

Şırnak İli ve Çevresinden Toplanan *Prangos ferulacea* ve *Ferula orientalis* Ekstrelerinin Türkiye’den İzole Edilmiş *Leishmania tropica*’ya Karşı Anti-Leishmanial Etkilerinin Araştırılması

Investigation of the Anti-Leishmanial Effects of *Prangos ferulacea* and *Ferula orientalis* Extracts Collected from Şırnak Province Against *Leishmania tropica* Isolated in Turkey

Sefer Özer BABAT¹(ID), İbrahim ÇAVUŞ²(ID), Ahmet ÖZBİLGİN²(ID), Hüsnü KAYALAR³(ID), Cumhur GÜNDÜZ⁴(ID), Şirin Sahra CEYLAN²(ID), Nogay GİRGİNKARDEŞLER²(ID)

¹ Şırnak Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı, Şırnak.

¹ Şırnak University Faculty of Health Sciences, Department of Nutrition and Dietetics, Şırnak, Turkey.

² Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

² Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Manisa, Turkey.

³ Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.

³ Ege University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Bornova, İzmir, Turkey.

⁴ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.

⁴ Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Bornova, İzmir, Turkey.

*Bu çalışma, 21. Parazitoloji Kongresi (28 Eylül-3 Ekim 2019, Çeşme, İzmir, Türkiye)’nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

**Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2018-194).

Makale Atfı: Babat SÖ, Çavuş İ, Özbilgin A, Kayalar H, Gündüz C, Ceylan ŞS ve ark. Şırnak ili ve çevresinden toplanan *Prangos ferulacea* ve *Ferula orientalis* ekstrelerinin Türkiye’den izole edilmiş *Leishmania tropica*’ya karşı anti-leishmanial etkilerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2022;56(2):339-348.

ÖZ

Leishmaniasis, *Leishmania* cinsi protozoonların neden olduğu vektör kaynaklı bir hastalıktır. Leishmaniasis dünya genelinde tropik, subtropik alanlarda bulunan 98 ülkede/bölgede görülen bir hastalıklar grubudur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre bu bölgelerde yaklaşık 350 milyon insan risk altında olduğu ve yaklaşık 12 milyon insanın da enfekte olduğu tahmin edilmektedir. Leishmaniasisin üç ana klinik formuna bağlı yılda yaklaşık 1.2 milyon yeni olgunun görülmekte ve tedavisinde son yıllarda endemik bölgelere göre giderek artan ilaç direncine rastlanmaktadır. Bu nedenle bitki kaynaklı etken maddelere ilgi son yıllarda artmakta ve in vitro çalışmalarda yeni anti-leishmanial ilaçlar araştırılmaktadır. Bu çalışmada, yeni bir tedavi ilacı olarak Şırnak kırsalından toplanan *Prangos ferulacea* ve *Ferula orientalis* bitkilerinden elde edilen ekstrelerinin *Leishmania tropica*’ya karşı anti-leishmanial etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. *P.ferulaceae* ve *F.orientalis* bitkilerinin kök, gövde ve meyve kısımlarının su, kloroform ve etanol ekstreleri elde edilerek sitotoksik aktivite testleri yapılmıştır. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankasından temin edilen *L. tropica* promastigotları (MHOM/TR/2012/CBCL-LT) RPMI 1640 besiyerinde çoğaltılmıştır. Her bir ekstreinin farklı oranlarda

İletişim (Correspondence): Dr. Sefer Özer Babat, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir, Türkiye. Tel (Phone): 0(232) 390 4916, E-posta (E-mail): sozerbabat@gmail.com

hazırlanan konsantrasyonları kullanılarak *L.tropica* promastigotları ile in vitro testleri yapılmış ve etkinliği XTT testi ile değerlendirilerek IC_{50} değerleri belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak amfoterisin B (AmpB), sitotoksisi- te testi için de WI-38 fetal akciğer fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Bitki ekstratlarının en düşük IC_{50} değ- erleri; *P.ferulaceae* bitkisinin kök kloroform ekstresi 36 µg/ml, meyve kloroform ekstresi 20 µg/ml; *F.orientalis* bitkisinin kök etanol ekstresi 2.5 µg/ml, meyve etanol ekstresi 48 µg/ml, gövde kloroform ekstresi 24 µg/ ml ve meyve kloroform ekstresi 3.1 µg/ml olarak bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızda sadece *P.ferulaceae* kök etanol ekstresinin WI-38 fetal akciğer fibroblast hücre hattı üzerine 72. saate 65.19 µg/ml'de sitotoksik aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ülkemizde yüksek rakımlı bölgelerinde yetişen *P.ferulaceae* ve *F.orientalis* bitkilerinin *L.tropica*'ya karşı potansiyel anti-leishmanial aktivitesi ilk kez çalışılmıştır. Anti-leishmanial aktivite- lerini incelediğimiz 18 bitki ekstresi arasında en düşük IC_{50} değerine sahip olanların *P.ferulaceae* kök etanol ekstresi ve meyve kloroform ekstresi olduğu belirlenmiştir. Bu araştırmada elde edilen verilerin *P.ferulaceae* ve *F.orientalis* bitkilerinin anti-leishmanial aktiviteleri konusunda etken madde saptanması açısından yararlı olacağı düşünülmektedir

Anahtar kelimeler: *Prangos ferulacea*; *Ferula orientalis*; *Leishmania tropica*; anti-leishmanial etki.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a vector-borne disease that is caused by the protozoa of *Leishmania* genus. Leishma- niasis is endemic in tropical, subtropical, and large areas of the Mediterranean basin, and covers a total of 98 countries worldwide. It is estimated, according to the World Health Organization (WHO) data, that approximately 350 million people are at risk in these areas, and approximately 12 million people are infected. Increased drug resistance has been documented lately, in the treatment of leishmaniasis which causes almost 1.2 million new cases annually. Thus, interest in plant-derived active substances has inc- reased in recent years, and new anti-leishmanial agents are investigated with in vitro studies. The aim of the present study was to investigate the anti-leishmanial effects of *Prangos ferulacea* and *Ferula orientalis* plant extracts collected from the rural areas of Şırnak province against *Leishmania tropica*. The water, chloroform, and ethanol extracts of the roots, stems, and fruits of *P.ferulaceae* and *F.orientalis* plants were obtained, and the cytotoxic activity tests of the extracts were performed. *L.tropica* isolate obtained from the Parasite Bank in Manisa Celal Bayar University in Turkey (MHOM/TR/2012/CBCL-LT) was grown on NNN and RPMI 1640 broth medium. The cytotoxicity of each extract on the *L.tropica* isolate was eva- luated with the XTT test. Amphotericin B (AmpB) was used as the positive control, and the IC_{50} values were determined. The lowest IC_{50} values of the plant extracts were found to be as follows: *P.ferulaceae* root chloroform extract 36 µg/ml and fruit chloroform extract 20 µg/ml, *F.orientalis* root ethanol extract 2.5 µg/ml, and fruit ethanol extract 48 µg/ml, stem chloroform extract 24 µg/ml, and fruit chloroform extract 3.1 µg/ml. It was also determined in our study that only *P.ferulaceae* root ethanol extract showed cytotoxic activity on the WI-38 fetal lung fibroblast cell line at 65.19 µg/ml at 72 hours. This is the first study that assessed the anti-leishmanial activities of *P.ferulaceae* and *F.orientalis* plants that grow in high altitude areas of our country. It was determined that *P.ferulaceae* root ethanol extract and fruit chloroform extract had the lowest IC_{50} values among the 18 plant extracts that we examined for their anti-leishma- nial activities. The outcomes of this study will be useful in further studies for the determination of active compounds in *P.ferulaceae* and *F.orientalis* plant extracts.

Keywords: *Prangos ferulacea*; *Ferula orientalis*; *Leishmania tropica*; anti-leishmanial effect.

GİRİŞ

Leishmaniasis, *Leishmania* cinsi hücre içi zorunlu protozoonların neden olduğu vektör kaynaklı bir hastalıktır. Leishmaniasis dünya genelinde 98 ülkeyi kapsayan tropik, subtro- pik ve Akdeniz Havzası'nda bulunan ülkelerde endemiktir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre endemik bölgelerde yaklaşık 350 milyon insanın risk altında ve yaklaşık 12 milyon insanın da enfekte olduğu tahmin edilmektedir¹. Endemik bölgelerde yıllık 0.7- 1.2 milyon kutanöz leishmaniasis (KL) ve 200-400 bin visceral leishmaniasis (VL) olgusu

meydana geldiği ve mortalitesinin ise 20-50 bin olduğu tahmin edilmektedir². Tropikal hastalıklar içerisinde leishmaniasis, morbidite açısından dördüncü, mortalite açısından ise ikinci sırada yer almaktadır. İnsanlardaki paraziter hastalıklar içerisinde leishmaniasis, sıtma ve schistosomiasis'ten sonra en yüksek morbiditeye sahip üçüncü ve sıtmadan sonra en fazla mortaliteye sahip ikinci paraziter hastalıktır³.

Gelişen moleküler teknikler ve protein analizleri gibi modern yöntemler sayesinde tür ayrımı kesin olarak yapılabilmektedir. Bugüne kadar *Leishmania* cinsine ait 53 tür tanımlanmıştır ve bunlardan 31'i memelilerde parazitemi oluştururken, sadece 20'sinin insanlarda parazitemiye neden olduğu bildirilmiştir⁴.

İnsanlarda VL, KL ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) olmak üzere leishmaniasisin üç farklı temel klinik formu görülür. VL iç organlara yerleşen ve tedavi edilmediğinde ölümlle sonuçlanan en ağır klinik formdur. KL ise genellikle kendiliğinden iyileşebilen fakat skar dokusu bırakabilen cilt ülserleri şeklindeki formudur. MKL ise ağız, burun ve boğaz mukoza zarlarının şekillerinin bozulmasına neden olmaktadır. Bunlara ek olarak hastada yüzde ya da diğer açık alanlara plak benzeri ya da nodüller şeklinde gelişen fakat lezyon oluşturmeyen diffüz kutanöz leishmaniasis (DKL) ile VL sonrasında hastalarda ortaya çıkabilen post-Kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) şeklinde hastalığın iki sekonder klinik formu da bulunmaktadır⁵.

Leishmania tedavisi temelde beş değerlikli antimon bileşiklerinin kullanımına dayanmakla birlikte pentamidin, amfoterisin B (AmpB) ve lipozomal formülasyonu, paramomisin ve miltefosin gibi ikinci basamak ilaçlar da kullanılmaktadır. Bununla birlikte toksisite, yüksek maliyet ve/veya parazit direncinin artması bu bileşiklerin etkinliğini engellemiştir. AmpB, *Leishmania* tedavisinde uygunluğu iyi değerlendirilmiş bir ilaçtır; fakat böbrek, karaciğer ve kalp toksisitesi gibi yan etkileri, uygulamasını sınırlandırmıştır. AmpB içeren lipit bazlı formülasyonlar serbest ürünün kullanımına kıyasla daha yüksek etkinlik ve daha düşük toksisite göstermiştir. Bununla birlikte, bu formülasyonların yüksek maliyeti, gelişmekte olan ülkelerde sınırlayıcı bir faktördür. Bu bağlamda, leishmaniasise karşı uygulanacak yeni terapötiklerin belirlenmesini amaçlayan çalışmalar zorunlu hale gelmektedir⁶.

Doğal ürünler ilaç endüstrisi tarafından biyolojik aktivite gösteren değerli yeni bir molekül kaynağı olarak kabul edilmiştir. Bitki kaynaklı bileşiklere son yıllarda ilgi artmış ve in vitro çalışmalarda yeni anti-leishmanial ilaçlar olarak belirlenmiştir⁷.

Bu çalışmada, Şırnak kırsalından toplanan *Prangos ferulaceae* ve *Ferula orientalis* bitkilerinin toprak altı ve toprak üstü kısımlarının su, sulu etanol ve klorofom ekstraktlarının *Leishmania tropica* promastigotları kullanılarak anti-leishmanial etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 12.09.2018 ve Karar No: 20.478.486).

***Prangos ferulaceae* ve *Ferula orientalis* Bitkilerinin Toplanması, Tür Tayinlerinin Yapılması ve Ekstrelerin Hazırlanması**

P.ferulacea ve *F.orientalis* bitkilerinin toprak altı ve toprak üstü kısımları Şirnak kırsalının 1890-2090 m rakımlı yaylarından haziran ayında toplandı. Bu bitkilerin tür tayinleri Siirt Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde yapılmış ve herbaryum numaraları (*P.ferulaceae*: SUFAF1536- *F.orientalis*: SUFAF1538) verilmiştir. Toplanan *P.ferulaceae* ve *F.orientalis* bitkilerinin toprak altı ve toprak üstü kısımlarının su, etanol ve kloroform ekstraktleri Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Laboratuvarlarında çıkarıldı.

Bitkinin kök, gövde ve meyve kısımları toplanıp oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan kısımlar değirmende toz hale getirildi. Su ekstresi %2'lik infüzyon şeklinde hazırlandı. Sonrasında 2 g toz haline getirilmiş bitkisel materyal 100 ml kaynamış su içinde 10 dakika bekletilip, sıcakken süzgeç kağıdı kullanılarak süzülde. Süzde kısımlar alçak basınçta rotavaporda 50°C'yi geçmeyen sıcaklıkta kuruyuncaya kadar buharlaştırıldı.

Sulu etanol ekstresi için; toz haline getirilen bitkinin kök, gövde ve meyve kısımları (5 g), %60'lık sulu etanol (100 ml) ile oda sıcaklığında çalkalama maserasyonu tekniğiyle ekstre edildi. Filtre edilip, çözücü rotavaporda 50°C'yi geçmeyen sıcaklıkta kuruyuncaya kadar buharlaştırıldı ve ekstre -80°C'de dondurulup liyofilize edildi.

Kloroform ekstresi için; toz haline getirilen bitkinin kök, gövde ve meyve kısımları (5 g), kloroform (100 ml) ile oda sıcaklığında çalkalama maserasyonu tekniği ile ekstre edildi. Filtre edilip, alçak basınçta kloroform uçana kadar bekletildi. Kalan kısımlar bir miktar distile su içinde süspanse edilip -80°C'de dondurulup liyofilize edildi. Liyofilize edilen ekstraktler ve sulu ekstraktler -20°C'de aktivite çalışmaları yapılana kadar saklandı⁸.

***Leishmania tropica* İzolatının Canlandırılması ve Üretilmesi**

Çalışmamızda Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasından temin edilen MHOM/TR/2012/CBCL-LT kodlu *L.tropica* izolatı kullanıldı. Sıvı azot tankından çıkarılan izolat 37°C'lik su banyosu içerisinde çözdeürüldü ve NNN besiyerlerine ekim yapıldı ve ardından 26°C'lik etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı. Besiyerleri ardışık günlerde kontrol edilerek üreme durumu saptandı. Promastigot üremesi gördeilen besiyerlerinden alınarak RPMI 1640 besiyerine ekim yapıldı. Besiyerleri 26°C'lik etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı ve ardışık günlerde üreme durumu kontrol edildi. Kontrol sonunda logaritmik faza giren *L.tropica* promastigotları hemositometre yöntemiyle sayılarak 107 promastigot/ml olacak şekilde çalışmada kullanılmaya hazır hale getirildi⁹.

***In vitro* *Prangos ferulaceae* ve *Ferula orientalis* Bitkilerinin Ekstrelerinin Anti-leishmanial Etkinliğinin Değerlendirilmesi**

Yapılan çalışma sonucunda *P.ferulaceae* bitkisinin kök etanol ekstresi (PfKE), gövde/yaprak etanol ekstresi (PfHE), meyve etanol ekstresi (PfME), kök kloroform ekstresi (PfKC), gövde/yaprak kloroform ekstresi (PfHC), meyve kloroform ekstresi (PfMC), kök su

ekstresi (PfKS), gövde/yaprak su ekstresi (PfHS) ve meyve su ekstresi (PfMS) ile *F.orientalis* bitkisinin kök etanol ekstresi (FoKE), gövde/yaprak etanol ekstresi (FoHE), meyve etanol ekstresi (FoME), kök kloroform ekstresi (FoKC), gövde/yaprak kloroform ekstresi (FoHC), meyve kloroform ekstresi (FoMC), kök su ekstresi (FoKS), gövde/yaprak su ekstresi (FoHS) ve meyve su ekstresi (FoMS) olmak üzere *P.ferulaceae* ve *F.orientalis* bitkilerinden 18 farklı ekstrenin anti-leishmanial etkinliği in vitro olarak 48. saatteki IC_{50} değeri her ekstre için hem XTT, hem de hemositometre yöntemiyle değerlendirildi.

Düz tabanlı 96'lık hücre kültürü plağının tüm kuyucuklarına 100 µl RPMI 1640 besiyeri çok kanallı pipetle dağıtıldı. Çalışmada her bir bitki ekstresi için ayrılan üç kuyucuğa ekstrakt konsantrasyonları 300, 150, 75, 37.5, 18.75 ve 9.375, 4.69 µg/ml olacak şekilde ilk kuyucuğa 600 µg/ml olarak hazırlanan ekstrakt süspansiyonundan 100 µl eklendi. Yapılan çalışmanın kontrolü olarak amfoterisin B için de üç kuyucuk ekstrakt dilüsyonlarının aynı olacak şekilde eklendi. İlk kuyucuğa (kör) 100 µl RPMI 1640 besiyeri eklendi. Geriye kalan kuyucuklara RPMI 1640 besiyeri içerisindeki parazit süspansiyonundan 100 µl (10^6 promastigot/ml) eklendi. Daha sonra ağız kapatılan plaklar 26°C' de etüvde inkübasyona bırakıldı. Etüvde 26°C' de 48 saatteki etkinliği [Half Maximal Inhibitor Concentration (IC_{50})] XTT hücre proliferasyon kiti ve hemositometre yöntemi ile ekstrelerin anti-leishmanial etkinlikleri değerlendirildi⁹.

***Prangos ferulaceae* ve *Ferula orientalis* Bitkilerinin Ekstrelerinin Sitotoksik Aktivitelerinin Değerlendirilmesi**

Ekstrelerin sitotoksik aktivite testi için; su ile sulandırılmış 0.001 -100 µg/ml konsantrasyon aralığında bitki ekstrelerinin 96. saate kadar IC_{50} değerleri belirlendi. Bitki özü içermeyen kontrol grubu dahil olmak üzere 96 kuyucuğa sahip plaklardaki her hücre çizgisi için WI-38 insan fibroblast hücresi dağıtıldı. Her bir değerlendirme üç tekrar yapıldı. Her hücre hattındaki bitki ekstrelerinin IC_{50} değerleri, [WST-1] (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisülfonat) testiyle bir kalorimetre kullanılarak belirlendi, tüm ekstraktlar 4 saat süreyle 37°C' de %5 CO₂ ve %95 nem içeren bir etüv içinde tutuldu. Sarı-turuncu renkli ürün, kararlı çözünür formazan, bir Multiscan FC Thermo Scientific mikropalak okuyucu kullanılarak 450 nm ve 620 nm referans aralığında ölçüldü¹⁰.

BULGULAR

P.ferulaceae bitkisinin; PfKC ve PfMC ekstrelerinin 48. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 39 µg/ml ve 20 µg/ml olarak saptanmıştır. Araştırmamızda kullandığımız diğer bitki türü olan *F.orientalis* bitkisinin; FoKE, FoHC, FoME ve FoMC ekstrelerinin 48. saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla 2.5 µg/ml, 24 µg/ml, 48 µg/ml ve 3.1 µg/ml olarak saptanmıştır (Tablo I). Her iki bitkiden elde ettiğimiz 18 farklı ekstreten geriye kalan 12 ekstretenin 1 ml'de etkinlik gösterdiği başlangıç dozlarının çok yüksek miktarda olması ve in vitro ortamı bozabilecek düzeylerde olmasından dolayı sağlıklı bir sonuç elde edilememiştir ve çalışma dışı bırakılmıştır.

Tablo 1. *In vitro* Prangos ferulaceae ve Ferula orientalis Bitki Ekstrelerinin Anti-leishmanial ve Sitotoksik Aktiviteleri

Bitki	Ekstre	Anti-leishmanial Etkinlik (IC ₅₀) (µg/ml)	Sitotoksik Aktivite (IC ₅₀) (µg/ml)
<i>P.ferulaceae</i>	Kök (kloroform)	39	3.077
	Meyve (kloroform)	20	16.96
<i>F.orientalis</i>	Kök (etanol)	2.5	0.12
	Gövde/Yaprak (kloroform)	24	0.47
	Meyve (etanol)	48	0.50
	Meyve (kloroform)	3.1	0.53

Sitotoksik aktivite sonucunda 24. ve 48. saatlerde hiçbir bitki ekstresi sitotoksik aktivite göstermezken, 72. saatte FoKE 65.19 µg/ml oranında sitotoksik aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemini koruyan bir halk sağlığı sorunu olan leishmaniasisin tedavisinde birçok zorluk yaşanmaktadır. Leishmaniasis için son yıllarda çeşitli ilaç tedavi seçenekleri ortaya çıkmış olmakla birlikte, ilaca karşı oluşan direnç ve dirence bağlı olarak yüksek doz ilaç kullanımının neden olduğu yan etkiler, maliyet, uzun tedavi süresi ve uygulamadaki sıkıntılar ciddi dezavantajlar doğurmaktadır. Bununla birlikte, bu ilaçlar genel olarak toksik olup dünya genelinde farklı düzeylerde bu ilaçlara karşı bir direnç gelişmiş durumdadır¹¹. Leishmaniasise karşı etkili bir aşının henüz olmayışı da gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde ciddi bir endişe yaratmaktadır¹². Bu ve benzeri nedenler yeni anti-leishmanial ilaçların araştırılmasını zorunlu kılmıştır. Bu amaçla birçok araştırmacı tıpta alternatif ilaç kaynağı olarak bitkiler üzerine yoğunlaşmıştır¹³.

Bir bileşiğin anti-leishmanial aktivitesini değerlendirmek için MİK (minimum inhibitör konsantrasyon), IC₅₀ [yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (half of maximal inhibitor concentration)] ve selektif endeksi olmak üzere çeşitli kriterler göz önüne alınmaktadır¹⁴. MİK değeri, bir bileşiğin veya ilacın minimum inhibisyon konsantrasyonu olarak değerlendirilir. Aynı zamanda IC₅₀ konağın canlı makrofaj hücreleri için de kullanılmaktadır. CC₅₀, genellikle BALB/c makrofaj hücre hattı ölümünün %50'sine neden olan ilacın sitotoksik konsantrasyonunu belirlemek için kullanılır¹⁵. Yaptığımız çalışmada *P.ferulaceae* ve *F.orientalis* bitki ekstrelerinin 48. saatteki anti-leishmanial aktiviteleri ve WI-38 fetal akciğer fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktivitesini değerlendirmek için IC₅₀ değerleri baz alınmıştır.

Dünyanın birçok yerinde geleneksel halk tıbbında *P.ferulaceae* bitkisinin kök, gövde, çiçek ve meyve kısımları sindirim bozukluklarının tedavisinde, yaraların iyileştirilmesinde ve kanamayı durdurmada kullanılmaktadır¹⁶. Ayrıca bu bitkinin uçucu yağlarının anti-fungal, anti-bakteriyel ve antioksidan özellikler taşıdığı da bildirilmiştir^{17,18}. Yaptığımız literatür taramasında, üyesi olduğu *Apiceae* familyasında anti-leishmanial aktivite gösteren

birçok türün olduğu görülmesine rağmen *P.ferulaceae* bitkisinin total ekstreleri üzerine herhangi bir anti-leishmanial aktivite çalışmasına rastlanılmamıştır¹⁹. Bu nedenle araştırmamızın literatürde *P.ferulaceae* bitkisinin anti-leishmanial etkisinin araştırıldığı ilk çalışma olduğu düşünülmektedir.

Kermani ve arkadaşları çalışmalarında²⁰ *P.ferulaceae* bitkisinin ana komponenti olan "osthole" maddesinin çarpıcı derecede anti-leishmanial aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Rodrigues ve arkadaşları²¹ ise farklı bir bitki türünden izole ettikleri α -pinen maddesinin *L.amazonensis* promastigotları üzerine güçlü anti-leishmanial aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Bruno ve arkadaşları da *P.ferulaceae* bitkisinin uçucu yağlarını inceledikleri çalışmada²² osthole ve α -pinen maddelerinin bitkinin ana komponentlerinden olduğunu bildirmişlerdir. Her üç çalışma ile yaptığımız çalışma karşılaştırıldığında *P.ferulaceae* bitkisinin anti-leishmanial aktivite göstermesini doğrulamaktadır.

Ülkemizde 24 türü olan ve bu türlerden 13'ü endemik olarak yetişen Apiceae familyasının *Ferula* cinsine ait bir tür olan *F.orientalis* bitkisi ülkemizde geleneksel halk tıbbında karminatif, sedatif, antispazmodik, laksatif, dijestif, ekspektoran, diüretik, afrodizyak, antiseptik, antihelmintik, analjezik ve stimulant olarak kullanılmaktadır²³. Yapılan çalışmalarda *F.orientalis* bitkisinin özellikle toprak üstü kısımlarının ana komponentini α -pinen (%75.9)'nin oluşturduğu bildirilmiştir²⁴. Iransahahi ve arkadaşları²⁵ *F.orientalis* bitkisinin içeriğindeki komponentlerin anti-bakteriyel, anti-leishmanial ve antioksidan özelliklerinin olduğunu ve bu bitkiden elde edilecek komponentlerin gelecekte biyolojik aktiviteler için umut verici olduğunu bildirmişlerdir. Bu da bizim araştırmamız için bitki seçimimizi desteklemektedir. Bitkinin ana komponentini oluşturan α -pinen maddesinin anti-leishmanial aktivite gösterdiği çalışmalarda bildirilmiştir^{21,26}. Çalışmamızda da *F.orientalis* bitkisinin diğer bitkiye göre daha fazla olacak şekilde dört farklı total ekstresinin anti-leishmanial aktivite göstermesinin ana komponenti olan α -pinen ile ilişkisi olabileceği düşünülmüştür.

F.orientalis bitkisinin total ekstrelerinin anti-leishmanial aktivitesini inceleyen bir çalışmaya rastlanılmaması, araştırmamızın bize bu bitkinin total ekstresi kullanılarak anti-leishmanial aktivitesini inceleyen ilk çalışma olduğunu düşündürmüştür. Iransahahi ve arkadaşları aynı cinsten yer alan *F.szowitsiana* bitkisinin *L.major* promastigotları üzerine in vitro güçlü anti-leishmanial aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir²⁷. Bafghi ve arkadaşları yayınladıkları makalelerinde yine *Ferula* cinsine ait başka bir tür olan *F.assafetida* bitkisinin yine *L.major* promastigotları üzerine in vitro anti-leishmanial aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir²⁸.

Coğrafi konumu ve iklim çeşitliliği nedeniyle çok zengin bir bitki çeşitliliğine sahip olan ülkemizde bitki ekstreleri ile yapılan anti-leishmanial aktivite çalışmaları sınırlı sayıdadır. Yapılan literatür taramalarında Özbilgin ve arkadaşları 2014 yılında *Centaurea calolepis* boiss, *Phlomis lycia*, *Eryngium thoriolium*, *Origanum sipyleum*, *Galium incanum* spp. centrale bitkilerinin ekstreleriyle *L.tropica* üzerine yaptıkları in vitro ve in vivo anti-leishmanial aktivite çalışmasında²⁹, özellikle *E.thoriolium* bitkisinin hem sitotoksik aktivite, hem de anti-leishmanial aktivite açısından umut verici olduğunu bildirmişlerdir²⁹. Ülkemizde Can

ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer çalışmada³⁰ ise *Sarcopoterium spinosum* bitkisinin *L.tropica* promastigotları üzerine in vitro anti-leishmanial aktivitesini araştırmışlar ve *S.spinosa* bitkisinin ciddi anti-leishmanial aktivite gösterdiğini, *L.tropica* tedavisinde geliştirilmeye değer yeni bir terapötik ilaç olduğunu bildirmişlerdir. Her iki çalışma ve bizim araştırmamızın sonuçları ülkemizdeki yeni terapötik ilaçların ortaya çıkarılması için endemik bitki ekstreleriyle yapılacak çalışmaların ne kadar gerekli olduğunu göstermektedir.

L.tropica üzerine *P.ferulaceae* ve *F.orientalis* bitki total ekstrelerinin anti-leishmanial etkinliğini in vitro olarak değerlendirdiğimiz çalışmamızda PFKC, PfMC, FoKE, FoHC, FoME ve FoMC ekstrelerini IC₅₀ değerleri sırasıyla 39 µg/ml, 20 µg/ml, 2.5 µg/ml, 24 µg/ml, 48 µg/ml ve 3.1 µg/ml olarak bulunmuştur. Literatürde *L.tropica* üzerine yapılan diğer çalışmalarda³¹ ise Mahmoudvand ve arkadaşları *Allium sativum* bitkisi soğanının metanol ekstresinin *L.tropica* promastigotları üzerine anti-leishmanial aktivitesinin 72. saatteki IC₅₀ değerini 12.3 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Yine Mahmoudvand ve arkadaşlarının bir başka çalışmasında³² *Nigella sativa* bitkisinin toprak üstü kısımlarının in vitro olarak uçucu yağlarını *L.tropica* promastigotları üzerine anti-leishmanial aktivitesinin IC₅₀ değerini 9.3 µg/ml, metanol ekstresinin IC₅₀ değerini 14.8 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Behrouz Ezatpour ve arkadaşları³³ *Pistacia khinjuk* bitkisinin meyvesinin alkol ekstresinin hem *L.tropica* promastigotları üzerine anti-leishmanial aktivitesinin IC₅₀ değerini 58.6 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Mahmoudv ve arkadaşları³⁴ *Berberis vulgaris* bitkisinin toprak üstü kısımlarının su ekstresinin *L.tropica* promastigotları üzerine anti-leishmanial aktivitelerinin IC₅₀ değerlerini 26.6 µg/ml olarak bildirmişlerdir. Diğer bir in vitro çalışmada *Achillea santolina* L. bitkisinin uçucu yağlarının *L.tropica* üzerine anti-leishmanial aktivitesinin IC₅₀ değerini 56.17 µg/ml olarak bildirmişlerdir³⁵. Literatürdeki *L.tropica* üzerine yapılan sınırlı sayıdaki anti-leishmanial aktivite çalışmalarının sonuçları ile bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçları karşılaştırdığımızda PFKC, PfMC, FoHC ve FoME ekstreleri ile benzer sonuçlar olduğunu, fakat FoKE ve FoMC ekstrelerinin hepsinden daha etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, ülkemiz de yetişen *P.ferulaceae* ve *F.orientalis* bitkilerinin *L.tropica*'ya karşı potansiyel anti-leishmanial aktivitesi ilk kez tarafımızdan tespit edilmiş, bu bitkiler üzerinde izolasyon ve saflaştırma çalışmalarının yapılması ve aktiviteden sorumlu olabilecek sekonder metabolitlerin izole edilip yapılarının aydınlatılmasının anti-leishmanial yeni ilaç adayı moleküllerinin geliştirilmesi bakımından umut vadeden bir araştırma olduğu düşünülmektedir. Tüm bu nedenler ve verilerin ışığında araştırmamızın ileride farklı bitkilerle yapılacak diğer anti-leishmanial etken madde saptanması çalışmaları ve *P.ferulaceae* ve *F.orientalis* bitkilerinin anti-leishmanial aktiviteleri konusunda önemli katkılar sunduğu düşünülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 12.09.2018 ve Karar No: 20.478.486).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO). Global leishmaniasis surveillance update, 1998-2016. Weekly epidemiological record. Relevé Épidémiologique Hebdomadaire 2018; (16): 201-20.
2. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. PLoS Neglected Tropical Diseases 2016; 10(3): 1-40. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
3. Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. J Infect Dev Ctries 2015; 9(6): 588-96. <https://doi.org/10.3855/jidc.6833>
4. Mauricio IL. Leishmania Taxonomy, pp: 15-30. In: Bruschi F, Gradoni L, The Leishmaniasis : Old Neglected Tropical Diseases 1st Cham, Switzerland, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0_2
5. Alemayehu B, Alemayehu M. Leishmaniasis: a review on parasite, vector and reservoir host. Health Science Journal 2017; 11(4): 1-6. <https://doi.org/10.21767/1791-809X.1000519>
6. Tavares GSV, Mendonça DVC, Lage DP, Antinarelli LMR, Soyer TG, Senna AJS, et al. In vitro and in vivo antileishmanial activity of a fluoroquinolone derivative against *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* species. Acta Tropica 2019; 191: 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.036>
7. Cheuka PM, Mayoka G, Mutai P, Chibale K. The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. Molecules 2017; 22: 58. <https://doi.org/10.3390/molecules22010058>
8. Özbilgin A, Çavuş İ, Çelebi Ç, Gündüz C, Kayalar H. *Olea europaea* bitki ekstraktının Türkiye'den elde edilmiş *Leishmania tropica* izolatına anti-leishmanial etkisinin araştırılması. Türk Mikrobiyol Cemiy Derg 2020; 50(3): 141-7. <https://doi.org/10.5222/TMCD.2020.141>
9. Özbilgin A, Çavuş İ, Yıldırım A, Kaya T, Ertabaklar H. Evaluation of in vitro and in vivo drug efficacy over *Leishmania tropica*: A Pilot Study. Türkiye Parazit Derg 2018; 42(1): 11-9. <https://doi.org/10.5152/tpd.2018.5554>
10. Özbilgin A, Durmuşkahya C, Kayalar H, Ertabaklar H, Gündüz C, Ural IO, et al. Antileishmanial activity of selected Turkish medicinal plants. Trop J Pharm Res 2014; 13(12): 2047-55. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i12.15>
11. Nardella F, Galle JB, Bourjot M, Weginer B, Vonthron-Senecheau C. Anti-leishmanial and Anti-trypanosomal Activities of Flavonoids, pp: 195-214. In: Mérillon JM, Riviere C, Natural Antimicrobial Agents, 19th ed. Cham, Switzerland, 2018. https://doi.org/10.1007/978-3-319-67045-4_7
12. Bansal R, Sen SS, Muthuswami R, Madhubala R. A plant like cytochrome P450 subfamily CYP710C1 gene in *Leishmania donovani* encodes sterol C-22 desaturase and its over-expression leads to resistance to amphotericin b. PLoS Negl Trop Dis 2019; 13(4): e0007260. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007260>
13. Ghodsian S, Taghipour N, Deravi N, Behniafar H, Lasjerdi Z. Recent researches in effective antileishmanial herbal compounds: narrative review. Parasitol Res 2020; 119: 3929-46. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06787-0>
14. Mahmoudvand H, Ayatollahi Mousavi SA, Sepahvand A, Sharififar F, Ezatpour B, Gorohi F, et al. Antifungal, Anti-leishmanial, and cytotoxicity activities of various extracts of *Berberis vulgaris* (Berberidaceae) and Its active principle berberine. ISRN Pharmacology 2014; 2014: 1-6. <https://doi.org/10.1155/2014/602436>
15. Monzote L, García M, Scull R, Cuellar A, Setzer WN. Anti-leishmanial activity of the essential oil from *bixa orellana*. Phytother Res 2014; 28(5): 753-8. <https://doi.org/10.1002/ptr.5055>
16. Kafash-Fakhd N, Asadi-Samani M, Rafieian-Kopaei M. A review on phytochemistry and pharmacological effects of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl. Life Science Journal 2013; 10:360-7.
17. Mneimne M, Baydoun S, Nemer N, Apostolides NA. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils isolated from aerial parts of *Prangos asperula* boiss. (Apiaceae) growing wild in lebanon. Med Aromat Plants 2016; 5(3): 5-9.
18. Cesur C, Coske Şenkal B, Yaman C, Uskutoğlu MK. Antioxidant activity of fruit extracts of *Prangos ferulacea* (L.) from Turkey. İğdir Univ J Sci & Tech 2017; 7(4): 249-56. <https://doi.org/10.21597/jist.2017.218>

19. Soosaraei M, Fakhar M, Hosseini Teshnizi S, Ziaei Hezarjaribi H, Banimostafavi ES. Medicinal plants with promising antileishmanial activity in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Medicine and Surgery* 2017; 21: 63-80. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2017.07.057>
20. Kermani, Kordzadeh E, Sajjadi SE, Hejazi SH, Arjmand R, Saberi E. Anti-leishmania activity of osthole. *Pharmacogn Res* 2016; 8(5): 1-4. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.178650>
21. Rodrigues KADF, Amorim LV, Dias CN, Moraes DFC, Carneiro SMP, Carvalho FADA. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-leishmania activity through immunomodulation in vitro. *J Ethnopharmacol* 2015; 160: 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.024>
22. Bruno M, Ilardi V, Lupidi G, Quassinti L, Bramucci M, Fiorini D, et al. Composition and biological activities of the essential oil from a Sicilian accession of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl. *Nat Prod Res* 2019; 0(0): 1-11.
23. Karakaya S, Yılmaz Oral D, Gür S, Kılıç CS. Effect of aerial part and root extracts from *Ferula orientalis* L. growing in Turkey on erectile dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biological Diversity and Conserv* 2019; 12(1): 1-6. <https://doi.org/10.5505/biodicon.2019.29392>
24. Karakaya S, Göğher G, Bostanlı FD, Demirci B, Duman H, Kılıç CS. Comparison of the essential oils of *Ferula orientalis* L., *Ferulago sandrasica* Peşmen and Quézel, and *Hippomarathrum microcarpum* Petrov and their antimicrobial activity. *Turk J Pharm Sci* 2019; 16(1): 69-75. <https://doi.org/10.4274/tjps.77200>
25. Iranshahi M, Rezaee R, Najafi MN, Haghighi A, Kasaian J. Cytotoxic activity of the genus *Ferula* (Apiaceae) and its bioactive constituents. *AJP* 2018; 8(4): 296-312.
26. Engin N, Erman Z. Doğadan esinlenen optimizasyon algoritmaları ve optimizasyon algoritmalarının optimizasyonu. *DÜBİTED* 2016; 4: 293-304.
27. Iranshahi M, Arfa P, Ramezani M, Jaafari MR, Sadeghian H, Bassarello C, et al. Sesquiterpene coumarins from *Ferula szowitsiana* and in vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxy coumarins against promastigotes. *Phytochemistry* 2007; 68(4): 554-61. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.11.002>
28. Bagheri S, Hejazian S, Bafghi A. Antileishmanial activity of *Ferula assa-foetida* oleo gum resin against *Leishmania major*: An in vitro study. *Journal of Ayurveda & Integrative Medicine* 2014; 5(4): 223. <https://doi.org/10.4103/0975-9476.146567>
29. Özbilgin A, Durmuşkahya C, Kayalar H, Ertabaklar H, Gündüz C, Ural IO, et al. Antileishmanial activity of selected Turkish medicinal plants. *Trop J Pharm Res* 2014; 13(12): 2047-55. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i12.15>
30. Can H, Kayalar H, Bozkurt B, Can Ş, Döşkaya M, Töz S. In vitro anti-leishmanial activity of *Sarcopoterium spinosum* against *Leishmania tropica*. *Ankara Univ Vet Fak Derg* 2018; 65(4): 373-7. https://doi.org/10.1501/Vetfak_00000002870
31. Mahmoudvand H, Sepahvand P, Jahanbakhsh S, Azadpour M. Evaluation of the antileishmanial and cytotoxic effects of various extracts of garlic (*Allium sativum*) on *Leishmania tropica*. *J Parasit Dis* 2016; 40(2): 423-6. <https://doi.org/10.1007/s12639-014-0520-9>
32. Mahmoudvand H, Tavakoli R, Sharififar F, Minaie K, Ezatpour B, Jahanbakhsh S, et al. Leishmanicidal and cytotoxic activities of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. *Pharm Biol* 2015; 53(7): 1052-7. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.957784>
33. Dalimi A, Delavari M, Ghaffarifar F, Sadraei J. In vitro and in vivo anti-leishmanial effects of aloe-emodin on *Leishmania major*. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 2015; 5: 96-9. <https://doi.org/10.1016/j.jtcm.2014.11.004>
34. Mahmoudv H, Sharififar F, Sharifi I, Ezatpour B, Fasihi Harandi M, Makki MS, et al. In vitro inhibitory effect of *Berberis vulgaris* (Berberidaceae) and its main component, Berberine against different leishmania species. *Iranian J Parasitol* 2014; 9(1): 28-36. <https://doi.org/10.1155/2014/602436>
35. Dakah A, Maarrouf M. Antileishmanial and antibacterial activity of essential oils of medicinal plant *Achillea santolina* L. *OnLine Journal of Biological Sciences* 2019; 19(1): 69-76. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2019.69.76>