

***Consolida orientalis* (Gay.) Schröd. ekstraktlarının *Acanthamoeba castellanii* trofozoit ve kist formları üzerine etkisi ve sitotoksik potansiyeli**

Amoebicidal activity of *Consolida orientalis* (Gay.) Schröd. on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites and its cytotoxic potentials

Necati ÖZPINAR¹

¹Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hatay, Türkiye, ORCID; 0000-0002-7317-885X

Makale bilgisi

Alındı: 03.01.2020
Revize form alındı: 05.04.2020
Kabul: 11.04.2020
Online yayım: 15.04.2020

Anahtar Kelimeler

Acanthamoeba
Amibisidal etki
Consolida orientalis
Sitotoksosite

Özet

Çalışmada *Consolida orientalis*'in *Acanthamoeba castellanii* (*A. castellanii*) kist ve trofozoitleri üzerine etkisi ve bitki ekstraktlarının sitotoksik potansiyellerinin araştırılması amaçlandı. *Consolida orientalis*'in amibisidal aktivitesini test etmek amacıyla *A. castellanii* trofozoit ve kistlerinin aksenik kültürleri hazırlandı. 24 kuyucuklu plaklarda *Consolida orientalis*'in 5 mg/100 µL, 2,5 mg/100 µL, 1,25 mg/100 µL ve 0,6 mg/100 µL' lik konsantrasyonları hazırlandı ve *A. castellanii* kist ve trofozoitleri bu kültürlerle ekildi. Parazitler tripan blue ile boyandıktan sonra hücre sayım cihazında 0, 1, 3, 6, 12, 24 ve 48'inci saatlerde sayıldı. Ayrıca *Consolida orientalis*'in WI-38 insan fibroblast hücre hattı üzerine sitotoksitesini de XTT testi ile test edildi. *Consolida orientalis* çiçek ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan *A. castellanii* canlılık durumları incelendiğinde 24 saat sonunda 5 mg/100 µL, 2,5 mg/100 µL konsantrasyonlarında canlı kist ve trofozoite rastlanmadı. *Consolida orientalis* toprak üstü kısmında ise 12 saat sonunda 5 mg/100 µL, 2,5 mg/100 µL konsantrasyonlarında canlı trofozoite, 24 saat sonunda 5 mg/100 µL ve 48 saat sonunda 5 mg/100 µL ve 2,5 mg/100 µL'lik konsantrasyonlarında canlı parazit kistine rastlanmadı. Yapılan sitotoksosite çalışmaları sonucunda *Consolida orientalis*'in WI-38 insan fibroblast hücre hattı üzerine 5 mg/100 µL konsantrasyonda dahi herhangi bir sitotoksik etki göstermediği tespit edildi. Verilerimizin *Acanthamoeba* kaynaklı hastalıkların tedavisinde yeni bir terapötik ajan geliştirilmesi için öncü bir çalışma olabileceği düşünülmektedir.

Araştırma Makalesi

Article info

Received: 03.01.2020
Received in revised form: 05.04.2020
Accepted: 11.04.2020
Available online: 15.04.2020

Keywords

Acanthamoeba
Amoebicidal effect
Consolida orientalis
Cytotoxicity

Abstract

In this study, it was aimed to investigate the effects of *Consolida orientalis* on *Acanthamoeba castellanii* (*A. castellanii*) cyst and trophozoites and cytotoxic potentials of plant extracts. Axenic cultures of *A. castellanii* trophozoites and cysts were prepared to test the amoebicidal activity of *Consolida orientalis*. *Consolida orientalis* concentrations of 5 mg / 100 µL, 2.5 mg / 100 µL, 1.25 mg / 100 µL and 0.6 mg / 100 µL were prepared in 24-well plates and *A. castellanii* cysts and trophozoites were cultured in these mediums. Parasites were counted in cell counting device at 0, 1, 3, 6, 12, 24 and 48 hours after staining with trypan blue. In addition, the cytotoxicity of *Consolida orientalis* on the WI-38 human fibroblast cell line was tested with the XTT test. When *A. castellanii*, which was exposed to different concentrations of *Consolida orientalis* flower extracts, was examined, no live cyst and trophozoite were found at the concentrations of 5 mg / 100 µL, 2.5 mg / 100 µL after 24 hours. Aerial part of *Consolida orientalis*, after 12 hours, all trophozoites died at concentrations of 5 mg / 100 µL, 2.5 mg / 100 µL. And no viable parasitic cyst was found at concentrations of 5 mg / 100 µL at the end of 24 hours and 5 mg / 100 µL and 2.5 mg / 100 µL after 48 hours. As a result of the cytotoxicity studies, it was determined that *Consolida orientalis* did not show any cytotoxic effects on the WI-38 human fibroblast cell line, even at a concentration of 5 mg / 100 µL. Our data is thought to be a pioneering study to develop a new therapeutic agent in the treatment of diseases, the cause of which is *A. castellanii*.

Research Article

GİRİŞ

Acanthamoeba, *Naegleria*, *Balamuthia* ve *Sappinia* gibi serbest yaşayan amipler toprak, hava, tatlı ve tuzlu su, toz, klimalar gibi pek çok çevresel ve klinik örneklerden izole edilmektedir¹⁻³. Bu amipler genellikle immün sistemi baskılanmış kişilerde granüloamatöz amebik ensefalit (GAE) denilen multifokal ensefalite ve sağlıklı kişilerde amibik keratite (AK) neden olabilmektedir⁴. *Acanthamoeba*'nın yaygın dağılımı nedeniyle, organizma ile insan teması kaçınılmaz ve siktir. Bir binanın içinde ve dışında havanın örneklenmesine dayanan bir çalışmada, bir insanın günde ortalama iki *Acanthamoeba* organizmasını soluduğu tahmin edilmiştir⁵. Sivas'ta yapılan bir çalışmada 24 hastane klima filtresinin

14 (%58,3)'ünde serbest yaşayan amip tespit edilmiş ve bu amiplerin 4 (%16,7)'ünün *Acanthamoeba* spp. olduğu görülmüştür⁶. Dolayısıyla insanlar hayatlarının her anında serbest yaşayan amiplerle temas edebilirler. Serbest yaşayan amiplerin doğada sıklıkla bulunması hastalık prevalansında artmasına neden olmaktadır. Son zamanlarda AK'nin sıklığı dikkat çekicidir^{7,8}. *Acanthamoeba*'nın birçok kimyasal ajana karşı direnç geliştirmesi⁹ tedavi olasılığını oldukça düşürmektedir. Tedavide kullanılan terapötikler genellikle birkaç terapötüğün kombinasyonu şeklindedir¹⁰. AK vakalarının son zamanlarda artması ve tedavisinin oldukça güç olması araştırmacıları yeni terapötiklerin keşfine itmıştır.

Son yıllarda bitkisel kökenli ilaçların kullanımı her geçen gün artmaktadır. Birçok bitki çeşitli hastalıklarda tedavi

aracı olarak kullanılmakta ve sentetik ilaçları aratmayacak etkiler görülmektedir. Ülkemizde Mor Çiçek ismiyle bulunan *Consolida orientalis* (Gay.) Schröd, Avrupa'nın güneyinde, Türkiye ve Kuzey Afrika'da doğal yayılışa sahiptir. Mayıs ile Ağustos ayları arasında koyu mor çiçekleri olan tek yıllık otsu bir bitkidir. Ekili tarlaları yoğun bir şekilde istila ettiklerinden yabancı ot olarak kabul edilebilirler. Bu bitkiler arılar, kuşlar ve kelebekler için çekicidir ve süs bitkisi olarak kullanılabilir.

Bu çalışmada *Consolida orientalis*'in çiçek ve toprak üstü kısmı etanol ekstraktlarının *Acanthamoeba castellanii* kist ve trofozoitleri üzerine etkilerini ve ekstraktların sitotoksik potansiyellerinin araştırılması amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Parazit kültürü

Çalışmada kullanılacak olan *A. castellanii* (ATCC 30010) suşu, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazitoloji AD'ndan temin edildi.

Aksenik trofozoit kültürü

Çalışmada Jensen ve ark.¹¹ tarafından tanımlanan aksenik kültür kullanıldı. Buna göre, 20 g Mycological Peptone (Oxoid), 20 g Yeast Extract (Difco), 18 g Glikoz, 120 mg NaCl, 3 mg MgCl₂-6H₂O, 142 mg Na₂HP0₄, 136 mg KH₂P0₄, 3 mg CaCl₂, 3 mg FeSO₄ tartılarak 1 lt distile suda eritildi. 121 °C'ta 15 dakika boyunca otoklavlandıktan sonra oda ısısına gelinceye kadar soğutuldu, pH sı 5,6'ya ayarlandı.

Aksenik kist kültürü

Çalışmada Moon ve ark.¹² tarafından tanımlanan aksenik kültür kullanılacaktır. Buna göre, 5,5519 g NaCl, 0,3728 g KCl, 0,963 g MgSO₄, 0,084 g NaHCO₃, 0,044 g CaCl₂, 3,152 g Tris-HCl tartılarak 1 lt distile suda eritildi. 121 °C'ta 15 dakika boyunca otoklavlandıktan sonra oda ısısına gelinceye kadar soğutuldu, pH sı 9'a ayarlandı.

Bitki Materyali

Çalışmamızda kullanılan *Consolida orientalis* (Gay.) Schröd. Sivas Merkez ilçesi 39° 42' 11" K, 37° 0' 56" D koordinatlarında, 1250 m rakıma sahip alandan, 2019 yılı Haziran-Temmuz aylarında toplandı. Toplanan örneklerin tür teşhisi Cumhuriyet Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik AD. Öğretim Üyesi Hülya ÖZPINAR tarafından yapıldı.

Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Çalışmamızda *Consolida orientalis*'in çiçek ve toprak üstü kısmı bitki ekstraktları kullanıldı. Örnekler önce çeşme suyu ve ardından saf su ile yıkandıktan sonra kurutma kâğıtları üzerinde kurutuldu. Çiçek ve tüm bitki örnekleri öğütücüde öğütülüp homojenat hazırlanarak bu homojenattan 100 er gram alınmak suretiyle üzerine 300 ml etanol eklenerek 24 saat 150 rpm de çalkalayıcıda oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre sonunda whatman No:1 filtreden 2 defa süzülde. Elde edilen sıvı kısımda bulunan etanol evaporatörde tamamen uçuruldu.

Deneyel Tasarım

Trofozoit

Deneyler 24 kuyucuklu 2 ml kuyucuk-hacimli steril plaklarda yapıldı. Aksenik trofozoit kültüründen 20 ml, 25 cm²'lik kültür flasklarına alınarak üzerine *A. castellanii* trofozoiti eklendi. 25°C'ta 96 saat inkübe edildi. Final parazit konsantrasyonu 1x10⁵/ml olacak şekilde üzerine aksenik trofozoit kültürü eklenerek ayarlandı ve çalışmada kullanıldı. Sayımlar tripan blue ile boyanarak hücre sayım cihazında (Olympus R1) sayıldı, canlı ve ölü hücre sayıları kaydedildi.

24 kuyucuklu plaklarda *Consolida orientalis*'in çiçek ve toprak üstü bitki kısmı ekstraktları 5 mg/100 µL, 2,5 mg/100 µL, 1,25 mg/100 µL, 0,6 mg/100 µL'lik konsantrasyonları, içinde *A. castellanii* trofozoitleri bulunan ve kalibre edilen trofozoit kültürü kullanılarak ayarlandı. Parazitler 0, 1, 3, 6, 12, 24 ve 48'inci saatlerde tripan blue ile boyanarak hücre sayım cihazında sayıldı, canlı ve ölü hücre sayıları kaydedildi.

Kist

Deneyler 24 kuyucuklu 2 ml kuyucuk-hacimli steril plaklarda yapıldı. Aksenik trofozoit kültüründen 20 ml, 25 cm²'lik kültür flasklarına alınarak üzerine *A. castellanii* suşu eklendi. 25°C'ta 96 saat inkübe edildi. Elde edilen kültür, 500 g'de 10 dakika santrifüjlendi. Daha önce hazırlanan aksenik kist kültüründen 20 ml, 25 cm²'lik kültür flaskına eklendi. Santrifüj sonrası elde edilen pelet kist kültüründe dilüe edilerek eklendi ve 25°C'ta 6 gün inkübe edildi. Kültür mikroskop altında incelendi ve parazitlerin tamamının kist formuna dönüştüğü görüldü. Final parazit konsantrasyonu 1x10⁵/ml olacak şekilde üzerine aksenik kist kültürü eklenerek ayarlandı ve çalışmada kullanıldı. Sayımlar tripan blue ile boyanarak hücre sayım cihazında sayıldı, canlı ve ölü hücre sayıları kaydedildi.

24 kuyucuklu plaklarda *Consolida orientalis*'in çiçek ve toprak üstü bitki ekstraktları 5 mg/100 µL, 2,5 mg/100 µL, 1,25 mg/100 µL, 0,6 mg/100 µL'lik konsantrasyonları, içinde *A. castellani* trofozoitleri bulunan ve kalibre edilen trofozoit kültürü kullanılarak ayarlandı. Parazitler 0, 1, 3, 6, 12, 24 ve 48'inci saatlerde saatlerde tripan blue ile boyanarak hücre sayım cihazında sayıldı, canlı ve ölü hücre sayıları kaydedildi.

Sitotoksinite

Consolida orientalis'in çiçek ve toprak üstü bitki ekstraktlarının WI-38 insan fibroblast hücre hattı üzerine sitotoksitesini araştırmak amacıyla XTT testi uygulandı. Hücreler ml'de 1×10^5 WI-38 hücresi olacak şekilde DMEM (fenol red'siz) besiyeri içerisinde deneyde kullanılacak miktarda hazırlandı. Besiyerinin üzerine %10 FBS + %1 Penisilin-Streptomisin eklenecek süspansiyon oluşturuldu. Hazırlanan hücre süspansiyonundan her kuyucuğa 100 µl (1×10^4 hücre/kuyucuk) eklendi. Süspansiyonun dağılımının eşit olduğu mikroskop ile incelendikten sonra, 37°C'lik CO₂ etüvüne kaldırıldı ve 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin yüzey kaplamalarının ve genel durumlarının normal olduğu tespit edildikten sonra 5 mg/100 µL, 2,5 mg/100 µL, 1,25 mg/100 µL, 0,6 mg/100 µL konsantrasyonda hazırlanan *Consolida orientalis*'in çiçek ve toprak üstü kısmı bitki ekstraktları, 2 şer µl olarak kuyucuklara (5 tekrarlı olarak) eklendi. Pozitif kontrole 200 µl DMEM (fenol red'siz) + % 10 FBS + % 1 Penisilin-Streptomisin süspansiyonu, negatif kontrole ise 2 µl DMSO eklendi. Bütün kuyucuklardaki son hacim 198 µl besiyeri süspansiyonu ile 200 µl' ye tamamlandı. İşlem tamamlandıktan sonra plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından XTT ajanı reaktif 1: cell proliferation kit II (XTT, labelling agent, Roche) ve aktivasyon ajanı reaktif II: cell proliferation kit II (XTT, electron coupling reagent, Roche)' den oluşmaktadır. Reaktifler 50 / 1 XTT ajanı (Labelling reagent) / Aktivasyon ajanı (electron coupling reagent) olacak şekilde karıştırılarak XTT solüsyonu hazırlandı. Plaklardaki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra, XTT solüsyonundan her bir kuyucuğa 30 µl eklendi. Üzerine renksiz DMEM içeren besiyeri çözeltisinden 170 µl ilave edildi. 37°C'de 4-6 saat inkübe edildikten sonra optik yoğunluğu ölçmek üzere 96 kuyucuklu plağın kapağı açılarak 450 nm dalga boyuna ayarlanmış ELISA okuyucusuna yerleştirildi ve ölçüm yapılarak sonuçlar bilgisayar ortamından alındı ve aşağıdaki formülasyona göre canlılık oranı hesaplandı.

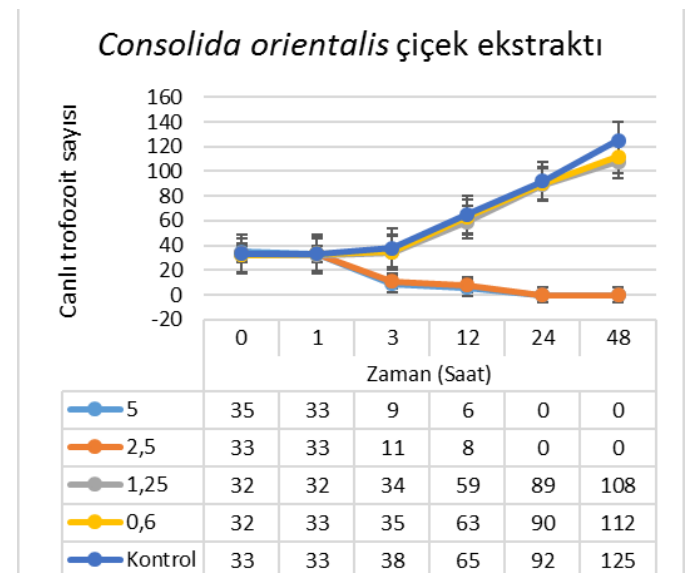
$$\text{Canlılık oranı (\%)} = \frac{\text{Çalışma örneği absorbanansı} - \text{Blank absorbanansı}}{\text{Kontrol örneği absorbanansı} - \text{Blank absorbanansı}} \times 10$$

İstatistik analiz

Çalışmamızda elde edilen veriler SPSS (Ver:22,0) programına yüklenerek verilerin değerlendirilmesinde One Way Anova testi kullanıldı ve yanılma düzeyi 0,05 olarak alındı.

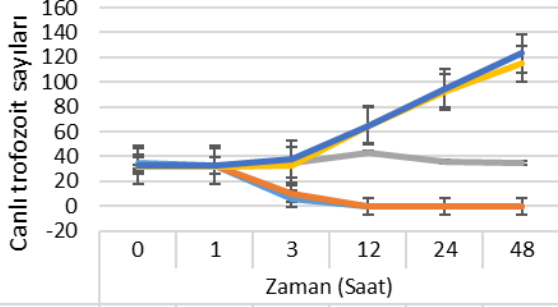
BULGULAR

Consolida orientalis çiçek ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan *A. castellanii* trofozoitleri canlılık durumları incelendiğinde 1'inci saat sonunda hiçbir etki görülmesine rağmen 3'üncü saatte 5 mg/100 µL, 2,5 mg/100 µL konsantrasyonlarında canlı parazit sayısının önemli ölçüde azaldığı görüldü. Bu veri kontrol grubuna göre önemliydi ($p < 0,05$, Şekil 1). Yine 24 saat sonundaki veriler incelendiğinde 5 mg/100 µL'lik ve 2,5 mg/100 µL'lik konsantrasyonda canlı parazite rastlanmadı (Şekil 1). Veriler istatistiksel olarak kontrol grubuna göre önemliydi ($p < 0,05$). Toprak üstü bitki ekstraktlarının canlılık durumu incelendiğinde ise 3'üncü saatte 5 mg/100 µL, 2,5 mg/100 µL konsantrasyonlarında canlı parazit sayısının önemli ölçüde azaldığı görüldü. Bu veri kontrol grubuna göre önemliydi ($p < 0,05$, Şekil 2). 12 saat sonunda 5 mg/100 µL ve 2,5 mg/100 µL'lik konsantrasyonlarında canlı parazite rastlanmadı (Şekil 2,5). Veriler istatistiksel olarak kontrol grubuna göre önemliydi ($p < 0,05$). Çalışmaya alınan diğer dozlarda istatistiksel olarak kontrol grubuna göre fark önemsiz bulundu ($p > 0,05$).



Şekil 1: *Consolida orientalis* çiçek ekstraktının *Acanthamoeba castellanii* trofozoitleri üremesi üzerine etkisi

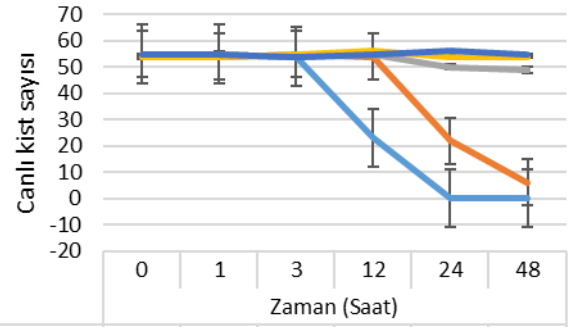
Consolida orientalis toprak üstü kısmı ekstraktı



Şekil 2: *Consolida orientalis* toprak üstü kısmı ekstraktının *Acanthamoeba castellanii* trofozoitleri üremesi üzerine etkisi

Consolida orientalis çiçek ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan *A. castellanii* kisti canlılık durumları incelendiğinde 1'inci ve 3'üncü saat sonunda hiçbir etki görülmemesine rağmen 12'inci saatte 5 mg/100 µL konsantrasyonlarında canlı parazit sayısının önemli ölçüde azaldığı görüldü (Şekil 3). Bu veri kontrol grubuna göre önemliydi ($p < 0,05$). 24 saat sonunda 5 mg/100 µL'lik konsantrasyonda canlı parazite rastlanmadı (Şekil 3). Veriler istatistiksel olarak kontrol grubuna göre önemliydi ($p < 0,05$). Toprak üstü bitki kısmı ekstraktlarının canlılık durumu incelendiğinde ise 12'inci saatte 5 mg/100 µL konsantrasyonda canlı parazit sayısının

Consolida orientalis çiçek ekstraktı

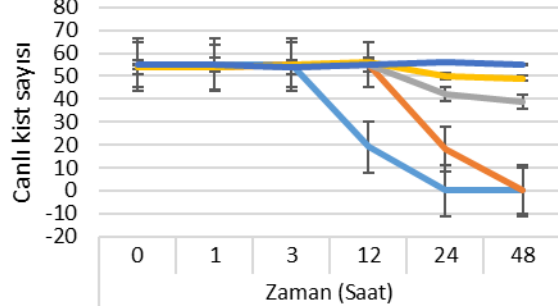


Şekil 3: *Consolida orientalis* çiçek kısmı ekstraktının *Acanthamoeba castellanii* kistleri üremesi üzerine etkisi

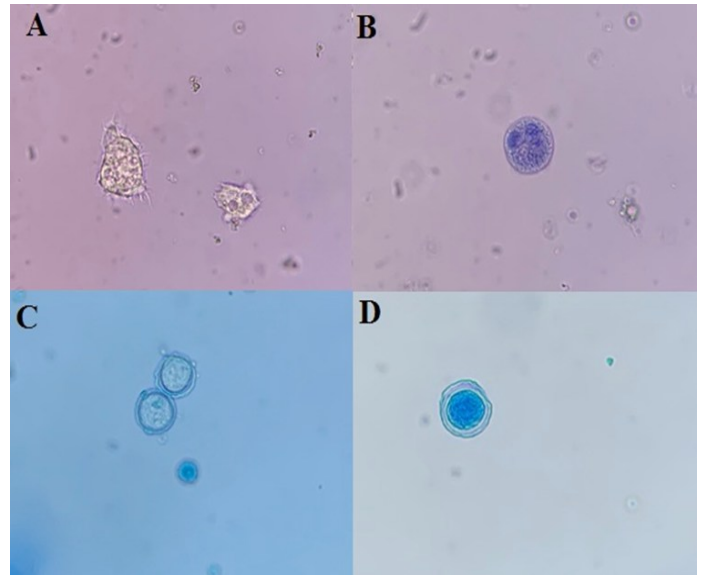
önemli ölçüde azaldığı görüldü (Şekil 4). Bu veri kontrol grubuna göre önemliydi ($p < 0,05$). 24 saat sonunda 5 mg/100 µL ve 48 saat sonunda 5 mg/100 µL ve 2,5 mg/100 µL'lik konsantrasyonlarında canlı parazite rastlanmadı (Şekil 4,5). Veriler istatistiksel olarak kontrol grubuna göre önemliydi ($p < 0,05$). Çalışmaya alınan diğer dozlarda istatistiksel olarak kontrol grubuna göre fark önemsiz bulundu ($p > 0,05$).

Yapılan sitotoksisite çalışmaları sonucunda *Consolida orientalis*'in WI-38 insan fibroblast hücre hattı üzerine çalışmaya alınan konsantrasyonlarda herhangi bir sitotoksik etki göstermediği tespit edildi (Şekil 6).

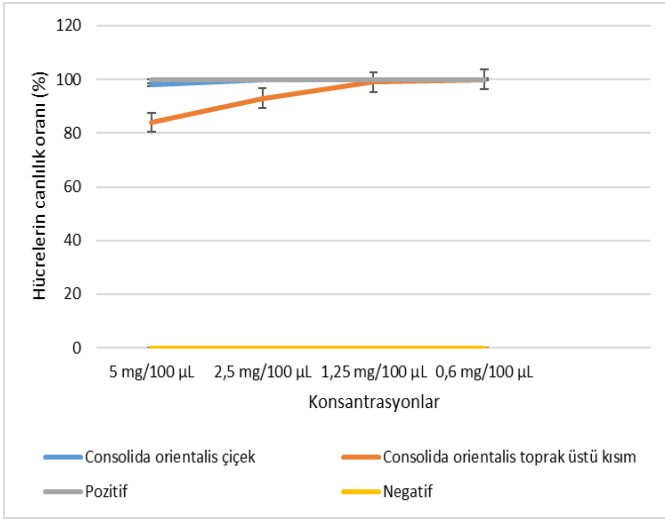
Consolida orientalis toprak üstü kısmı ekstraktı



Şekil 4: *Consolida orientalis* toprak üstü kısmı ekstraktının *Acanthamoeba castellanii* kistleri üremesi üzerine etkisi



Şekil 5: *Acanthamoeba castellanii* mikroskopik görünüm (40X) A; Canlı trofozoit, B; Ölü trofozoit, C; Canlı kist, D; Ölü kist



Şekil 6: *Consolidida orientalis*'in WI-38 insan fibroblast hücre hattı üzerine sitotoksik etkisi

TARTIŞMA

Bitkiler çok sayıda sekonder metabolit üretirler. Bu doğal metabolitlerin çoğu sadece belirli taksonlar tarafından üretilir. Bitkiler bu metabolitleri yaşadıkları ortama salmak suretiyle kendisine zarar verebilecek artropodlardan, bakteri veya mantarlardan ve hatta çevresindeki diğer bitkilerin büyümesini engelleyerek bu bitkilerin zararlı etkilerinden kurtulur. İşte çevreye salınan ve allelokimyasallar olarak adlandırılan bu maddeler çevredeki bitkileri doğrudan veya dolaylı, olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bitkiler arasında biyokimyasalların etkisiyle meydana gelen bu etkileşimler allelopati olarak tanımlanmaktadır¹³.

İnsanlar yüzyıllardır bitkilerden elde ettikleri özütleri ve karışımları birçok hastalık için tedavi aracı olarak kullanmışlardır ve hala da kullanmaya devam etmektedirler. Günümüzde de birçok ilaç etken maddesi yine bitkilerden izole edilerek tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Bitkilerin tedavi edici etkileri ürettikleri sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Benzoksazinoidler savunma ve allelopatide etkili olan sekonder metabolitlerdendir. Yapılan çalışmalar *Consolidida orientalis*'in, oluşturdukları bu sekonder metabolitler ile güçlü allelopatik etki oluşturduklarını göstermektedir^{14,15}.

Consolidida orientalis'in tıbbi etkileriyle ilgili literatürde yeterli çalışma bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde *Consolidida orientalis* özütlerinin bazı kene türleri üzerinde akarisit etki gösterdiği görülmüştür. Bu çalışmalardan biri *Argas persicus* üzerinde gerçekleştirilmiş ve bu kene larvaları üzerinde *Consolidida orientalis*'in akarisit etkisinin olduğu gösterilmiştir¹⁶. Yine başka bir çalışma *Rhipicephalus bursa* ve *Hyalomma anatolicum anatolicum* ile gerçekleştirilmiş ve

Consolidida orientalis'in *Rhipicephalus bursa* ve *Hyalomma anatolicum anatolicum* yumurta ve larvaları üzerinde güçlü akarisit etkilerinin var olduğu araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir¹⁷. *Consolidida* cinsine ait diğer türlerle yapılan çalışmalara bakacak olursak *Consolidida oliweriana*'nın *Leishmania* spp.¹⁸ ve *Trypanosoma cruzii*¹⁹ üzerindeki antiprotozoer aktivitesinden bahsedilmiştir.

Acanthamoeba castellanii'nin tedavisi oldukça güç olan AK ve GAE'ye sebep olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda *Consolidida orientalis* (Gay.) Schröd. çiçek ve toprak üstü kısmı ethanol ekstraktları *Acanthamoeba castellanii* kist ve trofozoitleri üzerine etkileri araştırılmış ve güçlü amibisidal etki tespit edilmiştir. Verilerimizin AK ve GAE tedavisinde yeni bir terapötik ajan geliştirilmesi için öncü bir çalışma olabileceği düşünülmektedir. Sonraki çalışmalarla, bitki ekstraktları içinde bulunan aktif bileşiklerin tespit edilmesi ve elde edilen verilerin hayvan deneyleriyle desteklenmesi gerekmektedir.

Teşekkür

Consolidida orientalis tür teşhisiniz yapan Dr. Hülya ÖZPINAR'a desteği için teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. Ashbolt NJ. Environmental (saprozoic) pathogens of engineered water systems: understanding their ecology for risk assessment and management. *Pathogens*. 2015;4:390-405.
2. Magnet A, Galvan A, Fenoy S, et al. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitology research*. 2012;111:383-392.
3. Ozpinar N, Ozpinar H, Bakay BB, Tunc T. Amoebicidal activity of benzothiazole on *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites and its cytotoxic potentials. *Acta Tropica*. 2020;203:105322.
4. Ak M, Dağcı H. *Özcel'in Tıbbi parazit hastalıkları*: Türkiye Parazitoloji Derneği; 2007.
5. Kingston D, Warhurst D. Isolation of amoebae from the air. *Journal of medical microbiology*. 1969;2:27-36.
6. Özpinar N, Özçelik S, Yünlü Ö. Isolation and morphotyping

- of *Acanthamoeba* spp. and *Vermamoeba* spp. from hospital air-conditioning systems. *Cumhuriyet Medical Journal*. 2017;39:369-373.
7. Greub G, Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical microbiology reviews*. 2004;17:413-433.
 8. Scheid P. Relevance of free-living amoebae as hosts for phylogenetically diverse microorganisms. *Parasitology research*. 2014;113:2407-2414.
 9. Turner N, Russell A, Furr J, Lloyd D. Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000;46:27-34.
 10. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*. 2015;22.
 11. Jensen T, Barnes WG, Meyers D. Axenic cultivation of large populations of *Acanthamoeba castellanii* (JBM). *The Journal of parasitology*. 1970:904-906.
 12. Moon E-K, Chung D-I, Hong Y-C, Ahn T-I, Kong H-H. *Acanthamoeba castellanii*: gene profile of encystation by ESTs analysis and KOG assignment. *Experimental parasitology*. 2008;119:111-116.
 13. Gülsoy S, Özkan K, Mert A, Eser Y. Chemical compounds of volatile oil obtained from fruit of Crimean Juniper (*Juniperus excelsa*) and leaves of Turkish plateau oregano (*Origanum minutiflorum*) and allelopathic effects on germination of Anatolian Black Pine (*Pinus nigra* subsp. *pallasiana*). *Biological Diversity and Conservation*. 2008;1:105-114.
 14. Schullehner K, Dick R, Vitzthum F, et al. Benzoxazinoid biosynthesis in dicot plants. *Phytochemistry*. 2008;69:2668-2677.
 15. Frey M, Schullehner K, Dick R, Fiesselmann A, Gierl A. Benzoxazinoid biosynthesis, a model for evolution of secondary metabolic pathways in plants. *Phytochemistry*. 2009;70:1645-1651.
 16. Ghanbarpour K, Tavassoli M, Shamsi L. Pesticide effects of *Consolida orientalis* extract on larval stage of *Argas persicus* (Acari: Argasidae). *Persian Journal of Acarology*. 2019;8.
 17. Tavassoli M, Maham M, Imani A, Rostami Z, Khezri A, Pourseyed S. Evaluation of *Consolida orientalis* and *Adonis vernalis* extracts on eggs and larval of *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Rhipicephalus bursa*. *Journal of Medicinal Plants*. 2012;1:141-148.
 18. Marin C, Boutaleb-Charki S, Diaz JG, et al. Antileishmaniasis activity of flavonoids from *Consolida oliveriana*. *Journal of natural products*. 2009;72:1069-1074.
 19. Marín C, Díaz JG, Maiques DI, et al. Antitrypanosomatid activity of flavonoid glycosides isolated from *Delphinium gracile*, *D. staphisagria*, *Consolida oliveriana* and from *Aconitum napellus* subsp. *Lusitanicum*. *Phytochemistry Letters*. 2017;19:196-209.