora</i>
Subphylum	:	<i>Mastigophora</i>
Classis	:	<i>Zoomastigophorea</i>
Ordo	:	<i>Kinetoplastida</i>
Subordo	:	<i>Trypanosomatina</i>
Familia	:	<i>Trypanosomatidae</i>
Genus	:	<i>Leishmania</i>
Species	:	<i>L. infantum, L. tropica, L. major, L. aethiopica, L. chagasi, L. mexicana, L. braziliensis, L. peruviana</i> (5).

Leishmania türleri memelilerin zorunlu hücre içi parazitidirler ve enfekte dişi kum sinekleri (*Phlebotomus*, Tatarcık, Yakarca) tarafından kan emme işlemi sırasında bulaştırılmaktadır (5,34,103,122).

Amastigot formlar, 2-4 µm büyüklüğünde, yuvarlak veya oval, omurgalı konakta RES makrofajlarının fagolizozomları içinde çoğalmaktadırlar. Kamçısız ve hareketsizdirler. Giemsa ile boyanmış preparatlarda sitoplazma soluk mavi boyanır, içinde pembe veya koyu kırmızı boyanan, arka uca yakın, oldukça büyük bir çekirdek ve ona bitişik kinetoplast görülmektedir. Elektron mikroskobu incelemeleri, amastigotun konak hücrenin oluşturduğu bir zarla örtülü olduğunu göstermiştir. *Leishmania*, amastigot döneminde hareketsizdir ve besinlerini içinde bulunduğu hücreden alır; aerobtur. Amastigot makrofajlar içinde boyuna ikiye bölünerek çoğalır (4,14,71,76,103,122).

Promastigot formlar, *Phlebotomus*'ların bağırsaklarında ve besiyerlerinde bulunan tipik formlardır. Bunlar, 12-20 µm uzunlukta, 1.5-2.5 µm genişlikte olup, mekik şeklinde vücudu ve yaklaşık aynı uzunlukta (20 µm'ye kadar) ön uçtan çıkan

serbest bir kamçısı bulunmaktadır. Çoğalma amastigot formlarda olduğu gibi ikiye bölünme şeklindedir (71,103,122).

Phlebotomus'ların erkekleri ağız yapılarından dolayı kan ile değil bitki özsuyu ile beslenmektedirler. Dişi *Phlebotomus*'lar geceleri kan emmekte, gündüzleri ise karanlık, kuytu yerlerde, taş, tahta yarıklarında, bodrumlarda, kemirgen hayvan deliklerinde bulunmaktadır (5,34,40,76).

Promastigot formlar, *Phlebotomus* memelilerden kan emerken verildikten sonra, *Phlebotomus*'un soktuğu yerdeki makrofajlara girerek amastigot şekline dönüşürler ve deri leishmaniosisini oluştururlar. Bölgede infekte olan veya olmayan mononükleer fagositler, lenfositler, plasma hücreleri ile karakterize bir granümatöz iltihap reaksiyonu oluşur. Önce bir papül vardır, daha sonra bu büyür ve sonunda ülserleşir. Parazitli mononükleer fagositler genellikle elimine edilirler, lenfositler predominant hale gelirler ve epiteloid hücreler ile dev hücreler ortaya çıkar. Nekrozlaşmayan lezyonlar süregen hale geçer ve tüberküloid karakter kazanırlar. Parazitlerin yok edilmesi esnasında derinin üst kısmında ödem ve fibröz gelişir. Bu sırada ufak kılcal damarlarda endotel şişmesi veya damar yangısı olabilir. Lezyonlar genellikle yavaş iyileşirler ve hastalığın geçirildiğinin bir göstergesi olan düz, atrofik bir yara izi bırakırlar (2,4,40,74,103,122).

Dünyada 80 ülkede, 20 milyondan fazla insanın *Leishmania* türleri ile infekte ve her yıl ilave olgu sayısının 400.000 olduğu ve yaklaşık 350 milyon insanın risk altında bulunduğu tahmin edilmektedir. 1990-1994 arası 5 yılda saptanan ölüm olgusu ise 40.000 civarındadır 1998 WHO raporlarına göre ise leishmaniosis her yıl tanı konulan 2 milyon yeni olgusuyla, dünya çapında yaklaşık 12 milyonu etkileyen büyük bir halk sağlığı problemidir (16,27,28,33,37,38,41,60,61,65,74,78,84,93,137).

Çocuklarda daha sık görülmesi nedeniyle çocuk sağlığı açısından da büyük önem taşıyan visseral leishmaniosis, tedavi edilmediğinde yüksek ölüm riskine sahiptir. Herhangi bir tedavi uygulanmаса bile kendiliğinden iyileşen ve kişiyi bağışık hale getiren deri leishmaniosisinin sebep olduğu yara izleri ise hayat boyu vücutta kalarak estetik açıdan sorun yaratmaktadır (11,16,122).

Visseral leishmaniosise neden olan parazit suşları vücut ısısında çoğaldıkları halde, deri leishmaniosisine sebep olan suşlar bu ısıda çoğalmalarını sürdüremezler (4).

İnsanda *L. donovani*'ye karşı doğal bir direnç olduğu halde *L. tropica*'ya karşı yoktur. *L. tropica* enfeksiyonu sonucu iyileşmeyi takiben ömür boyu bir bağışıklık meydana gelir. Bu bağışıklıkta ağırlıklı olarak etkin olan hücresel bağışıklıktır. Ancak şark çıbanına karşı gelişen bu bağışıklık kala-azar'a karşı koruma sağlamaz. Aynı şekilde kala-azar geçirenlerde oluşan bağışıklık da şark çıbanına karşı koruma sağlamaz. *L. tropica* ile *L. major* arasında da bağışıklık yönünden farklılıklar vardır. Örneğin; *L. major*'un (yaş tip) sağladığı bağışıklık *L. tropica*'ya (kuru tip) karşı da etkili olduğu halde, *L. tropica*'nın sağladığı bağışıklık *L. major*'a karşı etkili değildir (4,5,103,122).

Eski Dünyada *Leishmania* cinsinin en az 4 tanesi *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* ve *L. infantum* deri leishmaniosisine neden olabilmektedir. Yeni Dünyada ise etken olarak çok sayıda tür ve alt tür bulunmaktadır (5,14,31,40,76,103,122,137).

Leishmania cinsindeki türlerin ve alt türlerin sınıflandırılmasında, yaptığı hastalıklar, coğrafya dağılışı, epidemiyolojik, serolojik, biyokimyasal, immünolojik ve biyolojik verilerden yararlanılmıştır. Bu amaçla vektör *Phlebotomus*'lardaki gelişmeleri, kemirgenlerdeki virülansları araştırılır, promastigotlar tarafından besiyerine salgılanan faktörlerin (EF= excreted factor) serotipleri saptanır, monoklon antikorlar, iç DNA yapısı, DNA yoğunluğu ve kinetoplastik DNA'nın (kDNA) yapısı incelenir; içerdikleri izoenzimlerin karakterleri de tür ayırımında değer taşır. Özellikle son yıllarda izoenzim analizleri, monoklonal antikorların kullanılması veya kinetoplast DNA'sının incelenmesi sonucunda kesin tür ayırımına gitmek mümkün olabilmektedir (5,11,40,122-124,133,134).

Ülkemizde leishmaniosis deri ve visseral olmak üzere iki klinik şekli görülür. Deri Leishmaniosis Ege bölgesi, Çukurova yöresi ve Şanlıurfa'da en sık görülür. Visseral leishmaniosis ise Doğu Karadeniz, Marmara, Ege, Batı Akdeniz, Çukurova yöresi ve Doğu Akdeniz bölgelerinde görülmektedir. Kala-azar yurdumuzda çoğunlukla kıyı bölgelerimizde görülür fakat İç Anadolu ve Doğu Anadolu Bölgelerimizde de görülmüştür. Ülkemizde deri leishmaniosis etkeni olarak *L. tropica* ve *L. major*, visseral leishmaniosis etkeni olarak *L. infantum* ve *L. donovani* izole edilmiştir (4,5,10,31,40,71,76,103).

L. tropica iç organlara geçmez, ancak deney hayvanlarında yapılan çalışmalar etkenin iç organlarda gelişebileceğini göstermiştir. Bazı araştırmacıların *L. tropica*'nın visseral leishmaniosise sebep olabileceği şeklindeki iddiaları bu görüşü desteklemektedir. Hastalığın seyri ve şiddeti kişinin direncine ve parazitin hastalandırma gücüne göre değişiklik göstermektedir (4,11,14,18,22,40,51,76,103).

Yurdumuzda 1950'lerden sonra deri leishmaniosisi'nin, insan yerleşim alanlarında sıtmaya karşı sivrisinek mücadelesi için uygulanan kalıcı insektisitlerin (DDT) *Phelebotomus papatasi*'leri de öldürmesi nedeniyle insidansı ve prevalansı düşmüştür. Ancak, zamanla 1960'lerden sonra yoğunluğunu artırmaya rağmen, infekte rezervuarın azalmış olması, vektör yoğunluğunun eski düzeyine ulaşmaması, toplumun sosyo-ekonomik seviyesinin yükselmiş olması gibi sebeplerle Şark Çıbanı Güneydoğu Anadolu Bölgesinde daha sık görülmekle birlikte, Orta Anadolu'da sporadik olgular halinde rastlanmaktadır. Şanlıurfa Sağlık Müdürlüğü'nden edinilen bilgilere göre, Şark Çıbanı olgusu bu şehrimizde son birkaç yıl içinde 4000-5000 olguya ulaşmış, Adana'da ise 1993'de 868 ve 1994 yılında 1114 olguya çıkmıştır. Gerek hastalığın bildirilmesi zorunlu hastalıklar kapsamına girmemesi nedeniyle Sağlık Bakanlığı istatistiklerinden öğrenilememesi, gerekse hastanelerde olguların toparlanmasının zor olması nedeniyle hastalığın yurdumuzdaki yayılışı hakkında tam anlamıyla fikir edinilmesi mümkün olamamaktadır. Bu veriler yurdumuzda bir zamanlar yok olma aşamasına gelmiş olan bu parazitozun tekrar yayıldığını ve halk sağlığı sorunu yarattığını göstermektedir (5,11,30,34,40,71,134).

L. tropica enfeksiyonu kentlere yerleşik, insandan insana *P.sergenti* ve *P. papatasi* ile bulaşır. Kuluçka dönemi 2-12 ay, bazen daha uzundur. Genellikle vücudun açık kısımlarındaki deride, el, kol, yüzedir. *L. major* enfeksiyonu kırık bölgelerin zoonoz özelliğinde yaş tip deri leishmaniosisidir. Sporadik vakalar halinde görülür. Kuluçka dönemi 4 aydan azdır ve özellikle bacaklarda gözlenir. Yurdumuzda çoğunlukla *L. tropica*'nın neden olduğu kuru tip, daha az oranda ise *L. major*'un etken olduğu yaş tip lezyonlu deri leishmaniosisine rastlanmaktadır (2,4,5,31,40,71,103,122).

Deri leishmaniosisin tedavisine karar vermek lezyonun büyüklüğüne ve lokalizasyonuna bağlıdır. Tedavide 5-Değerli Antimon Bileşikler, Diamidin Bileşikler, Berberin sülphate, Monomycin, Ketoconazole, son zamanlarda Paromomycin-

Methylbenzethonium Chloride, Paromomisin (aminosidin), Sodyum stiboglukonat, 9-Amino acridine bileşikleri, Lipozomal amfoterisin B gibi ilaçlar kullanılmaktadır (7,16,41,74,78-80,121-123,130,131).

Leishmaniosis paraziter hastalıklar içerisinde, gerek tedavisinin gerekse kontrolünün çok daha zor olması nedeniyle belki de sıtmadan sonra ikinci önemli hastalıktır. Her ne kadar antimonlu ilaçlarla tedavi olanağı varsa da, tedavi pahalıdır ve uzun sürelidir, ilaçlar toksiktir ve tamamiyle etkili olduklarını da söylemek zordur. Parazitler makrofajlar içerisinde korunur. Böylelikle ilaçlar konağa da toksik olabilir (18,25,44,74,78,84,131).

Son yıllarda dirençli suşlara karşı etkili ilaçların bulunmaması ve paraziter hastalıkların yıldan yıla artması parazitolojide özellikle in vivo ve in vitro modellerin oluşturulmasıyla yapılan temel araştırmaların önemini artırmaktadır (3,19,21,42,60,62,95,98,111,118,124,125).

Dünyada leishmaniosis üzerine yapılan çalışmalar, tanıya yönelik yeni testlerin geliştirilmesi, HIV/AIDS ile ilişkisi, deri ve iç organlar leishmaniosisine karşı insan ve özellikle köpeklerde kullanılabilecek aşılarda geliştirilmesi, deri leishmaniosis için lokal, visseral leishmaniosis için genel tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi alanlarında yoğunlaşmıştır (11,16,38,78,125,132).

Biyokimyasal ve immünolojik araştırmalar, parazitlerin kullanılan ilaçlara karşı duyarlı olup olmadığının saptanması için çok önem taşımaktadır. Günümüzde bazı parazitlerin kısa süreli kültüründen yararlanılarak çeşitli ilaçlara karşı duyarlı olup olmadıkları tayin edilebilmektedir (3,16,18,69,82,86).

Uzun süreli kültür hem pratik hem de teorik açıdan önem taşımaktadır. Biyoteknolojik, biyokimyasal v. b. araştırmalar için duyulan fazla miktarda biyokütleyi ancak uzun süreli kültürün yardımı ile elde etmek mümkündür. Parazite ait değişik biyolojik özelliklerin (infektiflik, virülentlik, ilaçlara karşı dirençlilik v.b.) parazitin kendi genomundan mı yoksa parazit ile konak arasındaki ilişkilerden mi kaynaklandığının belirlenmesi çok önem taşımaktadır. Parazitlerin uzun süreli kültürlerde izlenmesiyle, onlarda değişebilen biyolojik özelliklere etki eden faktörleri araştırmak mümkün olabilir (3,14,31,122).

Değişik *Leishmania* türleri üzerine antimikotikler, antibiyotikler, diğer başka kimyasallar, insan serumu, sodyum klorür v.b. gibi maddeler, gerek in vivo olarak amastigotlar üzerinde çalışma veya topikal uygulama ile, gerekse de in vitro olarak araştırılmıştır (9,11,13,20-23,27,30,42,44,48,57,75,77-80,89,106,118).

Leishmaniosis sağaltımında sodyum stiboglukonat ve meglumin antimonat gibi beş değerli antimon (Sb^V) bileşikleri 1947'den beri başarı ile uygulanmaktadır. Genelde, bu bileşikler toksik ve pahalı olup, uzun süreli bir tedaviyi gerektirir. Ayrıca yan etkileri nedeniyle kalp ve böbrek rahatsızlıklarına neden olabilir. Fakat son yıllarda özellikle leishmaniosis tedavisinde bu ilaçlara karşı dirençli olguların sayısındaki artış ve immun yetmezlikli olguların tedavisindeki başarısızlık pentamidin, amfoterisin B, liposomal amfoterisin B (AmbiSome®), allopurinol, ketokonazol, itrakonazol, flukonazol gibi alternatif ilaçların tek başına veya kombine olarak kullanılmasına neden olmuştur. Bu ilaçlara bağlı olarak gelişebilecek kalp ve böbrek üzerine ağır yan etkilerden dolayı, hastaların hastanede tedavi edilmesi, bazı durumlarda ise ikinci veya daha fazla kür tedavi uygulama gereği ortaya çıkmaktadır ki bunlar da araştırmacıları yeni antileishmanial maddeleri araştırmaya itmektedir (13,28,37,57,60,63,84,95,123-125).

Bir kısım tedavi başarısızlıklarında, ikinci kuşak (pentamidin ve amfoterisin B gibi) ajanlar kullanılmaktadır. Bazı olgularda bu ajanlar bile paraziti eradike etmekte başarısız olur. Yeni antileishmanial ajanlar için ihtiyaç sadece başarısız tedavi varlığında değil, daha az toksik ve daha kolaylıkla uygulanabilir ajanların istenmesindendir. Antimonial ajanlar, pentamidin ve amfoterisin B lipozomlar içinde kapsüllendiklerinde, leishmaniosis tedavisinde daha etkili ve serbest kullanımlarından daha az toksik olmaktadırlar. Stearylamin taşıyan pozitif olarak yüklenmiş olan lipozomların leishmanisidal aktivitesi ve onların konak hücrelerine karşı düşük toksisiteleri, başka çalışmaları teşvik etmektedir (21,39,78,84,124,125).

Leishmaniosis, Dünya Sağlık Örgütü'nün tropikal hastalıklar araştırma bölümünde 6 önemli tropikal hastalıktan birisi olarak kabul edilmektedir. Yurdumuz da dahil olmak üzere tropikal ve subtropikal bölgelerde bulunan ülkelerde günümüze kadar bu hastalığın evrimi, hastalığın klinik bulguları, patogenezi, laboratuvar tanısı, tedavisi ve korunması üzerinde birçok çalışmalar yapılmış ve yapılmaktadır. Özellikle immün

yetmezlik bulunan kişilerde güncel bir konu haline geldiği için çeşitli sağlık kuruluşları bu konuya ayrı bir önem vermektedirler (16,74,78,123,130,131,132).

Uzun yıllardan beri leishmaniosis tedavisinde kullanılan Sb^V bileşikleri, gelişen direnç ve tedavideki başarısızlıkların her geçen gün artmasına rağmen günümüzde hala ilk tercih edilen ilaç grubudur. Halen kullanılmakta olan Sb^V bileşikleri meglumin antimonat (Glucantim®) ve sodyum stiboglukonat (Pentostam®). Sb^V 'a direnç visseral leishmaniosisde klinik ve ekonomik yönden önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda ilaca direnç primer veya sekonder olarak görülebilmekle beraber, primer direncin yaygın olarak görülmediği, Sb^V bileşiklerinin HIV-AIDS'li ve immunosupresif ilaç tedavisi gören VL'li hastaların tedavisinde başarısız bulunduğu bildirilmiştir (79,80,84,121).

Farmakolojik aktivite için yapılan ilk testler, hayvansal modellerle yapılmıştır. Fakat şimdi birçok yöntem, hücre kültürlerinde veya enzimatik yollarla biyolojik aktivite testlerinde gerçekleştirilmektedir (113).

Yukarıda bahsedilen verilerden yola çıkarak, çalışmamızda *L. tropica* promastigot hücre proliferasyonu üzerine bazı bitki extrelerinin potansiyel bir inhibitör etki gösterip göstermediği araştırılacaktır. Benzer çalışmalarda gerek amastigot formlar, gerekse promastigot formlar üzerine olan etki incelenmiştir. Antileishmanial madde etkisinin değerlendirilmesi ise çoğunlukla görsel olarak mikroskopik inceleme sonrası elde edilen verilere, radyoizotoplu elementlerle işaretli bileşiklerle yapılan çalışmalara, bazılarında ise MTT (3-[4,5-dimetyl-thiazol-2-yl]-2,5-dipenyltetra-zolium bromide) v.b. gibi kimyasal maddelerle yapılan araştırmalara dayanmaktadır (17,19-24,27-29,57,58, 61-68,98,106,108,111,128).

Leishmania'lara karşı daha etkili ilaçlar için araştırmalar son derece gereklidir. Kemoterapi pentavalan antimonlar v.b. ilaçlarla sağlanmakta olup, bunlar da toksik, sağlanması zor, uzun süreli tedavi ve yüksek maliyet, son zamanlarda klinik olgularda direnç oluşması gibi nedenlerle sınırlı kalmaktadır (95).

İç organlar leishmaniosis ve deri leishmaniosis için kullanılan ilaçlar ülkemizde üretilmemekte ve yurt dışından ithal edilmektedir. Yukarıda da bahsedilen nedenlerle, yurt dışında gerek bu alanda gerekse başka alanlarda yeni ilaç araştırmaları yapılırken, ülkemizde çalışmalar sınırlı kalmaktadır (26,97,107,110,113).

GAP gibi projelerin yapılması, gerek küresel ısınma gerekse yeni barajların v.b. yapılması ile iklimler değişmektedir. Özellikle leishmaniosis endemik olduğu bölgelerde nüfusun diğer bölgelere göre daha fazla artması, bir yandan nüfus hareketleri (Malatya'ya kayısı, Çukurova'ya pamuk, Karadeniz Bölgesine Fındık v.b. toplama gibi), öte yandan kır ve kentin fizik olarak birleşmesi, altyapı eksiklikleri, insektisitlere vektörlerin direnç kazanması nedeni ile Tatarcık kontrol hizmetlerinin zorlaşması ... gibi birçok nedenlerle endemik olan bölgelerin yanı sıra başka bölgelerde de Şark Çıbanı görülmesi riski olabilecektir.

Pentavalan antimonlar potansiyel olarak toksik ve gelişen dirençten dolayı sıklıkla etkisiz olabilmektedir. Amfoterisin B ve pentamidin gibi ikinci kuşak ilaçlar bile toksik olabilmektedir. Bunlardan dolayı yeni, etkili, güvenli terapötik bileşiklerin öncelikli olarak araştırılması gerekmektedir. Bitkiler benzersiz bir kimyasal çeşitliliğe ve yüzlerce ilacın geliştirilmesine yol açacak biyoaktiviteye sahiptir. Bulaşıcı ajanların tedavisi için klinik olarak kullanılan ilaçların çoğunluğu, doğal ürünlerden elde edilmektedir. Antimalarial ajanlar olan quinin, chlorokin, artemisinin ve antiamibik ajan olan emetin başarılı bir şekilde bitkilerden elde edilen örneklerdendir. Yine bir alkaloid olan berberin'in hem kutanöz, hem de visseral leishmaniosise karşı etkinliği klinik ve deneysel olarak gösterilmiş; berberin, jatrorrhizin, palmatin *P. falciparum*'a karşı in vitro olarak aktivite göstermiştir (36,119,126,137).

Farklı ülkelerde kutanöz ve mukokutanöz leishmaniosise karşı bilimsel ilaçlar bulunmadan önce de farklı yöntemler kullanılmıştır. Örneğin: benzin, mazot, gazyağı, sülfirik asit, limon suyu, pillerin içindeki siyah kömür tozu, *Hura crepitans* (Euphorbiaceae) veya *Ficus sp.* (Moraceae) gibi ağaçlardan yakıcı öz suları direkt lezyonlar üzerine konularak veya bazen bir mum aleviyle yara direkt yakılarak tedaviye gidilmiştir (47).

Değişik araştırmalarda, bir bölgenin yerli halkının, yüzyıllar boyunca o yöreyi ve o bölgenin içindeki canlı-cansız her şeyi daha iyi tanımaları nedeniyle, o bölgeye sonradan gelip yerleşen veya araştıranlara göre potansiyel olarak daha etkili bir geleneksel tedavi yöntemine sahip oldukları saptanmıştır (47,59,82,94,129).

Yüksek yapılı bitkiler, yeni antimikrobiyal ajanların potansiyel bir kaynağıdır. Bitki ekstraktlarının araştırılması, çeşitli hastalıkların tedavisinde etkili yeni ilaçların keşfi için bilim adamlarına büyük bir ilham kaynağıdır (72,104,110,113).

Birçok çalışma, etnofarmakolojik araştırmaların, leishmaniosis, diğer protozoonlar ve başka mikroorganizmalara karşı yeni aktif bileşikler bulmanın bir yolu olduğunu göstermiştir. Bir çok araştırmada, çeşitli bitkilerden elde edilen ekstraktlar ve bu ekstraktlardan izole edilen farklı bileşikler, gerek bakteri, virüs, mantarlar, gerekse de değişik parazitler üzerinde, antiviral, antibakteriyel, antifungal ve antiparaziter aktivite yönünden araştırılmıştır (36,47,54,69,82,102,113,138,139).

Geleneksel ilaçların hazırlanmasında kullanılan tıbbi bitkilerin bilimsel olarak değerlendirilmesi, geçmişte olduğu gibi, modern tıba parazitik hastalıkların tedavisi için çok etkili ilaçlar sağlamıştır. Klinikte kullanılan antiprotozoal ilaçların 3'ü, geleneksel tıp sisteminde kullanılan bitkilerden doğmuştur. Keşfedilmiş ilk etkili antimalarial ilaç olan kinin, ilkönce *Cinchona succirubra* bitkisinin kabuklarından izole edilmiş ve şimdi çoğu tropikal ülkede bulunan çeşitli *Cinchona* türlerinden elde edilmektedir. İçeriği daha aktif ve daha az toksik sentetik antimalarial ilaçlara rağmen, *Plasmodium falciparum*'un klorokin'e direnç kazanması nedeniyle, malarya klinik tedavisinde kinin hala kullanılmaktadır. Bu bileşik, çeşitli güçlü antimalarial ilaçların gelişmesi ve sentezi için moleküler bir temel kalıp sağlamıştır. Amoebosidal bir ilaç olan emetine'nin aktivitesi daha modern tıp tarafından tanınmadan önce, yüzyıllardır Asya'da geleneksel tıpta kullanılan bir bitki olan *Cephaelis ipecacuanha*'nın alt kısımlarından elde edilmekteydi. Çin tıbbında kullanılan tıbbi bir bitki olan, *Artemisia annua*'nın yeniden araştırılması, yeni antimalarial ajan olan artemisin'in endoperoksit sesquiterpene içeriğinin belirlenmesine ve izolasyonuna neden olmuştur. Yüksek yapılı bitkilerden çeşitli bileşikler, potansiyel antiparazitik ilaçlar olarak çeşitli laboratuvarlarda değerlendirilmeye çalışılmaktadır (36,60,69,72,82,91,92,104).

Bitkilerden yeni ilaç araştırılmasında temel olarak iki yaklaşım kullanılır. Bunlar, etnomedikal bilginin değerlendirilmesi için geleneksel halk hekimlerinden bilgi toplamak ve hedef parazitlere karşı bitki türlerinin rastgele araştırılmasıdır. İlk yaklaşımın daha verimli olduğu düşünülmektedir. Çünkü nesilden nesile aktarılacak bilgi birikmekte ve oluşabilecek herhangi bir toksik etki uzun yıllar boyunca kullanarak

elenmektedir. Bugün kullanılmakta olan, doğal ürünlerden geliştirilmiş tüm antiparazitik ajanlar geleneksel tıptan elde edilen bilgiyle ortaya konulabilmiştir. Yeni yeni bitkilerin araştırılmasıyla geleneksel tıbbın da bilmediği, bilimsel olarak önem kaydedecek birçok yeni kimyasal etken madde bulunabilecektir (53,60,69,91,102,113).

Yüksek yapılı bitkilerden elde edilen sekonder ürünlerin büyük bir kısmı *Entamoeba*, *Plasmodium*, *Leishmania* ve *Trypanosoma* türlerine karşı in vitro aktiviteye sahiptir. Bu bileşiklerin bazıları in vitro aktiviteye sahiptir fakat bunların çoğunun in vivo aktivitelerinin yanısıra, seçici antiprotozoal davranış ve toksisiteleri yönünden de araştırılmasına ihtiyaç vardır. In vivo değerlendirme yapmadan önce, selektif etkinin ilk bilgileri, protozoa ve memeli hücreleri üzerine in vitro sitotoksitenin karşılaştırılmasıyla elde edilebilir (93).

Değişik araştırmalarda, değişik bitkiler antileishmanial aktivite yönünden araştırılmıştır. Aşağıda araştırdığımız kaynaklardan derlenmiş olan bitki adları ve çalışılan etkin maddeler ('in bir kısmı) aşağıda sunulmuştur:

Abuta pahnii, *A. rufescens* (Menispermaceae); *Acacia sp.* (Leguminosaceae); *Acalypha benensis* (Euphorbiaceae); *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae); *Acanthus illicifolius* -oxazolinone (Acanthaceae); *Aceana ovalifolia* (Rosaceae); *Achyrocline alata*, *A. flaccida*, *A. polycephala*, *A. ramosissima* (Asteraceae); *Afromomum danielli* (Zingiberaceae); *Agathis lanceolata*, *A. australis* (Coniferae); *Agave sisalana* (Amaryllidaceae); *Ageratina azangaroensis*, *A. pentlandii* (Asteraceae); *Albertisia papuana* (Menispermaceae); *Amicia lobliana* (Leguminosaceae); *Ampelocera edentula*, *A. edentula* -tetralone (Ulmaceae); *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae); *Annona spinescens*, *A. haematantha*, *A. senegalensis* (Annonaceae); *Anthostema senegalense* (Euphorbiaceae); *Aristolochia argentina* (Aristolochiaceae); *Artabotrys venustus* (Annonaceae); *Artemia salina nauplii*, *A. senegalensis* (Annonaceae); *Asparagus africanus* -lignan (Liliaceae); *Aniba canelilla* (Lauraceae); *Anomospermum bolivianum* (Menispermaceae); *Artemisia herba alba*; *Azadirachta indica*; *Baccharis genistelloides*, *B. incarum*, *B. dracunculifolia*, *B. pentlandii*, *B. salicifolia*, *B. tricuneata* (Asteraceae); *Balanites aegyptiaca*; *Barnadesia odorata* (Asteraceae); *Berberis aristata* -berberine, *B. boliviana*, *B. paucidentata*, *B. bumeliaefolia*, *B. laurina* (Berberidaceae); *Bocconia integrifolia*, *B. pearcei* (Papeveraceae); *Bredemeyera floribunda* (Polygalaceae); *Brucea*

javanica (Simaroubaceae); *Buddleja incana*, *B. montana*, *B. australis*, *B. tucumanensis* (Loganiaceae); *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae); *Centrolobium sclerophyllum* (Leguminosae); *Chersodoma jodoppapa* (Asteraceae); *Chinothamnus lorentzii* (Asteraceae); *Cola attiensis* -aromatic polysulphur comp. (Sterculiaceae); *Conyza bonariensis* (Asteraceae); *Crescentia cujeta* (Bignoniaceae); *Desmodium gangeticum* -akylamine (Fabaceae); *Dictyoloma peruviana* -4-quinoline alkaloid (Simarubaceae); *Diospyros montana* -diospyrin (Ebenaceae); *Diplostegium haenkei* (Asteraceae); *Dorstenia multiradiata* -anthocynadine (Moraceae); *Dodonea viscosa* (Sapindaceae); *Draceana mannii*, *D. arborea*, *D. mannii* -saponin (Agavaceae); *Duguetia spixiana* (Annonaceae); *Echinacea purpurea* (Asteraceae); *Enantia chlorantha*; *Epilobium denticulatum* (Onagraceae); *Erythraea* sp. (Leguminosae); *Eucalyptus globulus*; *Euphorbia* sp.; *Famea guianensis* (Rubiaceae); *Ficus* sp. (Moraceae); *Fructus aristolochiae*; *Fuchsia boliviana* (Onagraceae); *Fusarium moliniforme* (Deuteromycetes); *Galactia speciosa* (Leguminosae); *Galipea longiflora* -quinolinealkoloid (Rutaceae); *Gamochaeta spicata* (Asteraceae); *Garcinia kola* (Guttiferae); *Glycyrrhiza uralensis*, *G. glabra*, *G. inflata* (Fabaceae); *Gongronema latifolia* -lignan (Asclepiadaceae); *Guetteria foliosa*, *G. schomburgkiana* (Annonaceae); *Gyrocarpus americanus* (Hernandiaceae); *Hedera helix* -saponin (Araliaceae); *Holarrhena curtisii* (Apocynaceae); *Hura crepitans* (Euphorbiaceae); *Hyptis mutabilis* (Labiatae); *Iryanthera* sp. (Myristicaceae); *Jakaranda copaia* -jacaranone, quinol, *J. cuspidifolia* (Bignoniaceae); *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae); *Khaya senegalensis* (Meliaceae); *Lupinus altiliani*, *L. bogotensis* (Leguminosae); *Macfadyena unguisati* (Bignoniaceae); *Marrubium vulgare* (Labiatae); *Maytenus senegalensis*; *Minthostachys andina* (Labiatae); *Monnina macrolada* (Polygalaceae); *Mandevilla antennacea* (Apocynaceae); *Metrodorea flavida* (Rutaceae); *Mikania urticifolia* (Apocynaceae); *Morinda lucida* (Rubiaceae); *Munnozia maronii* -sesquiterpene, *M. fournetii*, *M. maronii* (Apocynaceae); *Mutisia acuminata* (Asteraceae); *Nicandra physaloides* (Solanaceae); *Nicotiana glauca* (Solanaceae); *Nyctanthes arbortristis* -iridoid glycoside (Verbenaceae); *Odontocarya rusbyi* (Menispermaceae); *Oreopanax* sp. (Araliaceae); *Ophryosporus piqueriodes* (Asteraceae); *Oxalis* sp. (Oxalidaceae); *Oxandra espintana* -espintanol (Annonaceae); *Peganum harmala* -harmaline, tryptophan derivat. (Zygophyllaceae); *Peperomia*

apodostachia (Piperaceae); *Pera benensis* -naphthoquinone (Euphorbiaceae); *Perezia multiflora* (Asteraceae); *Periandra mediterranea* (Leguminosae); *Pernettya prostrata* (Ericaceae); *Peschiera australis*, *P. van heurkii* (syn. *Tabernaemontana van heurkii*)(Apocynaceae); *Phytolacca americana* -proteins (Phytolaccaceae); *Picralima nitida* -indole alkaloid (Apocynaceae); *Picrorrhiza kurroa* -picroliv, iridoid glycoside (Scrophulariaceae); *Piper aduncum*, *P. acutifolium*, *P. bolivianum*, *P. coriaceilimbium*, *P. rusbyi*, *P. semimetrale*, *P. elongatum* (Piperaceae); *Plumbago europaea*, *P. zeylanica* -plumbagin (Plumbaginaceae); *Polyalthia macropoda* - labdane (Annonaceae); *Potomorphe peltata* (Piperaceae); *Pseudocedra kotschyana*, *Pseudoxandra sclerocarpa* (Annonaceae); *Pterocaulon alopecuroides* (Asteraceae); *Ricinus communis* - proteins (Euphorbiaceae); *Rothmania withfieldii* (Loganiaceae); *Rynchosia pyramidalis* (Leguminosae); *Salvia haenkei* (Labiatae); *Saracha punctata* (Solanaceae); *Satureja boliviana* (Labiatae); *Schumaniophyton magnificum* (Loganiaceae); *Senna reticulata* (Leguminosae); *Senecio adenophyllioides*; *S. clivicola* (Asteraceae); *Serjania tenuifolia* (Sapindaceae); *Smilax officinalis* (Liliaceae); *Solanum nitidum*, *S. actaeobotrys*, *S. albidum*, *S. aphyodendron*, *S. consimile*, *S. pearcei*, *S. wrightii* (Solanaceae); *Sonchus cornatus*, *Stephania dinklagei* (Menispermaceae); *Stevia yaconensis* (Apocynaceae); *Swertia chirata* (Gentianaceae); *Tabebuia rosea* -lapachol, quinones (Bignoniaceae); *Tagetes minuta* (Asteraceae); *Tamarindus indica*; *Tecoma stans* (Bignoniaceae); *Tessaria integrifolia* (Asteraceae); *Tephrosia vogelii* (Leguminosae); *Triplaris setosa* (Polygonaceae); *Unonopsis buhchitienii* - aporphine alkaloid (Annonaceae); *Vernonia brachycalyx*, *V. amygdalina*, *V. fournetii*, *V. patens*, *V. squamulosa* (Apocynaceae); *Vinca sp.*; *Viola surinamensis*, *V. pavonis* (Myristicaceae); *Werneria nubigena* (Asteraceae); *Xylopia aromatica* (Annonaceae); *Xanthium catharticum* (Asteraceae) (6,8,12,24-26,28,29,37,43,45,47-50,55,56,58,60,61,66,69,73,81,83,92,93,96,101,109, 114,115,118-120,126,137).

Eczacılık biliminin her geçen yıl yaptığı aşamalarla halk ilacı kullanımı giderek terkedilmiştir. Böylece halk kendisine gerekli ilaçları kolaylıkla eczanelerden sağlama olanağına kavuşmuştur. Ancak son yıllarda özellikle endüstrisi gelişmiş ülkelerde sentetik olanlarla birlikte, doğa kökenli ilaçların kullanımı da giderek artmıştır. Çünkü sentetik kökenli ilaçların yan etkileri görülmekte, mikroplar bu ilaçlara karşı dayanıklı

yeni formlar geliştirmektedir. Oysa doğa kökenli ilaçlar mikroplara karşı kesin bir etki göstermekte ve bir yan tesiri olmamaktadır (59, 91,92,94,129,140).

Malarya, amoebiosis, leishmaniosis ve trypanosomiosis gibi yaygın protozoal enfeksiyonların tedavisi için yeni ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Böyle keşiflere gidecek yollar da, protozoal enfeksiyonların tedavisi için geleneksel tıpta kullanılan bitkilerde bulunan doğal bileşiklerde yatmaktadır. Böyle araştırmalar, şu an kullanımda olan in vitro test yöntemleri kullanılarak sürdürülebilmektedir. Aktif bitkileri seçmek ve antimalarial, antiamebik, antitrypanosomal aktivite gösteren bileşiklerin fraksiyonlarını izlemek için de çeşitli in vitro testler kullanılmaktadır (92).

Çalışmamızda kullandığımız bitkilerin birçoğunu rastgele seçtik. Fakat bir kısmı halk tarafından yıllardır, değişik tedavi amaçlarıyla kullanılmaktadır.

Salvia spp. Lamiaceae (Labiataceae) – Ballıbabagiller - (Adaçayı): *Salvia* sp. yeleri farmakolojik açıdan önemli olan uçucu bir yağ (sineol) içerir. *Salvia* türlerinin uçucu yağ oranı %0,05–3.0 civarındadır. *Salvia* türlerinden elde edilen uçucu yağlardan piren’ler, kafur, borneol, 1,8-sineol yönünden zengin olanlar tedavide kullanılmaktadır. Bu cinsin değişik türleri farklı yörelerde, farklı şekillerde çay olarak kullanılmaktadır. Yaprakları sinir yatıştırıcı ve mide için faydalıdır. *S. multicaulis* Vahl. (Kürt reyhanı), *S. virgata* Jacq. yaprakları haricen yaralara iyi gelir. *Salvia* sp.’de genelde uçucu yağların en önemli maddeleri thujan, cineol, kafur, borneol olup farklı adaçayı türlerinde oranları çok değişik bulunmaktadır. Karminatif, yatıştırıcı, mide rahatlatıcı, diuretik, antihidrotik, analjezik, ekspektoran ve dezenfektan etkilerinden dolayı kullanılmaktadır (26,88,105,112,140).

Tanacetum (Pyrethrum) balsamita L., T. parthenium L. Schultz Bip. - Asteraceae (Compositae) – Papatyagiller - (Marsuvanotu, Pireotu, Oltuotu, Gümüş dğme): Ülkemizde 44 tür ile temsil edilir. Bütün bu türler kuvvet verici, uyarıcı, ateş düşürücü ve böcek öldürücü olarak kullanılmaktadır. *T. balsamita* ssp. *balsamita*’nın iekli dalları idrar attırıcı, gaz söktürücü, mideyi rahatlatıcı ve safra kesesi taşlarını düşürücü olarak kullanılmaktadır. *Tanacetum* türlerinde %0,5–1,5 arasında yüksek kontakt insektisit etkisi olan Pyretrin I ve II, Cinerin I ve II, Jasmolin I ve II bulunur. Pyrethrin ve Cinerin kontakt insektisit etkiye sahip maddelerdir. Pyrethrin’lerin etkisi daha yüksektir. Ancak bu toksik etkileri insanlara ve sıcak kanlı hayvanlara etki

yapmamasına karşın soğukkanlı böceklerde kramp etkisi göstermektedir. Sentetik insektisitlere böcekler kolaylıkla bağışıklık kazandıklarından, uygulamada güçlükler çıkmaktadır. Halbuki bu tabii kökenli insektisitlere böceklerin bağışıklık kazanmaları daha güçtür. Bunların uçuculuk özelliği de diğer avantajlı bir yanıdır. Bugün özellikle insektisit olarak geniş çapta kullanılmaktadır (26,46,52,88,105,140).

Allium spp. L. Liliaceae - Zambakgiller: Ülkemizde 146 türü bulunur. Bazı türleri kültür edilerek gıda maddeleri olarak kullanılır. *Allium scorodoprasum ssp. rotundum* (L.) Stearn – (Çatlanguş, Sirmo) Doğu Anadolu’da otlu peynir yapımında ve baharat olarak kullanılmaktadır (70,88,105).

Achillea spp. L. Asteraceae (Compositae) – Papatyagiller - (Civanperçemi, Boyucan, Pireotu, Hazanebel, Akbaşı): *Achillea*’nın birçok türünün çiçekli dalları, yapraklı dalları idrar, gaz ve adet söktürücü, yara iyileştirici olarak kullanılır. Ülkemizde 40 türü bulunur. Çiçekli dallarının özü pirelere karşı kullanılır. Uçucu yağında azulen, limonen, borneol, pirenler ve seskiterpen’in bulunduğu tesbit edilmiştir (46,88,105,140).

Helichrysum plicatum DC. (Altınotu, Herdemtaze, Herdemgüzeli, Yaylaçiçeği, Ölmezçiçeği): Ülkemizde yaklaşık 16 *Helichrysum* türü vardır. *H. plicatum* en yaygın olanıdır. Bitkinin toprak üstü kısımları özellikle böbrek ağrılarını dindirmek için kullanılır. Kimyasal bileşiminde uçucu yağ, kumarin, serbest veya glikozit halinde flavon türevleri bulunmaktadır. Çiçekli dalları idrar ve safra söktürücü, kum düşürücü olarak kullanılır. *H. arenarum*’da apigenin, luteolin, galangin, galangin 3-metil eter, 3,5-dihidroksi 6,7,8-trime toksiflavon, kaempferol, quercetin, naringenin, apigenin 7-glikozit, astragalin, kaempferol 3-diglikozit, helichrysin A, helichrysin B, naringenin 5-diglikozit, isosalopurposit bulunur. *H. neoanum*’da apigenin, galangin 3-metil eter, kaempferol, naringenin, apigenin 7-glikozit, astragalin, helichrysin A,B, naringenin 4’-glikozit, isosalopurposit, kaempferol, astragalin, quercetin 3-glikozit; *H. plicatum ssp. plicatum*’da apigenin, naringenin, isostragalin, quercetin 3-glikozit, helichrysin A,B, isosalopurposit, quercetin, astragalin bulunur (32,46,88,105,107).

Origanum spp. L. Lamiaceae (Labiatae) – Ballıbabagiller – (Mercanköşk, Merzengüş, Güveyotu, Gökkekik, Keklikotu): Uçucu yağ olarak timol içerir. *Origanum* türlerinden elde edilen ve fenol taşıyan uçucu yağlar farmakolojik etkileri

nedeniyle hem tedavide hem de gıda, likör, parfüm ve sabun endüstrisinde kullanılmaktadır. Çiçekli dalları mideyi yatıştırıcı olup iştahsızlık ve hazımsızlıkta kullanılır. Üşütmeye, nezleye, öksürüğe, migrene, anjine iyi gelir. *Origanum* türlerinde'de %0,7–3,5 majoran uçucu yağı bulunmaktadır. Uçucu yağın en önemli kısmını limonen, linalol, linalylacetat, terpinen gibi maddeler oluşturmaktadır (26,88,105,112,140).

Thymus spp. Lamiaceae (Labiatae) – Ballıbabagiller – (Kekik): Ülkemizde 37 türü bulunur. Uçucu yağ olarak timol içerir. Uçucu yağ oranı %0,2–5,2'dir. *Thymus* türlerinden elde edilen uçucu yağlar çoğunlukla timol ve karvakrol yönünden zengin olmakla beraber, bazı türlerin sözü edilen fenoller az ya da hiç içermediği, buna karşılık bazı oksijenli terpenleri majör bileşik olarak taşıdığı da bilinmektedir. Bu uçucu yağlardan sitrol içerenler hem gıda ve parfümeri endüstrisi hem de tedavide, fenoller içerenler ise tedavide ve ilaç endüstrisinde yararlanılabilecek yağlardır. *T. sipyleus* L. bitkisinin tümü dolaşım uyarıcısı, idrar söktürücü, yatıştırıcıdır. Baharat olarak kullanılır. Sahip olduğu uçucu yağ (thymol) kuvvetli dozlarda mikrop kırıcı ve solucan düşürücüdür. *Thymus sp.*'de uçucu yağ oranı iklim, hasat zamanı, kurutma ve depolamaya göre değişir. Uçucu yağın en önemli maddeleri thymol, thymol methyleter, carvachol, cineol, cymol, linalool, borneol, piren, bornylacetat'dır. Kekik eskidenberi hem baharat hem de tababette kullanılmaktadır. Tıpta geniş ölçüde antiparaziter, antispazmodik olarak kullanımı yaygındır (26,88,105,112,140).

Astragalus spp. L. Fabaceae (Leguminosae) - Baklagiller – (Geven, Keven): Ülkemizde 347 türü bulunur. Bunlardan yaklaşık 222 türü endemik olup yalnız ülkemizde doğal olarak yetişmektedir. Bir kısmının gövdesinden kitre zıncı elde edilir. İlaç, tekstil ve gıda sanayiinde oldukça yaygın bir kullanım alanına sahiptir (88,105).

Pimpinella spp. L. Apiaceae (Umbelliferae) – Maydonozgiller: Ülkemizde 23 türü bulunur. Bunlardan *P. anisum* L. (Anason)'un kültürü de yapılır (105,117).

Pelargonium spp. L'Herita – Geraniaceae - Turnagagasigiller – (İtir): Ülkemizde tek türü bulunur. *P. endlicherianum* Fenzl. (Solucanotu). Çoğunlukla Güneybatı, İç ve Doğu Anadolu'da yayılış gösterir. *P. endlicherianum* Fenzl. çiçekli ve yapraklı dal özleri solucan düşürücüdür. Kahramanmaraş ve Malatya yörelerinde taze çiçekleri, kurutulmuş rizomları kurt düşürücü olarak kullanılan bu bitkiden %0,26

oranında bir uçucu yağ, β -sitosterol ve fenolik bir bileşik olan aposinin (=asetovanillon) elde edilmiştir (105,116,140).

Uçucu yağlar bitkilerin bağlı bulunduğu familyalara göre ya salgı tüyünde, ya salgı ceplerinde, ya da salgı kanalı veya salgı hücrelerinde bulunmaktadır (26).

Uçucu yağlar parfümeri, kozmetik ve baharat sanayiinde kullanım yanında yaşayan organizmalara fizyolojik etkileri nedeni ile tıbbi maksatla da kullanılmaktadır. Genellikle uçucu yağdaki tek maddenin değil, maddelerin toplu halde fizyolojik etkisi olmaktadır. Uçucu yağların terapide fazla kullanılmasından dolayı birçok uçucu yağ, çok sayıda kodekse girmiştir (26).

Uçucu yağlar eczacılıkta farmakolojik ve terapik etkilerine göre gruplandırılabilir:

- İrritania (uyarıcı), rubefacientia (deriyi kızartıcı), antirheumatica (antiromatizmal). Örn: *Thymus vulgaris*, ...
- Expectorantia (balgam söktürücü), antitussiya (öksürük kesici). Örn: *Thymus vulgaris*, *T. sipyleus*, ...
- Karminativa (gaz giderici), stomachica (mide yatıştırıcı), cholagoga (safra söktürücü). Örn: *Origanum sp.*, *Allium sativum*, ...
- Anthelmintika (solucan düşürücü). Örn: *Tanacetum cinerariifolium*, *Tanacetum occineum*, *Thymus vulgaris*, ...
- Dezenfektan, antiseptik, antibiyotik. Örn: *Salvia* türleri, *Thymus vulgaris*, *Allium sativum*, ... (26).

Çalışmamızda *Leishmania*'ya karşı etkili, toksik olmayan ve kolay uygulanabilir ilaçlara olan gereksinim göz önüne alınarak, bitki ekstralarının *in vitro* etkileri araştırılmış, bu ekstraların leishmaniosis tedavisinde kullanılabilme olanakları değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız başlıca aşağıdaki aşamalarla gerçekleştirilmiştir:

- I- Bitki özütlerinin elde edilmesi,
- II- Kültürün gerçekleştirilebilmesi için besiyerlerinin hazırlanması,
- III- Leishmania suşlarının elde edilmesi için, Kuru tip Şark Çıbanlı hastalardan örnekler alınarak bu kültürlerin sürdürülmesi,
- IV- Bitki özütlerinin Leishmania promastigotlarına etkisinin saptanabilmesi için mikrodilüsyon çalışmalarının yapılması.

Çalışmamızda 26 bitkiden elde edilmiş, 30 ham (crude) bitki özütünün (ekstrakt), *L. tropica* promastigotlarının hücre proliferasyonu üzerine potansiyel bir inhibitör etkilerinin olup olmadığı araştırıldı. Çalıştığımız Leishmania promastigotları, Şanlıurfa ve Adana yöresinden; hiç tedavi edilmemiş, yeni tesbit edilmiş, 24 Şark Çıbanlı hastadan alınmış olan örneklerden elde edildi. Alınan örneklerden elde edilen suşlardan 8'i üzerinde, 30 bitki özütünün farklı dilüsyonlarının antileishmanial aktiviteleri araştırıldı.

I- Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyelerinden Doç. Dr. Atalay Sökmen ile ortak çalışma sonucu elde edilen bitki özütlerinin (30 farklı ekstrenin bir kısmı endemik, bir kısmı endemik olmayan bitkilerden), 8 farklı Leishmania suşu promastigotlarına karşı etkinliği, kontrol grubu ile kıyaslamalı olarak, belirlenmeye çalışıldı.

Ülkemiz birçok bitki türünün yayılış merkezidir. Gen kaynakları Anadolu'da bulunan bu bitki türlerin çoğunun tıbbi ve endüstriyel kullanımı vardır (88,107,110,113, 140).

Bizde aşağıdaki bitkileri, bir kısmının tedavi edici özelliklerinin gerek bilimsel olarak, gerekse de halk hekimliği tarafından kullanılmasından dolayı, bir kısmını da tesadüfi olarak seçerek antileishmanial aktiviteleri yönünden araştırdık.

Aşağıdaki tabloda çalışmış olduğumuz bitki özütlerinin hangi bitkiden ve bitkinin hangi kısmından elde edildiği gösterilmiştir.

Tablo I – Deneylerde kullanılan bitkiler ve özütlerin hazırlandığı kısımları.

Sıra No	Bitki Adı	Familya	Bitki. Kull. Kısımı
1	<i>Astragalus densifolius</i>	Fabaceae (Leguminosae) Baklagiller	Toprak üstü kısımları
2	<i>Salvia cryptantha</i>	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	Toprak üstü kısımları
3	<i>Astragalus melanophourius</i>	Fabaceae (Leguminosae) Baklagiller	Toprak üstü kısımları
4	<i>Allium nevsehirense</i>	Liliaceae – Zambakgiller	Toprak üstü kısımları
5	<i>Salvia candidissima</i>	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	Toprak üstü kısımları
6	<i>Origanum acutidens</i>	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	Toprak üstü kısımları
7	<i>Thymus sipyleus ssp. rosulens</i>	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	Toprak üstü kısımları
8	<i>Thymus sipyleus ssp. sipyleus</i>	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	Toprak üstü kısımları
9	<i>Helichrysum plicatum ssp. plicatum</i>	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	Toprak üstü kısımları
10	<i>Tanacetum densum ssp. amani</i>	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	Toprak üstü kısımları
11	<i>Allium scorodoprasum ssp. rotundum</i>	Liliaceae - Zambakgiller	Yaprak ve Çiçekleri
12	<i>Allium sivasicum</i>	Liliaceae – Zambakgiller	Toprak üstü kısımları
13	<i>Helichrysum arenarum ssp. aucheri</i>	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	Toprak üstü kısımları
14	<i>Helichrysum noeanum</i>	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	Toprak üstü kısımları

15	<i>Salvia ruselli</i>	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	Toprak üstü kısımları
16	<i>Tanacetum parthenium</i>	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	Çiçekleri
17	<i>Pimpinella anicetum</i>	Apiaceae (Umbelliferae) Maydonozgiller	Toprak üstü kısımları
18	<i>Allium sivasicum</i>	Liliaceae – Zambakgiller	Soğanı
19	<i>Salvia virgata</i>	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	Toprak üstü kısımları
20	<i>Allium nevsehirense</i>	Liliaceae – Zambakgiller	Soğanı
21	<i>Achillea teretifolia</i>	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	Yaprak ve Çiçekleri
22	<i>Salvia syriaca</i>	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	Toprak üstü kısımları
23	<i>Tanacetum densum ssp. sivasicum</i>	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	Çiçekleri
24	<i>Pelargonium endlicherianum</i>	Geraniaceae-Turnagasıgiller	Toprak üstü kısımları
25	<i>Thymus pectinatus var. pectinatus</i>	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	Toprak üstü kısımları
26	<i>Helichrysum chionophyllum</i>	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	Çiçekleri
27	<i>Tanacetum balsamita ssp. balsamita</i>	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	Toprak üstü kısımları
28	<i>Allium dictyoprasum</i>	Liliaceae – Zambakgiller	Toprak üstü kısımları
29	<i>Helichrysum chionophyllum</i>	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	Yaprak ve Dalları
30	<i>Tanacetum parthenium</i>	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	Yaprak ve Dalları

Bitki Materyalinin Toplanması

Sivas yöresinden 2001 yılında toplanan, bir kısmı endemik olan bitkilerin sistematığı Cumhuriyet Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü tarafından yapılmıştır.

Ekstraksiyon (Özütleme) İşlemi

Ekstraksiyon işlemi farklı araştırmalarda farklı şekilde yapılmıştır (2,26,28,32,37,47,61,101,109,119).

Tür teşhisi yapılmış bitkilerin, yaprak ve çiçek kısımları gövde ve köklerinden ayrılarak kurutulmaya alındı.

Kuru havada, oda sıcaklığında kurutulan bitkilerde, uçucu bileşikler hariç, kimyasal maddelerin kaybolmadan veya bozulmadan, aksine kurutmayla bitkilerin su içeriği giderilerek, daha kolay özütleme gerçekleştirilmektedir (26).

Kurutulmuş bitki materyalleri küçük parçalar haline getirilip, soxhlet özütleme sistemine yerleştirilerek sistem çalışmaya hazır hale getirildi.

Sistemin Hazırlanışı

Soxhlet cihazı üç kısımdan oluşmaktadır:

- 1- Çözücüye Taşıyan Balon:** Çözücü olarak metanol (MeOH) kullanıldı. Isıtılarak buharlaşan çözücü (MeOH), cihazın yoğunlaştırıcı kısmına gelmektedir.
- 2- Yoğunlaştırıcı:** Cihazın üst kısmında yer alan yoğunlaştırıcı, buharlaşmış olan metanolü yoğunlaştırarak sıvı hale getirmektedir.
- 3- Soxhlet Birimi:** Çok küçük parçalar haline getirilerek cihaza konulmuş olan bitki materyalindeki metanolde çözülebilen bileşikler, yoğunlaştırıcıdan gelen sıcak metanolde çözünerek balon kısmına inmektedir.

Yoğunlaştırıcı, bitki parçalarını içeren soxhlet birimi ve balon özel ısıtıcısı ile beraber hazırlandı. Balonun içerisine yaklaşık 150 ml. kadar metanol konuldu. Balonun üzerinde bulunduğu özel ısıtıcının sıcaklığı 60 °C'ye ayarlanarak yaklaşık 36 saat sistem çalıştırıldı. Yoğunlaştırıcının en üst kısmı metanolün uçmasını önlemek amacıyla hidrofobik pamukla kapatıldı.

Buharlaştırma

Buharlaştırma işlemiyle, soxhlet sisteminde elde edilen bitki özütünün bulunduğu metanolün uzaklaştırılması ve böylece kaba bir özüt elde edilmesi amaçlanmıştır. Buharlaştırma işlemi için evaporatör kullanıldı. Evaporatör balonunda, soxhlet sistemi yardımıyla metanolde çözünmüş olan özüt yaklaşık 45 °C’de vakumda buharlaştırılarak bitki özütü ile metanol birbirinden ayrıldı.

Metanolden arındırılan bitki özütüne yaklaşık 10 ml. distile su eklendi. Suda çözünen ve çözünmeyen kısımların ayrıştırılması için yaklaşık 10 ml. kadar da kloroform eklendi. Bu karışım ayırma hunisine alınarak, farklı renk ve yoğunluktaki iki ayrı faz, suda ve kloroformda çözünebilen kısımlar olarak, birbirinden ayrıldı. Böylece suda veya kloroformda çözünebilen kimyasallar bitkinin uygun kısımlarından ekstrakte edilmiş oldu.

Liyofilizasyon

Liyofilizasyonla, hazırlanan özütlerin düşük sıcaklık (≥ -40 °C) ve basınçta (10^{-1} atm) dondurularak kurutulması ve özütlerin uzun süre saklanılabilmesi sağlandı. Özel liyofilizatör tüplerine alınan özütler -173 °C’de sıvı azotta donduruldu. Daha sonra liyofilizatörde liyofilize edildi. Tüplerdeki toz haldeki özütler şişelere alınarak çalışılıncaya kadar derin dondurucuda saklandı.

II- Leishmania promastigotlarının üretilmesi için aşağıdaki besiyerleri hazırlandı:

NNN (Tavşan Kanlı Tuzlu Agar) Besiyeri

İlk izolasyon için en iyi besiyerlerinden biri olan bu besiyeri için,

- Agar 3.5 gr.
- NaCl 1.5 gr.
- Saf su 225 ml. karıştırılıp, 121°C’de 20 dk. otoklavlanarak hem sterilizasyon yapılp, hem de agarın tam olarak erimesi sağlandı. Otoklavdan çıkarılan karışım 45-50°C’ye kadar soğutuldu. Steril şartlarda tavşan kalbinden

alınıp, steril cam boncuklu şişede defibrine edilmiş 60 ml. kan, 100 IU/ml. penicillin G, 100 µg/ml. streptomycin bu karışıma eklenerek karıştırıldı.

- Karışımdan 125x16 mm.lik tüplere 5'er ml. dağıtılıp, tüpler eğik durumda, kondansasyon sıvısının daha fazla olması için buzdolabında bırakılarak katılaşması beklendi. 24 saat 37 °C'de kontaminasyon kontrolü yapıldıktan sonra -20 °C veya +4 °C'de saklandı.

RPMI-1640 Besiyeri

Promastigot proliferasyonu için kullanılacak olan bu besiyeri L-Glutamin'li, Hepes'li (Sigma) olarak katı halde, hazır olarak alınıp Sodyum bikarbonat (Merck) ve %20 Fetal Calf Serum (FCS) (Sigma) katılıp, 0.22µm çaplı filtreden (Sartorius), Seitz filtresinde süzülerek tüplere dağıtıldı (Bundan sonra bu karışıma RPMI-1640 besiyeri denilecektir).

Hastalardan, NNN besiyerine alınarak promastigot forma dönüşmüş olan *Leishmania*'lar, NNN ve RPMI-1640 besiyerinde çoğaltıldı.

Çalışmamızda, "*şayet tavşan kanı bulamazsak veya NNN'den daha kısa sürede ve fazla sayıda promastigot üretebilirmiyiz ?* " diye kendimizin oluşturduğu bir besiyerini de denedik. Besiyerini aşağıdaki şekilde hazırladık:

- Agar 3,5 gr,
- NaCl 1,5 gr,
- Dextroz 2 gr ,
- Pepton 2 gr,
- Brain Hart İnfüzyon Agar 2 gr ,
- Bu maddelerin üzerine 225 ml saf su eklenip, karıştırılarak iyice erimesi sağlandı. 121 °C'de 20 dk. otoklavlanarak hem sterilizasyon yapıp, hem de agarın tam olarak erimesi sağlandı. Otoklavdan çıkarılan karışım 45-50°C'ye kadar soğutuldu.
- Cam boncuklu steril kaba, çalkalanıp defibrine edilerek alınan insan kanı (0 Rh+ ve A Rh+), 56 °C'de yarım saat inaktive edildi.

- Yukarıda belirtilen insan kanından 85 ml eklendi. 100 IU/ml. penicillin G, 100 µg/ml. streptomycin bu karışıma eklenerek karıştırıldı. Karışım 125x16 mm'lik tüplere 5'er ml. dağıtılıp, tüpler eğik durumda, kondansasyon sıvısının daha fazla olması için buzdolabında bırakılarak katılaşması bekledi. 24 saat 37 °C'de kontaminasyon kontrolü yapıldıktan sonra -20 °C veya +4 °C'de saklandı.

III- Birçok hücre ve moleküler biyolojik, biyokimyasal, immünolojik çalışmalarda laboratuvarıda üretilebilen *Leishmania* türlerinin sürekli pasajlarla canlılığının korunması mümkün olabilmektedir. Ancak, kültürde parazitin canlılığı korunabildiği halde *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda enfekte etme yeteneklerinin azaldığı vurgulanmaktadır. Bu nedenle, parazitin izolasyon sonrası kùltive edilme süresi yapılacak çalışmaları etkilemektedir (Bununla birlikte, Beaver'ın(14) Adler ve Zuckerman'dan bildirdiğine göre Locke-Serum ve Locke-Blood Agar'da 22 yıl kùltivasyondan, 800 transferden sonra bile infeksiyon oluşturulmuştur) (9,13).

Yukarıdaki nedenlerden dolayı uzun süreli pasajlarla canlılığı sürdürölen suşlar yerine, Ağustos-Eylöl 2001'de bizzat gidilerek, Şark Çıbanı etkenlerinin en fazla bulunduğu yörelerimizden olan Şanlıurfa'dan (Merkez, Suruç, Akçakale, Harran) 21, Adana'dan 3 (daha önce Şark Çıbanına yönelik hiç tedavi görmemiş) hastadan; muayene edilerek, yara olan bölgeler kaydedilerek, örnek alınıp NNN besiyerine ekim yapıldı. Aynı zamanda ince yayma preparat da yapılarak, Giemsa ile boyanıp etken arandı (5,33,67,75,80,85-87).

Tablo II – Şanlıurfa ve Adana yöresinden, örneklerin alındığı hasta adları ve örneklerin alındığı yara bölgeleri (Promastigot üremesinin olduğu hastalar ve hangi örnekte ürettiği koyu renkle gösterilmiştir. Ş=Şanlıurfa, A=Adana).

Hasta No	Hasta Adı-S.	Yaşı	Cins.	Şark Çıbanının Bulunduğu Yer
01 Ş	K. O.	40	B	Sol Üst Kol - Sağ Göz Kapağı - Burun Üstü
02 Ş	Y. P.	4	E	Sol Yanak – Sol Diz Kapağı – İç Bilek
03 Ş	A. K.	8	E	Sol El 2-3. Parmaklar Arası
04 Ş	İ. A.	15	E	Sol El 2-3. Parmaklar Arası
05 Ş	E. G.	4	E	Sol Yanak

06	Ş	M. H.	11	B	Sağ Üst Kol
07	Ş	H. Ö.	15	B	Burun Ucu
08	Ş	D. G.	22	B	Sol El Bilek Üstü
09	Ş	Ö. D.	4	B	Sağ Kol Üstü
10	Ş	A. K.	16	E	Sol Yanak Burun Üzeri
11	Ş	Ş. K.	5	B	Sağ Göz Burun Üzeri
12	Ş	M. A.	4	E	Sol Göz Burun Hizası
13	Ş	D. K.	9	E	Sağ Üst Kol
14	Ş	H. S.	11	E	Sol Yanak
15	Ş	B. T.	7	E	Sağ Taraf Dudak Üstü
16	Ş	K. U.	19	B	Sağ Taraf Burun Üzeri
17	Ş	M. M.	9	E	Sol El Baş İşaret Parmağı Arası
18	Ş	H. C.	5	E	Sol Yanak
19	Ş	İ. C.	8	E	Sol Bacak Diz Kapağı Bilek Arası
20	Ş	Ş. S.	8	B	Sağ El Üzeri - Sol Kol Bileği
21	Ş	K. C.	11	B	Sol Taraf Burun Yanak Arası
22	A	E. Ç.	27	E	Sağ Üst Kol
23	A	D. A. K.	13	E	Sağ Yanak
24	A	E. K.	37	B	Sol Taraf Dudak Yanak Arası

Temmuz-Ağustos aylarında Şanlıurfa'dan getirilen 21 hasta materyalinden sadece 7'sinde promastigotlar üredi. Diğerleri takip edildi fakat üreme olmadı. 1,2,3,4,7,9,17 Nolu hastalardan alınan örneklerde üreyen suşlar, NNN besiyerinde üretilmeye çalışıldı. Fakat daha sonra 9 ve 17 no'lu suşlarda mantar üredi. Tüm uğraşlarımıza rağmen mantardan kurtaramadık. Daha sonraki çalışmalarda bu iki suş çalışmaya alınmadı. Ağustos-Eylül aylarında Adana'dan getirilen 3 hasta materyalinde, eski tecrübelerden de faydalanılarak promastigotların üretilmesi başarıldı.

Türkiye'deki deri leishmaniasisi *L. major*'un etken olduğu yaş tip daha az olmak üzere, *L. tropica*'nın etkenliğini yaptığı antroponotik tipteki epidemilerle karakterize, kuru tip lezyonu olandır. Hastalardan alınan bilgilerden uzun süredir olması, kabarık, üzeri kabuklu, hafif sızıntılı olması, genellikle vücudun açık kısımlarında, el, yüz gibi yerlerde olması, nedeniyle suşların *L. tropica* olduğuna karar verildi (4,5,14,31, 71,76,86,103,122).

IV- Bitki Ekstraktları İle Deneylerin Yapılış Aşamaları:

- a- Daha önceden hazırlanmış olan katı haldeki bitki özütleri steril serum fizyolojik ile sulandırılıp, vortekslenerek iyice çözünmesi sağlandı. Bu çözelti 56 °C'de, 3 gün ard arda, Benmari'de tinalize edildi.
- b- Promastigotlar, (birçok kez yapılan denemelerde çoğalmanın en kısa sürede en fazla olduğu) NNN besiyerinde veya NNN+RPMI-1640 besiyerinde çoğaltıldı.
- c- Buradan alınan promastigotlar 50ml.'lik steril tüplerde, 3000 devirde, 10 dk. santrifüj edilerek üstte kalan süpernatant atıldı. Promastigotlar RPMI-1640 besiyeri ile sulandırılarak, hemositometrede formaldehit (%0,9'luk Serum Fizyolojik'ten 90 ml. + 10 ml. Formalin) ile promastigotların hareketleri durdurularak sayıları ayarlandı (1.000.000 promastigot / ml).
- d- Promastigot sayısının ayarlanması: Thoma lamında 1 büyük karenin genişliği 1 mm, Thoma laminin derinliği 0.1 mm olduğu için $1\text{ mm (en)} \times 1\text{ mm (boy)} = 1\text{ mm}^2$, $1\text{ mm}^2 \times 0.1\text{ mm (derinlik)} = 0.1\text{ mm}^3$, $0.1\text{ mm}^3 \times 10 = 1\text{ mm}^3$, $1\text{ mm}^3 \times 1000 = 1000\text{ mm}^3 = 1\text{ ml}$ 'deki promastigot sayısı bulundu. Sayımlarımızda, Thoma laminin 4 büyük karesi sayılarak ortalaması alındı. 1 büyük kare 0.1 mm^3 olduğu için, $10.000 \times \text{Büyük Kareler Ortalaması} = \text{mm}^3$ 'deki promastigot sayısı olarak değerlendirildi.
- e- İlk 5-6 bitki özütü ile yapılan çalışmalarda, dilüsyona başlanacak ilk çözelti 1 mg/ml olarak hazırlanmıştı. Fakat yapılan deneylerde promastigotlar üzerine etkinlik az bulununca, ekstraktan 8 mg/ml'lik çözelti hazırlandı ve deneylerde bu konsantrasyondan başlanarak 1/2'lik dilüsyonlar uygulandı.
- f- Steril şartlarda, daha önce hazırlanmış olan sulandırılmış özüt ve promastigotların besiyerine ekimleri şu şekilde gerçekleşti:

Steril, 96 gode'li mikrotitre plaklarına her bir suş ve her bir özüt için;

- Çukurlara 100'er µl RPMI-1640 besiyeri eklendi.
 - Kontrol grubu olan ilk godeden sonraki 2. godeye, başka bir mikrotitre plağının boş bir godesinde 16 mg/ml olarak ayarlanmış olan özütten 100µl konuldu. (İlk konsantrasyonumuz olan 8 mg/ml'nin diğerleriyle eşit miktarda besiyeri ve promastigot alabilmesi için.)
 - 100 µl RPMI-1640 besiyeri ve 100 µl özüt bulunan 2. gode mikropipet ile iyice karıştırılarak, buradan 100 µl'lik karışım bir sonraki godeye aktararak 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, 15,62 µg/ml, 7,81 µg/ml'lik dilüsyonlar hazırlandı.
 - Dilüsyonlar hazırlandıktan sonra her bir godenin üzerine hemositometrede sayısı belirlenmiş olan promastigotlardan (1×10^6 /ml), 100'er µl (1×10^5) eklendi.
 - Yani bir çukurcukta, kontrol grubu için 100 µl RPMI-1640 besiyeri + 100 µl promastigot; diğerleri için 100 µl RPMI-1640 besiyeri + 100 µl özüt + 100 µl promastigot konulmuş oldu.
- g-** Hazırlanmış olan mikrotitre plaklarının üstü steril, yapıştırıcı selofanbant ile kapatılarak 26 °C'de 4 gün inkübe edildi.
- h-** 4. günün sonunda etüvden çıkarılan plağın her bir godesi mikropipet ile iyice karıştırıldıktan sonra, hemositometre'de (Thoma lamı) sayıldı (Önce direkt sayıldı. Canlı sayısı fazla olup sayım zorlaştığında serum fizyolojik ile 5-10 kat sulandırıp yeniden sayım yapıldı. Sulandırım faktörüyle çarpılarak sonuç bulundu).
- ı-** Deneyler her bir bitki özütü ve her bir suş için, farklı zamanlarda en az 3 kez tekrarlandı. Bazı deneyler 4-5 kez çalışıldı.
- i-** Veriler daha sonra SPSS istatistik programında analiz edildi.

BULGULAR :

Çalışma, gereç ve yöntemde belirtilen aşamalardan geçtikten sonra, elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur.

Çalışmada, promastigotların proliferasyonu için kullanılan RPMI-1640 sıvı besiyerinin konulduğu steril, kültür kaplarında veya 125x16 mm'lik deney tüplerinde promastigotlar yeterince üremedi. Fakat deneylerimiz sırasında godelerde belirgin bir şekilde promastigot üremesi gözlemlendi (Kullanılan deney tüpleri cam, mikrotitre plakları ise plastikten idi).

Çalışmalarımız sırasında tesadüfen saptamış olduğumuz bir bulgu da pamuk lifciklerinin olduğu tüplerde, RPMI-1640 besiyerinde daha iyi bir üreme gözlenmesidir. Deney tüplerine pamuk lifciklerinden bir parça atılıp sterilize edildikten sonra, 0.22 µ'luk filtreden süzölmüş olan RPMI-1640 besiyerinden 5 ml eklenmiş olan tüplerde daha iyi üreme saptandı. Adeta promastigotların pamuk liflerine tutunup çoğaldıkları gözlemlendi.

En iyi üreme, klasik NNN besiyerinin kondansasyon sıvısının üzerine (besiyerinin yatık kısmının uzunluğuna göre) yaklaşık 1-2 ml RPMI-1640 besiyeri eklenip, 5-6 saat dinlendirildikten sonra ekim yapılan besiyerlerinde elde edildi. Bu besiyerinde yaklaşık 5-6. günde, promastigotların logaritmik fazı (koloniler de dikkate alındığında yaklaşık $80-100 \times 10^6$ promastigot/ml) gözlemlendi. Buradan alınan promastigotlar taze RPMI-1640 besiyeri ile seyreltilerek 1×10^6 promastigot/ml'ye ayarlandı ve deneylerde kullanıldı.

Yapılan pasajlarda, yukarıdaki besiyerindeki promastigotlarda 19. günün sonunda halen canlılık vardı. 20. günde canlı sayısında hayli azalma; 22. günde ise deformasyon, içlerinde boşalmalar, besiyerinde promastigot parçaları, hareketsizlik v.b. gibi olaylarla canlılıklarını yitirdikleri gözlemlendi.

Bizim hazırladığımız besiyerinde de bol miktarda üreme oldu. Promastigotların boylarının NNN'dekine göre biraz daha uzadıkları ve kalınlaştıkları gözlemlendi. 6-7. günde NNN + RPMI-1640 besiyerinde ulaşılan promastigot sayısından düşük sayıda (yaklaşık $70-80 \times 10^6$ promastigot/ml) promastigot saptandı. Yine hiç pasaj yapmadan bırakıldığında 18-19. günde canlılıklarının azalmaya başladığı gözlemlendi.

Yapılan deneylerin sonucunda ortaya çıkan sonuçlar tablolar haline getirilerek, SPSS istatistik programında ve grafikler yapılarak değerlendirildi (Tablo VI ve VII, Grafik 1-32).

Özütlerle yaptığımız ilk denemelerde 1 mg/ml'lik konsantrasyonlardan başlamıştık, fakat etkinin az olması nedeniyle konsantrasyona 8 mg/ml'den başlanarak dilüsyonlar hazırlandı. Her suş için en az 3 deney tekrarlandı. Suşların ekstraktlara karşı davranışlarında önemli bir farklılık saptanmadığı için, 8 suşun deneylerinin ortalamaları alınarak sonuçlar değerlendirildi.

Sayılmış olan canlı promastigotların ortalamaları saptandıktan sonra, kontrol deneylerinde elde edilen sonuçlarla karşılaştırılarak, promastigotların %50'sini inhibe eden inhibisyon konsantrasyon değerleri (IC_{50}) hesaplandı.

IC_{50} değerleri, çalışmış olduğumuz her bir konsantrasyondaki üremiş olan canlı promastigotların sayısının kontrol değerlerinden, ayrı ayrı çıkarılmasıyla elde edilen, inhibe edilmiş promastigotların %'sinin bulunmasıyla saptandı. Bulunan bu inhibisyon %'leri, grafik çizilerek, promastigotların %50'sini inhibe ettiği nokta saptanarak hesaplandı.

Farklı deneylerde elde edilen kontrol sonuçlarında, 4. gün sonundaki canlı promastigot oranları yaklaşık 3.000.000-5.000.000 promastigot/ml. arasında bulundu. Deneylerden elde edilen sonuçlar Tablo-VI ve VII'da görülmektedir.

Bitki ekstraktları, 8 mg/ml'den başlanarak 7.81 μ g/ml'ye kadar RPMI-1640 besiyeri ile dilüe edildi. Godeler küçük olduğu için, promastigotlar için mümkün olduğu kadar fazla besiyeri sağlayabilmek amacıyla, ekstraktlar besiyeri ile dilüe edildi.

Ortalama alındığı için ortalama değerlerinde görülme de, deneylerin bazılarında belirli bir konsantrasyondan sonra, ekstraktın promastigot sayısını daha fazla artırdığı görüldü. Yani yüksek konsantrasyonlarda belirli bir etkilenmeden sonra; konsantrasyon düşünce promastigotların, bir nevi ekstraktı kullandığı gözlemlendi.

Deneylerde Şanlıurfa'dan getirdiğimiz Glucantime® (1.5 gr/5 ml, RPR Pharma Specialites, Paris, France) de denenmiş olup, saptanan sonuç ortalamaları aşağıdaki gibi çıkmıştır (Tablo III, IV ve Grafik 1,2).

8 mg/ml'lik konsantrasyon denemelerinde Glukantim®'den 26.7 µl ilk godeye ekleyerek, diğer dilüsyonlar buradan yapıldı (Tablo III). Yine denemek amacıyla Glukantim®'den 100 µl (30 mg/ml) alınarak da Glukantim® denendi.

Tablo III - 1.5 gr/5 ml Glucantime®'den, 26.7 µl (= 8 mg/ml) alınarak yapılan deney sonuçları ortalamaları.

K	8 mg/ml	4 mg/ml	2 mg/ml	1 mg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml	62.5 µg/ml	31.25 µg/ml	15.62 µg/ml	7.81 µg/ml
365	47	105	185	220	260	285	290	290	295	295	300

Tablo IV - 1.5 gr/5 ml Glucantime®'den, 100 µl (= 30 mg/ml) alınarak yapılan deney sonuçları ortalamaları.

K	30 mg/ml	15 mg/ml	7.5 mg/ml	3.75 mg/ml	1.87 mg/ml	937 µg/ml	469 µg/ml	235 µg/ml	118 µg/ml	59 µg/ml	30 µg/ml
360	3	20	48	75	115	185	220	230	255	290	300

Deneylerin sonuçları elde edildikten sonra, canlı promastigot sayısındaki ani artış olan ara dilüsyon bölgelerinde ek deneyler yapılarak, promastigot gelişimleri izlendi.

2 no'lu bitkinin 4 - 2 mg/ml arasına 3 mg/ml ;

4 no'lu bitkinin 2 - 1mg/ml arasına 1.5 mg/ml ;

5 no'lu bitkinin 8 - 2 mg/ml arasına 7, 6, 5, 3 mg/ml ;

6 no'lu bitkinin 2 mg/ml - 250 µg/ml arasına 1500, 750, 375 µg/ml;

10 no'lu bitkinin 2 mg/ml - 250 µg/ml arasına 1500, 750, 375 µg/ml;

11 no'lu bitkinin 500 - 125 µg/ml arasına 375, 187.5 µg/ml ;

12 no'lu bitkinin 8 - 2 mg/ml arasına 7, 6, 5, 3 mg/ml ;

16 no'lu bitkinin 2 mg/ml - 250 µg/ml arasına 1500, 750, 375 µg/ml ;

18 no'lu bitkinin 8 - 2 mg/ml arasına 7, 6, 5, 3 mg/ml ;

19 no'lu bitkinin 8 - 2 mg/ml arasına 7, 6, 5, 3 mg/ml ;

20 no'lu bitkinin 1000 - 250 µg/ml arasına 750, 375 µg/ml ;

21 no'lu bitkinin 8 - 2 mg/ml arasına 7, 6, 5, 3 mg/ml ;

23 no'lu bitkinin 4 - 1 mg/ml arasına 3, 1.5 mg/ml ;

27 no'lu bitkinin 2 mg/ml - 250 µg/ml arasına 1500, 750, 375 µg/ml;

28 no'lu bitkinin 4 - 1 mg/ml arasına 3, 1.5 mg/ml ;

30 no'lu bitkinin 2 mg/ml – 500 µg/ml arasına 1500, 750 µg/ml'lik dilüsyonlar hazırlanarak, üçerli ek deneyler yapıldı.

Özellikle dilüsyon konsantrasyonu aralıkları arttıkça pik yapma oranlarının arttığı gözlemlendi. Fakat konsantrasyon aralıklarının yakın olduğu bölgelerde pik yapanların ise, inhibitör etkisi fazla olan bitki ekstraktlarında olduğu gözlemlendi. Canlı promastigot sayısının ilk dilüsyondan itibaren belirli miktarda olduğu deney gruplarında, daha sonraki ara dilüsyonlarda da dengeli gittiği görüldü. Oysa, promastigot sayısının ya 0, ya da çok az olarak başladığı deney gruplarında (yapılan ara konsantrasyon deneylerinde) pik yapma oranının aniden başladığı gözlemlendi.

Yapılan deneylerde, *L. tropica* promastigotlarına karşı IC₅₀'si bulunan bitki özütleri, Tablo III, Grafik 1'deki Glucantime® sonuçları ile kıyaslanarak, etkin olup olmadıklarına karar verildi.

Çalışmamızda Sivas yöresinden toplanan 26 farklı bitkiden, 30 metil alkol ekstraktı hazırlandı. Tablo I'de de gösterildiği gibi *Allium nevsehense* ve *Allium sivasicum*'un hem soğanı, hem de toprak üstü kısımlarından; *Tanacetum parthenium* ve *Helichrysum chionophyllum*'un ise çiçek, yaprak ve dallarından ayrı ayrı özütler hazırlanıp, ayrı ayrı çalışıldı.

1 No'lu bitki ekstraktımız *Astragalus densifolius* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri grafik 3'de de görüldüğü gibi **4531 µg/ml** olarak bulundu. Tablo III, Grafik 1'deki aynı miktardaki Glucantime®'in (8 mg/ml) IC₅₀ değeri ile kıyaslandığında, Glucantime®'e göre antileishmanial aktivite saptanamamıştır.

2 No'lu bitki ekstraktımız *Salvia cryptantha* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **1442 µg/ml** olarak bulundu. (8 mg/ml'lik

konsantrasyonda 8 suş karşı yapılan 3'lü deneylerin ($8 \times 3 = 24$ deney) hiç birinde de canlı promastigota rastlanmadı. 4 mg/ml'lik konsantrasyon ortalamasında 3.12×10^4 canlı promastigot/ml'ye rastlandı. 2 mg/ml'lik konsantrasyon ortalamasında 128.5×10^4 'lik ani yükselmeye rastlandı. Daha sonra yapılan ek deney ortalamalarında, 3 mg/ml'lik konsantrasyonda mililitrede 55×10^4 canlı promastigot saptandı. Diğer konsantrasyonlarda canlı promastigot sayısı dengeli bir şekilde artarak kontrolün altında seyretti. Glucantime®'le kıyaslandığında etki saptanmıştır.

3 No'lu bitki ekstraktımız *Astragalus melanophourius* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC_{50} değeri **5628 $\mu\text{g/ml}$** olarak bulundu. Çalışmalarımızda kullandığımız 2 *Astragalus* türünün ikincisi olan bu tür de, diğer ekstraktların deney sonuçlarıyla kıyaslandığında, antileishmanial aktivite yönünden çok düşük bulunmuştur. Antileishmanial etki saptanamamıştır.

4 No'lu bitki ekstraktımız *Allium nevsehirense* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC_{50} değeri **1077 $\mu\text{g/ml}$** olarak bulundu. 8 ve 4 mg/ml'lik konsantrasyon deneylerinde hiç canlı promastigota rastlanmadı. 2 mg/ml'lik konsantrasyonda mililitrede 3×10^4 promastigota rastlandı. 1 mg/ml'lik konsantrasyonda 237.25×10^4 'lik bir promastigot yoğunluğu ile karşılaşıldı. Yapılan ek deneylerde, 1.5 mg/ml'lik konsantrasyonda ortalama 145×10^4 promastigot oranına rastlandı. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite saptandı.

5 No'lu bitki ekstraktımız *Salvia candidissima* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC_{50} değeri **2943 $\mu\text{g/ml}$** olarak saptandı. Diğer bazı deneylerde de rastladığımız gibi, ilk konsantrasyonlarda promastigot sayısındaki bir düşüşten sonra promastigot miktarı artıp, hatta kontrolü geçip, son konsantrasyonlara doğru tekrar düşüşe geçtiği görüldü (Tablo V). Antileishmanial aktivite saptanamadı.

6 No'lu bitki ekstraktımız *Origanum acutidens* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC_{50} değeri **444 $\mu\text{g/ml}$** olarak bulundu. 8, 4, 2 mg/ml'lik konsantrasyon godelerinde hiç üreme olmadı. 1 mg/ml'lik godelerde mililitrede ortalama 67.75×10^4 , 0.5 mg/ml'de 137×10^4 , 250 $\mu\text{g/ml}$ 'de 244.87×10^4 canlı promastigota rastlandı. Daha sonra yapılan ek deneylerde 1.5 mg/ml'de 17×10^4 , 750 $\mu\text{g/ml}$ 'de 91×10^4 , 375 $\mu\text{g/ml}$ 'de 170×10^4 promastigot/ml saptandı. Diğer

konsantrasyonlardaki mililitredeki promastigot miktarları $250-260 \times 10^4$ 'lar civarında devam etti. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite açısından oldukça etkili bulundu (Grafik 1 ve 8).

7 No'lu bitki ekstraktımız *Thymus sipyleus ssp. rasulens* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **6664 µg/ml** olarak bulundu. Glucantime®'le kıyaslandığında etkili bulunmadı.

8 No'lu bitki ekstraktımız *Thymus sipyleus ssp. sipyleus* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **5779 µg/ml** olarak bulundu. Çalışmamızda kullandığımız üç kekik alt türünden bu iki alt türün antileishmanial aktivitesi, diğer alt tür olan *T. pectinatus ssp. pectinatus*'dan daha az bulunmuştur. Glucantime®'le kıyaslandığında etkili bulunmadı.

9 No'lu bitki ekstraktımız *Helichrysum plicatum ssp. plicatum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **5354 µg/ml** olarak bulundu. Glucantime®'le kıyaslandığında etkili bulunmadı.

10 No'lu bitki ekstraktımız *Tanacetum densum ssp. amoni* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **406 µg/ml** olarak bulundu. Bu ekstraktımızın da 8, 4, 2 mg/ml'lik konsantrasyonlarında hiç üreme olmadı. Daha sonra yapılan ek deneylerde 1.5 mg/ml'lik konsantrasyonda ortalama 3×10^4 , 750 µg/ml'de 71×10^4 , 375 µg/ml'de 170×10^4 promastigot/ml'ye rastlanmıştır. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite yönünden oldukça etkili bulundu.

11 No'lu bitki ekstraktımız *Allium scorodoprasum ssp. rotundum* bitkisinin toprak üstü kısımları olan yaprak ve çiçeklerinden hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **131 µg/ml** olarak bulundu. Çalıştığımız ekstraktların içinde en etkin bulunan bu bitkinin toprak üstü kısımları Doğu Anadolu'da otlı peynir yapımında ve baharat olarak kullanılmaktadır. 8, 4, 2, 1 mg/ml'lik konsantrasyonlarda hiç üreme görülmeyp, 0.5 mg/ml'de mililitrede 4.37×10^4 promastigot saptandı. 500-125 µg/ml arasında yapılan ek deneylerde 375 µg/ml'de 79×10^4 , 187.5 µg/ml'de ise 205×10^4 promastigot saptandı. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite yönünden en etkin ekstrakt olarak saptandı.

12 No'lu bitki ekstraktımız *Allium sivasicum* bitkisinin toprak üstü kısımları olan yaprak ve çiçeklerinden hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **1395 µg/ml** olarak

bulundu. Hem toprak üstü, hem de soğanının ekstraktını çalıştığımız bu bitkinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan 8 mg/ml'lik konsantrasyonda hiç üreme gözlenmedi. Daha sonra çalıştığımız ek deneylerde 7 ve 6 mg/ml'lik konsantrasyonlarda da hiç üreme olmaz iken; 5 mg/ml'lik konsantrasyonda ortalama 5×10^4 , 3 mg/ml'lik konsantrasyonda ise 88×10^4 promastigot/ml'ye rastlandı. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite saptandı.

13 No'lu bitki ekstraktımız *Helichrysum arenarum ssp. aucheri* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **3713 µg/ml** olarak bulundu. Glucantime®'le kıyaslandığında etkili bulunmadı.

14 No'lu bitki ekstraktımız *Helichrysum neoanum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri 6376 µg/ml olarak saptandı. Glucantime®'le kıyaslandığında etkili bulunmadı.

15 No'lu bitki ekstraktımız *Salvia ruselli* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **891 µg/ml** olarak bulundu. Çalıştığımız *Salvia* türleri içerisinde en etkin olanı bu tür çıkmıştır. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite saptandı.

16 No'lu bitki ekstraktımız *Tanacetum parthenium* bitkisinin çiçeklerinden hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **382 µg/ml** olarak bulundu. 8 ve 4 mg/ml'lik konsantrasyonlarda hiç üreme olmadı. 2000-500 µg/ml'lik konsantrasyonlar arasında yapılan ek deneylerde 1.5 mg/ml'lik konsantrasyonda 33×10^4 , 750 µg/ml'de 117×10^4 , 375 µg/ml'de ise 165×10^4 canlı promastigot saptandı. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite yönünden oldukça etkili bulundu.

17 No'lu bitki ekstraktımız *Pinpinella anisetum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **403 µg/ml** olarak bulundu. Mililitredeki promastigot sayısı 8 mg/ml'lik konsantrasyondan, 7.81 µg/ml'lik konsantrasyonlara kadar kontrolden çok düşük seyrettiği görüldü. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite yönünden oldukça etkili bulundu.

18 No'lu bitki ekstraktımız *Allium sivasicum* bitkisinin soğanından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **869 µg/ml** olarak bulundu. 8 mg/ml'lik konsantrasyonda 1×10^4 promastigot saptanırken; 500 µg/ml'lik konsantrasyona kadar dengeli bir şekilde artıp, bu konsantrasyondan itibaren $250-350 \times 10^4$ seviyelerinde devam ettiği görüldü.

Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite yönünden, toprak üstü kısımlarına göre daha etkili bulundu.

19 No'lu bitki ekstraktımız *Salvia virgata* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **2379 µg/ml** olarak bulundu. 8-4 mg/ml arasında yapılan ek deneylerde, 7 mg/ml'de 53x10⁴, 6 mg/ml'de 75x10⁴, 5 mg/ml'de 93x10⁴, 3 mg/ml'de ise 137x10⁴ promastigot/ml saptandı. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite saptanamadı. Fakat Glucantime® değerine yakın çıktı.

20 No'lu bitki ekstraktımız *Allium nevsehirense* bitkisinin soğanından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **345 µg/ml** olarak bulundu. 8, 4, 2, 1 mg/ml'lik godelerde hiç canlı promastigota rastlanmadı. Yapılan 750 ve 375 µg/ml'lik ek deneylerde sırasıyla 11x10⁴ ve 170x10⁴ canlı promastigot saptandı. Fakat 250 µg/ml'lik konsantrasyonlardan sonra promastigot üremesinde ani yükselmeler görülerek, kontrol miktarlarını dahi geçmiştir. 4 no'lu ekstraktımız olan aynı bitkinin toprak üstü kısımlarında da benzer değerler saptanmıştır. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite yönünden oldukça etkili bulundu.

21 No'lu bitki ekstraktımız *Achillea teretifolia* bitkisinin yaprak ve çiçeklerinden hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **2652 µg/ml** olarak bulundu. 8 mg/ml'lik konsantrasyonda hiçbir canlı promastigota rastlanmadı. Yapılan ek deneylerde 7 ve 6 mg/ml'lik konsantrasyonlarda da hiç üreme görülmedi. 5 mg/ml'lik konsantrasyonda mililitrede 13x10⁴, 3 mg/ml'de ise 117x10⁴ canlı promastigot saptandı. 2 mg/ml'den sonra ise 250-300x10⁴ arasında seyrettiği görüldü. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite saptanamadı.

22 No'lu bitki ekstraktımız *Salvia syriaca* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **7441 µg/ml** olarak bulundu. Deneylerde kullandığımız beş *Salvia* türü arasında en etkisizi bu tür olmuştur. Tüm konsantrasyon godelerinde de promastigot üremesi yüksek saptandı. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite saptanamadı.

23 No'lu bitki ekstraktımız *Tanacetum densum ssp. sivasicum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **681 µg/ml** olarak bulundu. 8 ve 4 mg/ml'lik konsantrasyonlarda hiçbir canlı promastigota rastlanmadı. Yapılan ek deneylerde 3 mg/ml'lik konsantrasyonlarda ortalama 9x10⁴, 78x10⁴ promastigot/ml

saptandı. 500 µg/ml'lik konsantrasyondan itibaren 7.81 µg/ml'lik konsantrasyona kadar mililitredeki canlı promastigot sayısı $300-400 \times 10^4$ arasında gözlemlendi. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite yönünden oldukça etkili bulundu.

24 No'lu bitki ekstraktımız *Pelargonium endlicherianum* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **5375 µg/ml** olarak saptandı. Çalıştığımız bitkinin ülkemizde tek türü bulunur. *P. endlicherianum* Fenzl. (Solucanotu). Çoğunlukla Güneybatı, İç ve Doğu Anadolu'da yayılış gösterdiği belirlenen bu bitkinin, farklı yörelerde taze çiçekleri, kurutulmuş rizomları kurt düşürücü olarak kullanılmaktadır. Fakat biz *L. tropica* promastigotlarına karşı fazla bir etkinlik saptayamadık. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite saptanamadı.

25 No'lu bitki ekstraktımız *Thymus pectinatus* var. *pectinatus* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **535 µg/ml** olarak saptandı. 8 ve 4 mg/ml'lik konsantrasyonlarda hiç üreme görülmedi. Deneylerimizde, elde ettiğimiz üç değişik *Thymus* alt türünü antileishmanial aktivite için çalıştık. Fakat bunlardan *Thymus sipyleus* ssp. *rosulens* ve *Thymus sipyleus* ssp. *sipyleus*'un IC₅₀ değerleri çok yüksek iken, *Thymus pectinatus* var. *pectinatus*'un IC₅₀ çok daha düşük çıkmıştır. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite yönünden oldukça etkili bulundu.

26 No'lu bitki ekstraktımız *Helichrysum chionophyllum* bitkisinin çiçeklerinden hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **4325 µg/ml** olarak bulundu. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite saptanamadı.

27 No'lu bitki ekstraktımız *Tanacetum balsamita* ssp. *balsamita* bitkisinin yaprak ve çiçeklerinden hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **375 µg/ml** olarak bulundu. 8 ve 4 mg/ml'lik konsantrasyonlarda hiç üreme gözlenmedi. 2 mg/ml-250 µg/ml'lik godeler arasında yapılan ek deneylerde 1.5 mg/ml, 750 ve 375 µg/ml'lik konsantrasyonlar kullanıldı ve sırasıyla 5×10^4 , 57×10^4 , 151×10^4 değerleri saptandı. Çalıştığımız beş *Tanacetum* ssp. ekstraktı içinde en etkin ekstraktımız bu olmuştur. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite yönünden oldukça etkili bulundu.

28 No'lu bitki ekstraktımız *Allium dictyoprasum* bitkisinin toprak üstü kısımları olan yaprak ve çiçeklerinden hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **1865 µg/ml** olarak bulundu. 8 mg/ml konsantrasyonda üreme olmaz iken, deneyler ortalaması 0.62 promastigot çıkan 4 mg/ml'lik konsantrasyonun, deneylerinin bazılarında hiç üreme olmadığı görüldü. Yapılan ek deneylerde 3 mg/ml'de 43x10⁴, 1.5 mg/ml'de ise 182x10⁴ promastigot/ml saptandı. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite yönünden etkili bulundu.

29 No'lu bitki ekstraktımız *Helichrysum chionophyllum* bitkisinin yaprak ve dallarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **3405 µg/ml** olarak bulundu. Çiçek ekstraktını da çalıştığımız bu bitkinin yaprak ve dallarının ekstraktının antileishmanial aktivitesi daha fazla bulunmuştur. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite saptanamadı.

30 No'lu bitki ekstraktımız *Tanacetum parthenium* bitkisinin yaprak ve dallarından hazırlanan ekstrakt olup, IC₅₀ değeri **714 µg/ml** olarak saptandı. 16 no'lu ekstraktımız olan bu bitkinin çiçeklerinden hazırlanan ekstrakt daha etkin çıkmıştır. 8 ve 4 mg/ml'lik konsantrasyonlarda hiç üreme görülmezken, deneylerde 2 mg/ml'lik konsantrasyonların bazılarında da üreme olmadığı görüldü. Yapılan ek deneylerde 1.5 mg/ml'de 43x10⁴, 750 µg/ml'de ise 174x10⁴ promastigot/ml saptandı. Glucantime®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite yönünden oldukça etkili bulundu.

Tablo V - IC₅₀ değerlerine göre bitki ekstraktlarının etkinlik sıralaması.

Etki Sıra No	Bitki Adı	Bitki. Kull. Kısmı	Familya	IC ₅₀ (µg/ml)
1	<i>Allium scorodoprasum</i> ssp. <i>rotundum</i>	Yaprak ve Çiçekleri	Liliaceae – Zambakgiller	131
2	<i>Allium nevsehirense</i>	Soğanı	Liliaceae – Zambakgiller	345
3	<i>Tanacetum balsamita</i> ssp. <i>balsamita</i>	Toprak üstü kısımları	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	375
4	<i>Tanacetum parthenium</i>	Çiçekleri	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	382
5	<i>Pimpinella anicetum</i>	Toprak üstü kısımları	Apiaceae (Umbelliferae) Maydonozgiller	403
6	<i>Tanacetum densum</i> ssp. <i>amani</i>	Toprak üstü kısımları	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	406
7	<i>Origanum acutidens</i>	Toprak üstü kısımları	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	444

8	<i>Thymus pectinatus</i> var. <i>pectinatus</i>	Toprak üstü kısımları	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	535
9	<i>Tanacetum densum</i> ssp. <i>sivasicum</i>	Çiçekleri	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	681
10	<i>Tanacetum parthenium</i>	Yaprak ve Dalları	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	714
11	<i>Allium sivasicum</i>	Soğanı	Liliaceae – Zambakgiller	869
12	<i>Salvia ruselli</i>	Toprak üstü kısımları	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	891
13	<i>Allium nevsehirense</i>	Toprak üstü kısımları	Liliaceae – Zambakgiller	1077
14	<i>Allium sivasicum</i>	Toprak üstü kısımları	Liliaceae – Zambakgiller	1395
15	<i>Salvia cryptantha</i>	Toprak üstü kısımları	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	1442
16	<i>Allium dictyoprasum</i>	Toprak üstü kısımları	Liliaceae – Zambakgiller	1865
17	<i>Salvia virgata</i>	Toprak üstü kısımları	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	2379
18	<i>Achillea teretifolia</i>	Yaprak ve Çiçekleri	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	2652
19	<i>Salvia candidissima</i>	Toprak üstü kısımları	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	2943
20	<i>Helichrysum chionophyllum</i>	Yaprak ve Dalları	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	3405
21	<i>Helichrysum arenarum</i> ssp. <i>aucheri</i>	Toprak üstü kısımları	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	3713
22	<i>Helichrysum chionophyllum</i>	Çiçekleri	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	4325
23	<i>Astragalus densifolius</i>	Toprak üstü kısımları	Fabaceae (Leguminosae) Baklagiller	4531
24	<i>Helichrysum plicatum</i> ssp. <i>plicatum</i>	Toprak üstü kısımları	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	5354
25	<i>Pelargonium endlicherianum</i>	Toprak üstü kısımları	Geraniaceae-Turnagagasıgiller	5375
26	<i>Astragalus melanophourius</i>	Toprak üstü kısımları	Fabaceae (Leguminosae) Baklagiller	5628
27	<i>Thymus sipyleus</i> ssp. <i>sipyleus</i>	Toprak üstü kısımları	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	5779
28	<i>Helichrysum noeanum</i>	Toprak üstü kısımları	Asteraceae (Compositae) Papatyagiller	6376
29	<i>Thymus sipyleus</i> ssp. <i>rosulens</i>	Toprak üstü kısımları	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	6667
30	<i>Salvia syriaca</i>	Toprak üstü kısımları	Lamiaceae (Labiatae) Ballıbabagiller	7441

Çalışmamızda 6 farklı familyadan 10 cins, 25 tür üzerinde çalışılmıştır. Çalıştığımız 26 bitkiden 30 metanol ekstraktı elde edilmiştir.

Papatyagiller (Asteraceae) ailesinden 11 ekstrakt elde edilmiş, bunlardan 5'i; Zambakgiller (Liliaceae) ailesinden elde edilen 6 ekstraktan hepsi; Ballıbabagiller (Lamiaceae) ailesinden 9 ekstrakt çalışılmış ve bunlardan 4'ü; Maydonozgiller (Apiaceae) ailesinden 1 ekstrakt kullanılmış ve bu da etkin bulunmuştur.

Baklagiller (Fabaceae) ailesinden 2 türden elde edilen 2 ekstrakt etkin bulunmamıştır.

Turnagasıgiller (Geraniaceae) ailesinden 1 türden hazırlanan ekstrakt da etkin bulunmamıştır.

Antileishmanial aktivite yönünden *Allium*, *Tanacetum*, *Pimpinella*, *Origanum* en etkin cinsler olarak saptanmıştır. Farklı 3 *Thymus* alt türünün çalışıldığı ekstraktlardan sadece *Thymus pectinatus* var. *pectinatus* aktif bulunmuş; diğer 2 alt tür aktif bulunmamıştır. *Salvia* türlerindé de benzer durum ortaya çıkmıştır. *S. ruselli* ve *S. cryptantha* etkin bulunurken, diğer *Salvia* türleri etkin bulunmamıştır.

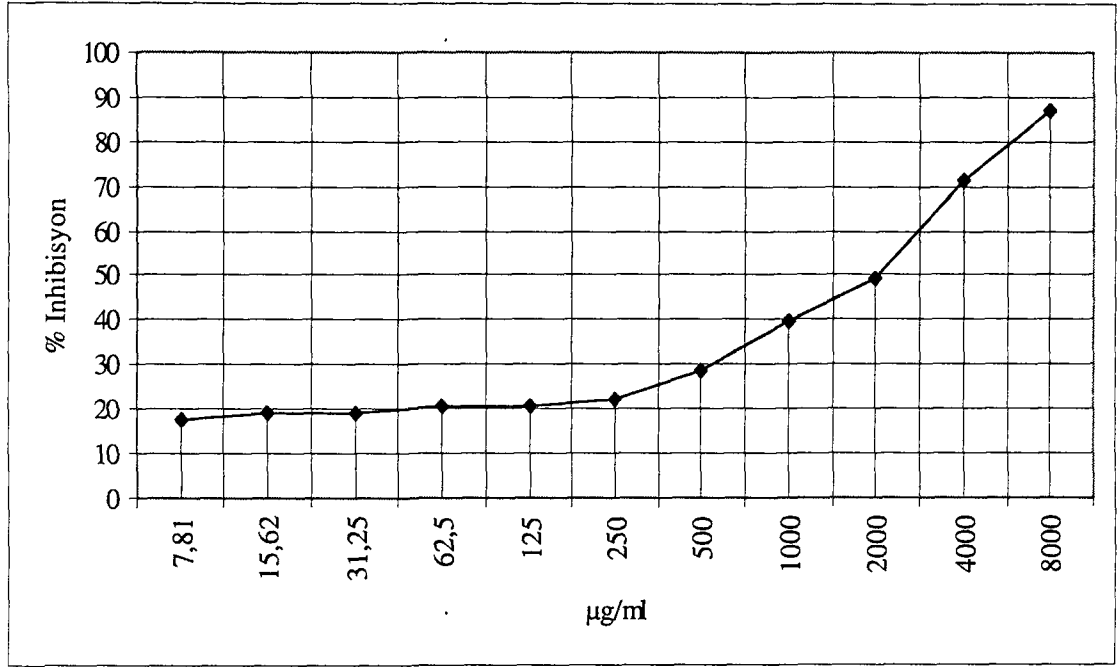
Papatyagiller, Ballıbabagiller ailelerinden bir kısım cinsler aktif bulunurken, *Salvia* ve *Thymus* cinslerinin bir kısmı aktif; *Achillea* ve *Helichrysum* cinsleri antileishmanial aktivite göstermemişlerdir.

Bitki No :	Kontrol		8 mg/ml		4 mg/ml		2 mg/ml		1 mg/ml		0.5 mg/ml		250 µg/ml		125 µg/ml		62,5 µg/ml		31,25 µg/ml		15,62 µg/ml		7,81 µg/ml	
	Ort.	St. Ht.	Ort.	St. Ht.	Ort.	St. Ht.	Ort.	St. Ht.	Ort.	St. Ht.	Ort.	St. Ht.	Ort.	St. Ht.	Ort.	St. Ht.	Ort.	St. Ht.	Ort.	St. Ht.	Ort.	St. Ht.	Ort.	St. Ht.
1	350,37	16,07	114,37	4,58	184,50	4,49	231,00	5,24	239,12	6,73	261,62	10,70	267,12	11,52	284,75	7,35	280,25	6,11	295,25	7,15	305,12	7,14	301,00	4,08
2	325,87	6,39	,00	,00	3,12	,89	128,50	13,90	190,25	8,01	199,00	4,47	222,37	6,47	216,50	2,87	224,12	4,91	238,25	6,32	250,12	2,46	270,62	5,34
3	362,25	10,02	42,50	2,63	276,25	7,44	290,50	4,65	302,12	3,75	318,25	4,74	318,50	5,42	315,25	6,25	327,00	10,62	327,25	7,93	310,50	6,59	307,75	6,01
4	438,37	17,57	,00	,00	,00	,00	3,00	1,23	237,25	7,10	327,87	6,93	346,12	4,39	354,62	6,74	365,00	6,63	380,75	3,55	377,75	5,88	395,62	5,91
5	414,87	12,66	37,87	3,33	152,00	16,04	255,50	12,64	318,50	22,03	400,00	18,36	411,37	15,32	429,37	25,34	418,12	33,21	411,12	16,22	407,25	9,22	397,50	10,14
6	322,12	13,67	,00	,00	,00	,00	,00	,00	67,75	2,78	137,00	5,79	244,87	8,85	250,75	7,48	251,12	9,50	221,37	7,80	257,25	7,98	260,75	5,00
7	369,25	18,91	125,12	11,60	303,37	11,22	339,00	15,11	345,25	14,74	340,50	14,15	332,62	19,37	332,37	14,57	323,75	5,86	311,87	5,61	314,12	9,86	305,25	7,69
8	341,12	6,64	81,00	9,50	242,25	23,54	278,00	22,18	314,75	21,92	333,62	21,19	328,37	12,52	316,75	13,40	302,00	9,74	326,62	16,57	288,62	21,94	327,50	14,23
9	359,75	21,36	68,50	5,28	236,87	8,77	271,00	11,01	296,75	13,03	265,12	10,16	286,12	8,90	288,75	8,84	305,12	9,12	289,12	12,87	284,87	9,97	310,87	8,80
10	324,25	6,43	,00	,00	,00	,00	,00	,00	24,50	1,54	136,37	16,40	204,87	13,55	264,25	7,83	264,12	9,51	265,87	10,74	278,00	10,63	285,62	6,47
11	490,00	49,31	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	4,37	,96	107,62	25,67	252,00	12,26	325,62	23,81	334,62	27,59	360,62	14,90	377,75	11,49
12	339,37	22,83	,00	,00	58,12	18,47	117,37	18,24	203,87	18,96	275,37	30,37	281,50	31,90	275,75	31,66	273,37	24,23	261,62	20,85	239,87	17,16	238,37	12,44
13	308,00	11,14	55,12	3,29	149,00	8,42	183,75	8,25	216,12	8,79	225,62	8,98	226,87	6,34	248,87	6,78	222,25	7,08	227,25	8,92	222,12	7,67	244,12	8,03
14	357,37	12,40	136,87	5,18	239,87	4,80	262,62	9,10	264,00	6,33	284,37	6,46	262,12	5,46	269,87	12,60	280,87	6,06	262,00	9,98	284,00	6,97	270,12	4,33
15	461,50	14,52	116,50	4,96	150,12	5,62	172,37	6,79	219,50	11,43	271,00	8,22	310,12	9,76	350,62	13,25	390,37	13,77	410,87	22,04	392,62	16,76	396,25	5,42
16	364,87	36,48	,00	,00	,00	,00	10,00	2,03	91,75	3,28	153,62	12,34	214,50	16,71	224,12	12,12	237,62	5,16	259,75	13,14	256,62	13,80	265,25	21,10
17	318,75	18,42	45,25	4,34	99,50	13,63	118,12	10,57	129,62	11,75	152,62	12,88	170,12	6,06	177,37	8,66	162,75	7,51	177,62	11,94	175,12	8,38	219,37	18,65
18	415,00	8,11	1,00	,18	53,87	28,40	130,87	11,45	191,37	19,43	253,12	8,59	309,12	12,35	364,37	7,70	366,62	7,81	340,87	14,89	367,62	6,98	340,50	10,46
19	355,50	27,63	48,50	4,56	114,12	19,43	192,62	13,91	207,37	11,20	244,87	9,94	236,62	6,56	255,25	10,02	259,50	10,70	239,50	3,47	254,12	9,38	274,00	8,15
20	377,25	11,37	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	,00	51,00	8,48	272,62	14,53	279,87	7,50	316,87	21,55	374,75	45,63	385,00	51,39	341,50	23,42
21	386,87	18,57	,00	,00	48,00	12,92	263,75	14,12	293,62	15,61	281,37	9,56	283,00	14,97	251,75	13,27	266,25	16,43	288,37	22,44	264,25	13,45	256,37	20,60
22	335,37	5,66	162,00	11,25	202,75	4,15	283,75	11,73	286,75	17,16	319,12	10,73	303,12	13,74	293,87	10,45	321,25	10,35	301,62	8,84	302,87	7,52	291,00	10,51
23	479,87	21,43	,00	,00	,00	,00	39,12	6,82	167,62	21,39	281,00	16,94	302,87	16,71	326,12	13,56	338,37	15,99	356,87	21,25	370,87	20,71	404,00	31,01
24	323,37	9,34	97,12	5,02	195,50	7,00	244,50	8,21	241,37	6,89	246,00	6,21	259,25	8,71	254,25	7,90	257,00	6,91	261,75	7,74	269,12	5,34	281,50	3,64
25	336,62	10,17	,00	,00	,00	,00	9,12	1,27	51,12	2,66	179,37	18,29	228,50	12,64	235,87	18,33	252,62	23,46	257,37	14,31	272,62	13,90	282,87	12,45
26	341,12	7,09	38,12	3,64	182,25	5,85	257,25	6,14	301,00	9,29	309,50	8,89	319,37	7,28	326,12	7,50	321,50	4,28	318,50	5,04	295,62	8,02	294,37	6,21
27	319,37	10,81	,00	,00	,00	,00	1,37	,18	16,25	1,58	112,75	3,69	206,50	6,28	220,00	8,52	243,37	6,45	225,37	2,33	252,25	7,26	242,87	4,74
28	358,12	10,31	,00	,00	,62	,37	156,00	4,97	327,00	7,51	319,87	6,45	308,87	6,64	326,37	7,15	327,12	7,71	314,12	12,04	319,50	6,88	320,75	7,35
29	324,50	10,03	47,12	4,94	150,50	7,74	190,00	9,52	214,25	10,38	236,37	9,05	236,25	4,67	248,00	12,95	274,62	4,84	269,12	11,33	242,37	9,95	236,50	4,21
30	330,50	8,51	,00	,00	,00	,00	1,62	,18	125,25	9,11	195,12	6,39	239,25	8,81	244,12	9,45	250,50	7,63	276,12	3,30	266,00	8,06	292,87	5,88

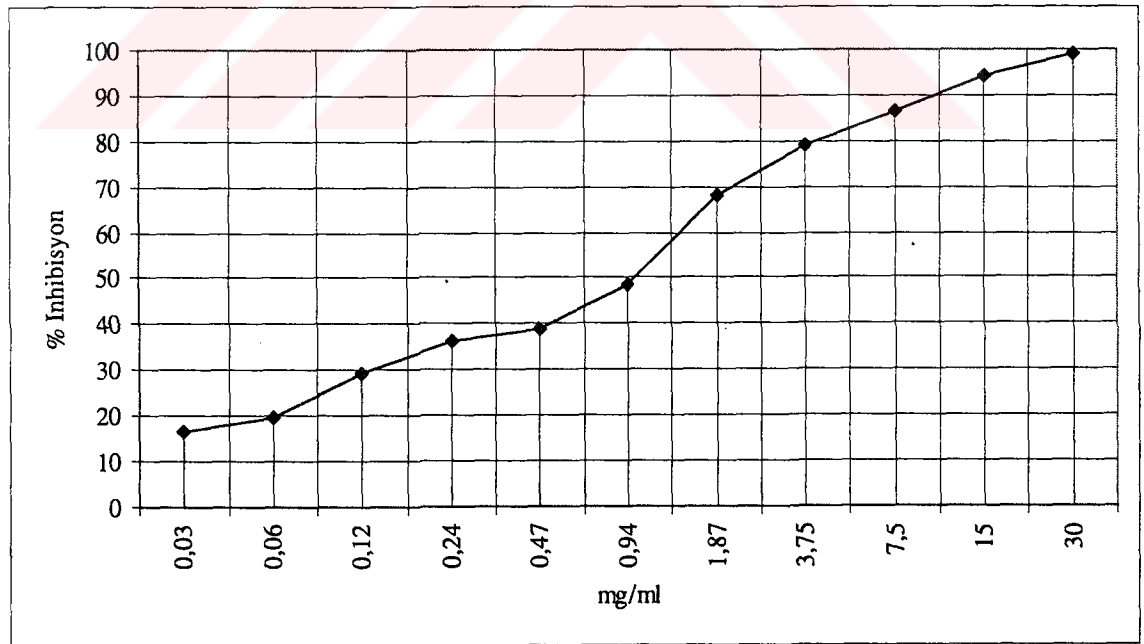
Tablo VI - Farklı dilüsyonlardaki bitki özütlerinin, *L. tropica* promastigotlarına karşı antileishmanial etkilerinin belirlendiği deneylerin sonuç ortalamaları.

Bitki No :	8000 µg/ml		4000 µg/ml		2000 µg/ml		1000 µg/ml		500 µg/ml		250 µg/ml		125 µg/ml		62,5 µg/ml		31,25 µg/ml		15,62 µg/ml		7,81 µg/ml	
	Canlı %	İnhib. %	Canlı %	İnhib. %	Canlı %	İnhib. %	Canlı %	İnhib. %	Canlı %	İnhib. %	Canlı %	İnhib. %	Canlı %	İnhib. %	Canlı %	İnhib. %	Canlı %	İnhib. %	Canlı %	İnhib. %	Canlı %	İnhib. %
1	32,64	67,36	52,66	47,34	65,93	34,07	68,25	31,75	74,67	25,33	76,24	23,76	81,27	18,73	79,99	20,01	84,27	15,73	87,09	12,91	85,91	14,09
2	0,00	100,00	0,96	99,04	39,43	60,57	58,38	41,62	61,07	38,93	68,24	31,76	66,44	33,56	68,78	31,22	73,11	26,89	76,75	23,25	83,05	16,95
3	11,73	88,27	76,26	23,74	80,19	19,81	83,40	16,60	87,85	12,15	87,92	12,08	87,03	12,97	90,27	9,73	90,34	9,66	85,71	14,29	84,96	15,04
4	0,00	100,00	0,00	100,00	0,68	99,32	54,12	45,88	74,79	25,21	78,96	21,04	80,90	19,10	83,26	16,74	86,86	13,14	86,17	13,83	90,25	9,75
5	9,13	90,87	36,64	63,36	61,59	38,41	76,77	23,23	96,42	3,58	99,16	0,84	100,00	0,00	100,00	0,00	99,10	0,90	98,16	1,84	95,81	4,19
6	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	21,03	78,97	42,53	57,47	76,02	23,98	77,84	22,16	77,96	22,04	68,72	31,28	79,86	20,14	80,95	19,05
7	33,88	66,12	82,16	17,84	91,81	8,19	93,50	6,50	92,21	7,79	90,08	9,92	90,01	9,99	87,68	12,32	84,46	15,54	85,07	14,93	82,67	17,33
8	23,75	76,25	71,02	28,98	81,50	18,50	92,27	7,73	97,80	2,20	96,26	3,74	92,86	7,14	88,53	11,47	95,75	4,25	84,61	15,39	96,01	3,99
9	19,04	80,96	65,84	34,16	75,33	24,67	82,49	17,51	73,70	26,30	79,53	20,47	80,26	19,74	84,81	15,19	80,37	19,63	79,19	20,81	86,41	13,59
10	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	7,56	92,44	42,06	57,94	63,18	36,82	81,50	18,50	81,46	18,54	82,00	18,00	85,74	14,26	88,09	11,91
11	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,89	99,11	21,96	78,04	51,43	48,57	66,45	33,55	68,29	31,71	73,60	26,40	77,09	22,91
12	0,00	100,00	17,13	82,87	34,58	65,42	60,07	39,93	81,14	18,86	82,95	17,05	81,25	18,75	80,55	19,45	77,09	22,91	70,68	29,32	70,24	29,76
13	17,90	82,10	48,38	51,62	59,66	40,34	70,17	29,83	73,25	26,75	73,66	26,34	80,80	19,20	72,16	27,84	73,78	26,22	72,12	27,88	79,26	20,74
14	38,30	61,70	67,12	32,88	73,49	26,51	73,87	26,13	79,57	20,43	73,35	26,65	75,52	24,48	78,59	21,41	73,31	26,69	79,47	20,53	75,59	24,41
15	25,24	74,76	32,53	67,47	37,35	62,65	47,56	52,44	58,72	41,28	67,20	32,80	75,97	24,03	84,59	15,41	89,03	10,97	85,07	14,93	85,86	14,14
16	0,00	100,00	0,00	100,00	2,74	97,26	25,15	74,85	42,10	57,90	58,79	41,21	61,42	38,58	65,12	34,88	71,19	28,81	70,33	29,67	72,70	27,30
17	14,20	85,80	31,22	68,78	37,06	62,94	40,67	59,33	47,88	52,12	53,37	46,63	55,65	44,35	51,06	48,94	55,72	44,28	54,94	45,06	68,82	31,18
18	0,24	99,76	12,98	87,02	31,53	68,47	46,11	53,89	60,99	39,01	74,49	25,51	87,80	12,20	88,34	11,66	82,14	17,86	88,58	11,42	82,05	17,95
19	13,64	86,36	32,10	67,90	54,18	45,82	58,33	41,67	68,88	31,12	66,56	33,44	71,80	28,20	73,00	27,00	67,37	32,63	71,48	28,52	77,07	22,93
20	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	13,52	86,48	72,27	27,73	74,19	25,81	83,99	16,01	99,34	0,66	102,05	-2,05	90,52	9,48
21	0,00	100,00	12,41	87,59	68,18	31,82	75,90	24,10	72,73	27,27	73,15	26,85	65,07	34,93	68,82	31,18	74,54	25,46	68,30	31,70	66,27	33,73
22	48,30	51,70	60,46	39,54	84,61	15,39	85,50	14,50	95,15	4,85	90,38	9,62	87,63	12,37	95,79	4,21	89,94	10,06	90,31	9,69	86,77	13,23
23	0,00	100,00	0,00	100,00	8,15	91,85	34,93	65,07	58,56	41,44	63,12	36,88	67,96	32,04	70,51	29,49	74,37	25,63	77,29	22,71	84,19	15,81
24	30,03	69,97	60,46	39,54	75,61	24,39	74,64	25,36	76,07	23,93	80,17	19,83	78,63	21,37	79,48	20,52	80,94	19,06	83,22	16,78	87,05	12,95
25	0,00	100,00	0,00	100,00	2,71	97,29	15,19	84,81	53,29	46,71	67,88	32,12	70,07	29,93	75,05	24,95	76,46	23,54	80,99	19,01	84,03	15,97
26	11,17	88,83	53,43	46,57	75,41	24,59	88,24	11,76	90,73	9,27	93,62	6,38	95,60	4,40	94,25	5,75	93,37	6,63	86,66	13,34	86,30	13,70
27	0,00	100,00	0,00	100,00	0,43	99,57	5,09	94,91	35,30	64,70	64,66	35,34	68,89	31,11	76,20	23,80	70,57	29,43	78,98	21,02	76,05	23,95
28	0,00	100,00	0,17	99,83	43,56	56,44	91,31	8,69	89,32	10,68	86,25	13,75	91,13	8,87	91,34	8,66	87,71	12,29	89,22	10,78	89,56	10,44
29	14,52	85,48	46,38	53,62	58,55	41,45	66,02	33,98	72,84	27,16	72,80	27,20	76,43	23,57	84,63	15,37	82,93	17,07	74,69	25,31	72,88	27,12
30	0,00	100,00	0,00	100,00	0,49	99,51	37,90	62,10	59,04	40,96	72,39	27,61	73,86	26,14	75,79	24,21	83,55	16,45	80,48	19,52	88,61	11,39

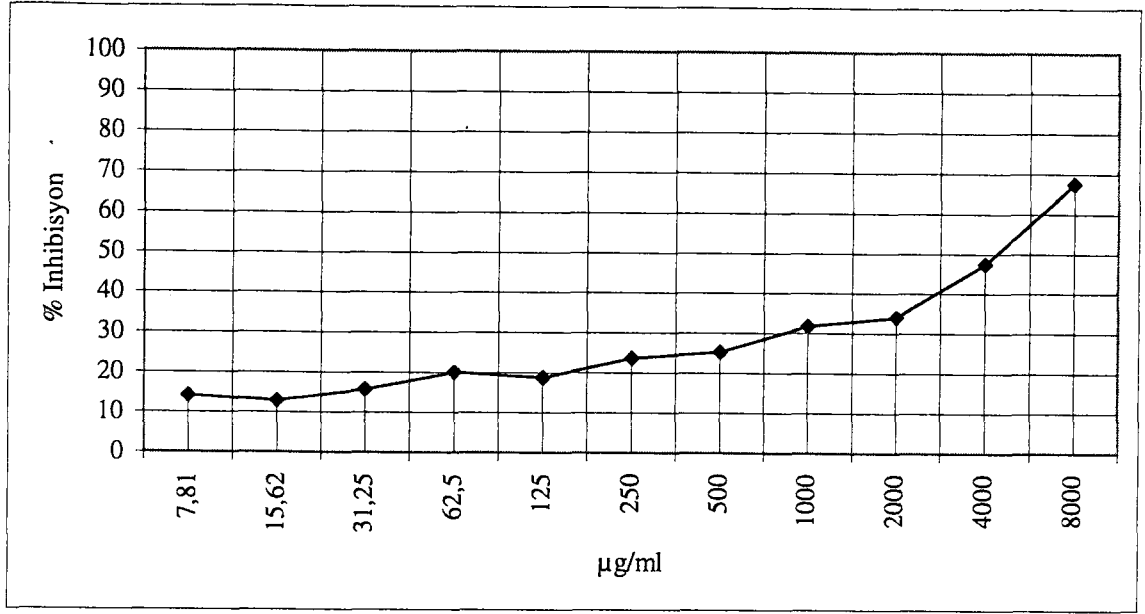
Tablo VII - Farklı dilüsyonlardaki bitki özütlerinin, *L. tropica* promastigotlarına antileishmanial etkilerinin, kontrollere karşı canlılık ve inhibisyon oranları.



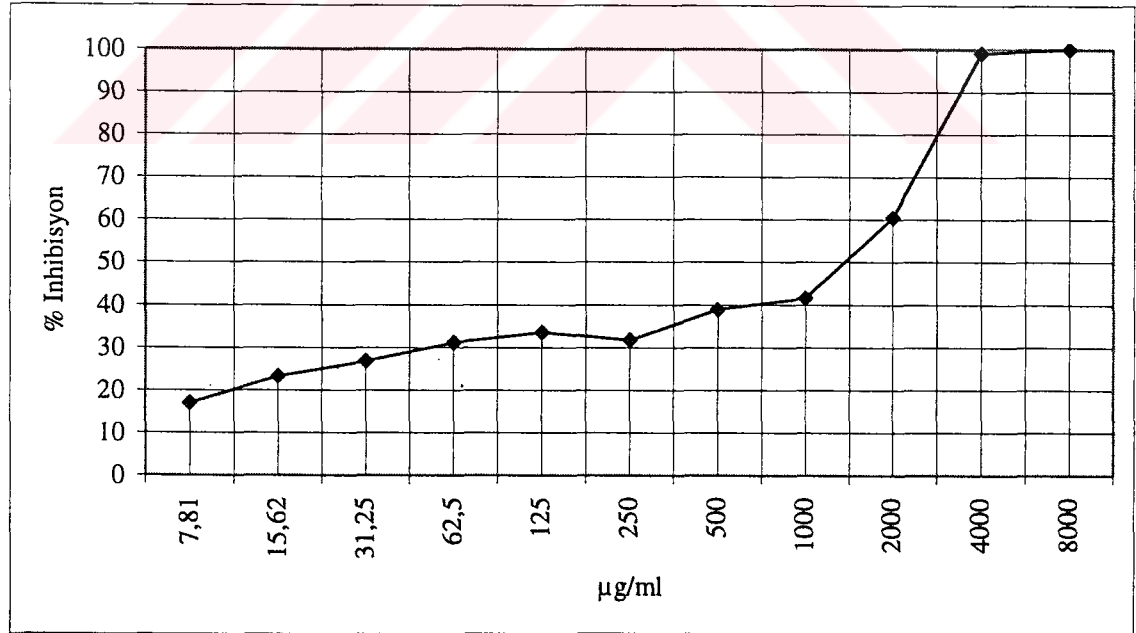
Grafik 1 - Tablo III'deki Glucantime®'in (8 mg/ml), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 2062 µg/ml



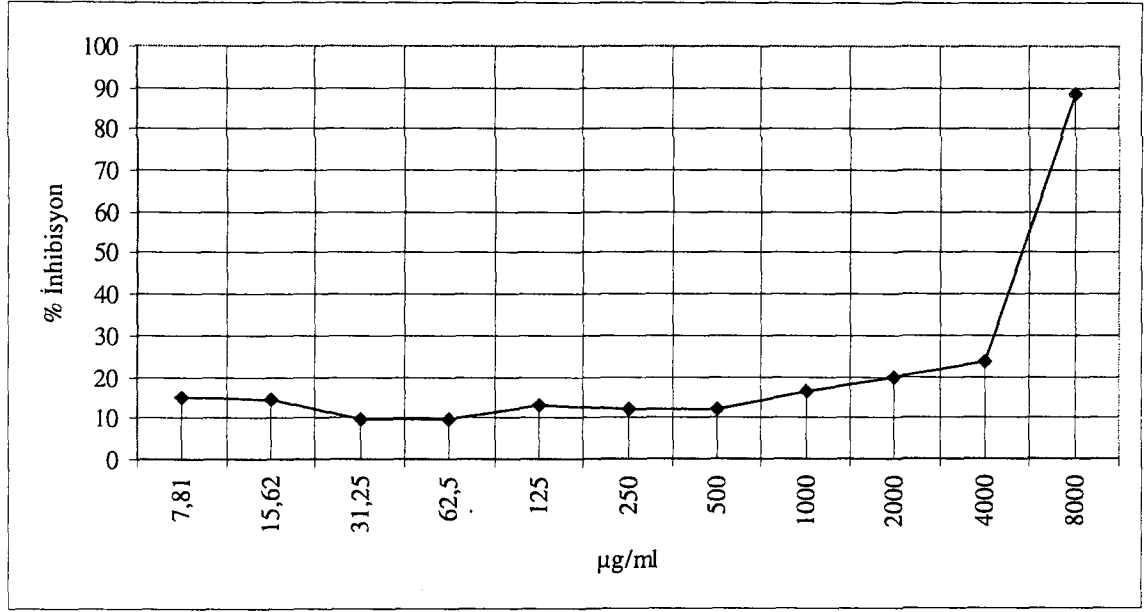
Grafik 2 - Tablo IV'deki Glucantime®'in (30 mg/ml), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 1010 µg/ml



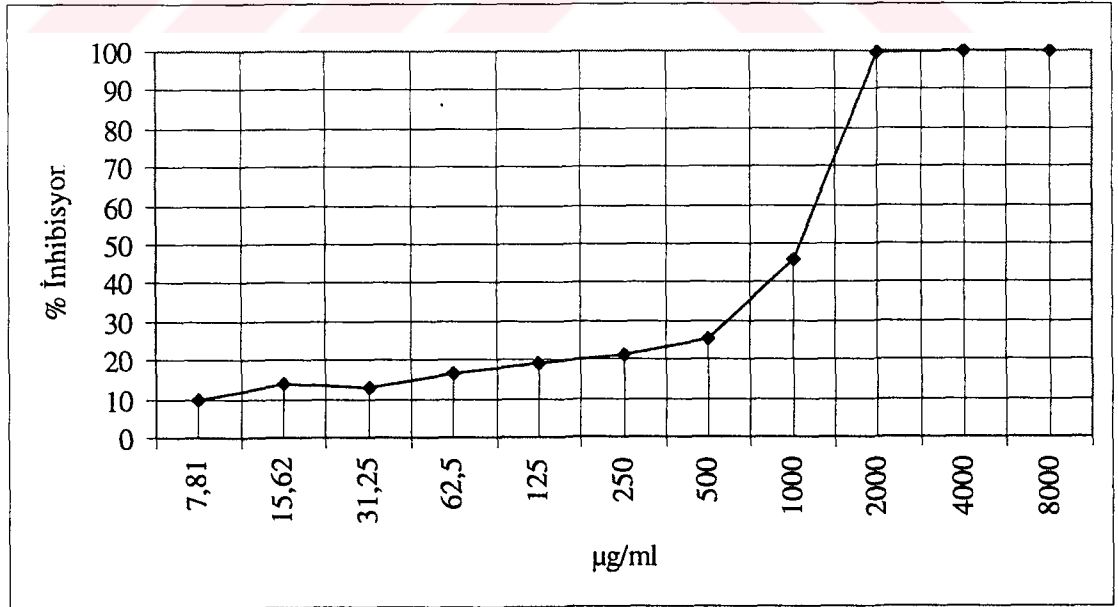
Grafik 3 - 1No'lu Bitki ekstraktının (*Astragalus densifolius*), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 4531 $\mu\text{g/ml}$



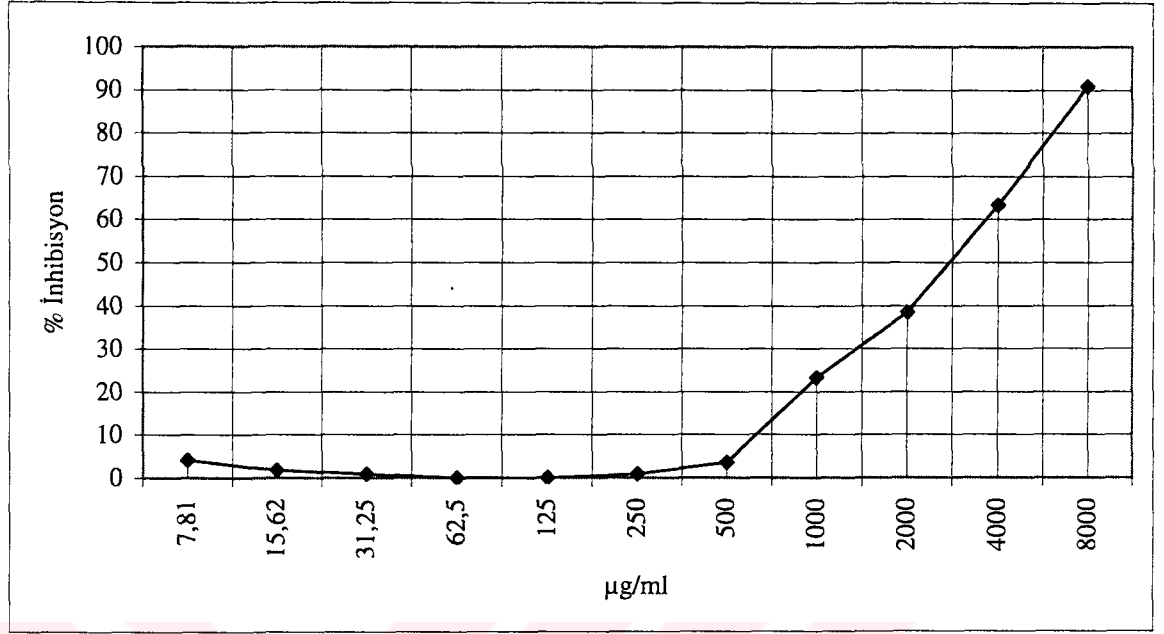
Grafik 4 - 2 No'lu Bitki ekstraktının (*Salvia cryptantha*), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 1442 $\mu\text{g/ml}$



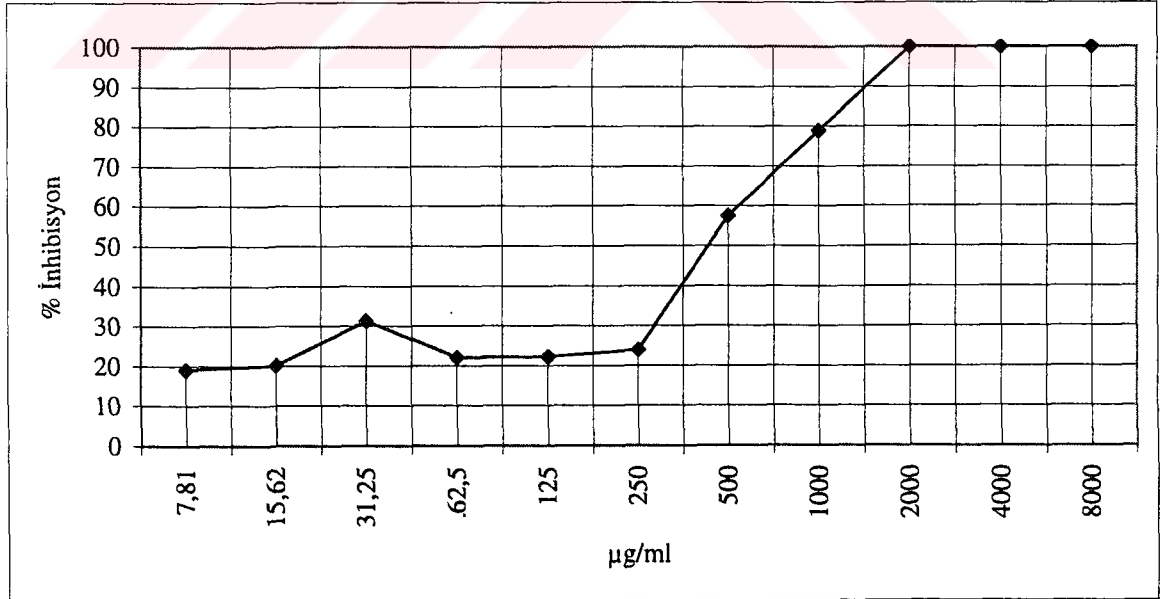
Grafik 5 - 3 No'lu Bitki ekstraktının (*Astragalus melanophourius*), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 5628 µg/ml



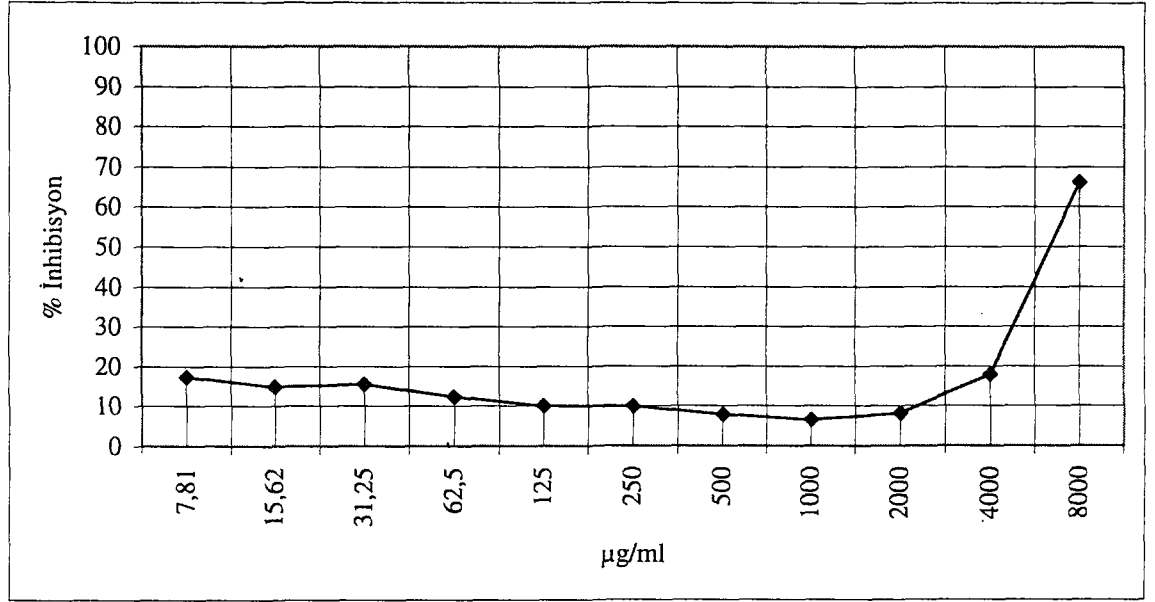
Grafik 6 - 4 No'lu Bitki ekstraktının (*Allium nevsehirense*-Topraküstü Kısımları), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 1077 µg/ml



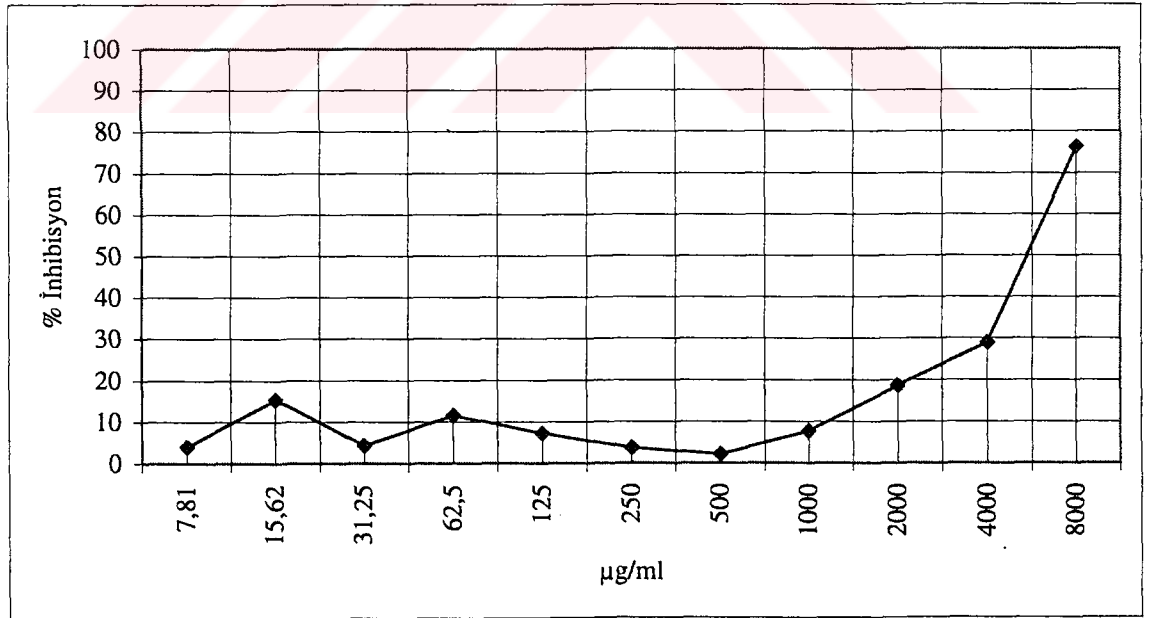
Grafik 7 - 5 No'lu Bitki ekstraktının (*Salvia candidissima*), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 2943 µg/ml



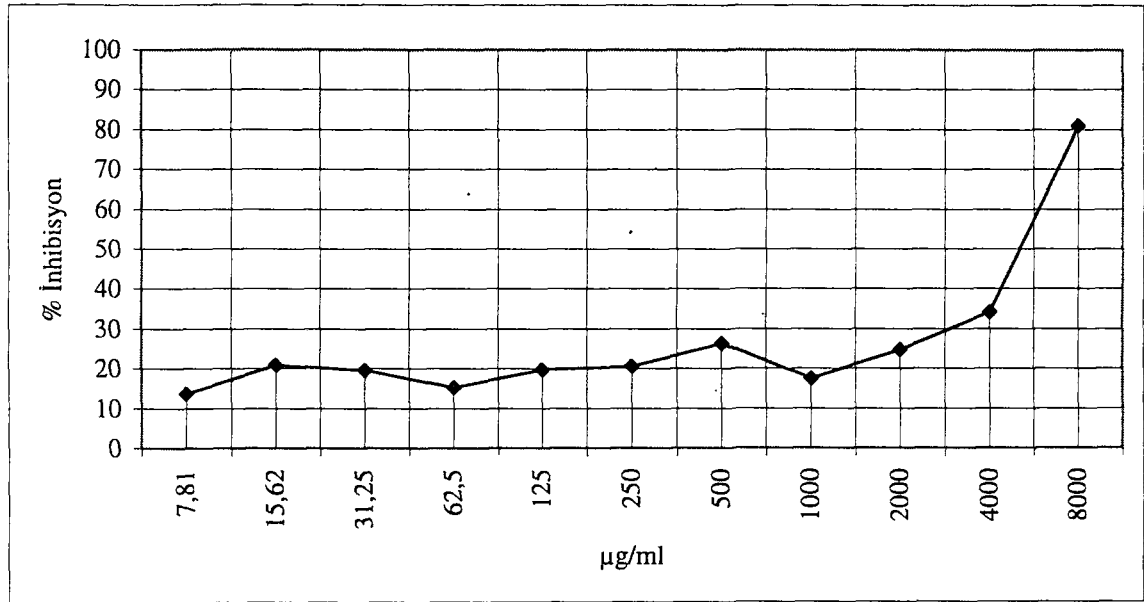
Grafik 8 - 6 No'lu Bitkinin (*Origanum acutidens*), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 444 µg/ml



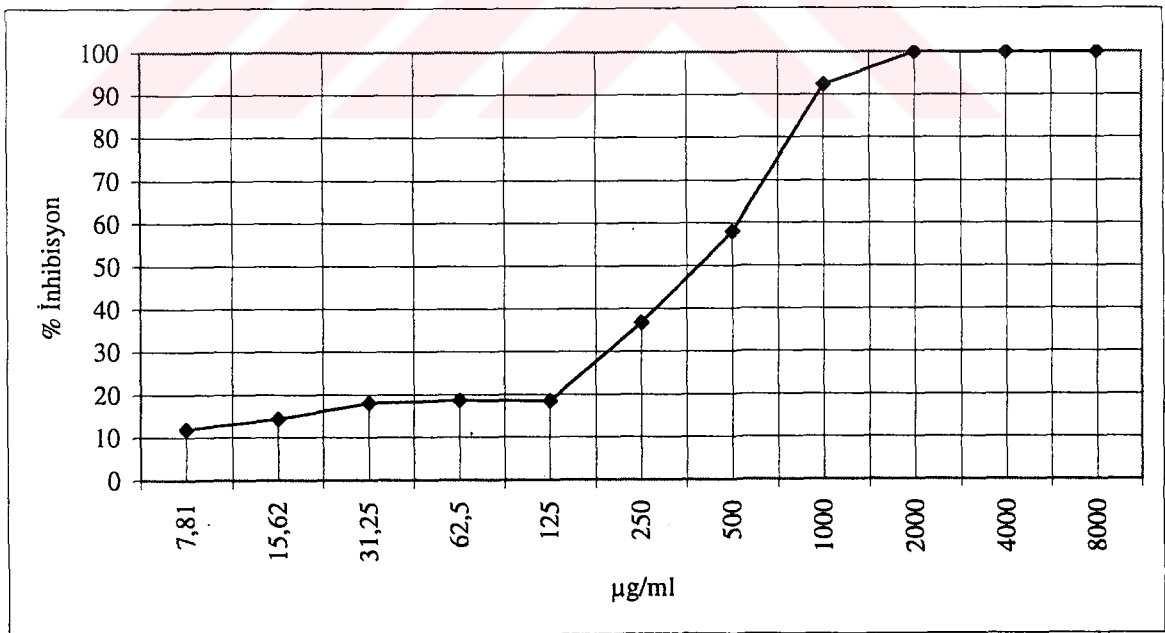
Grafik 9 - 7 No'lu Bitki ekstraktının (*Thymus sipyleus ssp.rasulens*), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 6667 µg/ml



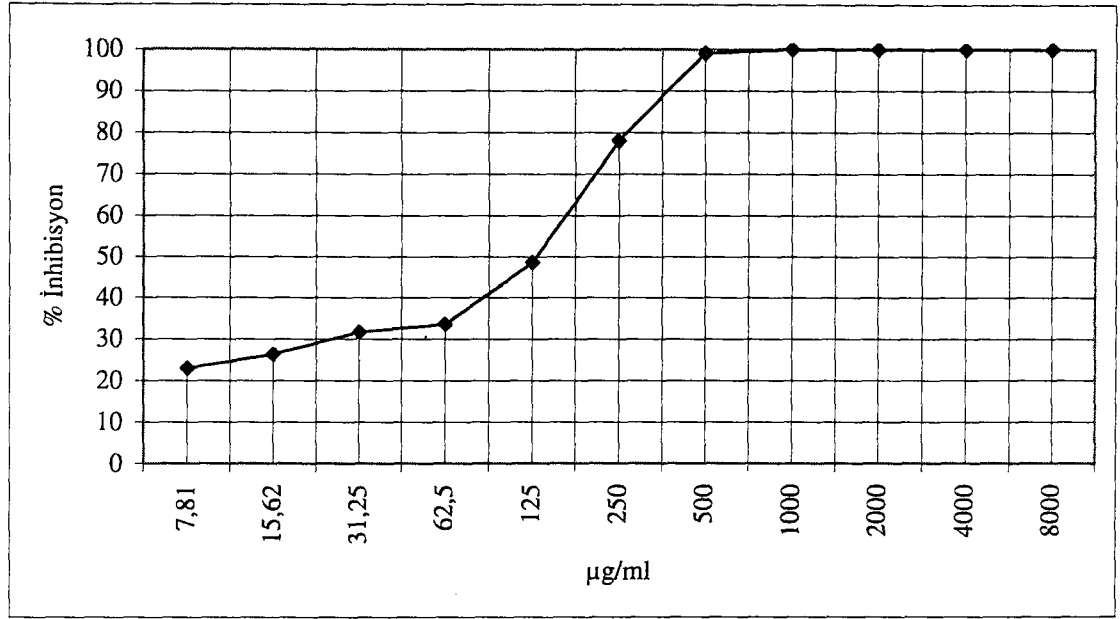
Grafik 10 - 8 No'lu Bitkinin (*Thymus sipyleus spp. sipyleus*), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 5779 µg/ml



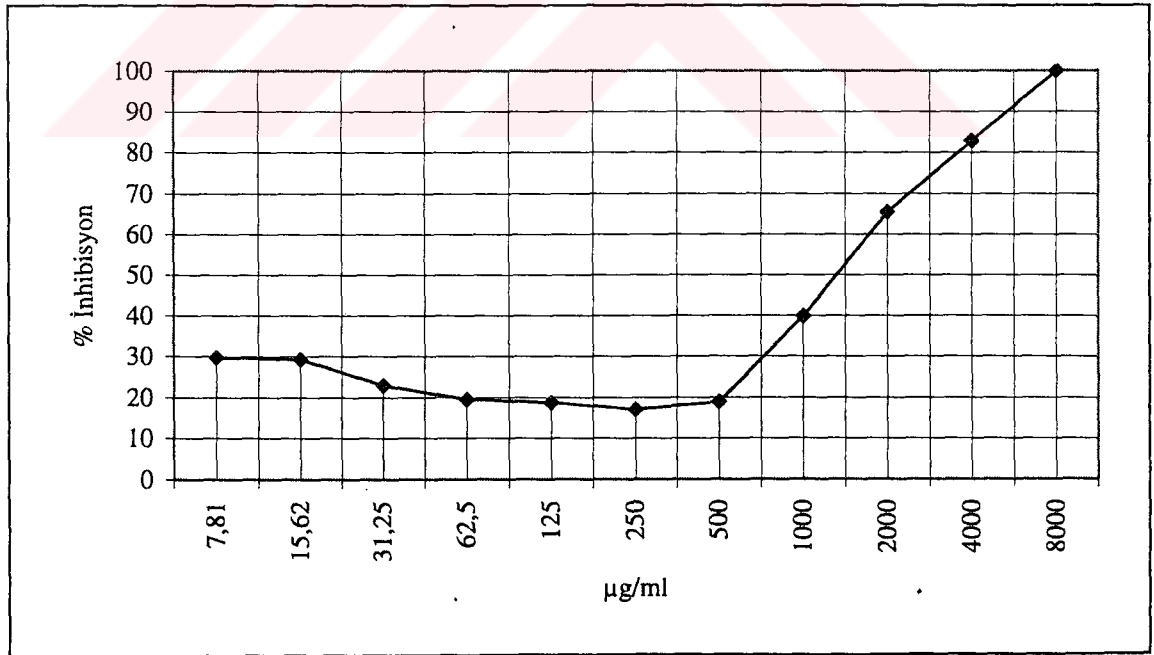
Grafik 11 - 9 No'lu Bitki ekstraktının (*Helichrysum plicatum spp. plicatum*), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 5354 µg/ml



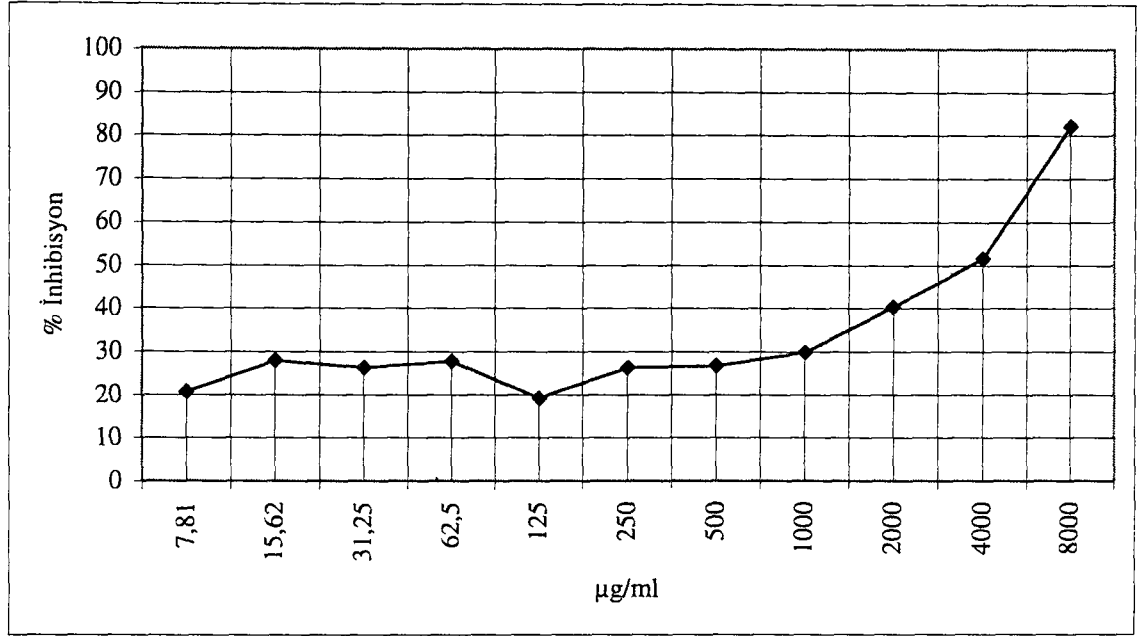
Grafik 12 - 10 No'lu Bitki ekstraktının (*Tanacetum densum spp. amoni*), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 406 µg/ml



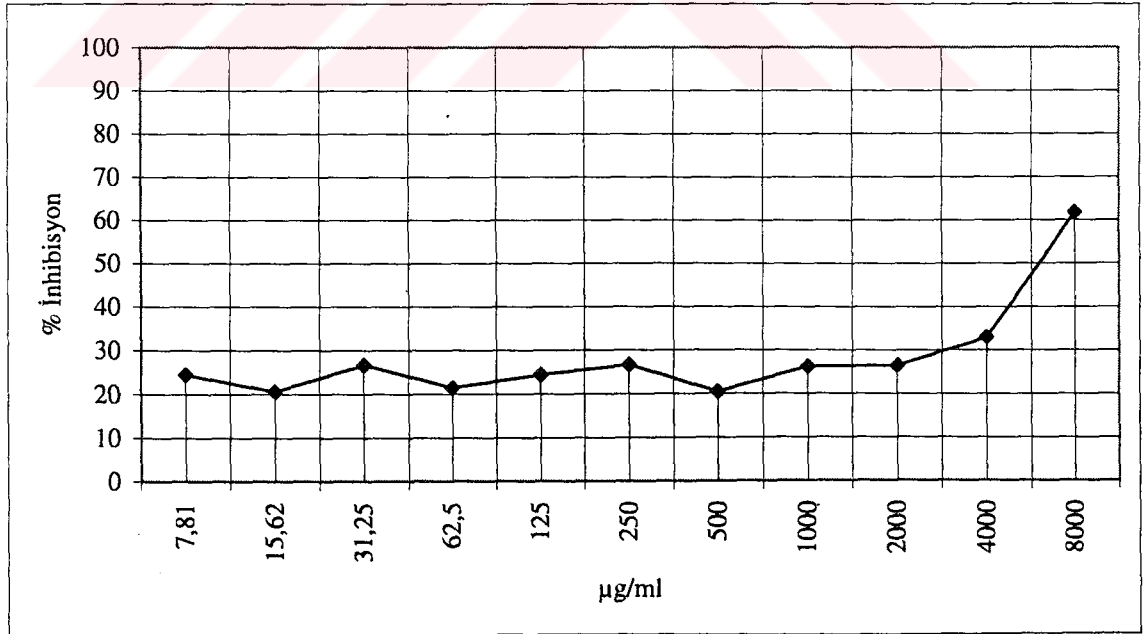
Grafik 13 - 11 No'lu Bitki ekstraktının (*Allium scorodoprasum ssp. rotundum*-Yaprak ve Çiçek), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : **131 µg/ml**



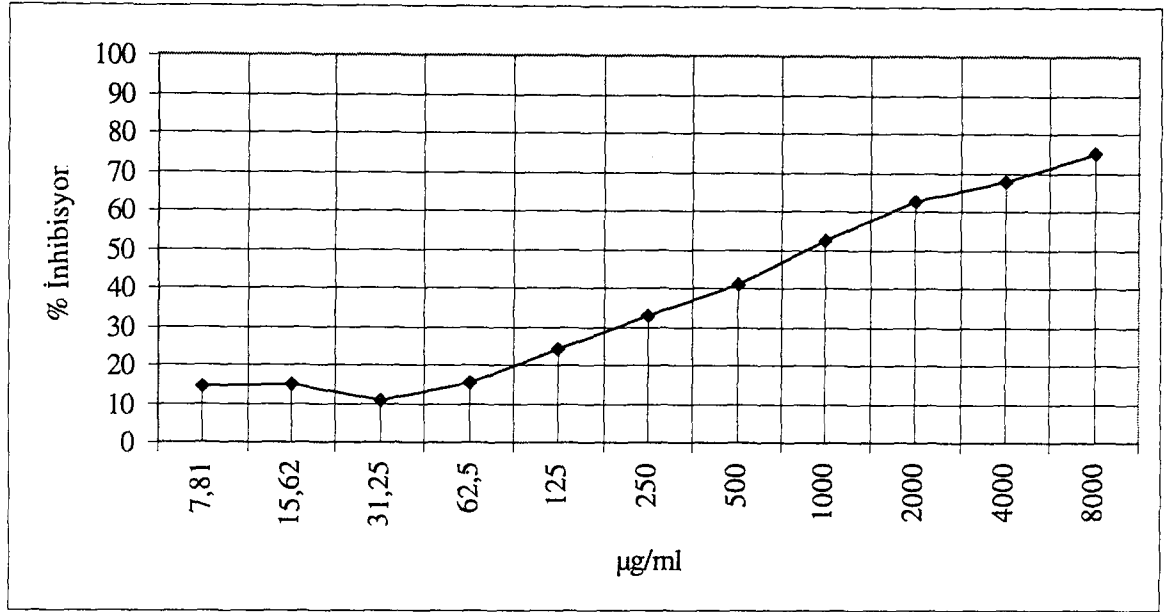
Grafik 14 - 12 No'lu Bitki ekstraktının (*Allium sivasicum*-Topraküstü Kısımları), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : **1395 µg/ml**



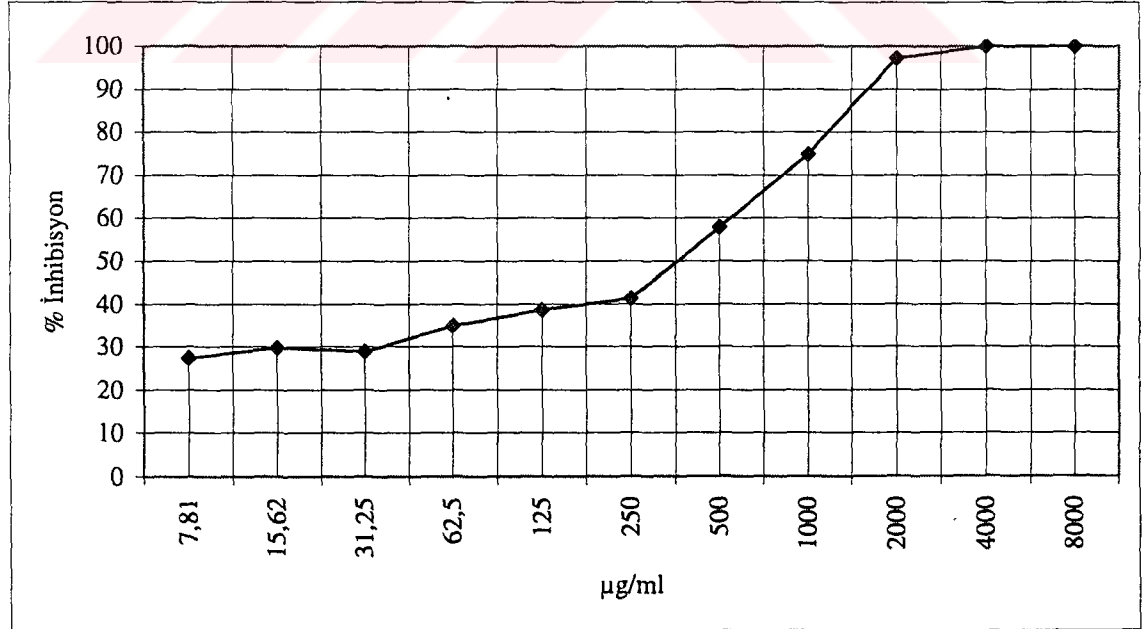
Grafik 15 - 13 No'lu Bitki ekstraktının (*Helichrysum arenarum ssp. aucheri*), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 3713 µg/ml



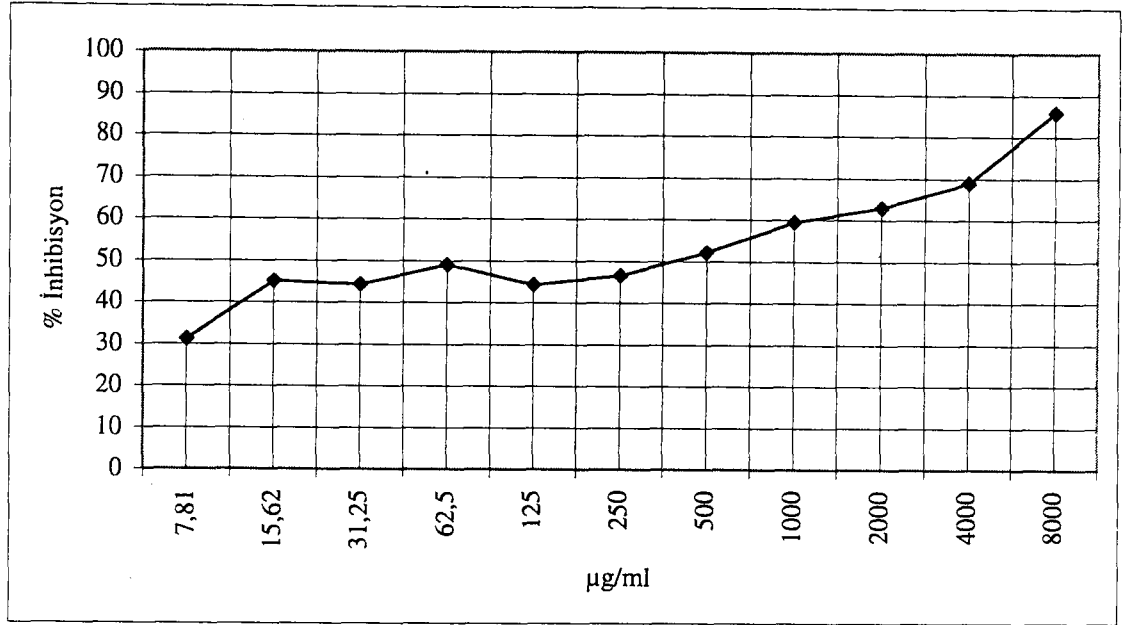
Grafik 16 - 14 No'lu Bitki ekstraktının (*Helichrysum neoanum*), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 6376 µg/ml



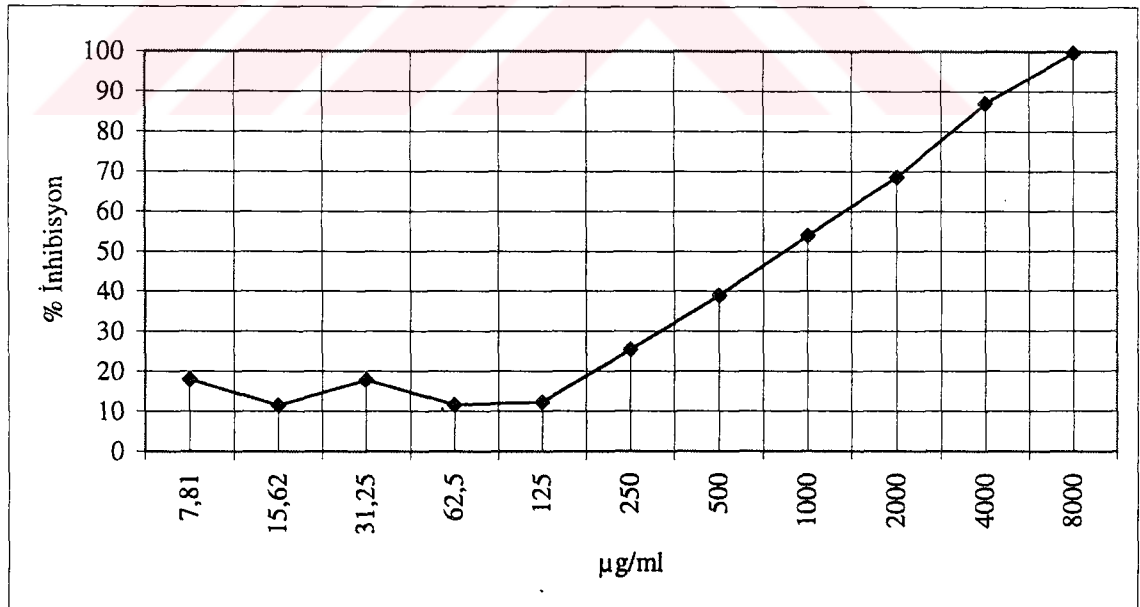
Grafik 17 - 15 No'lu Bitki ekstraktının (*Salvia ruselli*), *L. tropica* promastigotların %50' sini inhibe eden miktarı : 891 µg/ml



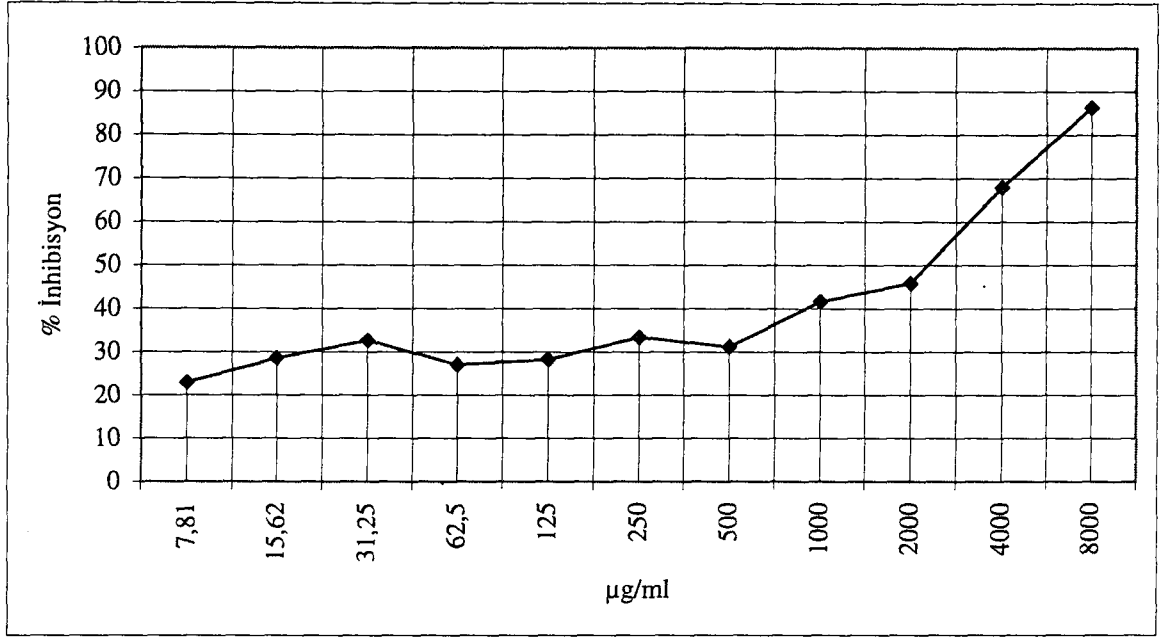
Grafik 18 - 16 No'lu Bitki ekstraktının (*Tanacetum parthenium*-Çiçekleri), *L. tropica* promastigotlarının %50' sini inhibe eden miktarı : 382 µg/ml



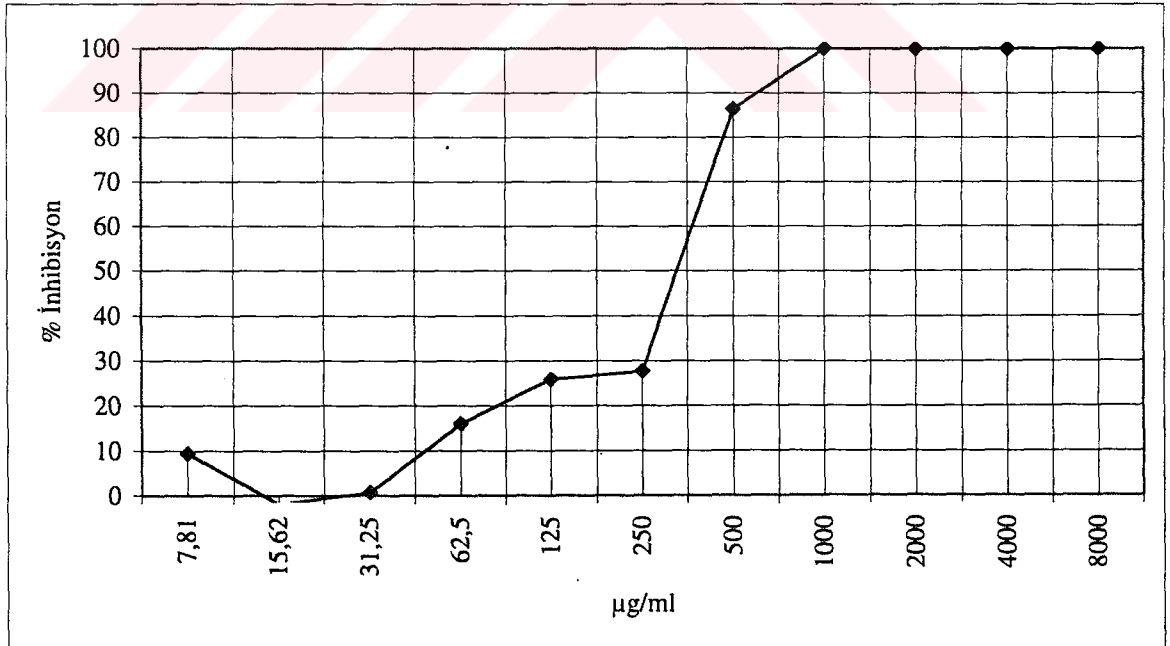
Grafik 19 - 17 No'lu Bitki ekstraktının (*Pinpinella anisetum*), *L. tropica* promastigotlarının %50' sini inhibe eden miktarı : 403 µg/ml



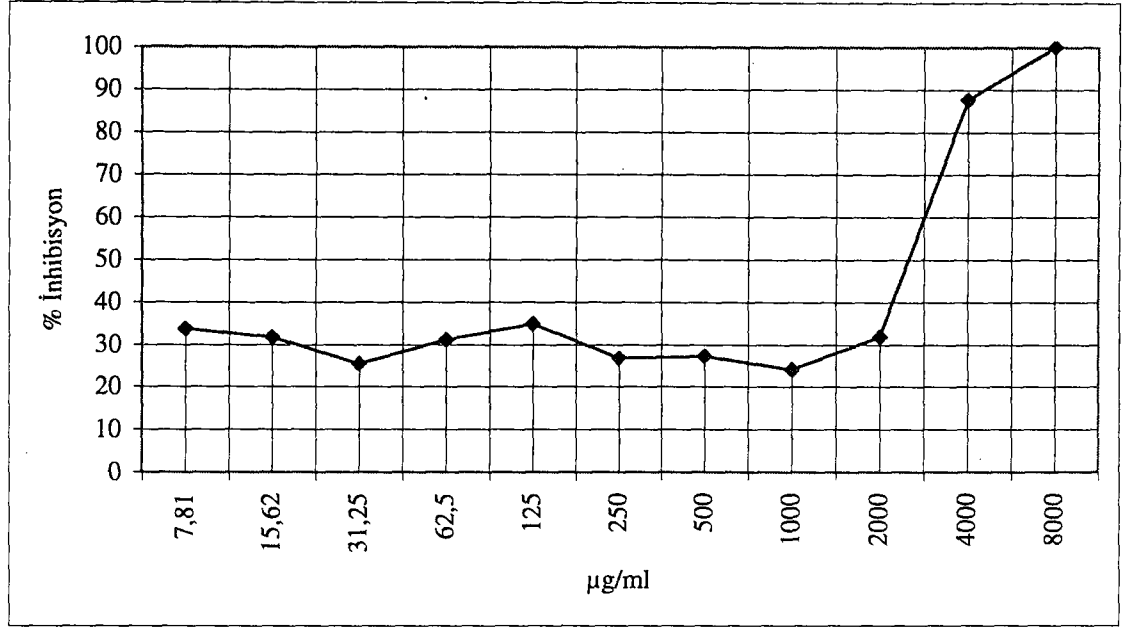
Grafik 20 - 18 No'lu Bitki ekstraktının (*Allium sivasicum*-Soganı), *L. tropica* promastigotlarının %50' sini inhibe eden miktarı : 869 µg/ml



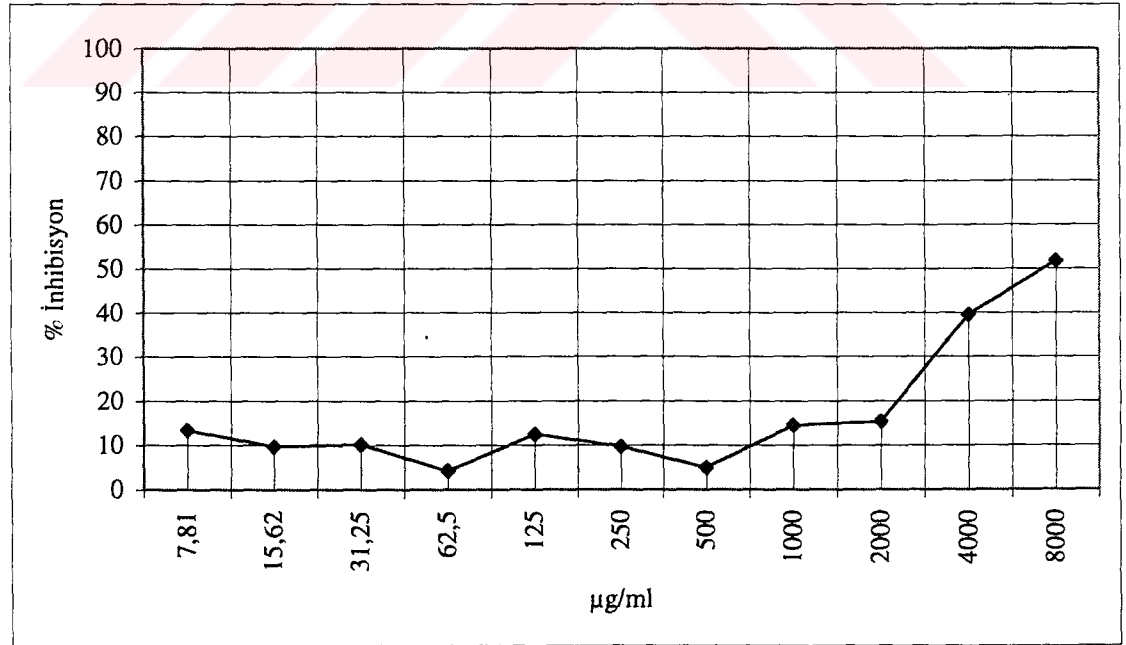
Grafik 21 - 19 No'lu Bitki ekstraktının (*Salvia virgata*), *L. tropica* promastigotlarının %50' sini inhibe eden miktarı : 2379 µg/ml



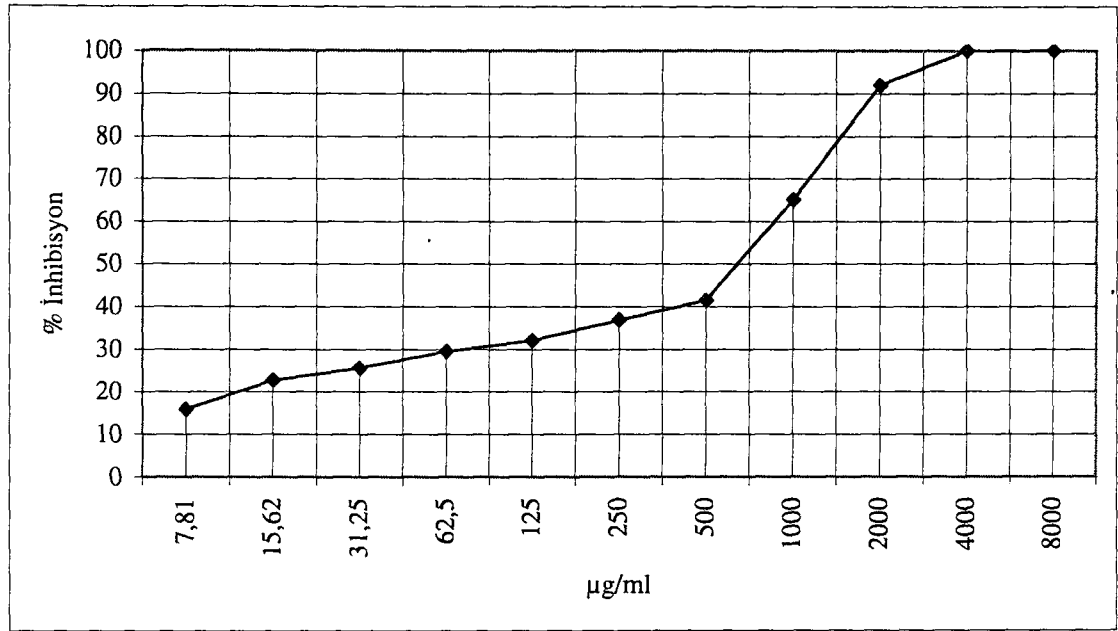
Grafik 22 - 20 No'lu Bitki ekstraktının (*Allium nevsehirense*-soğanı), *L. tropica* promastigotlarının %50' sini inhibe eden miktarı : 345 µg/ml



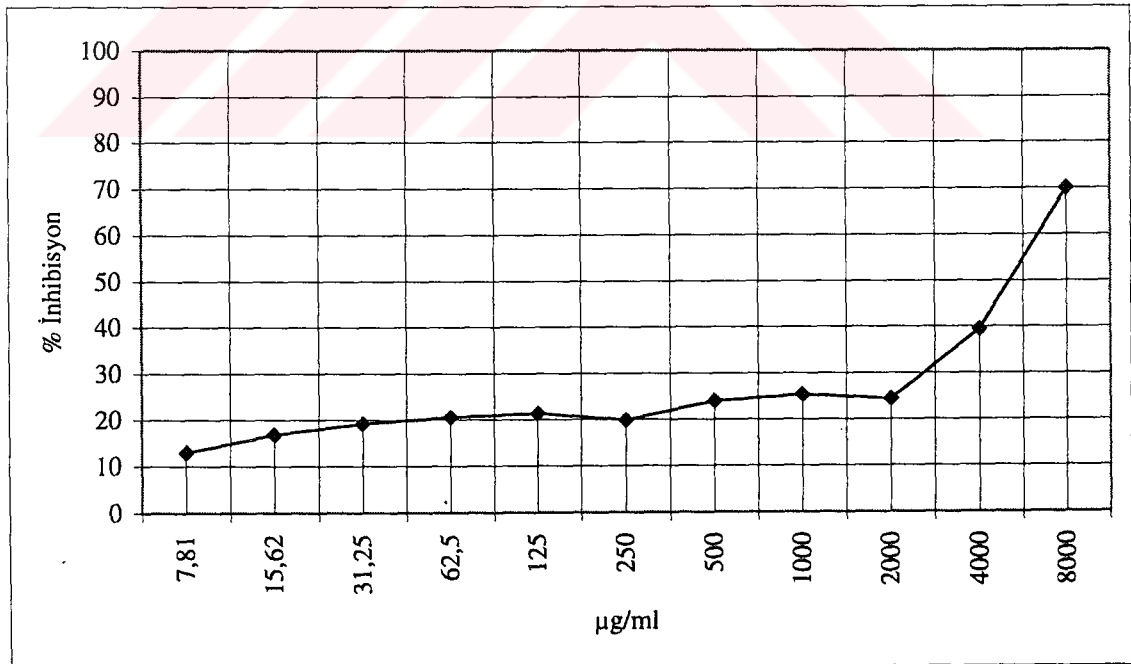
Grafik 23- 21 No'lu Bitki ekstraktının (*Achillea teretifolia*), *L. tropica* promastigotlarının %50' sini inhibe eden miktarı : 2652 µg/ml



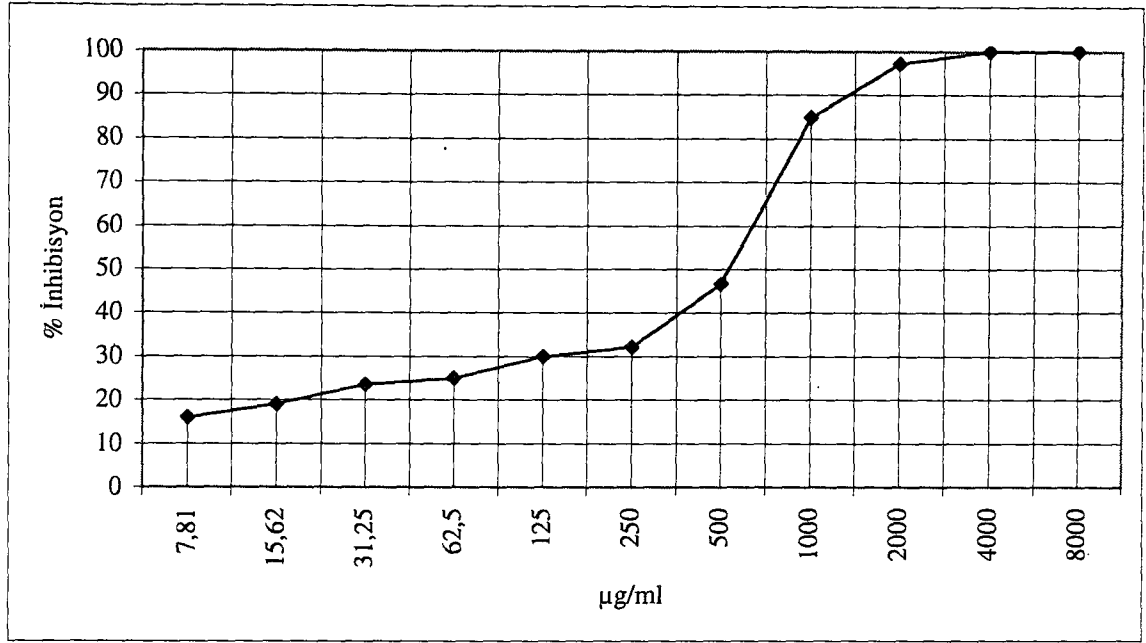
Grafik 24 - 22 No'lu Bitki ekstraktının (*Salvia syriaca*), *L. tropica* promastigotlarının %50' sini inhibe eden miktarı : 7441 µg/ml



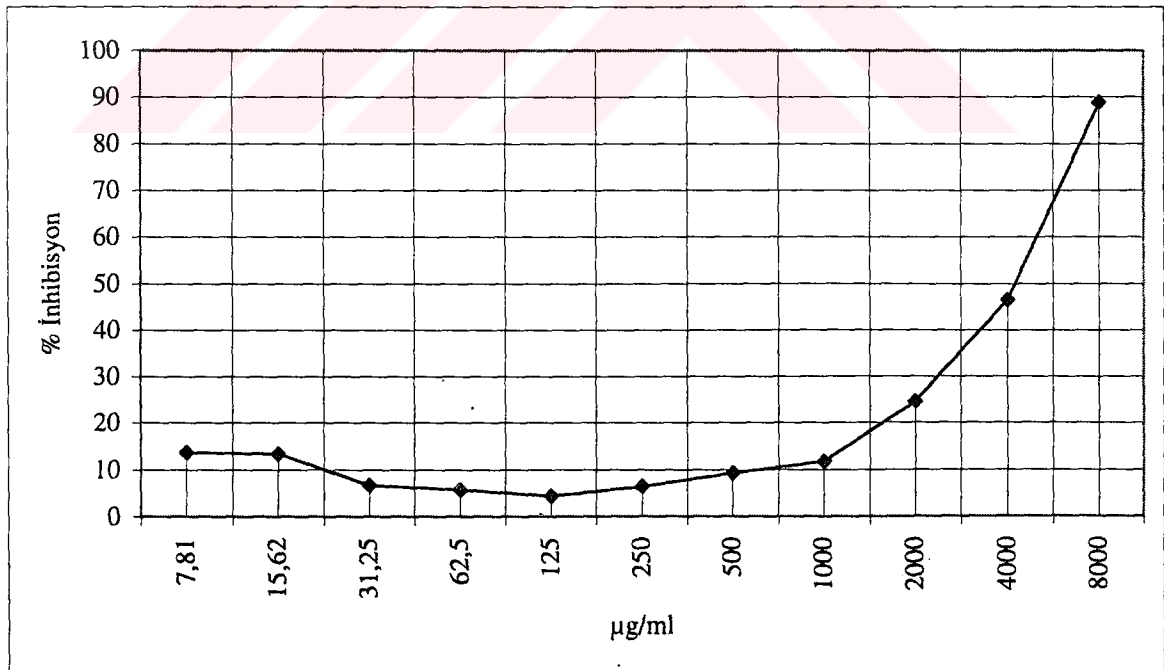
Grafik 25 - 23 No'lu Bitki ekstraktının (*Tanacetum densum spp. sivasicum*-Cicek), *L. tropica* promastigotlarının %50' sini inhibe eden miktarı : **681 µg/ml**



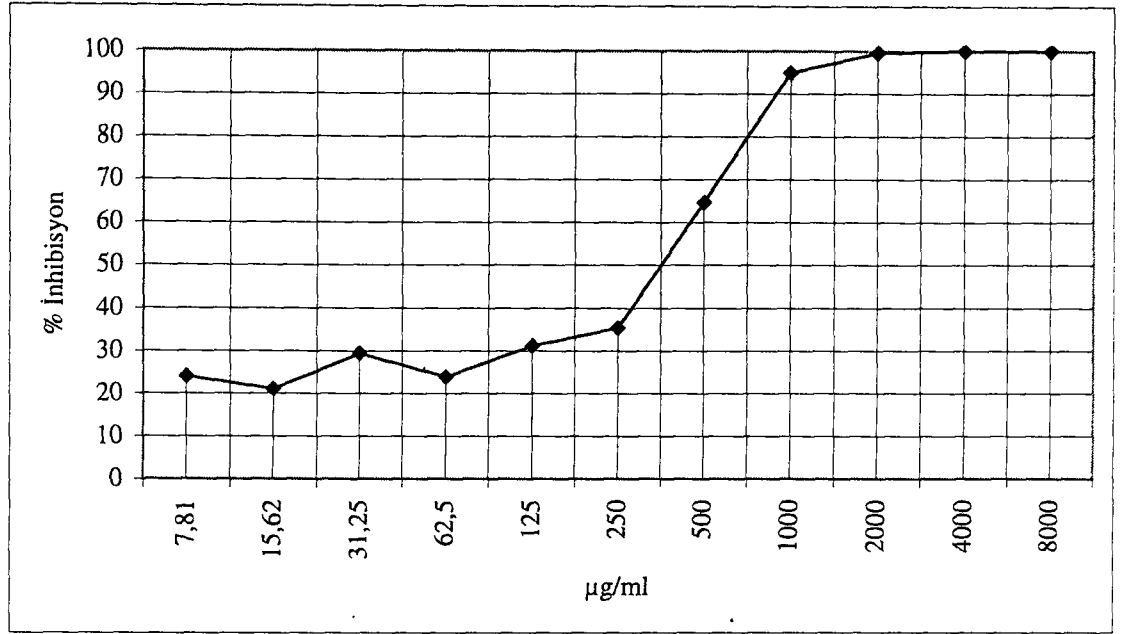
Grafik 26 - 24 No'lu Bitki ekstraktının (*Pelargonium endlicherianum*), *L. tropica* promastigotlarının %50' sini inhibe eden miktarı : **5375 µg/ml**



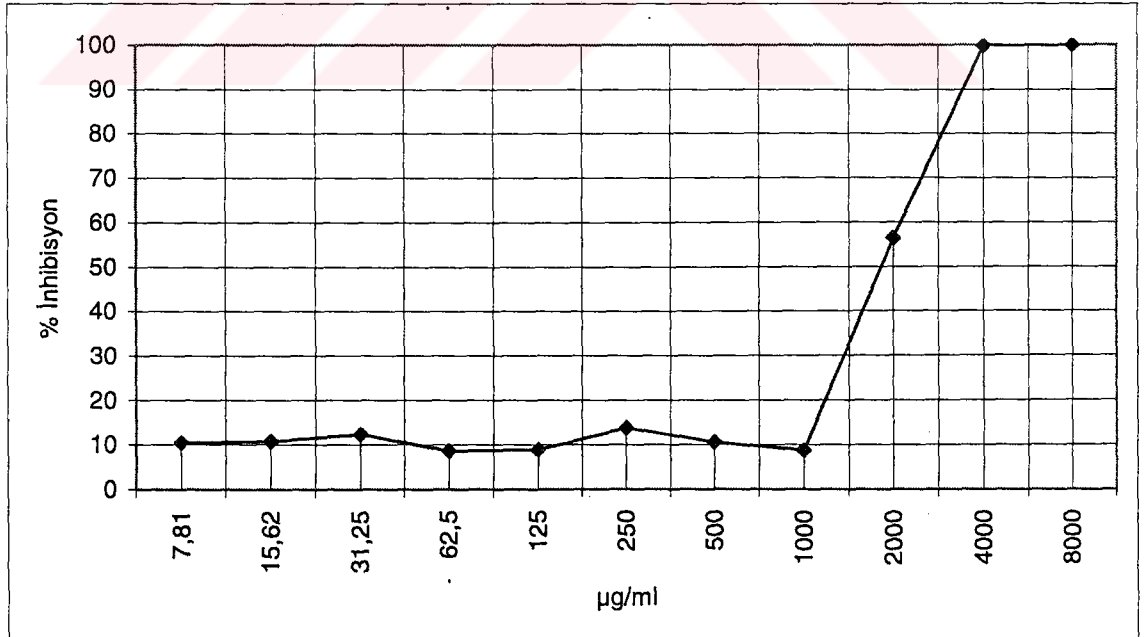
Grafik 27 - 25 No'lu Bitki ekstraktının (*Thymus pectinatus* var. *pectinatus*), *L. tropica* promastigotlarının %50' sini inhibe eden miktarı : 535 µg/ml



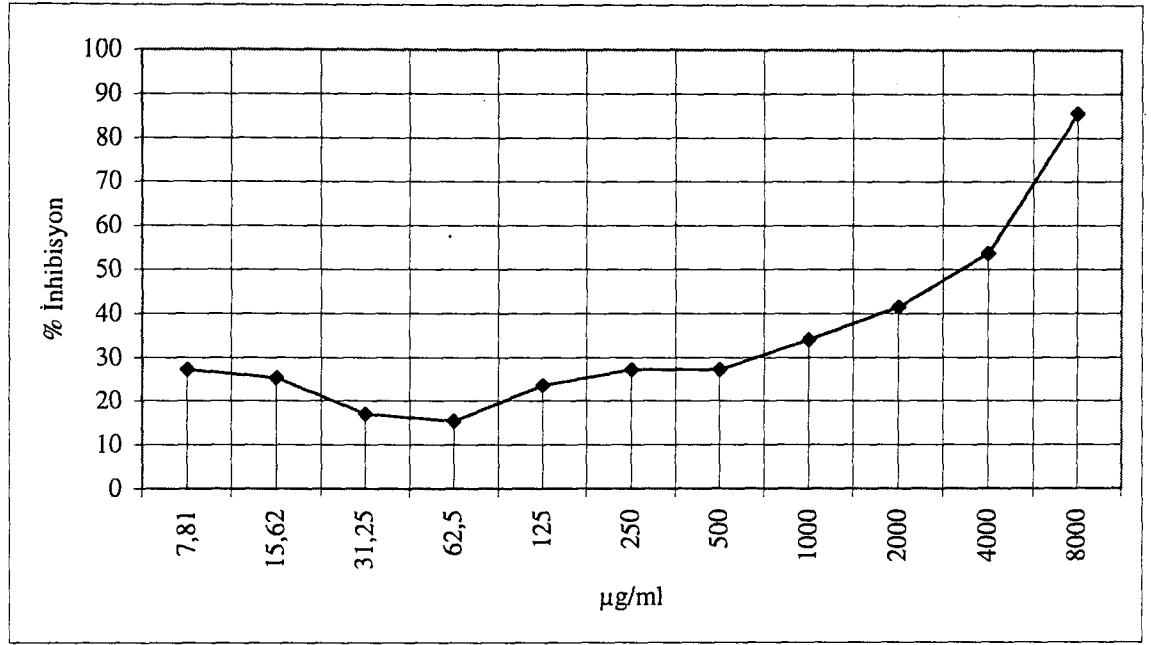
Grafik 28 - 26 No'lu Bitki ekstraktının (*Helichrysum chionophyllum*-Çiçek), *L. tropica* promastigotların ın%50' sini inhibe eden miktarı : 4325 µg/ml



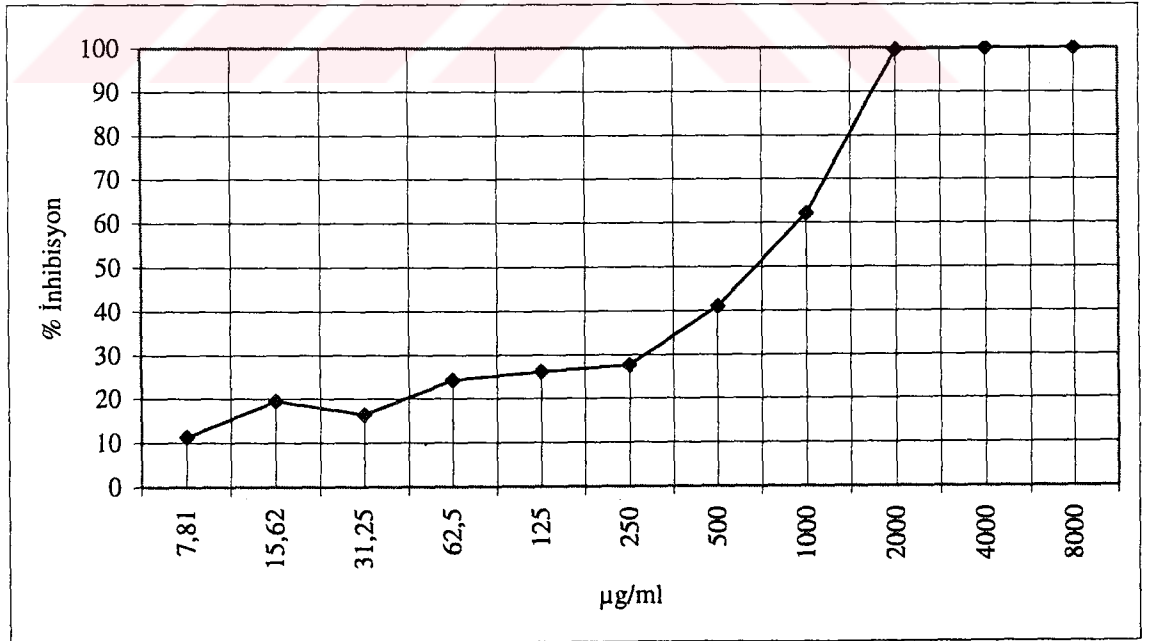
Grafik 29 - 27 No'lu Bitki ekstraktının (*Tanacetum balsamita* spp. *balsamita*), *L. tropica* promastigotlarının %50' sini inhibe eden miktarı : 375 µg/ml



Grafik 30 - 28 No'lu Bitki ekstraktının (*Allium dictyoprosum*), *L. tropica* promastigotlarının %50' sini inhibe eden miktarı : 1865 µg/ml



Grafik 31 - 29 No'lu Bitki ekstraktının (*Helichrysum chionophyllum*-Toprak üstü Kısımları), *L. tropica* promastigotlarının %50' sini inhibe eden miktarı : **3405 µg/ml**



Grafik 32 - 30 No'lu Bitki ekstraktının (*Tanacetum parthenium*-Yaprak ve Dalları), *L. tropica* promastigotlarının %50' sini inhibe eden miktarı : **714 µg/ml**

TARTIŞMA

Çalışmamızda kullanılan bitki ekstralarının, *Leishmania* promastigotları ve amastigotları üzerine olan etkilerini inceleyen daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle denemelerimizin sonuçları, leishmaniosise karşı daha iyi mücadele verebilmek için farklı bilim adamlarının, farklı bileşikler üzerinde yaptıkları çalışmalar ve etkilerle karşılaştırılmıştır. Genel bilgiler kısmında da belirttiğimiz gibi, son yıllarda gelişen direnç mekanizmasından dolayı yeni ilaç araştırmaları kapsamında, gerek ülkemizde, gerekse ülkemiz dışında; araştırma amacımız olan şark çıbanı etkeninin yanı sıra, diğer protozoonlar, virüsler, bakteriler ve helmintler üzerine de farklı bitki ekstralarının aktivitesi ile ilgili bir çok araştırma yapılmıştır (1,24,36,47-50,53-56, 58-61,69,81-83,102,109,110,127,129,138,139).

Antileishmanial ilaçların aktivitesinin en iyi şekilde, makrofajlar içindeki amastigot formlara karşı belirlenebildiğini; ekstraselüler promastigot formların, serumdaki ulaşılabilen klinik aktif ajanların konsantrasyonuna nisbeten duyarsız olduğunu belirten araştırmacıların yanı sıra, problemin aciliyetinden dolayı leishmaniosise karşı kullanılan ajanların bir kısmının deneysel modellerde etkinliğini önceden göstermeksizin kullanıldığını belirten araştırmacılar vardır. Araştırmacılar in vitro çalışmaların bir avantajının, toksisiteden dolayı hücre kültürleri ve hayvanlarda kullanılamayacak ilaç dozlarına, promastigotların maruz bırakılabileceğini; böylelikle de parazitin duyarlılığını, antimonial ilaçların davranış ve direnç mekanizmasını belirlemede faydalı olabileceğini belirtmektedirler. Yeni ilaçların etkinliğinin belirlenmesinde daha hızlı, kolay, uygulanabilir metodların geliştirilmesi ile; bir çok laboratuvar da uygulama kolaylığından dolayı promastigotlar üzerinde ilk denemeler yapıp, daha sonra da amastigotlar ve canlı hayvan deneyleri ile deney sonuçları desteklenmelidir (19,21,28).

Organik kimya'nın gelişmesine bağlı olarak birçok bileşikler geliştirilmiş, bunlar değişik hastalıkların tedavisinde denenmiş ve kullanılmıştır. Fakat zamanla gelişen direnç mekanizmasından dolayı, daha yeni bileşiklere ihtiyaç duyulmuştur. Son yıllarda çoğalan Kanser, AIDS, ...vb. tedavisi imkansız veya çok zor olan hastalıklar için gerek halk, gerekse bilim adamları doğal ürünlerden yeni bileşikler elde ederek tedaviye yönelmişlerdir (25,26,59,72,94,104,113,129,132,135,136).

Arora ve ark.'ları, ilaçların metabolizma ve kinetiklerinin hayvan deneylerinde insanlardakinden belirgin bir şekilde farklı olduğu için, in vitro olarak promastigotlar ve intrasellüler amastigotlar üzerinde çalışmışlardır. In vitro olarak promastigotlar üzerinde yaptıkları çalışmalarda allopurinol, metronidazol, rifampisin, dapson, amfoterisin B (fungizone), pentamidin isotiyonat, sodyum antimon glukonat'ın değişik konsantrasyonlarının promastigotlardaki % inhibisyonunu incelemişlerdir. Yapılan çalışmada Dapsone'un yüksek konsantrasyonlarda düşük promastigot inhibisyonuna rağmen; diğer ilaçların düşük konsantrasyonlarda yüksek oranda promastigot inhibisyonu gerçekleştirdiklerini saptamışlardır. Yine bu araştırmacıların Cenini ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan naklettiklerine göre, bazı bitki proteinlerin *Trypanosoma* ve *Leishmania*'da, ribozom inaktive etme kapasitesinin bulunduğu belirtilmektedir. Yapılan çalışmada, allopurinol, metronidazol, rifampisin, dapson, AmB, pentamidin isotiyonat ve sodyum antimon glukonatın *L. donovani* promastigotlarına karşı antileishmanial etkinliği araştırılmış ve promastigot inhibisyon oranı sırasıyla, allopurinol için 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml konsantrasyonlarda % 91, % 88, % 64; metronidazol için 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml konsantrasyonlarda % 90, % 69, % 47; rifampisin için 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml konsantrasyonlarda % 90, % 82, % 71; dapson için 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml konsantrasyonlarda % 52, % 38, %10; AmB'nin 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1 µg/ml, pentamidin isotiyonat'ın 0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,12 µg/ml ve sodyum antimon glukonat'ın 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml konsantrasyonlarında % 100 olarak saptanmıştır (7).

Assmar ve ark.'ları 4 farklı *Vinca sp.* türünün yaprak ve gövdelerinden elde ettikleri ekstrelerin etkinliğini, *Leishmania major* üzerinde in vivo ve in vitro olarak çalışmışlar; in vivo çalışmada, hazırlanan ekstreleri topical ve intralezyonel olarak araştırmışlardır. Promastigotlar üzerinde yaptıkları in vitro çalışmada farklı konsantrasyonlardaki ekstrelerin, kontrole karşılaştırıldığında önemli derecede parazitleri tahrip ettiğini, yine in vivo denemelerin de oldukça iyi sonuçlar verdiğini saptamışlardır (8).

Aybay ve ark.'ları 10 farklı antimikrobik ajanın *L. major* promastigot hücre proliferasyonu üzerine etkisini, MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) klorimetrik yöntemi ile araştırmışlar; bu çalışmada kullanılan 10 antibiyotikten chloramphenicol dışında diğerlerinin *L. major* promastigot hücre

proliferasyonunu in vitro koşullarda, değişen konsantrasyonlarda inhibe ettiklerini gözlemlemişlerdir (9). [³H]thymidine karıştırılması, hemositometrede sayım vb. gibi daha alışıldık tekniklere göre MTT ve XTT gibi tetrazolium tuzu deneylerinin; reagenler ve donanımdaki maliyet tasarrufu, daha az emek ve radyoizotopların kullanımındaki atıkların elden çıkarılması ve güvenlik problemlerinin ortadan kaldırılması gibi avantajları içerdiği belirtilmektedir (9,98,111).

Barata ve ark.'ları *Virola* türleri ve bunların sentetik analoglarından elde edilen neolignanların anti-leishmanial aktivitelere yönelik yaptıkları araştırmada hem amastigotlar, hem de promastigotlar üzerinde çalışmışlardır. Neolignanların bazısı *L. donovani* promastigotlarına karşı 30 µM'da aktif iken, intraselüler amastigotlara karşı ise aynı dozda inaktif bulunmuştur. *Virola pavonis*'den elde edilen doğal bir neolignan 100 µM'da *L. donovani* promastigotlarına aktif, elde edilen diğer bileşikler inaktif bulunmuştur. *Virola surinamensis*'den izole edilen bir neolignan(surinamensis)'ın başka çalışmalarda anti-schistosomal aktivitesi de bulunmuştur. Surinamensis 50 µM'da *L. donovani* promastigotlarına in vitro olarak aktif bulunmuş, fare periton makrofajlarında amastigotlarına karşı test edildiğinde ise seçici toksik etki göstermemiştir. *V. surinamensis*'den elde edilen diğer bileşiklerin 30 ve 100 µM'da farklı oranlarda promastigotlar üzerine aktivite bulunmuştur. Kükürt bağlantılı bileşiklerde, daha yüksek seçici aktivite bulunmuştur. β-ketosülfid bileşiklerinin promastigotlar üzerine etki çalışmalarının başlangıcında küçülmüş kamçı, yerinden ayrılmış çekirdeklerle tipik olmayan hareketsiz formlar oluşturduğu gözlenmiştir (12).

Leishmania promastigotlarının sterol biyosentezi ve büyümesi üzerine antimikotik ajanlar olan azol türevlerinin (itraconazole, ketoconazole, fluconazole) etkisini araştıran Beach ve ark.'ları 36 farklı suşu yukarıdaki maddelerin farklı konsantrasyonlarında incelemişlerdir. Tüm suşlar için, hem büyüme hem de sterol biyosentezinin inhibisyonu ile ilgili ilaç aktivitesi itrakonazol ≥ ketokonazol > flukonazol olarak bulunmuştur. Her üç azol türevinin *L. donovani*, *L. braziliensis* (alt türleri) ve *L. mexicana amazonensis* suşlarına inhibitör etkisi; *L. aethiopica*, *L. major*, *L. tropica*, ve *L. mexicana mexicana* suşlarından daha büyük bulunmuştur (13).

Berman ve Wyler leishmaniosis'e karşı kemoterapötik ajanların araştırılmasına yönelik *L. tropica* ve *L. donovani* suşlarına uyguladıkları farklı bir in vitro modelde; 10-

15 µg/ml pentostam varlığında amastigotların %80-90'ını elemine etmişlerdir. Bu pentostam konsantrasyonu, kutanöz leishmaniosis tedavi edilen insanlarda elde edilen serum seviyesinden, daha düşük veya eşit seviyededir. Besiyerinde serbest bir şekilde çoğalan her iki *Leishmania* promastigotları, pentostamın ≤ 20 µg/ml'lik konsantrasyonundan hemen hemen etkilenmemiştir. Pentamidine karşı ise; makrofaj kültürlerindeki amastigotlar 0,05-0,5 µg/ml'lik konsantrasyonda %85-90 oranında elimine edilirken, promastigotlar $\leq 0,5$ µg/ml'lik konsantrasyonlara maruz bırakılınca sadece %20-40 oranında azalmışlardır. Makrofaj kültüründe 1 µg/ml amfoterisin B tüm amastigotları elimine ederken, promastigotlar 0.25 µg/ml'lik konsantrasyona tabi tutulunca tamamen elimine edilmişlerdir (21)

Problemin aciliyetinden dolayı leishmaniosis'e karşı kullanılan ajanların bir kısmının deneysel modellerde etkinliğini önceden göstermeksizin kullanıldığını belirten Berman ve Lee, in vitro ortamda insan makrofajları içerisindeki *L. tropica* amastigotları üzerine, oral olarak kullanılan 19 ilaç ve ilaç kombinasyonun antileishmanial etkinliğini araştırmışlardır. In vitro makrofaj kültüründe, metronidazolün intravenöz uygulama sonrası insanda ulaştığı serum düzeyi olan 30 µg/ml'de parazitlerin % 30'u elimine edilirken, trimetoprim-sulfamethoxazol'ün *Pneumocystis carinii* pnömonisinin sağaltımı için önerilen düşük serum düzeyindeki 5 µg/ml TMP + 100 µg/ml SMX konsantrasyonunda çok az sayıda *L. tropica* paraziti elimine ettiği belirlenmiştir. 10 mg isoniazidin oral kullanım sonrası ulaşılan serum konsantrasyonu olan 3-10 µg/ml ile 600 mg rifampinin oral kullanım sonrası ulaşılan en yüksek serum konsantrasyonu olan 30 µg/ml kombinasyonunun bu çalışmadaki en az etkinliği sağlayabildiği bildirilmiştir. Klorpromazin ve lukantonun ED₅₀ konsantrasyonu 0,8-0,9 µg/ml, ED₉₀ konsantrasyonu ise 2,5 µg/ml olarak bildirilmiştir. Oral kullanım sonrası ulaşılan serum konsantrasyonlarında ($\leq 0,3$ µg/ml) klorpromazinin parazitin %15'ini, kinakrinin ise % 35'ini elimine ettiği belirlenmiş; *Trypanosoma cruzi* enfeksiyonunun sağaltımında kullanılan nifurtimoksinin ve nitrofurantoinin ED₅₀ konsantrasyonları yaklaşık 3 µg/ml olarak saptanırken, bu değer nitrofurazon, nifuroksim ve furazolidon için sırasıyla 0,46 µg/ml, 0,61 µg/ml ve 0.53 µg/ml olarak bildirilmiştir. In vitro olarak allopurinolün, pentostam'ın 5 µg/ml'lik düşük konsantrasyonunda antileishmanial aktivitesini arttırdığı saptanırken, aynı konsantrasyondaki allopurinol ve pentostam'ın 20'şer µg/ml'lik

konsantrasyonları birlikte kombine edildiğinde antileishmanial etkinin artmadığı gözlenmiştir (22).

Berman ve ark.'ları, kültür ortamında *L. mexicana*'nın çoğalması ve sterol biyosentezine ketokonazol'ün etkilerini çalıştıkları araştırmada; klinik olarak etkili bir antimikotik olan ve insan makrofajlarında *L. mexicana*'nın amastigot formlarına karşı da etkili olan ketokonazolün, yaklaşık 10^{-8} M'lık bir konsantrasyonda kültürdeki promastigotların %50 oranında çoğalmasını engellediği ve sterol biyosentezini zayıflatmış bulunmuştur. Ketokonazol'ün antipromastigot aktivitesini belirlemek için, taze besiyeri ile ml'de 1×10^6 olacak şekilde dilüe edilen promastigotlar 0-10 µg/ml'lik ketokonazol konsantrasyonunda, Schneider besiyerinde 4 gün, modifiye RIII besiyerinde ise 8 gün, 100ml'lik doku kültür kaplarında, 26 C°'de inkübe edilmiştir. 4 ve 8 gün'lük inkübasyon sonrasında uzamış durumdaki hareketli promastigotlar bir hemositometre'de sayılmıştır (23). Bizim çalışmalarımızda da bazı ekstrelerde promastigotların uzadıklarını, lobutlaştıklarını, hareketli olmalarına rağmen şekillerinin bozulduğunu, farklı şekiller alabildiklerini gördük .

Camacho ve ark.'ları, Afrika'da ormanlarda yetişen, her yıl yapraklarını döken tırmanıcı bir çalı olan, kök ve gövdeleri halk tarafından solucan düşürücü, afrodisyak, aneljezik v.b. farklı amaçlar için ilaç olarak kullanılan *Stephania dinklagei* 'nin (Menispermaceae) metanolik ekstraktını ve farklı alkaloidlerini (6 farklı alkaloid) elde ederek, farklı protozoonlara karşı antiprotozoal yönden araştırmışlardır. Araştırmacılar *S. dinklagei*'nin toprak üstü kısımlarının metanolik ekstraktının *L. donovani* promastigotlarına ($IC_{50} = 8 \pm 0.21$ µg/ml) ve *T. b. brucei*'nin tripomastigotlarına ($IC_{50} = 31.25 \pm 3.3$ µg/ml) karşı önemli aktivite gösterdiğini tesbit etmişlerdir. Elde edilen bileşiklerden Liriodenine, *L. donovani* promastigotlarına ($IC_{50} = 26.16$ µM ve *P. falciparum* 'a ($IC_{50} = 15$ µM) karşı çok güçlü bir aktivite göstermiştir. Bu çalışmada bulunan liriodenine'nin antileishmanial aktivitesi, daha önce başka araştırmacıların (127), belirttikleriyle uyuma göstermiştir. Test edilen bileşikler *L. donovani*'nin amastigot formlarına karşı aktivite göstermemiş, N-Methyliriodendronine amastigotlara karşı en aktif etkiyi $IC_{50} = 36.1$ µM'lık konsantrasyonda göstermiştir. Diğer test edilen dört bileşikten hiçbiri, ilaç standartlarıyla karşılaştırıldığında antiprotozoal ve sitotoksik aktivite göstermemiştir (24).

Chakrabarti ve ark.'ları doğal olmayan indolylquinoline türevlerini *L. donovani* amastigot ve promastigotlarına karşı in vitro olarak denemişler; yedi türevden dördü etkisiz, üçünün ise hem promastigotların çoğalmasını inhibe ettiğini, hem de parazitin amastigot ve promastigot formlarına sitotoksik etkiye sahip olduklarını saptamışlardır. Araştırmada da belirtildiği gibi indole ve quinoline, biyolojik aktif bileşiklerin büyük bir kısmında yaygındır. Bazı indole ve quinoline türevlerinin antileishmanial aktiviteye sahip olduğu başka araştırmalarda da belirtilmiştir (24,27,68,126).

Leishmania türlerine karşı yeni bir antiparazitik ajan olarak Licochalcone A'nın aktivitesini araştıran Chen ve ark.'ları, Çin meyan köklerinden (*Glycyrrhiza glabra*, *G. uralensis*, *G. inflata*) elde ettikleri bir alkol ekstraktının *L. major* ve *L. donovani* promastigotlarının çoğalmasını inhibe ettiğini bulmuşlardır. Yapılan deneylerde, 1:800 ($p<0.05$)'lük bir ekstrakt dilüsyonunda, *L. major* ve *L. donovani* promastigotlarının logaritmik olarak çoğaldığı kültürlerde önemli bir azalma gözlenmiştir. Logaritmik faz promastigotlarının %50 inhibisyonu, 1:400–1:800 arasındaki ekstrakt dilüsyonunda olmuştur. 1:100'lük ekstrakt dilüsyonunda promastigot çoğalmasının tamamının inhibisyonu olmuştur. Promastigotların %90'ından daha fazlasının inhibisyonu, 1:100–1:200 arasındaki dilüsyonlarda gözlenmiştir. Paralel deneylerde, makalede belirtilen ekstraksiyon yöntemiyle hazırlanan, diğer bir bitki ekstraktı (*Fructus aristolochiae*), *L. major* ve *L. donovani* promastigotlarına, test edilen en düşük dilüsyon'da (1:100), aynı etkiyi göstermiştir. Yine bu çalışmada promastigot canlılığı, kamçı canlılığı ve parazit morfolojisi gibi morfolojik kriterler yönünden araştırılmıştır. 1:200'lük dilüsyon promastigotların %85'inden daha fazlasının hareketlerini inhibe etmiştir. Bu dilüsyonda, promastigotların yaklaşık %75'i anormal bir yuvarlak morfoloji sergilemiştir. Licochalcone A parazitlerin 3 ve 6 günlük kültürlerinde güçlü bir inhibitör etki göstermiştir. Hem *L. major*, hem de *L. donovani*'deki logaritmik ve sabit faz promastigotlarını inhibe eden konsantrasyon 2.5 µg/ml (*L. major*) ve 4 µg/ml (*L. donovani*)'dir. Parazitler licochalcone A ile daha uzun bir süre inkübe edildiğinde, inhibitör aktivite daha güçlüdür ve daha az licochalcone A dozuna ihtiyaç duyulur. Yine bu çalışmada, licochalcone A ile inkübe edildiğinde parazitlerin, mümkün olabilecek ultrastrüktürel değişiklikleri belirlenmiştir. 10 µg licochalcone A ile inkübe edilen promastigotlarda, büyük oranda genişlemiş boş, parlak mitokondriler görülürken, diğer organeller normal saptanmıştır (28).

Çeliksöz ve ark.'ları, trimethoprim-sulphametaxozole ve ofloksasin'in in vitro koşullarda *Leishmania*'ların promastigot formlarına herhangi bir etkisinin olup olmadığını araştırmışlar ve her ikisinin de etkili olmadığını saptamışlardır (30).

Delorenzi ve ark.'ları *Peschiera australis* (Apocynaceae) bitkisinden elde ettikleri değişik bileşiklerle antileishmanial aktivite çalışmaları yapmışlar; bitkinin gövdesinden elde ettikleri etanolik kaba ekstraktın, aksenik kültürlerde *L. amazonensis*'in promastigotlarının ve infekte fare makrofajlarındaki amastigotların çoğalmasını inhibe ettiğini bulmuşlardır. Daha sonra organik çözücülerle kaba ekstrakt 3 fraksiyona ayrılmıştır. Sadece kloroform fraksiyonu parazitin her iki formuna antileishmanial aktivite göstermiştir. Kloroform fraksiyonunda saptanan bu aktivite, 25 µg/ml'de promastigot çoğalmasını tamamen; 20 µg/ml'de de amastigot canlılığının %98'ini inhibe etmiştir. Yapılan antipromastigot aktivite testinde, kaba ekstaktın günlük 1 mg/ml'lik uygulamasında *L. amazonensis*'in çoğalması inhibe edilmiştir. Promastigotların hareketleri ve çoğalmalarındaki %30'luk bir inhibisyona ekstrakt uygulamasından 24 saat sonra; 6 gün sonra da %100'lük inhibisyona ulaşılmıştır. Sulu fraksiyon (Coronaridine)'la (100 µg/ml) promastigotların muamelesi, 3 gün sonra parazit canlılığının %80'ini inhibe etmiştir. Kloroform fraksiyonu, glukantimden 5-6 kat daha etkili bulunmuştur. Kloroform fraksiyonu ve coronaridine'nin neden olduğu morfolojik değişiklikleri değerlendirmek için, promastigotlar ve infekte makrofajlar bu bileşiklerle muamele edilip transmisyon elektron mikroskopuyla incelenmiştir. Kloroform fraksiyonuna maruz bırakılan promastigotlar üzerine de en çarpıcı değişiklik, mitokondrinin düzensizliği ve önemli derecede şişmesidir. Diğer organellerde değişiklikler gözlemlenmemiştir. Amastigotlarda da benzer mitokondri değişiklikleri gözlemlenmiştir (37). Chen ve ark.'larının(28), Torres-Santos ve ark.'larının(118) araştırmasında da benzer değişiklikler gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda da bitki ekstraktlarının bir kısmının Glukantim'den daha etkili olduğu saptanmıştır.

El-On ve Messer, *in vitro* ortamda *L. major*'un fare makrofajları içerisindeki amastigotlarına ve sıvı besiyerindeki promastigotların karşı metilbenzetonyum kloridin antileishmanial etkisini araştırmışlardır. İlacın 1 µg/ml konsantrasyonunda belirgin bir inhibisyon sağladığı ve 4. günde üreme oranının % 6 olduğu belirlenmiştir. Promastigot formu için kullanılan en yüksek konsantrasyon olan 0,2 µg/ml'de 2. günde üreme oranı

% 6; 4. günde ise % 0,2 olarak saptanmış, sonuçta metilbenzentyum klorid *L. major* amastigotlarına karşı çok etkili bulunmuştur (41).

Leishmanial parazitler üzerine Rifampisin'in etki temelini araştıran El-On ve ark.'ları, *L. major* promastigot ve amastigotlarının in vitro gelişmesini azalttığını saptamışlardır. 100 µg/ml'ye kadar, in vitro ortamda *L. major* promastigotlarına uygulanan rifampisin gelişmeyi etkilememiştir. Parazitlerin gelişmesi, 500 µg/ml'lik konsantrasyona, 24 saat maruz bırakılmakla hızlı bir şekilde inhibe edilmiştir. Gelişmenin inhibisyonuna ilaveten, promastigot morfolojisinin mikroskopik çalışmasında, hızlı bir şekilde hücre içi granulasyon, kamçıda kısalma, büyüklükte belirgin bir değişme gözlenmiştir. Bu çalışmada, *Leishmania*'nın farklı suşlarının promastigotları, rifampisine farklı duyarlılıklar göstermişlerdir. *L. donovani*, *L. minor* ve *L. major*'a nazaran *L. aethiopica* daha duyarlıdır (42).

El Tahir ve ark.'larının Sudan'dan topladıkları sekiz bitki türünden elde ettikleri, ham metanol ekstraktlarının ön çalışmasında, sadece üç bitki türünün, < 0.5 µg/ml'lik bir konsantrasyonda, *L. major* promastigotlarına önemli bir in vitro antileishmanial aktivite gösterdiği saptanmıştır. Bitkilerden *Azadirchta indica* 11.5 µg/ml, *Maytenus senegalensis* 55 µg/ml, *Eucalyptus globulus* 78 µg/ml'de IC₅₀ değerlerini vermiştir. *Pseudocedra kotschy* ve *Balanites aegyptiaca*'nın ekstraktları, < 100 µg/ml'de, orta derecede bir biyolojik aktiviteye sahip iken; *Sonchus oleraceus*, *Khaya senegalensis* ve *Tamarindus indica* aynı konsantrasyonda, *L. major*'a karşı önemli bir antileishmanial aktivite sergilememiştir. Metanol ekstraktlarının fraksiyonlanmasında, *M. senegalensis*'in diklorometan ve etil asetat içindeki fraksiyonları, 5 µg/ml'de en yüksek antileishmanial aktiviteyi göstermiştir. IC₅₀ değerleri ise diklorometan'da 5.01 µg/ml, etil asetat'da ise 29.7 µg/ml'dir (43).

Kullanılmakta olan antileishmanial ilaçlara, daha etkin alternatifler bulmak için yapılan araştırmada, Evans ve ark.'ları antimikobakteriyel bileşiklerin ana gruplarının aktivitesini hem in vitro, hem de in vivo hayvansal modellerde incelemişlerdir. In vitro olarak, çözülebilir en uygun formda, Clofazimine *L. mexicana amazonensis*'e karşı 2.3 mg/ml, *L. donovani*'ye 1.4 mg/ml ve *L. major*'a karşı 0.5 mg/ml'lik bir ED₅₀ dozu ile, test edilen en aktif bileşik olarak bulunmuştur. Thiambutosine (*L. m. amazonensis*'e karşı ED₅₀ 11 µg/ml) ve salinazid (*L. m. amazonensis*'e karşı ED₅₀ 18 µg/ml) diğer aktif

bileşiklerdir. Rifampisin kutanöz suşlara kısmen aktif, *L. donovani*'ye karşı ise inaktif bulunmuştur. In vivo olarak ise, sadece clofazimine önemli bir aktivite göstermiştir ve en aktif olarak kutanöz infeksiyonlara karşı en aktiftir (44).

Fournet ve ark.'ları, yerli halk ve sonradan gelen kolonistlerden elde ettikleri bilgileri de değerlendirerek, Bolivya'da tıbbi amaçlarla kullanılan bitkilerin leishmaniasidal ve trypanosomasidal aktivitelerini, etnofarmakolojik ve botanik açıdan, kutanöz leishmaniasisin endemik olduğu iki farklı bölgede araştırmışlardır. Bitkilerin petrol eteri, kloroform, etil asetat ve etil alkol'de ekstraktları hazırlanıp, yapılan deneylerde parazitlerin ekstraktlarla temasından 48 saat sonraki gelişimleri değerlendirilmiştir. Test edilen ilaçlarla suşların duyarlılığını karşılaştırmak için %90 inhibitör konsantrasyonları (IC₉₀) kullanılmıştır. Kutanöz leishmaniasisin endemik olduğu alanlarda bu hastalığı tedavi etmek için, topikal olarak kullanılan 14 bitki, bu araştırmada *Leishmania sp.* ve *Trypanosoma cruzi*'ye karşı in vitro olarak test edilmiştir. Sanguinarine ve Chelerythrine gibi benzophenanthridine alkaloidlerinin izole edildiği *Bocconia integrifolia* ve *B. pearcei* (Papaveraceae); 4-hydroxy-1-tetralone'nin izole edildiği *Ampelocera edentula* (Ulmaceae); üç ayrı naphthoquinon'un izole edildiği *Pera benensis* (Euphorbiaceae); çeşitli quinoline alkaloidlerinin izole edildiği *Galipea longiflora* (Rutaceae)'nin in vitro ve in vivo olarak antileishmanial aktiviteye sahip oldukları saptanmıştır. Yine, başka hastalıklar için kullanılan 53 tıbbi bitki araştırılmış ve bu bitkilerin bir kısmı 100 µl/ml'de *T. cruzi* ve *Leishmania spp.*'ye karşı in vitro olarak aktif bulunmuştur. *Oxandra espinosa*'dan yeni aktif monoterpen espinanol; *Berberis spp.*'den, antiprotozoal aktivite sergileyen berbamine, obaberin, ve isotetrandrine gibi bazı bisbenzylisoquinoline'ler izole edilmiştir. Asteraceae familyasının araştırılmış olan 26 tıbbi türünden 10 ekstrakt 100 µl/ml'de aktivite göstermiştir. Fakat test edilen Solanaceae ve Leguminosae familyasından elde edilen hiçbir ekstrakt aktivite göstermemiştir. Yerli halk tarafından ateş ve ishal için kullanılan bir tıbbi bitki olan *Aniba canellila* (Lauraceae) 100 µl/ml'de in vitro olarak aktif bulunmuş fakat, *L. amazonensis*'le infekte farelerde in vivo olarak bu aktivite doğrulanamamıştır. Ayrıca kemotaksonomik kriterlere göre toplanılan 43 bitki araştırılmış, bu bitkilerden hazırlanan 14 ekstrakt in vitro olarak 100 µl/ml'de aktif bulunmuştur. Bunlardan *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae), *Abuta rufescens* (Menispermaceae) ve *Abuta pahnii*'de isoquinoline alkaloidleri saptanmıştır. *Munnozia*

maronii (Asteraceae)'nin yapraklarından, dehidrozaluzanın C olarak tanımlanan bir sesquiterpene lactone fraksiyonlanmış ve bu bileşik *Leishmania spp.*'ye karşı antileishmanial aktiviteden sorumlu bulunmuştur. Araştırmacılar, bu etnofarmakolojik çalışmaların sonunda kutanöz leishmaniosis lezyonlarını tedavi etmek için halk tıbbında kullanılan Bolivya bitkilerinden bir çoğunun antileishmanial aktiviteye sahip olduklarını saptamışlardır. Yine, ülkenin asıl yerli halkının kullandıkları bitkilerin, sonradan ülkeye gelen kolonistlerin kullandıklarından daha etkili olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, yapılan bu çalışmalar ışığında, “etnofarmakolojik araştırmaların, leishmaniosis ve diğer protozoon hastalıklarına karşı yeni aktif bileşiklerin bulunması için, iyi bir yol olduğunu” belirlemişlerdir (47,48,50,58).

Fournet ve ark.'larının daha önceden yapmış oldukları bu çalışmada, *Annonaceae*, *Berberidaceae*, *Hernandiaceae* ve *Menispermaceae* familyalarından elde edilen isoquinoline alkaloidlerinin (özellikle bisbenzylisoquinoline alkaloidleri) *Leishmania spp.*'ye karşı etkili bir aktiviteye sahip olduklarını bulmuşlardır. Bunların arasından gyrocarpine, daphnandrine ve obaberine en önemlilerindendir. Bu alkaloidlerin antileishmanial aktiviteleri, in vitro olarak, *L. donovani*, *L. braziliensis* ve *L. mexicana amazonensis* suşlarında araştırılmış ve bu türlerin promastigotlarına karşı önemli derecede aktif oldukları gösterilmiştir (48,60,137).

Hatimi ve ark.'ları *Artemisia herba-alba*'nın su ile hazırlanan ekstraktı ile uçucu yağını, *L. tropica* ve *L. major*'a karşı antileishmanial aktivite yönünden araştırmışlar; yapılan araştırmalar sonucunda, en güçlü leishmanisidal aktivite her iki suşa karşı, 2 µg/ml ile uçucu yağda gözlenmiştir. Su ile hazırlanan ekstraktda antileishmanial aktivite 4 µg/ml'de olmuştur (55).

Hiraoka ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, *L. donovani* ve *L. tropica* promastigotlarına karşı Karbosiklik inosin'in in vitro antileishmanial etkinliği araştırılmış, ilacın ED₅₀ düzeyi *L. tropica* için 0,083 µM, *L. donovani* için 0,13 µM olarak saptanmış; 3 µM konsantrasyonunda ise promastigotların üremesini % 100 olarak önlediği bildirilmiştir (57).

Iwu ve ark.'larının bildirdiğine göre Sauvain ve ark.'ları Guyana platolarından toplanan *Jacaranda copaia* bitkisinin kuru gövdesinden izole ettikleri Quinone'lerin, *L. amazonensis*'in (ED₅₀ 0.02mM) amastigot ve promastigotlarına karşı in vitro olarak

önemli aktivite gösterdiğini belirtmektedirler. Fakat farelerde in vivo olarak zayıf aktivite göstermiştir. Quinol ve quinone asetat gibi sentetik analogların, farede deneysel olarak oluşturulan leishmaniosiste, artmış bir aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. *Bignoniaceae* familyasının çeşitli üyelerinde bulunan naphtoquinone'lar, in vivo ve in vitro olarak *Leishmania sp.*'nin değişik suşlarına karşı aktiftir. Lapachol, diospyrin, plumbagin ve β -lapachone bu grubun en aktif üyeleridir. Yine, Malezya'da tıbbi bitki olarak kullanılan *Polyalthia macropoda*'nın gövde kabuklarından izole edilen diterpene'nin antileishmanial aktivite gösterdiği tesbit edilmiştir (60).

Iwu ve ark.'ları başka bir çalışmada, Nijerya halk tıbbında antiparazitik ilaç olarak kullanılan, 11 bitkiden elde ettikleri ekstraktların antileishmanial aktivitelerini, radiorespirometrik mikrottest (RAM)'le değerlendirmişler; test edilen 11 metanolik ekstraktan 5'ini (*Gongronema latifolia*, *Dorstenia multiradiata*, *Picralima nitida*, *Cola attiensis*, *Desmodium gangeticum*), 50 μ g/ml veya daha az konsantrasyonda, *L. chagasi*'ye karşı aktif bulmuşlardır. *C. attiensis*, *D. multiradiata* ve *D. gangeticum* ekstraktlarının amino asit katabolizmasına karşı daha aktif; *P. nitida* ve *G. latifolia* ekstraktlarının ise şeker ve yağ asitlerini inhibe ettikleri görülmüştür. Bu bitkilerden, *C. attiensis* migren, bronşit, nezle tedavisinde; *P. nitida* malarya, Afrika uyku hastalığı ve bakteriyel infeksiyonların tedavisinde; *D. gangeticum* antifungal, antiviral, antienflamatuvar ve çeşitli parazitik deri infeksiyonlarında; *D. multiradiata* antiviral ve lokal antienflamatuvar olarak; *G. latifolia* bilharzia, viral hepatit ve antimikrobial olarak geleneksel tıpta kullanıldığı belirtilmektedir (61).

Jackson ve ark.'ları insan leishmaniosisinin tüm formlarından izole edilmiş parazitlere kantitatif, hızlı ve kolaylıkla uygulanabilir bir in vitro mikrottest tanımlamışlardır. Araştırmacıların belirttiğine göre yeni ilaç gelişiminin, basit, hızlı ve her zaman her yerde uygulanabilir (*Leishmania tür/suşlarıyla* enfekte insanlara) ilaç değerlendirme yöntemi eksikliğinden kaynaklandığı bildirilmektedir. İlaç duyarlılığının daha çok parazit büyüme inhibisyonu veya parazit ölümü ile belirlendiği bildirilmektedir. Kendilerinin uyguladıkları radiorespirometrik mikrottest'in, daha kısa bir sürede daha düşük ilaç konsantrasyonunda aracı ilacın parazit zararının ortaya çıkmasını kolaylaştırdığı ve böylelikle promastigotlar tarafından ^{14}C substratlarının bir dizisinin $^{14}\text{CO}_2$ 'ye katabolizmasının ilaç tarafından engellenmesine dayandığını belirtmektedirler (62).

Jernigan ve ark.'ları *L. chagasi* promastigotlarına karşı Atovaquone'nin in vitro aktivitesini serumlu ve serumsuz ortamlarda araştırmışlar; serum olmadan yapılan deneylerde, canlı promastigotlarda %90'dan daha büyük azalmayı atovaquone'nin $\geq 3.13 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda sağladığını bulmuşlardır. Başlangıç (0) zamanından itibaren %10 Fetal Calf Serum varlığında deneyler yapıldığı zaman, ölüm, sadece $\geq 25 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda gözlenmiştir. *L. chagasi*'nin atovaquone duyarlı olduğu fakat serumun, etkisini azalttığı bulunmuştur. Araştırmacılar atovaquone'nin hidrofobik kısmının, ilacın biyolojik varlığını azaltan lipidlerle karşılıklı etkileşimde olabileceğini; serumun in vitro olarak atovaquone'i engelleyebilmesine rağmen, lipofilik ilaçların amastigotların bulunduğu makrofajlarda yoğunlaşmasından dolayı etkinin, in vivo olarak daha az olabildiğini savunmaktadırlar (63).

Johnson ve ark.'ları 8-quinolinamin'lerin, hamsterlerdeki *L. donovani* amastigotlarına karşı antileishmanial aktivitelerini araştırmışlar; bunlardan 4-[6-[(6-methoxy-4-methyl-8-quinoliny) amino] hexyl]-1-piperazineethanol'ün hamsterlerdeki *L. donovani* infeksiyonlarına karşı son derece etkili olduğunu saptamışlardır (64).

Kinnamon ve ark.'ları da lepidinlerin (6-methoxy-4-methyl-8-aminoquinoline derivatları) bir serisini hamsterlerde oluşturulan *L. donovani* enfeksiyonlarına karşı çalışmışlardır. Bu sınıf bileşiklerin bir kısmının meglumine antimonat (Glucantime)'den çok fazla aktiviteye sahip olduklarını bulmuşlardır (68).

L. infantum promastigotlarının canlılığı ve çoğalmasına Allopurinol ve Chloralin gibi antiparazitik ilaçların etkinliğini araştırmayı amaçlayan Kamau ve ark.'ları, ilaçların değişik konsantrasyonlarına *L. infantum* promastigotlarını maruz bıraktıktan sonra tamamlayıcı iki Flow Sitometrik Yöntemi kullanmışlardır. Yapılan çalışmalarda, $50 \mu\text{g/ml}$ 'nin üzerindeki allopurinol konsantrasyonlarının promastigotların çoğalma oranında belirgin bir düşüşe yol açmasına rağmen; canlılık deneylerinde $800 \mu\text{g/ml}$ allopurinol varlığında inkübe edilen promastigotlar 96 saat sonra bile canlı kalmışlardır. Oysaki $10 \mu\text{M}$ ($2.7 \mu\text{g/ml}$) chloralin ile bırakılan promastigotların %90'ından daha fazlası, 48 saat sonra ölmüşlerdir. Araştırmacılar bulgulardan, dinitroanilin bileşiği olan chloralin'in promastigotlara karşı leishmaniosidal etkiye sahip olduğunu; allopurinol'ün ise leishmaniostatik etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Yine, araştırmacılar, proliferasyon ve canlılık üzerine Flow Sitometrik Yöntemle elde edilen bilgilerle,

Hemositometri Yöntemiyle elde edilen sonuçların birbirleriyle tutarlılık gösterdiğini belirtmektedirler (65).

Kapil, Piperine ve Pentamidine'i karşılaştırmalı olarak çalışmış ve aşağıdaki sonuçları bulmuştur: piperine 120 µg/ml'de %100, 100 µg/ml'de %86, 80 µg/ml'de %70 oranında; pentamidine ise 120 µg/ml'de %100, 100 µg/ml'de %100, 80 µg/ml'de %90 oranında promastigotları inhibe etmiştir. Doğal antiprotozoal ürünler olan gyrocarpine, daphnandrine, obaberine, diospyrin ve pinifolic acid gibi piperine'nin de antileishmaniosidal etkiye sahip olduğu bulunmuştur (66).

Khan ve ark.'ları Pakistan' da değişik amaçlarla kullanılan Massicot (Murdar sung)'un yerli, ham ilaç süspansiyonunu in vitro olarak antileishmanial aktivite yönünden araştırmışlar; 144 saatlik periyot süresince %0.5(w/v)'lik ilaç konsantrasyonunun, canlı promastigot sayısını %20'den %1'e düşürdüğünü saptamışlardır. %2'lik ilaç konsantrasyonu ile temas ettirilen 120 saatin sonunda canlı promastigot sayısı %0 olmuştur. %1 ve %1.5'lik ilaç konsantrasyonlarında ise canlı promastigot sayıları sırasıyla %1 ve %0.35 olmuştur. İlaç farklı konsantrasyonlarda, önemli bir derecede antileishmanial aktivite göstermiş; %1.5 ve %2 ilaç konsantrasyonu kullanıldığı zaman 11. günde, promastigot sayısı başlangıç değeri olan %100 (5×10^6 promastigot/ml)'den %0'a düşmüştür. İlacın konsantrasyonu ve ilaçla temas süresi arttıkça, ilacın antileishmanial aktivitesi de artmıştır. Fakat in vivo çalışmalarla da kontrolün gerektiği belirtilmektedir (67).

In vitro olarak *L. donovani* amastigot ve promastigotları üzerine disodyum tuzu olan Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA)'in etkisini belirlemek için çalışan Mbatı ve ark.'ları amastigotlara, promastigotlardan daha fazla etki saptamışlardır. Zamana bağlı olarak, 1. ve 2. günde, 1 mg/ml EDTA ile muamele edilen kültürler en yüksek parazit popülasyonuna sahip iken; 0.2 mg/ml EDTA ile temas ettirilen kültürler 2. derecede; oysa kontroller en düşük sayıda parazit popülasyonuna sahip çıkmıştır. Zaman ilerledikçe (7. günde) 1 mg/ml EDTA konsantrasyonu parazit popülasyonunu farkedilir derecede azaltmış, fakat tamamen ortadan kaldırmamıştır. 0.2 mg/ml'lik konsantrasyon ise, parazit sayısını belirgin bir şekilde azaltmamıştır. Kontroller ise en yüksek parazit sayısına ulaşmış bulunmuştur (12×10^5 promastigot/ml). Dolayısıyla kısa süreli temasta EDTA'nın, değişen konsantrasyonlarının promastigotlar üzerine etkisi az olmuş; zaman

uzadıkça EDTA'nın Leishmaniosidal özelliği önemli bir noktaya gelmiştir. Oysa, makrofajlarda hem EDTA ile tedavi, hem de zamanın uzunluğu amastigotların ortadan kaldırılmasında önemli bulunmuştur (75).

Misra ve ark.'ları Trans-Asonitik Asit'in (TAA) antileishmanial aktivitesini araştırmışlar; parazitin enerji metabolizmasında hayati bir rol oynayan asonitaz enziminin bir inhibitörü olan TAA'nın, *L. donovani* promastigotlarının çoğalmasını inhibe ettiğini saptamışlardır. TAA'nın inhibitör etkisi amastigotlarda, promastigotlardan daha fazla bulunmuştur. Transasenitik Asit'in, pirinç hariç *Gramineae* familyasının ve şeker kamışı suyunun (%0.3-2.1) önemli bir bileşeni olup gerek tropikal ülkelerde, gerekse de diğer ülkeerde popüler bir içecek olduğu belirtilmektedir (77).

Moreira ve ark.'ları farklı *Leishmania* promastigotlarına meglumine antimonat ve pentavalent antimonial ilaçların in vitro aktivitesini araştırmışlar; *L. guyanensis* ve *L. braziliensis* promastigotları doza bağımlı olarak azalmış ve maksimum aktivite (yaklaşık % 70'lik büyüme inhibisyonu)'ye 20 mM'da ulaşılmıştır. Daha yüksek konsantrasyonlarda, inhibisyonda belirgin bir artış görülmemiştir. %50'lik inhibisyona sebep olan Glukantim konsantrasyonlarında gelişen *L. guyanensis* promastigotlarının morfolojik olarak değişikliklerini saptamışlardır. Promastigotlardan çoğu ince, uzamış ve genellikle daha az hareketli bulunmuştur. Kültürde normal olarak gözlenen rozetler, alışıldığından daha fazla organizma içerdiği görüldüğü için hücre yüzey karakteristikleri üzerine glukantimin etkisini değerlendirme deneyleri de yapmışlardır. Glukantim, Concovalin A'nın neden olduğu promastigot aglütinasyonunu çok fazla etkilememiştir. Araştırmacılar in vitro çalışmaların bir avantajının, toksisiteden dolayı hücre kültürleri ve hayvanlarda kullanılamayacak ilaç dozlarına, promastigotların maruz bırakılabileceğini; böylelikle de parazitin duyarlılığını, antimonial ilaçların davranış ve direnç mekanizmasını belirlemede faydalı olabileceğini belirtmektedirler (79). Yine Moreira ve ark.'larının yaptıkları başka bir çalışmada, kutanöz ve mukokutanöz leishmaniosise neden olan farklı *Leishmania* türleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda, farklı suşların Glukantim'e dirençli olmalarına rağmen, Pentostam'a duyarlı olduklarını saptamışlardır. Deneylerin sonucuna göre bu antimonial bileşiklerin kimyasal yapısı ve in vitro aktiviteleri arasında bazı ilişkilerin var olduğunu; bu sonuçlardan dolayı da

leishmaniosis tedavisinde Glukantim ve Pentostam'ın terapötik etkisini karşılaştırmak için yeniden bir klinik değerlendirmeye gidilmesi gerektiğini savunmuşlardır (80).

Nik A Rahman ve ark.'ları Malezya'da tıbbi amaçla kullanılan belirli bitkilerin ekstraktlarının antimalarial aktivitelerini araştırdıkları in vitro çalışmada, kloroform ekstraktlarının, metanol ekstraktlarından daha etkili olduklarını belirtmektedirler (82).

Oketch-Rabah ve ark.'ları Asteraceae familyasından *Vernonia brachycalyx*'in yapraklarından elde ettikleri ekstraktların aktivitelerini in vitro olarak *P. falciparum* ve *L. major*'e karşı araştırmışlar ve in vitro antileishmanial testlerde 16,17-dihydrobrachycalyxolide bileşiğinin, şu anda leishmaniosis tedavisinde kullanılan, Pentostam'ın aktivitesinden daha fazla olacak şekilde, *L. major*'un promastigotlarının gelişmesini inhibe ettiğini; fakat aynı konsantrasyonlarda insan lenfositlerinin çoğalmasında da inhibe ettiğini saptamışlardır. Yazarlar bunu “*bu bileşiğin antiprotozoal aktivite göstermesi belki de genel toksisiteden dolayıdır*” diye yorumlamaktadırlar (83).

Özçelik ve ark.'larının yaptıkları çalışmada in vitro şartlarda *Leishmania*'ların gerek ilk izolasyonu gerekse de promastigotların logaritmik fazda en fazla bulunması için klasik NNN besiyerini saptamışlardır (87). Biz de çalışmamızda aynı bulguları elde ettik. Özellikle de kondansasyon sıvısına bir miktar RPMI-1640+%20 FCS kattığımızda daha iyi bir üremenin olduğunu gördük .

Pearson ve ark.'ları antipsikotik, antianksiyete ve antiemetik amaçlarla kullanılan Phenothiazine ilaçlarından olan Clorpromazine'ni *L.donovani*ye karşı, protozoosidal aktivitesini belirlemek için araştırmışlar; ilaçla muamele edilmemiş olan kontrollerle karşılaştırıldığında, canlı parazitlerde önemli orandaki bir azalma, $\geq 9.8 \times 10^{-6}$ M (3.12 µg/ml) ($p < 0.01$) chlorpromazine konsantrasyonunda görülmüştür. Promastigotlar için minimal protozoosidal konsantrasyon (18 saat sonra canlı parazitlerde $\geq 90\%$ azalmaya neden olan konsantrasyon), 13.8 µg/ml olmuştur. Araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda Clorpromazine ve analoglarının, enfekte hamsterlerin dalaklarından serbest kalan amastigotları da, promastigotları da öldürebildiği saptanmıştır (89).

Peixoto ve Beverley, in vitro ortamda inkübe edilmiş *L. major* promastigotları üzerine çeşitli Sulfonamidlerin ve Dapsonun antileishmanial etkinliğini araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada sulfamoksol, sulfakinoksalin ve dapson için EC_{50}

konsantrasyonlarının (İnhibisyonda %50'ye kadar büyümeyi inhibe eden, %50'ye kadar logaritmik büyüme oranını azaltan ilaç konsantrasyonu) sırasıyla 150 μ M, 600 μ M ve 600 μ M olduğu; denenen diğer onbir sulfonamidin hepsinin test edilen en yüksek konsantrasyon olan 2 mM da bile antileishmanial etkinliğinin olmadığı bildirilmiştir (90).

Robledo ve ark.'ları, komplike olmayan kütanoz leishmaniosisli hastalardan tedavi öncesi izole edilen 20 *L. panamensis*, 8 *L. braziliensis* suşunun, beş değerli antimon bileşiklerinden meglumine antimoniate (Glucantime®)'e in vitro duyarlılıklarını, U-937 insan monosit hücre kültüründeki intraselüler amastigotlarda ve logaritmik fazdaki promastigotlar üzerinde araştırmışlardır. Glukantim'in katkısız ve ilaç formülasyonlarının %50 etkili dozları (ED₅₀), in vitro olarak SbV'lerine suşların cevaplarının kinetiğine dayanarak belirlenmiş; Glukantim'in katkısız formülasyonunun gücü, belirgin bir şekilde, ilaç formülasyonundan fazla bulunmuştur. Suşlardaki SbV'lerine in vitro duyarlılık < 5.3 μ g/ml'den, >170 μ g/ml'ye kadar değişmektedir. Klinik olarak lezyonları iyileştirmek için, ihtiyaç duyulan SbV ve Glukantim'in ilaç formülasyonunun toplam miktarına in vitro cevap arasında, karşılıklı bir ilişki gözlenmemiştir. Tersine, klinik cevap ve Glukantim'in katkısız formülasyonuna promastigotların in vitro duyarlılığı arasında önemli bir karşılıklı ilişki gözlenmiştir (97).

Sahbaz ve ark.'ları Senegal'de geniş yayılımı olan, çeşitli ağrılar için çok yaygın bir şekilde geleneksel tıpta kullanılan, *Annona senegalensis* (Annonaceae) bitkisinin tohumlarından elde edilen ekstraktların protozoosidal aktivitelerini belirlemek için *Leishmania* ve *Trypanosoma* üzerinde çalışmışlardır. Ham(crude) metanolik ekstrakt, 24 ve 96 saatlik bir inkübasyon periyodu sonunda 200 μ g/ml'lik bir konsantrasyonda, *L. major* promastigotlarına karşı aktif; *L. donovani* promastigotlarına karşı ise inaktif bulunmuştur. Hekzan ekstraktı da aynı şekilde bulunurken; diklorometan ekstraktı daha düşük konsantrasyonda (50 μ g/ml) aktivite göstermiştir. Daha sonra farklı fraksiyonlara ayrılan ekstraktlardan, bir mono-tetrahydrofuranic- γ -lactone ve dört bis-tetrahydrofuranic- γ -lactone izole edilerek tanımlanmış; *Leishmania sp.*'ye karşı 25 μ g/ml'den 50 μ g/ml'ye kadar değişen bir etki bulmuşlardır (101). Bizim çalışmamızda kullandığımız 8 suş'un sonuçlarını, gerek tek tek bitkiler için, gerekse de tüm bitkilerdeki davranışlarını karşılaştırdığımızda önemli bir farklılık göremedik .

Sett ve ark.'ları, iyi bir antikanser ilaç olan Doxorubicin'i *L. donovani*'ye karşı in vivo ve in vitro olarak test etmişler; in vitro, %50 etkili doz (ED₅₀) aktivitesini, bu parazitin promastigot ve amastigot formlarında sırasıyla, 0.43 µM ve 0.86 µM olarak bulmuşlardır. Bir infekte fare modelinde %95'e kadar yüklenen dalak parazitin in vivo inhibisyonu, ard arda 4 günde verilen 625 µg doxorubicin/kg/gün'lük, çok az toksik doz olan, dozla başarılmıştır. Sonuçlardan, doxorubicin'in visseral leishmaniose karşı hayli aktif olduğu ve amfoterisin B ve pentamidin gibi ikinci kuşak ajanlarla birlikte kullanılabileceğini bildirmektedirler (106).

Sittie ve ark.'ları *Morinda lucida* (Rubiaceae) bitkisinin köklerinden elde ettikleri ekstraktları ve bunlardan fraksiyone ederek elde ettikleri Antraquinon'ların in vitro antimalarial ve antiplazmodial aktivitelerini araştırmışlar; elde edilen antraquinon'lar ve diğer quinoid bileşiklerin *L. major* promastigotlarının çoğalmasına da in vitro olarak bazı etkiler gösterdiklerini saptamışlardır. Çalışılan dokuz bileşik, 9.6 µM ile 185 µM arasında farklı miktarlarda antileishmanial aktivite göstermiştir (109).

Torres-Santos ve ark.'ları *L. amazonensis* üzerinde, *Piper aduncum* (Piperaceae) bitkisinin diklorometan ekstraktından izole ettikleri 2',6'-Dihydroxy-4'-methoxychalcone(DMC)'nin seçici etkisini araştırmışlar; promastigotlara ve intraselüler amastigotlara karşı in vitro olarak önemli oranda bir aktivite saptamışlardır. In vitro olarak *L. amazonensis* promastigotlarının canlılığını önemli bir şekilde azaltmış ve ED₅₀ dozu promastigotlarda 0.5 µg/ml, amastigotlarda 24 µg/ml olarak bulunmuştur. Oysa, ham(crude) ekstrakt, 2.2 µg/ml'lik bir ED₅₀ dozuyla promastigot çoğalmasını inhibe etmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, DMC'nin varlığında, promastigotların mitokondrilerinin genişlediği ve düzeninin bozulduğu görülmüştür. Yapılan gözlemlerden 2',6'-Dihydroxy-4'-methoxychalcone'nin seçici toksik etkiye sahip olduğunu; bu bileşiğin basit yapısının yeni antileishmanial ilaçların sentezi için yeni bir kılavuz bileşik olarak hizmet etme kabiliyetinde olduğunu saptamışlardır (119). Torres-Santos farklı bir çalışma grubuyla, önceki çalışmada elde edilen 2',6'-Dihydroxy-4'-methoxychalcone'nin, Poly(D,L-Lactide) polimerik nanopartiküllerinde yakalanarak, *L. amazonensis*'in hücre içi amastigot formlarının gelişmesine daha fazla inhibisyon aktivitesi göstermesini ve infekte BALB/c farelerinde antileishmanial aktivitenin artmasını sağlamışlardır (118). Torres-Santos ve ark.'ları yeni antileishmanial bileşikler belirlemek için yaptıkları başka bir çalışmada ise, Brezilya'da tıbbi amaçla

kullanılan çeşitli bitkileri *L. amazonensis*'in promastigot formları üzerinde denemişler ve *Piper aduncum* (*Piperaceae*)'un çiçek açmış kısımlarından elde edilen ham(crude) diklorometan ekstraktının, ^3H -thymidin karıştırılarak 48 saat sonra ölçüldüğünde, parazitin çoğalmasını 100 $\mu\text{g/ml}$ 'de %76 oranında inhibe ettiğini görmüşlerdir. Daha sonra fraksiyone edilerek 2',6'-Dihydroxy-4'-methoxychalcone ayrılmış ve bununla yapılan denemede de intraselüler amastigotların gelişmesinin 100 $\mu\text{g/ml}$ 'de tamamen bloke edildiği görülmüştür. Gözlemlerden, izole edilen chalcone'nin potansiyel bir antileishmanial bileşik adayı olduğu; sadece parazitler için seçici toksik etkiye sahip olmadığı, aynı zamanda makrofajları uyarıcı aktiviteye de sahip olduğunu gözlemlenmiştir (120).

Waechter ve ark.ları *Unonopsis buchtienii* (*Annonaceae*) bitkisinin gövde kabuklarından elde ettikleri ekstraktlardan dört alkaloid ve iki sterol izole etmişler ve bu bileşiklerin in vitro biyolojik aktivitelerini *L. major*, *L. donovani* ve *T. brucei*'ye karşı denemişlerdir. Elde edilen petrol eteri ekstraktları bu iki farklı *Leishmania* türüne ve *T. brucei*'ye karşı protozoal aktivite sergilemiştir. Bu ekstraktan izole edilen iki triterpen, β -sitosterol ve stigmasterol 100 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda *Leishmania* türlerine karşı herhangi bir aktivite göstermemiştir. Diklorometan ekstraktından izole edilenler ise, dört alkaloid, üç aporphin alkaloidi (lysicamine, liriodenine, O-methylmoschatoline) ve bir dimerik aporphin alkaloidi (unonopsine)'dir. O-methylmoschatoline ve lysicamine sırasıyla, 50 $\mu\text{g/ml}$ ve 25 $\mu\text{g/ml}$ 'lik IC_{100} değerleri sergilemiştir. Liriodenine, IC_{100} 3.12 $\mu\text{g/ml}$ ile en etkili alkaloid olmuştur. Unonopsine, 25 $\mu\text{g/ml}$ 'de promastigotları eritmiştir (127).

Evans ve Croft, *Peganum harmala* bitkisinden elde ettikleri harmalin ve tryptamin derivatlarını, in vitro olarak fare periton makrofajlarını kullanarak *L. amazonensis* amastigotlarına karşı; yine in vivo olarak aynı organizmayla enfekte edilmiş fare lezyonlarına uygulayarak değerlendirmişlerdir. Harmalin, 24 $\mu\text{g/ml}$ 'lik ED_{50} dozuyla güçlü bir in vitro aktiviteye sahip olduğu; ancak, oral yoldan kullanıldığında aktif, topikal uygulandığında ise düşük aktivite gösteren α -etiltriptamin'den daha toksik olduğu saptanmıştır. Harmalin ve ilgili diğer bileşikler, terapötik olarak kullanımlarını engelleyen psikotik etkilere de sahiptir. Yine bu bitkiden Ahmad ve ark.ları harmin, harmalin ve bunların derivatlarını izole ederek gram negatif,

gram pozitif bakteriler ve dermatofitler üzerinde antibakteriyel ve antifungal aktivite belirlemeye çalışmışlardır (1,45,56,60,137).

Diospyros montana bitkisinin gövde kabuklarından, güçlü bir antitümör aktivite gösteren Diospyrin'i izole eden Hazra ve ark.'ları, bu bileşiğin in vivo ve in vitro antileishmanial aktivitesini araştırmışlardır. *L. donovani* promastigotlarında, Diospyrin için minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) 1 µg/ml, Pentamidin için ise MIC 2 µg/ml olarak bulunmuştur. 5 µg/ml'lik bir diospyrin konsantrasyonuna 2-3 saat maruz bırakılan *L. donovani* promastigotları, asıl şekilleri bozulmuş, sınırları belirginsizleşmiş, şişmiş, hareketsiz, kamçısız ve bazıları parçalara ayrılmış olarak görülmüştür. 3 saatlik ilaç teması sonunda ise hücrelerin çoğu parçalanmıştır (56,137).

Afrika'da parazitik deri hastalıklarında geleneksel olarak kullanılan *Plumbago spp.* bitkisinin ekstraktları, antibakteriyel ve antifungal aktivite gösteren bir naftoquinon içerir. Ayrıca, *L. donovani* ve *L. amazonensis* amastigotlarına karşı in vitro olarak; in vivo olarak da, topikal uygulamayla lezyonları önemli bir şekilde bastırdığı gözlemlenmiştir. Croft ve ark.'ları da in vivo ve in vitro olarak *L. donovani* ve *L. m. amazonensis* amastigotları üzerinde, basit bir naftoquinon olan ve *Plumbago sp.* bitkisinden de elde edilen plumbagin'in antileishmanial aktivitesini araştırarak, farklı oranlarda aktivite bulmuşlardır (29,137).

Balcıoğlu azitromisin ile yaptığı denemelerde, promastigotlar üzerine 5 µg/ml dozun % 50 oranında (ED₅₀), 75 µg/ml dozun ise % 90 oranında (ED₉₀) öldürücü etki yaptığını saptamıştır. Makrofaj içerisindeki amastigotlar üzerinde ise, ED₅₀ düzeyi 50-75 µg/ml dozları arasında; ED₉₀ düzeyi ise 100 µg/ml olarak saptanmıştır (11).

Tadesse ve ark.'ları, Etiyopya'da paraziter enfeksiyonlarının sağaltımında oldukça sık kullanılan *Vernonia amygdalina* isimli bir bitkinin kloroform ve metanol ekstraktlarının in vitro ortamda *L. aethiopica* amastigot ve promastigotlarına karşı ED₅₀ ve LD₅₀ konsantrasyonlarını araştırmışlardır. Çalışmada ED₅₀ düzeyleri kloroform ekstraktında amastigotlar için 18,5 µg/ml, promastigotlar için 13,3 µg/ml; metanol ekstraktında amastigotlar için 74,4 µg/ml, promastigotlar için 45,8 µg/ml; LD₅₀ düzeyi kloroform ve metanol ekstratı için amastigotlara karşı sırasıyla 19,6 µg/ml ve 243,4 µg/ml olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada *V. amygdalina*'nın kloroform ve metanol ekstratlarının ED₅₀ ve LD₅₀ konsantrasyonlarını karşılaştırmak için standart

antileishmanial ilaç olarak pentamidinin ED₅₀ ve LD₅₀ konsantrasyonlarının sırasıyla 0,5 µg/ml ve 1,4 µg/ml olarak saptandığı bildirilmiştir (114).

Werbovetz ve ark.'ları tarafından yapılan bir çalışmada, *L. donovani* ve *L. chagasi* promastigotlarına karşı çeşitli ajanların LD₉₀ konsantrasyonları araştırılmıştır. *L. chagasi* promastigotlarına karşı 9-aminoakridin türevleri olan; amsakrin, *p*-fenol, dimetoksifenol, *p*-metoksifenil, fenil, (N,N-dimetil-amino)etil'in LD₉₀ konsantrasyonları sırasıyla 75 µM, 10 µM, 12 µM, 9 µM, 15 µM ve 15 µM olarak saptanırken; bu değer klorpromazin için 15 µM, kinakrin için 2 µM olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada araştırılan antibiyotiklerden pefloksasin, rosoksasin, amifloksasin, norfloksasin, ofloksasin ve nalidilik asitin, ayrıca antineoplastik adriamisin ve etoposidin *L. chagasi* promastigotları için LD₉₀ konsantrasyonları 100 µM'dan büyük bulunmuştur. *L. donovani* promastigotlarına karşı amsakrin, *p*-fenol, dimetoksifenol, *p*-methoksifenil, fenil, (N,N-dimetil-amino) etil'in LD₉₀ konsantrasyonları sırasıyla 50 µM, 10 µM, 25 µM, 9 µM, 25 µM ve 6 µM olarak saptanırken, klorpromazinin LD₉₀ konsantrasyonu 22 µM olarak bildirilmiştir (128). Balcıoğlu'nun Pefloksasin kullanarak yaptığı denemeler sonucunda ise, bu ilacın *Leishmania* promastigotları üzerine ED₅₀ etkisinin 25 µg/ml konsantrasyonda, ED₉₀ etkisinin ise 500 µg/ml konsantrasyondan daha az bir değerde sağlandığı görülmüştür (11).

Shin ve ark.'ları tarafından, *L. tropica* ve *L. donovani*'ye karşı 3'-deoksi-3'-fluorinosinin *in vitro* ve *in vivo* etkileri araştırılmış, ED₅₀ konsantrasyonu *L. tropica* promastigotlarına karşı 0,23 µM, *L. donovani* promastigotlarına karşı ise 1 µM olarak saptanmıştır (108).

Fournet ve ark.ları, birçok tıbbi bitkiyi, özellikle de Bolivya'da yerli halk tarafından "apainiki" diye adlandırılan ve kutanöz leishmaniosis tedavisinde kullanılan *Pera benensis* (*Euphorbiaceae*) bitkisini araştırmışlardır. Yerli halk, 15-20 m. uzunluğundaki bu ağacın sarı renkli taze gövde kabuklarını kutanöz lezyonlarda topikal olarak tedavi için kullanmışlardır. Araştırmanın ilk aşamasında, bitkinin kök ve gövde kabuklarından elde edilen quinonik ekstraktlar; *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. donovani* promastigotları ve *T. cruzi*'nin epimastigotlarına karşı denenmiş ve 10 µg/ml'lik bir konsantrasyonda *in vitro* aktivite görülmüştür. İlaç testlerinde suşların duyarlılığının karşılaştırılması için %90 inhibitör konsantrasyonu (IC₉₀) seçilmiştir.

Fraksiyonlama ve saflaştırma ile üç aktif bileşik (plumbagin, 3,3'-biplumbagin, 8,8'-biplumbagin) saptanmıştır. Plumbagin ve 8,8'-biplumbagin *Leishmania*'nın her üç türüne 5 µg/ml'lik bir IC₉₀ konsantrasyonu ile en güçlü bileşiktir. Bu antileishmanial aktivite, plumbagin'le *L. amazonensis*'in intraselüler (amastigot) formlarını, 10 µg/ml'lik bir konsantrasyonda konak hücrelerinde parazitlerin %16.5'ini inhibe ederek doğrulanmıştır. *P. benensis*'in köklerinde bol bulunan bir bileşik olan Lupeol de, her iki cins üzerine de zayıf bir aktivite göstermiştir (49).

Araujo ve ark.'ları, Brezilya'da yaygın bir şekilde yetişen *Centrolabium sclerophyllum* (Leguminosae) bitkisinden iki diarilheptanoid ve bir izoflavanoid bileşiğini izole ederek, *L. amazonensis* promastigotlarına karşı araştırmışlardır. Bu üç bileşik de (halen klinik olarak kullanımda olan) Glukantim'le karşılaştırıldığında, iyi bir antileishmanial aktivite göstermiştir. Fakat Pentamidin daha iyi bir aktivite göstermiştir. Deneylerin sonucunda canlı kalan promastigotlar yeniden kültüre alındığında canlılık gözlenmiş ve kontroller kadar iyi üremişlerdir (6).

Oxandra espintana (Annonaceae) bitkisinden elde edilen petrol eteri ekstraktının in vitro leishmanisidal ve trypanosidal aktivitelerini araştıran Hocquemiller ve ark.'ları, ikisini ilk kez izole ettikleri, dört aromatik monoterpen izole etmişlerdir. İzole edilen bu iki monoterpen'den espintanol'ü antiparazitik aktivite için yirmi *T. cruzi* ve oniki *Leishmania* suşuna karşı denemişlerdir. *Leishmania* spp. promastigotlarına karşı espintanol'ün IC₉₀ konsantrasyonları 10-50 µg/ml; Pentamidin için IC₉₀ 1-5 µg/ml; Glukantim için ise IC₉₀ 100 µg/ml'nin üzerinde saptanmıştır (58).

Fournet ve ark.'ları, *Munnozia maronii* (Asteraceae) bitkisinin yapraklarından petrol eter ekstraktını hazırlayarak 12 *Leishmania* spp. türünün promastigotlarına ve üç *T. cruzi* suşunun epimastigotlarına karşı in vitro olarak denemişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmalarında, diğer çalışmalarının aksine geleneksel tıpta kullanılmayan bir bitkiyi seçerek çalışmışlardır. Farklı bir yöntemle çalışılan bu araştırmada, Dehidrozaluzanın C ile inkübasyondan 24 saat sonra, *Leishmania*'nın 10 suşunun promastigot formları için IC₉₀ konsantrasyonu 5 µg/ml olarak bulunmuştur. *L. donovani* ve *L. panamensis* için IC₉₀ konsantrasyonu sırasıyla, 25 µg/ml ve 50 µg/ml'dir. Dehidrozaluzanın C ile inkübasyondan 72 saat sonra ise, IC₉₀ konsantrasyonu *L. panamensis* için 5 µg/ml, *L. donovani* için 10 µg/ml, diğer suşlar için ise 2.5 µg/ml olarak bulunmuştur (50).

Munoz ve ark.ları, Bolivya’da tıbbi bitki olarak kullanılan *Peschiera van heurkii* (*Syn. Tabernaemontana van heurkii*) (Apocynaceae) bitkisinin yaprak ve gövde kabuklarından alkol ekstraktları hazırlayarak, *Leishmania* türlerine karşı in vitro aktivitelerini araştırmışlardır. Bu ekstraktlardan, 15’i daha önceden izole edilmiş olan, 20 bileşik izole edilmiştir. *L. amazonensis* ve *L. braziliensis* promastigotlarına karşı etkili bileşik N-demethylconodurine (=gabumine), 10 µg/ml’de olmuştur. Conodurine ve Conoduramine ortalama bir aktivite göstermiş; Apodine ve Accedinisine ise 50 µg/ml’de bile aktivite göstermemiştir. In vitro olarak N-demethylconodurine (=gabumine) amastigotlara 25 µg/ml’de %3 gibi bir aktivite göstermiştir ki, bu dozda Glukantim inaktif bulunmuştur. İzole edilen bu bileşiklerden konodurin ve konoduramin, gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalara karşı da denenmiş ve çok aktif bulunmuştur. Gabumin ve aksedinisin ise *Bacillus subtilis*’e karşı zayıf etkili bulunmuştur (81).

Tandon ve ark.’ları, Hindistan’da geleneksel tıbbi ilaç olarak geniş bir şekilde kullanılan *Nyctanthes arbortristis* (Oleaceae) bitkisinin antileishmanial aktivitesini hem in vitro, hem de in vivo olarak amastigotlar ve hamsterlerde araştırmışlardır. Bitkinin tohumlarından elde edilen ekstraktlardan iridoid glukozidleri in vivo ve in vitro olarak *L. donovani* amastigotlarına karşı aktivite göstermişlerdir (115).

Richomme ve ark.’ları, Malezya’da yetişen bir tür olan *Polyalthia macropoda* (Annonaceae) bitkisinin gövde kabuklarından elde ettikleri ekstrakttan, yeni bir diterpen olan methyl 18-carboxy-labda-8,13(E)-diedine-15-oate’yi izole ederek, *L. donovani* promastigotları üzerindeki antileishmanial aktivitelerini araştırmışlardır. İlaç konsantrasyonuna karşı, kontrol gelişiminin yüzdesi ve ilaç duyarlılığı, beş gün sonra belirlenmiştir. Bulunan değerler, kontrol kültürleri ve leishmaniosise karşı güçlü bir aktivitesi olduğu bilinen toksik bir poliyamin olan Lomidine® (pentamidin methanesulfonate)’nin inhibitör etkisiyle karşılaştırılmıştır. 0.25 mg/ml’lik bir diterpen konsantrasyonu, yaklaşık %15’lik bir derecede parazit bölünmesini inhibe etmiştir. Oysa aynı konsantrasyonda Lomidine® promastigotların ölümüne neden olmaktadır. Promastigot gelişiminin %100 inhibe edilmesi için gerekli doz 1.5 mg/ml (LD₅₀ 0.75 mg/ml) ve litik etkinin daha yüksek konsantrasyonlarda, daha etkili olduğu görülmüştür (96).

Majester-Savornin ve ark.ları, antihelmintik, antifungal ve mollussidal aktivite de gösteren *Hedera helix* (Araliaceae) bitkisinin yapraklarından elde ettikleri saponin'lerin, antileishmanisidal aktivitelerini belirlemeye çalışmışlar; yapılan çalışmalar sonucunda izole edilen bileşiklerden CS 60 diye adlandırılan %60 saponik kompleks ve bidesmosidler, *L. infantum* ve *L. tropica* promastigotlarına etki göstermemişlerdir. Monodesmoidler ve hederagenin bileşikleri ise aktivite göstermiştir (73).

Saha ve ark. tarafından yapılan çalışmada, *in vitro* ortamda *L. donovani* promastigotlarına karşı Amphotericine B'nin etkinliği araştırılmış, ilacın 0.3 µg/ml konsantrasyonunun sıvı besiyerindeki *L. donovani* promastigotlarının üremesini tamamıyla durdurduğu bildirilmiştir. İlacın üremeyi durdurmada pentamidinden daha güçlü olduğu ve Amphotericine B'nin protozoon membranının geçirgenlik özelliği üzerinde kesin bir etkisi olduğu bildirilmiştir (100).

Berman tarafından *L. tropica* ile enfekte edilmiş makrofaj kültüründe dört farklı imidazol bileşiğinin antileishmanial etkinliği araştırılmıştır. Yapılan bu *in vitro* çalışmada, RPMI 1640 besiyerinde insan makrofajları *L. tropica* ile enfekte edilmiş ve ortama belirli konsantrasyonlarda ketakonazol, mikonazol, klotrimazol ve hidrolize ketakonazol ilave edilmiştir. Klotrimazol 1.0-2.5 µg/ml konsantrasyonlarda *Leishmania* amastigotlarına karşı etkisiz bulunurken, 5 µg/ml konsantrasyonda parazitlerin % 40'ını elimine ettiği, 7.5 µg/ml konsantrasyonda ise daha etkili olarak saptanmasına rağmen, konak makrofajları için toksik etki oluşturduğu bildirilmiştir. Mikonazol 5 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında etkisiz bulunurken, 12.5 µg/ml'da parazitlerin % 50'sini elimine ettiği belirtilmiştir. Ketakonazolün 7.5 µg/ml'deki antileishmanial etkisinin 10 µg/ml'da arttığı, en etkin olduğu 15 µg/ml'da parazitlerin % 85'ini elimine ettiği bildirilmiştir. Yine bu çalışmada hidrolize ketakonazolün 2 µg/ml konsantrasyonda parazitlerin % 80'ini, 2.5 µg/ml'da % 95'ini elimine ederken; konak makrofaj hücreleri için bu konsantrasyonların toksik olmadığı, amastigotların % 100'ünü elimine ettiği 3 µg/ml konsantrasyonda ise konak hücreler için toksik olduğu bildirilmiştir (15).

Doğal bileşiklerin pek çoğunun antiprotozoal aktiviteye sahip olduğu görülür (genellikle *in vitro*), fakat bunlardan bir kısmı terapötik olarak yerini alabilir. Bunun nedeni, insanlar üzerindeki çalışmalarda toksik etkilere sebep olmalarıdır. Parazit

üzerine seçici etkisi ispatlanmadıkça, bir veya daha fazla protozoona karşı aktif olan doğal bir ürünün önemi sınırlı kalmaktadır (137).

Bitkilerinin antileishmanial, antiprotozoal, antihelminetik, antiviral, antimikrobiyal aktivitelerini çalışan bir çok bilim adamı ekip halinde çalışmışlar; organik, inorganik, biyokimya uzmanları, biyologlar vb. araştırmacılar işbirliği içinde ortak olarak çalışarak sonuca varmışlardır.

Yine ekip halinde çalışan bu araştırmacılar tek veya birkaç bitki üzerine yoğunlaşarak çalışmışlardır.

Ham ekstraktlar veya değişik analizler sonucu fraksiyone edilerek elde edilen tek bir bileşiğin etkinliğinin belirlenmesinde, hem etkin madde miktarları, hem de etkin olan bileşik kesinleşmektedir. Bizim ham bileşiklerimizdeki IC_{50} dozlarının yüksek çıkması bu nedenle olabilir. Araştırma sonuçlarını incelediğimizde, birçoğunda bizim sonuçlarımızdan daha düşük düzeyde etkin madde miktarı saptanmıştır.

SONUÇ

Yaptığımız çalışmalardan aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

Şanlıurfa ve Adana yöresinden, Şark çıbanlı hastalardan temin ettiğimiz 24 örnekten 10'unda *L. tropica* promastigotlarının üretilmesi başarılmıştır. Fakat daha sonra bunlardan 2'sinde mantar üremiştir. Tüm çabalara rağmen bu 2 suş mantardan kurtarılamamıştır. Deneylere alt kültürlerini yaptığımız diğer 8 suşla devam edilmiştir.

Antileishmanial aktiviteleri araştırılan 30 ekstrakta karşı, *L. tropica* suşları arasında önemli bir farklılık saptanamamıştır.

Bitki aktiviteleri ile aynı konsantrasyondaki Glukantim®'in IC₅₀ değeri ile kıyaslandığında 30 ekstraktan 16'sı aktif bulunmuştur.

Farklı 6 familyadan 26 bitkinin çalışıldığı bu araştırmada en etkili türler sırası ile, *Allium scorodoprasum ssp. rotundum* (IC₅₀ 0,1 mg/ml), *Allium nevsehirense* – soğanı (IC₅₀ 0,3 mg/ml), *Tanacetum balsamita ssp. balsamita* (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Tanacetum parthenium* –çiçekleri (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Pimpinella anicetum* (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Tanacetum densum ssp. amani* (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Origanum acutidens* (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Thymus pectinatus var. pectinatus* (IC₅₀ 0,5 mg/ml), *Tanacetum densum ssp. sivasicum* (IC₅₀ 0,7 mg/ml), *Tanacetum parthenium* -yaprak ve dalları (IC₅₀ 0,7 mg/ml), *Allium sivasicum* -soğanı (IC₅₀ 0,9 mg/ml), *Salvia ruselli* (IC₅₀ 0,9 mg/ml), *Allium nevsehirense* -toprak üstü kısımları (IC₅₀ 1 mg/ml), *Allium sivasicum* -toprak üstü kısımları (IC₅₀ 1 mg/ml), *Salvia cryptantha* (IC₅₀ 1 mg/ml), *Allium dictyoprasum* (IC₅₀ 2 mg/ml) olmuştur.

Glukantim®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite saptanamayanlar ise, *Salvia virgata* (IC₅₀ 2 mg/ml), *Achillea teretifolia* (IC₅₀ 3 mg/ml), *Salvia candidissima* (IC₅₀ 3 mg/ml), *Helichrysum chionophyllum* -yaprak ve dalları (IC₅₀ 3 mg/ml), *Helichrysum arenarum ssp. aucheri* (IC₅₀ 4 mg/ml), *Helichrysum chionophyllum* - çiçekleri (IC₅₀ 4 mg/ml), *Astragalus densifolius* (IC₅₀ 5 mg/ml), *Helichrysum plicatum ssp. plicatum* (IC₅₀ 5 mg/ml), *Pelargonium endlicherianum* (IC₅₀ 5 mg/ml), *Astragalus melanophourius* (IC₅₀ 6 mg/ml), *Thymus sipyleus ssp. sipyleus* (IC₅₀ 6 mg/ml), *Helichrysum noeantum* (IC₅₀ 6 mg/ml), *Thymus sipyleus ssp. rosulens* (IC₅₀ 7 mg/ml), *Salvia syriaca* (IC₅₀ 7 mg/ml) olarak bulunmuştur.

In vitro olarak *L. tropica* promastigotlarına karşı test edilen en aktif ekstraktlar *Allium* (Liliaceae-Zambakgiller) türlerinden hazırlanan ekstraktlar olmuştur. Bunu *Tanacetum* (Asteraceae-Papatyagiller), *Pimpinella* (Umbelliferae-Maydonozgiller) ve *Origanum* (Lamiaceae-Ballıbabagiller) cinsleri takip etmiştir.

Promastigotlar üzerinde yapılan denemeler, amastigotlar ve hayvan deneyleriyle de desteklenmelidir. Ayrıca etkili bulunan bitkilerden, farklı analiz yöntemleri ile ana bileşikler ayrılarak deneyler tekrarlanırsa, kesin etkin maddenin ve asıl etkin dozun daha iyi bir şekilde belirleneceği düşüncesindeyiz.



ÖZET

Bu araştırmada, halen kullanımda olan antileishmanial ilaçlara daha etkili alternatifler bulmak için, in vitro koşullarda 30 bitki ekstraktının aktivitesi araştırılmıştır.

Çalışmamızda Şanlıurfa ve Adana yörelerinden elde edilen 8 farklı *Leishmania tropica* suşu kullanılmıştır. Bitki ekstraktlarının *L. tropica* promastigotları üzerine dördüncü gün sonunda olan inhibitör etkilerinin araştırıldığı çalışmamızda, promastigot proliferasyon düzeyi hemositometri yöntemiyle sayılmıştır.

Bitki ekstraktlarının *L. tropica* suşlarına olan aktivitelerinde önemli bir fark bulunamamıştır.

Sivas yöresinden toplanmış 26 bitkiden elde edilen 30 metil alkol ekstraktı, 8 farklı *L. tropica* suşuna karşı çalışılmıştır. Bu ekstraktlardan 16'sının IC₅₀ konsantrasyonları, Glukantim®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite yönünden etkin bulunmuştur. Çalıştığımız bitki ekstraktları ile aynı konsantrasyondaki Glukantim® deneylerinin sonucunda, Glukantim®'in IC₅₀ değeri 2 mg/ml olarak saptanmıştır.

Farklı 6 familyadan 26 bitkinin çalışıldığı bu araştırmada en etkili türler sırası ile, *Allium scorodoprasum* ssp. *rotundum* (IC₅₀ 0,1 mg/ml), *Allium nevsehirense* – soğanı (IC₅₀ 0,3 mg/ml), *Tanacetum balsamita* ssp. *balsamita* (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Tanacetum parthenium* –çiçekleri (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Pimpinella anicetum* (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Tanacetum densum* ssp. *amani* (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Origanum acutidens* (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Thymus pectinatus* var. *pectinatus* (IC₅₀ 0,5 mg/ml), *Tanacetum densum* ssp. *sivasicum* (IC₅₀ 0,7 mg/ml), *Tanacetum parthenium* -yaprak ve dalları (IC₅₀ 0,7 mg/ml), *Allium sivasicum* -soğanı (IC₅₀ 0,9 mg/ml), *Salvia ruselli* (IC₅₀ 0,9 mg/ml), *Allium nevsehirense* -toprak üstü kısımları (IC₅₀ 1 mg/ml), *Allium sivasicum* -toprak üstü kısımları (IC₅₀ 1 mg/ml), *Salvia cryptantha* (IC₅₀ 1 mg/ml), *Allium dictyoprasum* (IC₅₀ 2 mg/ml) olmuştur.

Glukantim®'le kıyaslandığında antileishmanial aktivite saptanamayanlar ise, *Salvia virgata* (IC₅₀ 2 mg/ml), *Achillea teretifolia* (IC₅₀ 3 mg/ml), *Salvia candidissima* (IC₅₀ 3 mg/ml), *Helichrysum chionophyllum* -yaprak ve dalları (IC₅₀ 3 mg/ml), *Helichrysum arenarum* ssp. *aucheri* (IC₅₀ 4 mg/ml), *Helichrysum chionophyllum* -

çiçekleri (IC₅₀ 4 mg/ml), *Astragalus densifolius* (IC₅₀ 5 mg/ml), *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum* (IC₅₀ 5 mg/ml), *Pelargonium endlicherianum* (IC₅₀ 5 mg/ml), *Astragalus melanophourius* (IC₅₀ 6 mg/ml), *Thymus sipyleus* ssp. *sipyleus* (IC₅₀ 6 mg/ml), *Helichrysum noeanum* (IC₅₀ 6 mg/ml), *Thymus sipyleus* ssp. *rosulens* (IC₅₀ 7 mg/ml), *Salvia syriaca* (IC₅₀ 7 mg/ml) olarak bulunmuştur.



SUMMARY

The present work was designed to study the in vitro susceptibility of extracts of 30 plants in order to determine more effective alternatives to antileishmanial drugs which currently being used for treatment.

Eight different *Leishmania tropica* strains were used in this study and they were collected from the region of Adana and Şanlıurfa. The inhibitor effects of plant extracts on proliferation of *L. tropica* promastigotes on day fourth was evaluated by using of haemocytometer technique.

There was no significant different effects of plant extracts on activities among *L. tropica* strains.

Thirty methyl alcohol extracts which obtained from 26 different plants that were harvested in the region of Sivas, were studied against to 8 different *L. tropica* strains. Sixteen of those extracts in the IC₅₀ concentrations were found that they have an antileishmanial activity compared to Glucantime®. Glucantime® IC₅₀ value was found as 2 mg/ml when it was compared to same concentration of plant extracts.

In this study, 26 plants were studied in the 6 different family and the most effective strains were as follow: *Allium scorodoprasum* ssp. *rotundum* (IC₅₀ 0,1 mg/ml), *Allium nevsehirense* –bulb (IC₅₀ 0,3 mg/ml), *Tanacetum balsamita* ssp. *balsamita* (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Tanacetum parthenium* –flowers (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Pimpinella anicetum* (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Tanacetum densum* ssp. *amani* (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Origanum acutidens* (IC₅₀ 0,4 mg/ml), *Thymus pectinatus* var. *pectinatus* (IC₅₀ 0,5 mg/ml), *Tanacetum densum* ssp. *sivasicum* (IC₅₀ 0,7 mg/ml), *Tanacetum parthenium* –aqueous and chloroform parts (IC₅₀ 0,7 mg/ml), *Allium sivasicum* -bulb (IC₅₀ 0,9 mg/ml), *Salvia ruselli* (IC₅₀ 0,9 mg/ml), *Allium nevsehirense* -aerial (IC₅₀ 1 mg/ml), *Allium sivasicum* -aerial (IC₅₀ 1 mg/ml), *Salvia cryptantha* (IC₅₀ 1 mg/ml), *Allium dictyoprasum* (IC₅₀ 2 mg/ml), respectively.

Those plants did not show antileishmanial activity when they were compared to Glucantim® were as follow: *Salvia virgata* (IC₅₀ 2 mg/ml), *Achillea teretifolia* (IC₅₀ 3 mg/ml), *Salvia candidissima* (IC₅₀ 3 mg/ml), *Helichrysum chionophyllum* - aqueous and chloroform parts (IC₅₀ 3 mg/ml), *Helichrysum arenarum* ssp. *aucheri* (IC₅₀ 4 mg/ml), *Helichrysum chionophyllum* -flowers (IC₅₀ 4 mg/ml), *Astragalus densifolius* (IC₅₀ 5

mg/ml), *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum* (IC₅₀ 5 mg/ml), *Pelargonium endlicherianum* (IC₅₀ 5 mg/ml), *Astragalus melanophourius* (IC₅₀ 6 mg/ml), *Thymus sipyleus* ssp. *sipyleus* (IC₅₀ 6 mg/ml), *Helichrysum noeanum* (IC₅₀ 6 mg/ml), *Thymus sipyleus* ssp. *rosulens* (IC₅₀ 7 mg/ml), *Salvia syriaca* (IC₅₀ 7 mg/ml).



KAYNAKLAR

- 1) **Ahmad A, Khan KA, Sultana S, Siddiqui BS, Begum S, Faizi S, Siddiqui S :** Study of in vitro antimicrobial activity of harmine, harmaline and their derivatives. J. Ethnopharm., 35:289-294, 1992.
- 2) **Aksu HSZ :** Leşmanyaz: Tedavide Yeni Gelişmeler. ANKEM Derg., 9(3):263-268, 1995.
- 3) **Allahverdiyev AM :** Paraziter hastalıkların etkenlerinin in vivo ve in vitro kültürünün bugünü ve yarını. T. Par. Derg., 18(2):145-150, 1994.
- 4) **Altıntaş K :** Tıbbi Genel Parazitoloji ve Protozooloji. Medical Network&Nobel ISBN: 975-567-017-3, Ankara, 1995.
- 5) **Altıntaş N :** Güneydoğu Anadolu Projesi'ni Tehdit Eden Parazit Hastalıkları. Leishmaniosis. Özcel MA (Ed.), Tür. Sağ. İş. Send., Tür. Par. Der., Ege Üniv. Bas., İzmir, s. 97-131, 1995.
- 6) **Araujo CAC, Alegrio LV, Leon LL :** Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. Phytochem., 49(3):751-754, 1998.
- 7) **Arora SK, Sinha R, Seghal S :** Use of in vitro method to assess different brands of anti-leishmanial drugs. Med. Microb. Immun., 180(1):21-27, 1991.
- 8) **Assmar M, Mehrabian S, Farahmand M, Pyazak N, et al. :** Antileishmanial activity of four species of *Vinca* plant extract on *Leishmania major* in vitro and in vivo. First World Congress on Leishmaniosis Abstracts, Özcel MA (Ed.), Acta Par. Tur., Vol. 21, suppl. 1, p.176, 1997.
- 9) **Aybay C, İmir T, Özkan S, Çağlar K, Sultan N :** Bazı antibiyotiklerin *Leishmania major* promastigot hücre proliferasyonu üzerine etkisi. T. Par. Derg., 21(1):1-6, 1997.
- 10) **Balcıoğlu İC, Özbel Y, Özensoy S, Özbilgin A :** Farklı zamanlarda izole edilen *Leishmania tropica* suşlarının virulansı üzerine denemeler. T. Par. Derg., 25(2):123-127, 2001.

- 11) **Balcioğlu İC** : Makrofaj kültüründe elde edilen *Leishmania amastigot* ve promastigot formlarının antijenik özellikleri ve bu formlara çeşitli antibiyotiklerin etkilerinin araştırılması. Celal Bayar Ün., Sağlık Bilimleri Ens., Doktora Tezi. Manisa, 2000.
- 12) **Barata LE, Santos LS, Ferri PH, Phillipson JD, Paine A, Croft SL** : Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochem.*, 55(6):589-595, 2000.
- 13) **Beach DH, Goad LJ, Holz GG** : Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. *Mol. Biochem. Par.*, 31:149-162, 1988.
- 14) **Beaver PC, Jung RC, Cupp EW** : Clinical Parasitology. 9th Edition. Lee&Febiger, Philadelphia, 1984.
- 15) **Berman JD** : Activity of imidazoles against *Leishmania tropica* in human macrophage cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 30(3):566-569, 1981.
- 16) **Berman JD** : Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. *Clin. Infect. Dis.*, 24:684-703, 1997.
- 17) **Berman JD** : *Leishmania tropica*: Quantitation of In vitro Activity of Antileishmanial Agents by Giemsa Staining, Viability, and ³H-formycin B Incorporation. *J. Par.*, 83(5):447-454, 1989.
- 18) **Berman JD** : Chemotherapy for Leishmaniasis: Biochemical Mechanisms. Clinical Efficacy, and Future Strategies. *Rev. Infect. Dis.*, 10(3):560-586, 1998.
- 19) **Berman JD, Gallalee JV** : Semiautomated assessment of in vitro activity of potential antileishmanial drugs. *Antimic. Agents Chemother.*, 28(6):723-726, 1985.
- 20) **Berman JD, Gallalee JV** : In vitro antileishmanial activity of inhibitors of steroid biyosynthesis and combinations of antileishmanial agents. *J. Par.*, 73(3):671-673, 1987.
- 21) **Berman JD, Wyler DJ** : An in vitro model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, 42(1):83-86, 1980.

- 22) **Berman JD, Lee LS** : Activity of oral drugs against *Leishmania tropica* in human macrophages in vitro. Am. J. Trop. Med. Hyg., 32(5):947-951, 1983.
- 23) **Berman JD, Holz GG Jr, Beach DH** : Effects of Ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes in culture. Mol. Biochem. Par., 12:1-13, 1984.
- 24) **Camacho MDR, Kirby GC, Warhurst DC, Croft SL, Phillipson JD** : Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. Planta Medica, 66:478-480, 2000.
- 25) **Carvalho PB, Ferreira EI** : Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. Fitoterapia, 72:599-618, 2001.
- 26) **Ceylan A** : Tıbbi Bitkiler II (Uçucu Yağ İçerenler). Ege Üniv. Ziraat Fak. Yay. No: 481, E.Ü. Ziraat Fak. Ofset Bas., İzmir, 1987.
- 27) **Chakrabarti G, Basu A, Manna PP, Mahato SB, Mandal NB, Bandyopadhyay S** : Indolylquinoline derivatives are cytotoxic to *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes in vitro and are effective in treating murine visceral leishmaniasis. J. Antimic. Chemother., 43(3):359-366, 1999.
- 28) **Chen M, Christensen SB, Blom J, Lemmich E, Nadelmann L, Fich K, Theander TG, Kharazmi A** : Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. Antimic. Agents Chemother., 37(12):2550-2556, 1993.
- 29) **Croft SL, Evans AT, Neal RA** : The activity of plumbagin and other electron carriers against *Leishmania donovani* and *Leishmania mexicana amazonensis*. Ann. Trop. Med. Par., 79(6):651-653, 1985.
- 30) **Çeliksöz A, Saygı G, Özçelik S, Öztıp AY, Şanlıdağ T** : Trimethoprim-Sulphametaxazole ve Ofloksasin'in *Leishmania* promastigotlarına in vitro etkilerinin araştırılması. T. Par. Derg., 22(4):343-347, 1998.
- 31) **Çetin ET, Anđ Ö, Töreci K** : Tıbbi Parazitoloji. 3.Baskı. İst. Üniv. İst. Tıp Fak. Yay. Fak. No: 146, İstanbul, 1983.

- 32) **Çubukçu B, Meriçli AH, Damadyan B, Bingöl S, Yüksel V** : Yukarı Fırat Bölgesinde Yetişen *Helichrysum* Türlerinin Flavonoid Bileşikleri Yönünden İncelenmesi. Baltepe Ş, Babaç MT, Evren H (Ed.), Fırat Havzası Tıbbi ve Endüstriyel Bitkileri Sempozyumu (6-8 Ekim 1986, Elazığ) Bildirileri, Fırat Ün., Bizim Büro Bas., s. 179-187, Elazığ, 1991.
- 33) **Çulha G, Özcan K, Özpoyraz M** : Leishmania'nın değişik besiyerlerinde üreme yoğunluğu ve canlı kalma süresinin araştırılması. T. Par. Derg., 21(2):115-118, 1997.
- 34) **Daldal N, Özbel Y** : Parazitolojide Artropod Hastalıkları&Vektörler. Phlebotomus ssp., vektörlükleri ve kontrolü. Özcel MA, Daldal N (Ed.), T. Par. Dern. Yay. No: 13, Ege Ün. Bas., İzmir, 1997.
- 35) **Davidson RN, Croft SL** : Recent advances in the treatment of visceral leishmaniasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 87:130-131&141, 1993.
- 36) **Decosterd LA, Hoffmann E, Kyburz R, Bray D, Hostettmann K** : A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and in vitro antimalarial activity. Planta Medica, 57:548-551, 1991.
- 37) **Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, Pinto AC, Henriques AT, Bou-Habib DC, Saraiva EMB** : Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. Antimic. Agents Chemother., 45(5):1349-1354, 2001.
- 38) **Desjeux P** : Leishmania and HIV in gridlack. Leishmaniasis/98. 9 Add. 1-UNAIDS/98. 23. Division of control of typical diseases. 23:5-27, WHO, Geneva, 1998.
- 39) **Dey T, Anam K, Afrin F, Ali N** : Antileishmanial activities of stearylamine-bearing liposomes. Antimic. Agents Chemother., 44(6):1739-1742, 2000.
- 40) **Doğan F** : Leishmania enfeksiyonlarının epidemiyolojisi, Leishmaniya'ların rezervuar ve vektörleri. Yaşarol Ş (Ed.), Leishmaniasis (Kala Azar ve Şark Çıbanı). 2. Ulusal Par. Kong.(3-5 Haz. 1981, Ank.). Türk. Par. Der. Yay. No:2, Ege Ün. Matb., s. 25-50, İzmir, 1981:

- 41) **El-On J, Messer G** : *Leishmania major*: Antileishmanial activity of Methylbenzethonium Chloride. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 35(6):1110-1116,1986.
- 42) **El-On J, Pearlman E, Schnur LF, Greenblatt CL** : Chemotherapeutic Activity of Rifampicin on Leishmanial Amastigotes and Promastigotes In vitro. *Israel J. Med. Sci.*, 19(3):240-245, 1983.
- 43) **El Tahir A, Ibrahim AM, Satti GMH, Theander TG, Kharazmi A, Khalid SA** : The potential antileishmanial activity of some Sudanese medicinal plants. *Phytother. Res.*, 12(8):576-579, 1998.
- 44) **Evans AT, Croft SL, Peters W, Neal RA** : Antileishmanial Effects of Clofazimine and Other Antimycobacterial Agents. *Ann. Trop. Med. Par.*, 83(5):447-454, 1989.
- 45) **Evans AT, Croft SL** : Antileishmanial activity of harmaline and other tryptamine derivatives. *Phytother. Res.*, 1:25-27, 1987.
- 46) **Evren H** : Elazığ Yöresinden Toplanmış *Fabaceae* ve *Asteraceae* Familyalarına Ait Tıbbi ve Endüstriyel Bitkiler. Baltepe Ş, Babaç MT, Evren H (Ed.), Fırat Havzası Tıbbi ve Endüstriyel Bitkileri Sempozyumu (6-8 Ekim 1986, Elazığ) Bildirileri, Fırat Üniv., Bizim Büro Bas., s. 127-135, Elazığ, 1991.
- 47) **Fournet A, Barrios AA, Munoz V** : Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *J. Ethnopharm.*, 41:19-37, 1994.
- 48) **Fournet A, Munoz V, Manjon AM, Angelo A, Hocquemiller R, Cortes D, Cave A, Bruneton J** : Activite Antiparasitaire D'alcaloides Bisbenzylisoquinoleiques. I: Activite In vitro Sur Des Promastigotes De Trois Souches De *Leishmania*. *J. Ethnopharm.*, 24(2-3):327-335, 1988.
- 49) **Fournet A, Angelo A, Munoz V, Roblot F, Hocquemiller R, Cave A** : Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *J. Ethnopharm.*, 37:159-164, 1992.
- 50) **Fournet A, Munoz V, Roblot F, Hocquemiller R, Cave A, Gantier JC** : Antiprotozoal activity of dehydrozaluzanin C, a sesquiterpene lacton isolated from *Munnozia maronii* (*Asteraceae*). *Phytother. Res.*, 7:111-115, 1993.

- 51) **Grogl M, Thomason TN, Franke ED** : Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 47(1):117-126, 1992.
- 52) **Güven A, Yürekli AK** : Fırat Havzasında Yayılış Gösteren *Tanacetum* Türlerinin Ekonomik Potansiyeli. Baltepe Ş, Babaç MT, Evren H (Ed.), Fırat Havzası Tıbbi ve Endüstriyel Bitkileri Sempozyumu (6-8 Ekim 1986, Elazığ) Bildirileri, Fırat Üniv., Bizim Büro Bas., s. 251-259, Elazığ, 1991.
- 53) **Hamburger M, Hostettmann K** : Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochem.*, 30(12):3864-3874, 1991.
- 54) **Hanafy MSM, Hatem ME** : Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J. Ethnopharm.*, 34:275-278, 1991.
- 55) **Hatimi S, Boudouma M, Bichichi M, Chaib N, Idrissi NG** : In vitro evaluation of antileishmania activity of *Artemisia herba alba* Asso. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 94(1):29-31, 2001.
- 56) **Hazra B, Saha AK, Ray R, Roy DK, Sur P, Banerjee A** : Antiprotozoal activity of diospyrin towards *Leishmania donovani* promastigotes in vitro. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 81:738-741, 1987.
- 57) **Hiraoka O, Satake H, Iguchi S, Matsuda A, Ueda T, Wataya Y** : Carbocyclic Inosine as a Potent Anti-leishmanial Agent: The Metabolism and Selective Cytotoxic Effect of Carbocyclic Inosine in Promastigotes of *Leishmania tropica* and *Leishmania donovani*. *Bioche. Biophys. Res. Commun.*, 134(3):1114-1121, 1986.
- 58) **Hocquemiller R, CortesD, Arango GJ, Myint SH, Cave A, Angelo A, Munoz V, Fournet A** : Isolement et synthese de L'espintanol, nouveau monoterpene antiparasitaire. *J. Nat. Prod.*, 54(2):445-452, 1991.
- 59) **Houghton PJ** : Medicinal Plants and the Control of Parasites. Compounds with Anti-HIV from Plants. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 90:601-604, 1996.
- 60) **Iwu MM, Jackson JE, Schuster BG** : Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Par. Today*, 10(2):65-68, 1994.

- 61) **Iwu MM, Jackson JE, Tally JD, Klayman DL** : Evaluation of plant extracts for antileishmanial activity using a mechanism-based radiorespirometric microtechnique (RAM). *Planta Medica*, 58(5):436-441, 1992.
- 62) **Jackson JE, Tally JD, Tang DB** : An in vitro micromethod for drug sensitivity testing of *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 41(3):318-330, 1989.
- 63) **Jernigan JA, Pearson RD, Petri WA Jr, Rogers MD** : In vitro activity of atovaquone against *Leishmania chagasi* promastigotes. *Antimic. Agents Chemother.*, 40(4):1064, 1996.
- 64) **Johnson JL, Werbel LM** : Synthesis and antileishmanial activity of 6-Methoxy-4-methyl-N-[6-(substituted-1-piperazinyl) hexyl]-8-quinolinamines and related compounds. *J. Med. Chem.*, 26:185-194, 1983.
- 65) **Kamau SW, Nunez R, Grimm F** : Flow cytometry analysis of the effect of allopurinol and the dinitroaniline compound (Chloralin) on the viability and proliferation of *Leishmania infantum* promastigotes. *BMC Pharmacology*, 1(1): --, 2001. <http://www.biomedcentral.com/1471-2210/1/1>
- 66) **Kapil A** : Piperine: A potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes in vitro. *Planta Medica*, 59(5):474, 1993.
- 67) **Khan S, Khan GM, Alamsher, Hamid Ullah** : In-vitro study on antileishmanial activity of *Massicot*. *J. College Physicians Surgens Pakistan*, 11(3):161-165, 2001.
- 68) **Kinnamon KE, Steck EA, Loizeaux PS, Hanson WL, Chapman WL Jr, Waits VB** : The antileishmanial activity of Lepidines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27(4):751-757, 1978.
- 69) **Kirby GC** : Medicinal plants and the control of parasites. *Medicinal plants and the control of protozoal disease, with particular reference to malaria*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 90:605-609, 1996.
- 70) **Koyuncu M** : Geofitlerin Ekonomik Önemi ve Yukarı Fırat Havzası Geofitleri. Baltepe Ş, Babaç MT, Evren H (Ed.), *Fırat Havzası Tıbbi ve Endüstriyel Bitkileri Sempozyumu (6-8 Ekim 1986, Elazığ) Bildirileri*, Fırat Ün., Bizim Büro Bas., s. 47-62, Elazığ, 1991.

- 71) **Kuman A, Altıntaş N** : Protozoon Hastalıkları. Ege Ün. Bas., İzmir, 1996.
- 72) **Lancet** : Pharmaceuticals from plants: great potential, few funds. Lancet, V.343, N. 8912:1513-1515, (Editorial), 1994.
- 73) **Majester-Savornin B, Elias R, Diaz-Lanza AM, Balansard G, Gasquet M, Delmas F** : Saponins of the Ivy plant, *Hedera helix*, and their Leishmanicidal activity. Planta Medica, 57:260-262, 1991.
- 74) **Marinkelle CJ** : The control of Leishmaniasis. Bull. WHO., 58(6):807-818, 1980.
- 75) **Mbati PA, Abok K, Mwaniki-Kagai J, Ndemwa P, Koech DK** : In vitro experimental antileishmanial potential of Ethylenediamine Tetraacetic Acid, Disodium salt. East African Med. J., 69(6):327-332, 1992.
- 76) **Merdivenci A** : Medikal Protozooloji. Değişimli ve eklemeli, yenilenmiş 2. Basım. İst. Ün. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yay.:2834/80, İstanbul, 1981.
- 77) **Misra S, Sanyal T, Sarkar D, Bhattacharya PK, Ghosh DK** : Evaluation of antileishmanial activity of. trans-aconitic acid. Biochem. Med. Metab. Biol., 42(3):171-178, 1989.
- 78) **Modabber F** : Leishmaniasis: will new technology provide a breakthrough? WHO Drug Information, Reports on Individual Drugs, Vol.13, No.3, p.150-152, 1999.
- 79) **Moreira ES, Petrillo-Peixoto ML** : In vitro Activity of Meglumine Antimoniate, a Pentavalent Antimonial Drug, on *Leishmania* Promastigotes. Braz. J. Med. Biol. Res., 24(5):459-469, 1991.
- 80) **Moreira ES, Guerra JB, Petrillo-Peoto MD** : Glucantime resistant *Leishmania* promastigotes are sensitive to pentostam. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 25(4):247-250, 1992.
- 81) **Munoz V, Moretti C, Sauvanin M, Caron C, Porzel A, Massiot G, Richard B, Le Men-Olivier L** : Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera van heurkii* (syn. *Tabernaemontana van heurkii*). Planta Med., 60:455-459, 1994.

- 82) **Najib Nik A Rahman N, Furuta T, Kojima S, Takane K, Mohd MA :** Antimalarial Activity of Extracts of Malaysian Medicinal Plants. *J. Ethnopharm.*, 64(3):249-254, 1999.
- 83) **Oketch-Rabah HA, Christensen SB, Frydenvang K, Dossaji SF, Theander TG, Cornett C, Watkins WM, Kharazmi A, Lemmch E :** Antiprotozoal Properties of 16,17-Dihydrobrachycalxolide from *Vernonia brachycalyx*. *Planta Medica*, 64(6):559-562, 1998.
- 84) **Olliaro PL, Bryceson ADM :** Practical progress and new drugs for changing patterns of Leishmaniasis. *Par. Today*, 9(9):323-328, 1993.
- 85) **Özbiğın A, Taşçı S, Atambay M, Alkan MZ, Özbel Y :** *Leishmania infantum* promastigotlarının in vitro kùltivasyonunda sıvı ve bifazik besiyerlerinin karşılaştırılması. *T. Par. Derg.*, 19(1):1-5, 1995.
- 86) **Özcel MA, Altıntaş N, (Ed.) :** Parazit Hastalıklarında Tanı. *T. Par. Der. Yayın No:* 15, Ege Üniv. Bas., İzmir, 1997.
- 87) **Özçelik S, Çeliksöz A, Saygı G :** Farklı kùltür ortamlarında *Leishmania* promastigotlarının in vitro kùltürü. *T. Par. Derg.*, 20(2):169-174, 1996.
- 88) **Öztürk M, Özçelik H :** Doğı Anadolu'nun Faydalı Bitkileri. Siirt İlim Spor Kùltür ve Araştırma Vakfı (SİSKAV), Semih Ofset Matb., Ankara, 1991.
- 89) **Pearson RD, Manian AA, Hall D, Marcus JL, Hewlett EL :** Antileishmanial Activity of Chlorpromazine. *Antimic. Agents Chemother.*, 25(5):571-574, 1984.
- 90) **Peixoto MP, Beverley SM :** In vitro activity of Sulfonamides and Sulfones against *Leishmania major* promastigotes. *Antimic. Agents Chemother.*, 31(10):1575-1578, 1987.
- 91) **Phillipson JD :** Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochem.*, 56(3):237-243, 2001.
- 92) **Phillipson JD, O'Neill MJ :** New leads to the treatment of protozoal infections based on natural product molecules. *Acta Pharm. Nordica*, 1(3):131-144, 1989.
- 93) **Phillipson JD, Wright CW :** Antiprotozoal agents from plant sources. *Planta Medica*, 57(supl.1):53-59, 1991.

- 94) **Phillipson JD** : Natural Products as Drugs. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 88(Sup. 1):17-19, 1994.
- 95) **Ram VJ, Singha UK, Guru PY** : Chemotherapeutic agents XI: synthesis of pyrimidines and azolopyrimidines as leishmanicides. Eur. J. Med. Chem., 25:533-538, 1990.
- 96) **Richomme P, Godet MC, Foussard F, Toupet L, Sevenet T, Bruneton J** : A novel Leishmanicidal labdane from *Polyalthia macropoda*. Planta Medica, 57:552-554, 1991.
- 97) **Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG** : Sensitivity to Glucantime of *Leishmania viannia* isolated from patients prior to treatment. J. Par., 85(2):360-366, 1999.
- 98) **Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL** : An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. J. Immun. Methods, 142:257-265, 1991.
- 99) **Rojas A, Hernandez L, Pereda-Miranda R, Mata R** : Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. J. Ethnopharm., 35:275-283, 1992.
- 100) **Saha AK, Mukherjee T, Bhaduri A** : Mechanism of action amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. Mol. Biochem. Par., 19:195-200, 1986.
- 101) **Sahpaz S, Bories C, Loiseau PM, Cortes D, Hocquemiller R, Laurens A, Cave A** : Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. Planta Medica, 60:538-540, 1994.
- 102) **Saxena G, McCutcheon AR, Farmer S, Towers GHN, Hancock REW** : Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. J. Ethnopharm., 42:95-99, 1994.
- 103) **Saygı G** : Temel Tıbbi Parazitoloji. Esnaf Ofset Matb., Sivas, 1998.
- 104) **Science** : Medicine from plants. Science, 247:513, (Editorial), 1990.
- 105) **Seçmen Ö, Gemici Y, Leblebici E, Gürk G, Bekat L** : Tohumlu Bitkiler Sistematigi. 2. Baskı. Ege Ün. Fen Fak. Kit. Ser. No: 116, Ege Ün. Bas., İzmir, 1989.

- 106) **Sett R, Basu N, Ghosh AK, Das PK** : Potential of doxorubicin as an antileishmanial agent. *J. Par.*, 78(2):350-354, 1992.
- 107) **Sezik E, Tabata M, Yeşilada E, Honda G, Goto K, İkeshiro Y** : Traditional medicine in Turkey. I. Folk medicine in Northeast Anatolia. *J. Ethnopharm.*, 35:191-196, 1991.
- 108) **Shin IS, Tanifuji H, Arata Y, Morizawa Y, Nakayama T, Wataya Y** : 3'-Deoxy-3'-fluorinosine as a potent antileishmanial agent. The metabolism and selective cytotoxic effect of 3'-deoxy-3'-fluorinosine against in vitro and in vivo. *Par. Res.*, 81(7):622-26, 1995.
- 109) **Sittie AA, Lemmich E, Olsen CE, Hviid L, Kharazmi A, Nkrumah FK, Christensen SB** : Structure-Activity studies: In vitro antileishmanial and antimalarial activities of Anthraquinones from *Morinda lucida*. *Planta Medica*, 65(3):259-261, 1999.
- 110) **Sökmen A, Jones BM, Ertürk M** : The in vitro antibacteriyal activity of Turkish medicinal plants. *J. Ethnopharm.*, 67:79-86, 1999.
- 111) **Stevens MG, Olsen SC** : Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *J. Immun. Methods*, 157:225-231, 1993.
- 112) **Şarer E** : Yukarı Fırat Havzası *Labiataceae*' lerinin Uçucu Yağları Yönünden Tedavide ve Endüstride Değerlendirme Olanakları. Baltepe Ş, Babaç MT, Evren H (Ed.). Fırat Havzası Tıbbi ve Endüstriyel Bitkileri Sempozyumu (6-8 Ekim 1986, Elazığ) Bildirileri, Fırat Üniv., Bizim Büro Bas., s. 165-178, Elazığ, 1991.
- 113) **Şener B** : Recent results in the search for bioactive compounds from Turkish medicinal plants. *Pure&Appl. Chem.*, 66(10/11):2295-2298, 1994.
- 114) **Tadesse A, Gebre-Hiwot A, Asres K, Djote M, Frommel D** : The in vitro activity of *Vernonia amygdalina* on *Leishmania aethiopica*. *Ethiop. Med. J.*, 31(3):183-189, 1993.
- 115) **Tandon JS, Srivastava V, Guru PY** : Iridoids: a new class of leishmanicidal agents from *Nyctanthes arbortristis*. *J. Nat. Prod.*, 54(4):1102-1104, 1991.

- 116) **Tanker M** : Anabilim Dalımızda Yukarı Fırat Bölgesi Bitkileri Üzerine Yapılan Bazı Araştırmalar. Baltepe Ş, Babaç MT, Evren H (Ed.), Fırat Havzası Tıbbi ve Endüstriyel Bitkileri Sempozyumu (6-8 Ekim 1986, Elazığ) Bildirileri, Fırat Ün., Bizim Büro Bas., s. 37-45, Elazığ, 1991.
- 117) **Tanker N, İzgü F** : *Pimpinella* Türleri Üzerine Araştırmalar. Baltepe Ş, Babaç MT, Evren H (Ed.), Fırat Havzası Tıbbi ve Endüstriyel Bitkileri Sempozyumu (6-8 Ekim 1986, Elazığ) Bildirileri, Fırat Ün., Bizim Büro Bas., s. 189-195, Elazığ, 1991.
- 118) **Torres-Santos EC, Rodrigues JM Jr, Moreira DL, Kaplan MAC, Rossi-Bergmann B** : Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2', 6'-Dihidroxy-4'-Methoxychalcone by entrapment in Poly(D,L-Lactide) nanoparticles. Antimic. Agents Chemother., 43(7):1776-1778, 1999.
- 119) **Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MAC, Meirelles MN, Rossi-Bergmann B** : Selective effect of 2',6'-Dihidroxy-4'-Methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. Antimic. Agents Chemother., 43(5):1234-1241, 1999.
- 120) **Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MAC, Rossi-Bergmann B** : A chalcone isolated from the plant *Piper aduncum* is selectively toxic for Leishmania. First World Congress on Leishmaniosis Abstracts,. Özcel MA (Ed.), Acta Par. Tur., Vol. 21, supl. 1, p.183, 1997.
- 121) **Tracy JW, Webster LT** : Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. Trypanosomiasis, Leishmaniasis, Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis, and other protozoal infections. Goodman and Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. Hardman JG, Limbird LE (Ed.), Chap. 41, Int. Ed., p. 987-1008, McGraw-Hill, 1996.
- 122) **Unat EK, Yücel A, Altaş K, Samastı M** : Unat'ın Tıp Parazitolojisi. 5. Baskı. Cerrahpaşa Tıp Fak. Yay. No: 15, İstanbul, 1995.
- 123) **UNDP/WORLD BANK/WHO** Special programme for research and training in tropical diseases. Tropical Disease Research TDR Seventh Programme Report 1 Jan. 1983 - 31 Dec. 1984. The Leishmaniasis. p. 7/3-7/18, Geneva, 1985.

- 124) **UNDP/WORLD BANK/WHO** : The Leishmaniasis. WHO Special programme for research and training in tropical diseases. Progress in international research. 1987-1988. p. 10-30, Geneva, 1989.
- 125) **United Nations Development Program/ World Health Organization**, TDR News 34, p. 1-2, 1990.
- 126) **Vennerstrom JL, Lovelace JK, Waits VB, Hanson WL, Klayman DL** : Berberine derivatives as antileishmanial drugs. Antimic. Agents Chemother., 34(5):918-921, 1990.
- 127) **Waechter AI, Cave A, Hocquemiller R, Bories C, Munoz V, Fournet A** : Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii* (*Annonaceae*). Phytother. Res., 13(2):175-177, 1999.
- 128) **Werbovetz KA, Lehnert EK, Macdonald TL, Pearson RD** : Cytotoxicity of acridine compounds for *Leishmania* promastigotes in vitro. Antimic. Agents Chemother., 36(2):485-497, 1992.
- 129) **Whitfield PJ** : Medicinal Plants and the Control of Parasites. Novel Anthelmintic Compounds and Molluscicides from Medicinal Plants. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 90:596-600, 1996.
- 130) **WHO** : The Work of WHO 1988-1989 biennial report of the director-general. p. 122-123, 138,143. Geneva.
- 131) **WHO Drug Information** : Essential Drugs, WHO Model Formulary, Drugs used in Leishmaniasis. Vol.11, No.3, p. 145-152, 1997.
- 132) **WHO Drug Information** : Herbal Medicines. Vol. 14, No.4, p. 237-243, 2000.
- 133) **WHO Information Circular** : WHO Mediterranean Zoonose Control Centre. 40:11-13,1996.
- 134) **WHO Technical Report** : Leishmaniasis. Report No:701, 1984.
- 135) **WHO Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines** : WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations, Technical Report Series, No. 863, 1996.
- 136) **WHO Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials** : Geneva, 1998.

- 137) **Wright CW, Phillipson JD** : Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother. Res.*, 4(4):127-139, 1990.
- 138) **Wright CW, O'Neill MJ, Phillipson JD, Warhurst DC** : Use of microdilution to assess in vitro antiamebic activities of *Brucea javanica* fruits, *Simarouba amara* stem, and a number of quassinoids. *Antimic. Agents Chemother.*, 32(11):1725-1729, 1988.
- 139) **Wright CW, Bray DH, O'Neill MJ, Warhurst DC, Phillipson JD, Quetin-Leclercq J, Angenot L** : Antiamebic and antiplasmodial activities of alkaloids isolated from *Strychnos usambarensis*. *Planta Medica*, 57(4):337-340, 1991.
- 140) **Yıldırım Ş** : Munzur Dağlarının Tıbbi ve Endüstriyel Bitkileri. Baltepe Ş, Babaç MT, Evren H (Ed.), Fırat Havzası Tıbbi ve Endüstriyel Bitkileri Sempozyumu (6-8 Ekim 1986, Elazığ) Bildirileri, Fırat Üniv., Bizim Büro Bas., s. 83-102, Elazığ, 1991.