

Kuzey Kıbrıs'ta Yetişen Bitkilerden Elde Edilen Uçucu Yağlarda *Leishmania tropica*'ya Karşı *in vitro* Anti-leishmanial Etkinlik Araştırılması

In vitro Anti-Leishmanial Activity of Essential Oils Extracted from Plants Growing in Northern Cyprus Against *Leishmania tropica*

Emrah Güler^{1,2}, Ahmet Özbilgin³, İbrahim Çavuş³, Buket Baddal^{1,2}, İlker Etikan^{2,4}, K. Hüsnu Can Başer⁵, Tamer Şanlıdağ^{2,6}

¹Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

²Yakın Doğu Üniversitesi, DESAM Enstitüsü, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

³Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

⁴Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

⁵Yakın Doğu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

⁶Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Manisa, Türkiye

Cite this article as: Güler E, Özbilgin A, Çavuş İ, Baddal B, Etikan İ, Başer KHC, Şanlıdağ T. *In vitro* Anti-Leishmanial Activity of Essential Oils Extracted from Plants Growing in Northern Cyprus Against *Leishmania tropica*. Türkiye Parazitoloj Derg 2021;45(2):101-107.

ÖZ

Amaç: Bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin leishmaniasis tedavisi için yeni ve etkili bileşiklerin üretilmesine öncülük edeceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, Kuzey Kıbrıs'ta yetişen *Origanum dubium* (OD), *Origanum majorana* (OM), *Salvia fruticosa* (SF) ve *Laurus nobilis* (LN) bitkilerinden elde edilen uçucu yağların *Leishmania tropica*'ya karşı *in vitro* etkinlikleri araştırılmıştır.

Yöntemler: Çalışmamızda, *Leishmania tropica* suşu (MHOM/TR/2012/CBCL-LT) kullanıldı. Düz tabanlı 96'lık plaklarda, tüm kuyucuklara 100 µL RPMI-1640 ve ilk kuyucuklara 100 µg/mL uçucu yağlar eklenerek, seri dilüsyonları yapıldı. Ardından tüm kuyucuklara *Leishmania tropica* promastigot süspansiyonundan pipetlendi ve inkübe edildi. Hemositometre yöntemiyle promastigotların sayısı incelendi.

Bulgular: OD yağının minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK)=0,2 µg/mL'de tüm promastigotları öldürürken, en düşük konsantrasyonlarda bile etkili olduğu görülmüştür. SF ve LN uçucu yağlarının ikisinde de MİK=1,56 µg/mL, LD₅₀=0,78 µg/mL olarak saptanmıştır. SF'nin en düşük konsantrasyonlarının bile promastigot morfolojisini bozduğu görülürken, *Laurus nobilis*'in ise 0,2 µg/mL'den sonraki konsantrasyonlarda etkisini kaybettiği belirlenmiştir. OM uçucu yağının MİK=3,13 µg/mL, LD₅₀=1,56 µg/mL olduğu görülmüştür.

Sonuç: Kullanılan tüm uçucu yağların *Leishmania tropica* promastigotlarını inhibe ettiği görülürken, en yüksek anti-leishmanial etkinlik *Origanum dubium* uçucu yağında bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Leishmaniasis, anti-leishmanial etkinlik, *in vitro*, uçucu yağ, Kuzey Kıbrıs

ABSTRACT

Objective: Natural plant products are considered as a source of novel and effective compounds for the treatment of leishmaniasis. In this study, the *in vitro* activities of essential oils obtained from *Origanum dubium* (OD), *Origanum majorana* (OM), *Salvia fruticosa* (SF) and *Laurus nobilis* (LN) plants in Northern Cyprus were investigated against *Leishmania tropica*.

Methods: *Leishmania tropica* strain (MHOM/TR/2012/CBCL-LT) was obtained. RPMI-1640 was added to 96-well plates in 100 µL aliquots, 100 µg/mL essential oil was added to the first well of each row and serial 2-fold dilutions were performed. A promastigote suspension was pipetted into all wells, and the plates were incubated. The promastigotes were enumerated using a haemocytometer.

Results: OD essential oil was effective at killing all promastigotes at a minimum inhibitor height (MIC)=0.2 µg/mL and had high activity at the lowest concentrations. Both SF and LN oils had MIC=1.56 µg/mL and LD₅₀=0.78 µg/mL. SF was observed to impair promastigote morphology at the lowest concentrations, while LN did not exert any effect at concentrations <0.2 µg/mL. OM essential oil was found to have a MIC=3.13 µg/mL and a LD₅₀=1.56 µg/mL.



Geliş Tarihi/Received: 06.06.2020 Kabul Tarihi/Accepted: 30.01.2021

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Emrah Güler, Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı; Yakın Doğu Üniversitesi, DESAM Enstitüsü, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

Tel/Phone: +90 392 675 10 00 **E-Posta/E-mail:** emrah.guler@neu.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0002-1635-0051

Conclusion: All tested essential oils inhibited promastigotes of *Leishmania tropica*. OD essential oil demonstrated the highest anti-leishmanial activity.

Keywords: Leishmaniasis, anti-leishmanial activity, *in vitro*, essential oil, Northern Cyprus

GİRİŞ

Leishmaniasis, insan ve hayvan sağlığı için önemli olan, *Leishmania* türü parazitlerin neden olduğu zoonotik karakterli bir enfeksiyon hastalığıdır (1). *Leishmania* türleri, *Leishmania* paraziti ile enfekte hayvan veya insandan kan emerek enfekte olmuş yaklaşık 2-3 mm uzunluğundaki dişi tatarcık (yakarca, kum sineği) (aile: *Phlebotominae*) sineğinin insanı ısırmasıyla bulaşmaktadır (2,3). Hastalık, genellikle malnütrisyon, kötü yaşam koşulları ve sosyo-ekonomik düzeyi düşük olan bölgelerde görülmektedir. Ayrıca göç, enfeksiyonun endemik olduğu bölgelerde iş alanlarının açılması, ormanların tahribi, barajların inşası, sulama düzenlemeleri ve kentleşme gibi çevresel faktörler leishmaniasisin görülme sıklığını etkilemektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre her yıl yaklaşık 700,000-1 milyon yeni olgu görülmekte ve bu hastaların 26,000-65,000'i hayatını kaybetmektedir (4,5). Hastalık, ülkemiz ve Türkiye'nin içinde bulunduğu Akdeniz havzası, Ortadoğu, Hindistan ve Güney Amerika ülkelerinde önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir (6). DSÖ'ye göre leishmaniasis, en önemli yedi tropikal hastalıklardan biri sayılmakta ve dünya üzerinde yaklaşık 98 ülkede endemik olarak görülmektedir. *Leishmania* türüne ve konağın immün sistemine bağlı olarak enfeksiyon kutanöz leishmaniasis (KL), mukokutanöz leishmaniasis ve tedavi edilmediğinde ölümcül olabilen visseral leishmaniasis (VL) (kala azar) olmak üzere üç farklı tipte izlenmektedir (7,8). KL, başta Güneydoğu Anadolu Bölgesi olmak üzere, Akdeniz, Orta Anadolu ve Ege Bölgeleri'nde sporadik olgular şeklinde görülmektedir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda 2005-2012 yılları arasında 14.587 KL olgusu bildirilmiş olup, bu olguların genelinden *Leishmania tropica*'nın sorumlu tutulduğu bildirilmektedir (5).

Kıbrıs Adası, leishmaniasisin endemik olarak görüldüğü Doğu Akdeniz havzasında yer almaktadır. Leishmaniasis vektörü *Phlebotomus* türü sineklerin adada var olduğu ve kanın leishmaniasise neden oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bunun yanında Kıbrıs'taki insan enfeksiyonları 1935 yılından beri bildirilmektedir (9). Güney Kıbrıs'ta 2006 yılında yapılan bir çalışmada 3 KL ve 2 VL olmak üzere toplam 5 insan leishmaniasis olgusu rapor edilmiş ve bu olguların hepsinin *Leishmania donovani* MON-37 ile enfekte olduğu tespit edilmiştir (10). Yine 2014 yılında, Güney Kıbrıs'ın Baf şehrinde yaşayan bir ailenin dört üyesine (1 çocuk, 3 yetişkin) KL tanısı konmuş ve bu hastalardan *Leishmania donovani* izole edilmiştir (11). Tüm bunların yanında, 2016 yılında yayınlanan bir çalışmada, Kuzey Kıbrıs'ın Lefkoşa şehrindeki devlet hastanesinde Ocak 2011-Aralık 2012 yılları arasında 3 VL (1 erkek, 2 kadın) olgusu bildirilmiştir. Olguların hepsinin de *Leishmania infantum* ile enfekte olduğu belirlenmiştir (12). Ruh ve ark.'nın (9), Kuzey Kıbrıs'ın Girne Bölgesi'nde 249 kişiyi inceledikleri çalışmalarında yalnızca 3 (%1,2) kişinin direkt aglütinasyon testi (DAT) ve/veya rK39 açısından seropozitif olduğu bulunmuştur.

Anti-leishmanial ilaçlardan uzun yıllardır en sık kullanılan beş değerli antimon bileşikler, maalesef düşük koruyuculuk ve toksik özellik taşımaktadır. Bu bileşiklerden sodyum stiboglukonat

(SAG) ve meglumin antimonat, leishmaniasis tedavisinde ilk tercih edilen ilaçlardır. Son zamanlarda SAG'ye direnç artmış, hatta Hindistan'ın bazı bölgelerinde SAG direnci epidemik hale gelmiştir. Tedavide kullanılacak diğer ilaçlar pentamidin ve amfoterisin B'dir. Fakat bu ilaçların yüksek oranda toksik ve pahalı olmasından dolayı kullanımları sınırlıdır. Son yıllarda, insan VL tedavisinde miltefosin ve KL tedavisinde ise flukonazol oral yolla uygulamalara girmiş ve etkili bulunmuştur (13,14). Tüm bu ilaçların çoğunun nefrotoksik, hepatotoksik ve teratojenik etkiler başta olmak üzere ciddi yan etkileri bulunmaktadır (6).

Ticari satılan anti-leishmanial ilaçlara ulaşamayan birçok bölgede, tedavide tıbbi bitkilerden yararlanılmaktadır. Kimyasal özellikleri ve biyoaktivite çeşitliliklerinden dolayı bitkilerin farmasötik ürünlerin eldesinde kullanıldığı bilinmektedir (15). Günümüzde bitki ekstreleri ve uçucu yağlarının yeni tıbbi ajanlara kaynaklık edebileceği düşünülmektedir. Leishmaniasis tedavisinde de acil olarak doğal ürünlerin taranması ve kullanıma girmesi önemli sayılmaktadır. Ayrıca, yapılan araştırmalar göstermiştir ki, bitkilerden elde edilen doğal ürünler leishmaniasis tedavisi için yeni ve etkili bileşiklerin üretilmesine öncülük etmektedir (16). Bitkilerden damıtma yoluyla elde edilen uçucu yağlar kompleks yapıda hidrofobik sıvılardır ve bitkilerin uçucu aromatik bileşenlerini barındırırlar. Bu uçucu yağların doğal tedavi ürünleri olarak kullanıldığı asırlardır bilinmektedir. Birçok biyolojik aktif madde içeren bu yağlar, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiprotozoal ve antioksidan özellik taşımaktadır. Bu sebeplerden dolayı, bitkisel uçucu yağların kimyasal biyositlere alternatif olabileceği düşünülmektedir (14). Tüm dünyada konuyla ilgili araştırmalar yapılmakta ve başarılı sonuçlar elde edilmektedir (17).

Çalışmamızda, ülkemizde yetişen ve anti-leishmanial etkinliği olabileceği düşünülen *Origanum dubium* (OD), *Origanum majorana* (OM), *Salvia fruticosa* (SF) ve *Laurus nobilis* (LN) bitkilerinden elde edilen uçucu yağlar *in vitro* ortamda incelenmiştir. Amacımız, bitkisel uçucu yağların *Leishmania tropica* (*L. tropica*) promastigotlarına karşı etkinliğinin araştırılmasıdır.

YÖNTEMLER

Bitkilerin Toplanması ve Kurutulması

Kullanılan tüm bitkiler, üniversitemiz eczacılık fakültesi, farmasötik botanik-farmakognozi anabilim dalı tarafından Kuzey Kıbrıs'ın çeşitli bölgelerinden toplandı (Tablo 1), tür tanımlaması yapıldı ve Yakın Doğu Üniversitesi (YDÜ) Herbaryum Merkezi'nde (OM no: NEUN 6895, OD no: NEUN 6896, SF no: NEUN 6897, LN no: NEUN 6898) saklandı. Karanlık ortamda kurutulmuş bitkiler, yağ verimini artırmak amacıyla steril makas ile küçük parçalara bölündü. Kuru materyaller cleverger apareyi kullanılarak distilasyona tabii tutuldu ve üç saatlik distilasyon sonrasında bitkilere ait uçucu yağlar elde edildi. Daha sonra kuru baz üzerinden verim hesabı yapıp piknometre yardımıyla yağların özkütleri hesaplandı. Tüm uçucu yağlar +4 °C'de, kullanılacağı zamana kadar muhafaza edildi.

Tablo 1. Kullanılan bitkilere ait bilgiler

Adı	Türkçe adı	Toplanan kısım	Toplanan bölge
<i>Origanum majorana</i> L. var. <i>tenuifolium</i> Weston*	Mercan köşk	Toprak üstü kısımları	St. Hilarion Kalesi/Girne
<i>Origanum dubium</i> Boiss.	Kekik	Toprak üstü kısımları	Yeşilirmak/Lefke
<i>Salvia fruticosa</i> Mill.	Adaçayı	Toprak üstü kısımları	Zeytinlik/Girne
<i>Laurus nobilis</i> L.	Defne	Yaprak	Bostancı/Güzelyurt

*Endemik tür

Uçucu Yağların Analizleri

Gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi analizleri (GC-MS) Agilent 5975 GC-MSD sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Innovaks FSC kolonunda (60 m x 0,25 m film kalınlığı) taşıyıcı gaz olarak helyum gazı (0,8 mL/dak) kullanıldı. Gaz kromatografisinde fırın sıcaklığı, 10 dakika boyunca 60 °C'de tutuldu ve her dakikada 1 °C artacak şekilde 220 °C'ye programlandı. Bölünme oranı 40:1 ve enjektör sıcaklığı 250 °C olarak ayarlandı. Kütle aralığı m/z 35 ile 450 idi ve kütle spektrumları 70 eV'de kaydedildi.

Gaz kromatografi analizi, agilent 6890N GC sistemi kullanılarak yapıldı. Alev iyonizasyon dedektörünün (FID) sıcaklığı 300 °C olarak ayarlandı. Gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi ile aynı elüsyon sırasını elde etmek için, aynı kolonun bir kopyasına aynı koşullarda eş zamanlı olarak otomatik enjeksiyon yapıldı. Ayrılan bileşiklerin yüzdesi FID kromatogramlarından hesaplandı. Ayrılan maddelerin teşhisinde "Başer Uçucu Yağ Bileşikleri Kütüphanesi" kullanıldı.

Sitotoksikite Analizleri

Elde edilen uçucu yağların sitotoksik aktivitelerini saptamak için L929 fare fibroblast hücre hattı (Amerikan Type Culture Collection, ABD) kullanıldı. L929 hücreleri DMEM (BI, 01-050-1A) besiyerinde %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS) (Capricorn Scientific, FBS-11B), %1 penisilin-streptomisin (Biochrom, A2213) ve %1 glutamin (EMD Millipore, K0282) eklenerek 37 °C'de, %5 CO₂'li ortamda çoğaltılmıştır. Besiyerinde çoğaltılan hücreler ile uçucu yağlar muamele edildi ve MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromit] kiti (Glenham Code, GT3156) kullanılarak sitotoksik aktiviteleri belirlendi.

MTT, canlı hücreler tarafından indirgenen mor formazan bir ürün olan 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolyum bromitin redüksiyonunun kolorimetrik ölçümüne dayanır. OD, OM, SF ve LN uçucu yağları, dimetilsülfoksit (DMSO, Sigma-Aldrich) kullanılarak 100 mg/mL olacak şekilde hazırlandı ve beş farklı (5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL) konsantrasyondaki kültür ortamında seyreltildi. L929 fare fibroblast hücreleri, 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucukta 100 µL (5x10³/mL hücre yoğunluğu) gelecek şekilde ekildi. Kör, hücre ve ekstrakt içermemekte iken negatif kontrolde sadece ekilmiş hücreler bulunmaktaydı. OD, OM, SF ve LN dilüsyonları üç kez tekrarlandı ve hücre hattı içerisinde 24-48 saat inkübasyonda bırakıldı. Ardından MTT çözeltisi 37 °C'ye ısıtıldı ve daha sonra her bir kuyucuğa 10 µL gelecek şekilde eklendi. Dört saat 37 °C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübe edildikten sonra,

formazan tuzlarını çözmek için 50 µL DMSO eklendi. Absorbans, spektrofotometre (Versa Max, Molecular Device, Sunnyvale, ABD) ile 540 nm'de ölçüldü. Tüm deneyler her ekstrakt için 3 kez tekrarlanarak gerçekleştirildi.

Leishmania tropica Suşu

Çalışmamızda, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazit Bankası'nda sıvı azotta muhafaza edilen MHOM/TR/2012/CBCL-LT kodlu *Leishmania tropica* suşu kullanıldı.

L. tropica Kültürü

Çalışmamızda kullanılmak üzere sıvı azot tankından çıkartılan *L. tropica* promastigotları 37 °C'lik sıcak su banyosunda 2 dakika çözüldükten sonra NNN besiyerine ekimi gerçekleştirildi. Fazla miktarda promastigot elde etmek amacıyla yine RPMI-1640 (%10 FBS + %1 penisilin/streptomisin + %1 gentamisin) hazırlandı ve 25 mL'lik flasklara 5 mL olacak şekilde dağıtıldı. Besiyerinde üreyen promastigot süspansiyonundan 50 µL çekilerek, 5 mL RPMI-1640 bulunan flasklar içerisine eklendi. Ekim yapılan flasklar 25 °C'de inkübe edildi ve her üç günde bir flasklar içerisine yeni besiyeri eklendi. Son aşamada üreyen promastigotlar Thoma lamında sayılarak 1x10⁶ promastigot/mL olacak şekilde promastigot süspansiyonu hazırlandı.

In vitro Anti-leishmanial Çalışma

Etken maddeler 250 µL'ye 750 µL %10'luk DMSO (250 µg/mL) ile seyreltildi. Çalışmamızda düz tabanlı 96'lık hücre kültürü plakları yatay olarak kullanıldı. İlk aşamada %10 FBS içeren RPMI-1,640 besiyerinden (Biological Industries, Israel) (%1 penisilin/streptomisin + %1 gentamisin) 100 µL tüm kuyucuklara aktarıldı. OD, OM, SF ve LN etken maddelerle hazırlanan süspansiyonlardan 100 µL (100 µg/mL) alınarak ilk kuyucuklara eklendi ve son kuyucuğa kadar seri dilüsyonları yapıldı. İlaç kontrol için 300 µg/mL SAG'den (Pentostam, İngiltere) 100 µL aktarıldı ve yine seri dilüsyon yapıldı. Daha sonra pozitif kontrol, ilaç kontrol ve etken maddelerin olduğu (negatif kontrol kuyucukları hariç) tüm kuyucuklara 1x10⁶ promastigot/mL *L. tropica* promastigot süspansiyonundan 100 µL eklendi. Son olarak, hücre kültürü plağının kapağı katılarak, parafilmle sarıldı ve 25 °C'de 48 saat boyunca etüvde inkübe edildi. Tüm etken maddeler, ilaç kontrol ve pozitif kontroller triplike olacak şekilde çalışıldı. *L. tropica* promastigotlarının tümünün hareketsiz olduğu en düşük konsantrasyon, minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), parazitin yarısının hareketsiz olarak görüldüğü konsantrasyon ise letal doz (LD₅₀) olarak belirlendi. Hareket görülmeyen kuyucuklardan NNN besiyerlerine ekim yapıldı ve besiyerleri 25 °C'de 48 saat boyunca etüvde inkübe edildi (5,14).

Hemositometre Yöntemi

Hemositometre yöntemiyle Thoma lamı kullanılarak 48 saat sonraki promastigotların sayısı değerlendirildi. Etüvden çıkartılan plakların her bir kuyucuğundan ayrı ayrı örnek alınarak Thoma lamında 40x objektifte incelendi. Toplam promastigot sayısı 10.000 ile çarpılıp sayılan kareye bölünerek mL'deki promastigot miktarı bulundu (5).

İstatistiksel Analiz

Verilerin tüm istatistiksel analizlerinde SPSS (Statistical Package of the Social Sciences) Demo Ver 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) programı kullanıldı. İlk olarak her gruba dahil verilerin normal dağılıma uyup uymadıklarını belirlemek amacıyla "Shapiro-Wilk"

testi uygulandı. Bu teste göre eğer veriler normal dağılıma uyuyorsa $p > 0,05$, uymuyorsa $p < 0,05$ olmalıdır. Yüzde (%) *Leishmania tropica* promastigot canlılığının gruplara göre ortalamaları arası farkın önem kontrolüne “Kruskal-Wallis Varyans Analizi verilerimiz norma dağılıma uymadığından dolayı” ile bakıldı.

Etik kurul onayı: Yakın Doğu Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından düzenlenen 23 Nisan 2020 tarihli toplantısında 2020/78-1032 proje numarası ile etik kurul onayı alındı. Araştırmamızda, *in vitro* ortamda parazit hücreleri ile çalışıldığından dolayı hasta onam formuna gerek duyulmadı.

BULGULAR

Uçucu Yağlar

Çalışmamızda kullanılan uçucu yağların içeriğinde bulunan majör bileşikler Tablo 2’de verilmektedir.

Sitotoksikite Test Sonuçları

L929 fare fibroblast hattı hücre kültüründe, farklı konsantrasyonlardaki OD, OM, SF ve LN uçucu yağları ile 24 ve 48 saatlik sürelerde inkübe edilmiştir. Bu konsantrasyonlar sırası ile 5, 10, 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ ’dir. MTT sonuçlarına göre genel olarak, L929 fare fibroblast hücrelerinde yağ konsantrasyonlarının dozu yükseldikçe doza bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı görülmüştür. OD yağı ile 24 ve 48 saat inkübe edilmiş L929 fare fibroblast hücrelerinde hücre canlılığının özellikle yüksek dozlarda (25-100 $\mu\text{g/mL}$) çok az olduğu belirlenmiştir. Bunlara ek olarak, OM uçucu yağı ile inkübe edilen L929 fare fibroblast hücrelerinde özellikle 100 $\mu\text{g/mL}$ dozunda 48 saat inkübasyon sonunda fare fibroblast hücrelerinin yaklaşık yarısının (%50) canlılığını kaybettiği görülmüş, düşük dozlarda ise hücre canlılığı stabil kalmıştır. Hücre kültüründe, SF uçucu yağının fare fibroblast hücre canlılığına olumsuz etki göstermediği tespit edilmiştir. LN uçucu yağının ise tüm dozlardaki 24 saatlik inkübasyonlarında fare fibroblast hücre canlılıklarında anlamlı bir azalma izlenmezken, 48 saat inkübasyon sonunda hücre canlılığı yaklaşık %50 azalmıştır. Tüm bitki yağlarının sitotoksik aktivite sonuçları Grafik 1’de (A-D) görülmektedir.

In vitro Test Sonuçları

Kullanılan etken maddelerin *L. tropica* üzerine *in vitro* etkinliği Tablo 3’te gösterilmiştir.

Çalışmamızda, ilaç kontrol grubunda herhangi bir canlı promastigota rastlanmazken, pozitif kontrol grubunda ise promastigotların yaşamlarını devam ettirdiği görülmüştür. Tüm uçucu yağların *L. tropica* promastigotları üzerinde farklı konsantrasyonlarda etkili oldukları görülmüştür. OD yağı 0,2 $\mu\text{g/mL}$ ’de tüm parazitleri öldürürken (MİK), daha düşük konsantrasyonlarda parazitin etkilendiği fakat canlılığını yüksek

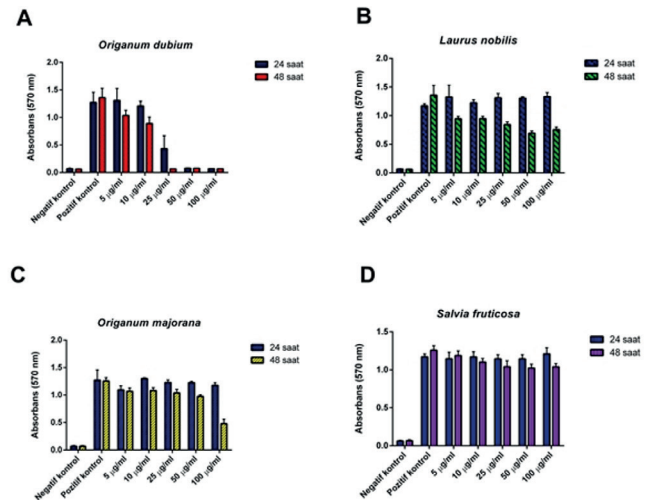
düzeyde koruduğu tespit edilmiştir. SF ve LN uçucu yağlarının her ikisinde de MİK=1,56 $\mu\text{g/mL}$, LD₅₀ konsantrasyonu ise 0,78 $\mu\text{g/mL}$ olarak saptanmıştır. SF’nin en düşük konsantrasyonlarının bile promastigot morfolojisini bozduğu görülürken, LN’nin ise 0,2 $\mu\text{g/mL}$ ’den sonraki konsantrasyonlarda etkisini kaybettiği belirlenmiştir. OM’den elde edilen uçucu yağın MİK konsantrasyonunun 3,13 $\mu\text{g/mL}$, LD₅₀ konsantrasyonunun ise 1,56 $\mu\text{g/mL}$ olduğu görülmüştür. Bunun yanında, OM’nin son olarak 0,1 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda promastigotlar üzerine etkili olduğu fakat öldüremediği görülmüştür (Grafik 2). Hareket görülmeyen kuyulardan NNN besiyerine yapılan ekimlerin hiç birinde üreme görülmemiştir.

İstatistiksel Sonuçlar

Çalışmamızdaki veriler normal dağılıma uymadıklarından dolayı (Shapiro-Wilk testine göre) ($p < 0,05$) verilere ilişkin aritmetik ortalama, standart sapma ve standart hata gibi tanımlayıcı ölçüler verilemez. Bunların yerine; minimum değer, maksimum değer, medyan (ortanca) değeri ve çeyrekler arası yüzde=çeyrekler arası aralık [(Q3 (3. çeyrek)-Q1 (1. çeyrek)] değerleri verilmiştir. *Leishmania tropica* promastigotlarının canlılık % ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,0001$) (Tablo 4).

TARTIŞMA

Leishmaniasis, tüm dünya genelinde görülen en önemli parazitik enfeksiyonlardan biridir. Endemik bölgelerde görülen ilaç direncinin önüne geçmek adına, bitkisel ürünlerin kullanımı gibi farklı stratejiler geliştirilmelidir. Son yıllarda yapılan *in vitro*

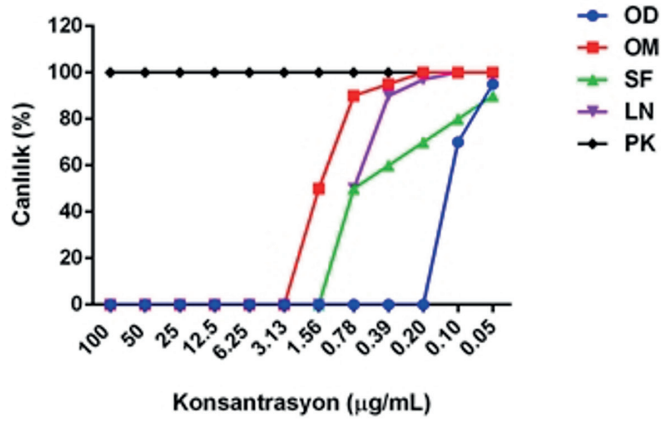


Grafik 1. Uçucu yağların MTT sonuçları
MTT: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromit]

Tablo 2. Uçucu yağların içeriğinde bulunan majör bileşikler

OD	%	OM	%	SF	%	LN	%
Karvakrol	81,8	cis-Sabinen hidrat	29,1	1,8-sineol	43,9	1,8-sineol	57,2
p-Simen	5,0	Terpinen-4-ol	19,6	Kamfor (kafur)	14,0	α-Terpinil asetat	9,4
Myrcene	1,9	γ-Terpinen	9,5	Kamfen	8,8	Sabinen	6,7
Terpinen-4-ol	0,8	α-Terpineol	5,8	α-Pinen	6,6	Terpinen-4-ol	4,3
α-Terpineol	0,8	α-Terpinen	5,7	β-Pinen	5,8	α-Pinen	4,1

OD: *Origanum dubium*, OM: *Origanum majorana*, SF: *Salvia fruticosa*, LN: *Laurus nobilis*



Grafik 2. *L. tropica* promastigotlarının farklı konsantrasyonlardaki canlılık % dağılımı

ve *in vivo* çalışmalar gösteriyor ki, bitki ekstraktlarının *Leishmania* türleri üzerine yüksek düzeyde etkisi bulunmaktadır (16). Sağlık sorunlarının ve hastalıkların tedavisinde insanların birkaç bin yıldır tıbbi özellikteki bitkileri kullandığı bilinmektedir. Günümüzde halen parazitik enfeksiyonların tedavisinde bitkisel ürünler veya onlardan elde edilen ikincil metabolitler sıklıkla kullanılmaktadır. Uzun yıllardır uygulamada bulunan sentetik ilaçlara karşı bazı parazit türlerinin geliştirdikleri direnç günümüzün önemli bir problemidir (18). Kullanımda olan ticari anti-leishmanial ilaçların yeterince efektif olmamaları, toksik etkilerinin bulunmaları ve çok pahalı olmalarından dolayı endemik bölgelerde ilaçlara ulaşamamaktadır. Dolayısıyla, geleneksel tıbbi bitkilere yönelim artmaktadır (19,20). Bu bağlamda, Kuzey Kıbrıs Bölgesi'nde yetişen bazı bitkilerden elde edilen uçucu yağların anti-leishmanial etkinlikleri incelemeye alınmıştır.

Çalışmamızda, OD türü kekik yağının *Leishmania tropica* üzerine

en etkili uçucu yağ olduğu görülmüştür. Özellikle çok düşük konsantrasyonlarda bile (MİK=0,2 µg/mL) promastigotların tümünü öldürdüğü tespit edilmiştir. Buna rağmen, 10 µg/mL'nin üzerindeki konsantrasyonların toksik özellik gösterebileceği saptanmıştır. OD yağının majör bileşeninin %81,8 oranında karvakrol olduğu, anti-leishmanial etkinin de bu bileşikten kaynaklandığını düşünmekteyiz. Tasdemir ve ark.'nın (21) diğer bir kekik türü olan *Origanum onites*'in antiprotozoal etkinliğini inceledikleri çalışmalarında, uçucu yağın *Leishmania donovani* amastigotları üzerine kısmen etkili olduğu bildirilmektedir. Aynı çalışmada, ilgili yağın ana bileşeninin %70,6 oranında karvakrol olduğu belirlenmiştir. Bizim çalışmamızın aksine, Tasdemir ve ark. (21), *Origanum onites* uçucu yağının memeli hücrelerine toksik etki göstermediğini vurgulamıştır. On dokuz farklı uçucu yağın incelendiği bir çalışmada, *Origanum virens* (karvakrol oranı %68,2) yağının düşük de olsa *Leishmania infantum* promastigotları üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir (22). Bunların yanında Brezilya'da, ana bileşeni %33,9 cis-p-Menth-2-en-1-ol olan *Origanum vulgare* uçucu yağının *Leishmania amazonensis* promastigotları üzerine etkisiz olduğu vurgulanmıştır (23). Silva ve ark.'nın (24) araştırmasında, karvakrol bileşiğinin, çalışmada kullanılan 10 farklı doğal madde arasında en yüksek anti-leishmanial etkiye sahip olduğu (IC₅₀=25,4 µg/mL⁻¹) görülmüş, L929 fibroblast hücrelerine orta düzeyde toksik olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan diğer bir *Origanum* türü olan OM var. tenuifolium'un MİK=3,13 µg/mL, LD50=1,56 µg/mL konsantrasyonlarında *L. tropica* promastigotlarına etkili olduğu görülmüştür. Sonuçlara göre OM'nin çalışmamızda kullanılan uçucu yağlar içinde en az anti-leishmanial etkisi bulunan yağ olduğu belirlenmiştir. Bu türün ana bileşeni cis-sabinen hidrat (%29,1) ve terpinen-4-ol (%19,6) olarak tespit edilmiş olup, tenuifolium varyetesi Kıbrıs adası için endemik takson olarak

Tablo 3. Etkin maddelerin *L. tropica* üzerine *in vitro* etkinlikleri

	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	12,5 µg/mL	6,25 µg/mL	3,13 µg/mL	1,56 µg/mL	0,78 µg/mL	0,39 µg/mL	0,2 µg/mL	0,1 µg/mL	0,05 µg/mL
İK	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C
OD	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%70 C, V, MB	%95 C, V, MB
SF	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%50 C, MB, V	%60 C, MB, V	%70 C, MB, V	%80 C, MB, V	%90 C, MB, V
OM	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%50 C, MB, V	%90 C, MB, V	%95 C, MB, V	%100 C, MB	%100 C, MD	%100 C, MD
LN	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%0 C	%50 C, MB, V	%90 C, MB, V	%97 C, MB, V	%100 C, MB	%100 C, MD

İK: İlaç kontrol, OD: *Origanum dubium*, SF: *Salvia fruticosa*, OM: *Origanum majorana*, LN: *Laurus nobilis*, MB: Morfoloji bozuk, MD: Morfoloji düzgün, C: Canlı, V: Vakuol

Tablo 4. Kruskal-Wallis Varyans Analizi ile % promastigot canlılığının gruplara göre önemi

	Grup	n	Medyan	Minimum	Maksimum	ÇAY	X ²	p
<i>Leishmania tropica</i> promastigot canlılığı (%)	OD	12	0	0	95	0	29,00	<0,0001*
	SF	12	0	0	90	67		
	OM	12	25	0	100	98		
	LN	12	0	0	100	95		
	PK	12	100	100	100	-		

*İstatistiksel açıdan önemli, OD: *Origanum dubium*, SF: *Salvia fruticosa*, OM: *Origanum majorana*, LN: *Laurus nobilis*, ÇAY: Çeyrekler arası yüzde, PK: Pozitif kontrol

kabul edilmektedir. Bizim çalışmamızın aksine, *Leishmania amazonensis*'e karşı 52 farklı uçucu yağın incelendiği Monzote ve ark.'nın (25) çalışmasında, OM türünün anti-leishmanial etkinliğinin olmadığı görülmüştür. Hamarsheh ve ark.'nın (26) Filistin'de yetişen bitkiler üzerinde yaptıkları araştırmasında OM'nin *Leishmania major* promastigotları üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı rapor edilmiştir.

Türkçede adaçayı olarak bilinen, genelde hoş kokulu bitkilerin yer aldığı *Salvia* türleri uçucu ve aromatik yağ içermelerinden dolayı farmakoloji ve parfümeri sanayide önemli sayılmaktadır (27). Yapılan çalışmalarda SF uçucu yağında predominant bileşenin 1,8-sineol (%52,8) olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında kamfor (kafur) (%5,8), alfa-pinen (%5,8), beta-pinen (%4,5), mirsen (%3,8) ve kamfen (%3,1) bileşenleri olmak üzere %1'in üzerinde toplam 15 bileşik belirlenmiştir. İçerisindeki 1,8-sineol, kamfor, alfa-pinen, beta-pinen ve kamfen bileşenlerinin tıbbi açıdan önemli olduğu kanıtlanmıştır (28,29). Protozoal parazitlerin neden olduğu enfeksiyon hastalıklarından *Plasmodium* spp. etkenli sıtma, *Leishmania* spp. etkenli leishmaniasis ve *Trypanosoma* spp. etkenli Chagas ve uyku hastalıklarına bazı *Salvia* türlerinin etkili olabileceği düşünülmektedir (30). İran'da geleneksel tıpta *Salvia* türlerinin çiçeklerinden elde edilen ekstrelerin leishmaniasis tedavisinde kullanıldığı rapor edilmiştir (31). Essid ve ark.'nın (32) çalışmasında, *Salvia officinalis* türünün *Leishmania infantum* ($IC_{50}=2,67\pm 0,33 \mu\text{g/mL}$) ve *Leishmania major*'a ($IC_{50}=3,40\pm 0,16 \mu\text{g/mL}$) karşı iyi bir aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan türün majör maddeleri kamfor (%25,13±0,21), α -tuyon (%21,47±1,52) ve 1,8-sineol (%16,43±0,24) olarak belirlenmiştir (32). Nikmehr ve ark.'nın (33) çalışmasında ise *Salvia officinalis* yapraklarından elde edilen ekstrelerin *Leishmania major* amastigot ve promastigotlarını inhibe ettiği tespit edilmiştir (33). Khan ve Khan (34) *Salvia bucharica* yapraklarının metanollü ekstresinin anti-leishmanial aktivitesinin ($IC_{50}=7,231 \mu\text{g/mL}$) olduğunu saptamıştır. Bizim çalışmamızda SF bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın $MİK=1,56 \mu\text{g/mL}$, $LD_{50}=0,78 \mu\text{g/mL}$ değerlerinde *Leishmania tropica* promastigotlarını inhibe ettiği görülmüştür.

LN'nin (defne) esas yayılış alanı Akdeniz havzası ve Anadolu'dur. Bu bölgeler dışında Avrupa ve Amerika kıtalarında defne bitkisi yetiştiriciliği yapılmaktadır. Başta Türkiye olmak üzere tüm Batı Akdeniz havzasında yetişen defne uçucu yağında majör bileşik olarak 1,8-sineol bulunmaktadır. Karık ve ark.'nın (35) çalışmasında, Türkiye'nin Akdeniz, Ege, Marmara ve Karadeniz Bölgeleri'nden toplanan 100 farklı defne bitkisinden elde edilen uçucu yağda %31,9-67,6 oranında 1,8-sineol tespit edilmiştir (36). Ayrıca Kuzey Kıbrıs defne ağacının uçucu yağında majör bileşik olarak %58,6 oranında 1,8 sineol bulunmuştur (37). LN'nin toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağın *Leishmania infantum* promastigotları üzerine orta düzeyde etkili olduğu ($IC_{50}=13,24\pm 0,70 \mu\text{g/mL}$) bildirilmektedir (38). Tunus'un kuzey kesiminde yetişen 12 bitkiden çıkartılan uçucu yağlarda *Leishmania infantum* ve *Leishmania major* promastigotlarına karşı farklı derecelerde etkinlik bulunmuştur. Aynı çalışmada, LN'nin düşük düzeyde antileishmanyal etkinliğe sahip olduğu ileri sürülmektedir (32). Çalışmamızda kullandığımız LN yapraklarından elde edilen uçucu yağın anti-leishmanial etkiye sahip olduğu ($MİK=1,56 \mu\text{g/mL}$, $LD_{50}: 0,78 \mu\text{g/mL}$) anlaşılmaktadır.

Çalışmamız, Kuzey Kıbrıs'ta yetişen dört farklı bitkiden elde edilen uçucu yağların KL etkeni *Leishmania tropica* promastigotları üzerindeki etkinliklerinin ilk kez araştırıldığı bir pilot çalışma özelliği taşımaktadır. Tüm yağların promastigot üremesini inhibe ettiği görülürken, OD'nin en etkin uçucu yağa sahip olduğu tespit edilmiştir. Buna rağmen, OD yağının yüksek konsantrasyonlarda memeli fibroblast hücrelerine toksik etki yaratabileceği saptanmıştır. SF ve LN uçucu yağlarının aynı oranda anti-leishmanial aktivite gösterdiği görülürken, bu yağların toksik özellikte olmadığı belirlenmiştir. OM uçucu yağının ise en düşük etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Sonuç olarak, çalışmada kullanılan tüm yağların yeni, doğal ve güvenilir anti-leishmanial ilaç potansiyellerine sahip olduğunu ve özellikle hayvan deneyleri gibi ileri çalışmalarla sonuçların desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızda, *Leishmania tropica* suşunun teminindeki yardımlarından dolayı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Parazit Bankası'na, biyokimyasal testlerin çalışılmasında Doç. Dr. Eda Becer'e ve bitki uçucu yağlarının elde edilmesindeki yardımlarından dolayı Dr. Azmi Hanoğlu'na teşekkür ederiz.

* Etik

Etik Kurul Onayı: Yakın Doğu Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından düzenlenen 23 Nisan 2020 tarihli toplantısında 2020/78-1032 proje numarası ile etik kurul onayı alındı.

Hasta Onayı: Araştırmamızda, *in vitro* ortamda parazit hücreleri ile çalışıldığından dolayı hasta onam formuna gerek duyulmadı.

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulunda olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

* Yazarlık Katkıları

Cerrahi ve Medikal Uygulama: E.G., A.Ö., İ.Ç., K.H.C.B., Konsept: A.Ö., T.Ş., Dizayn: A.Ö., T.Ş., Veri Toplanma veya İşleme: E.G., A.Ö., İ.Ç., İ.E., K.H.C.B., Analiz veya Yorumlama: E.G., A.Ö., İ.Ç., B.B., İ.E., K.H.C.B., T.Ş., Literatür Araması: E.G., B.B., Yazan: E.G., B.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Çelik BA, Çelik ÖY, Şahin T. Retrospective Evaluation of Canine Leishmaniasis in Turkey. *F U Vet J Health Sci* 2019; 33: 123-30.
2. World Health Organization. Leishmaniasis. The diseases and its epidemiology. Erişim Tarihi: 08.03.2020. https://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/
3. Çetin H, Özbek Y. Sand Flies and Their Control Methods. *Türkiye Parazit Derg* 2017; 41: 102-13.
4. World Health Organization. Leishmaniasis. Erişim Tarihi: 08.03.2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
5. 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: 11-9.
6. Direkel Ş, Karaman Ü, Tezcan Ülker S, Utku S, Aslan G, Uysal M, et al. Investigation of Anti-leishmanial Activity of the Ten Different Hydrazone Derivatives. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2016; 22: 519-24.

7. Sirekbasan S, Polat E, Kutlubay Z, Engin B. A Case of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum*. Türkiye Parazit Derg 2019; 43: 41-3.
8. Harman M. Cutaneous Leishmaniasis. Turk J Dermatol 2015; 9: 168-76.
9. Ruh E, Bostanci A, Kunter V, Tosun O, Imir T, Schallig H, et al. Leishmaniasis in northern Cyprus: Human cases and their association with risk factors. J Vector Borne Dis 2017; 54: 358-65.
10. Antoniou M, Haralambous C, Mazeris A, Pratlong F, Dedet JP, Soteriadou K. *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. Lancet Infect Dis 2009; 9: 6-7.
11. Koliou MG, Antoniou Y, Antoniou M, Christodoulou V, Mazeris A, Soteriades ES. A cluster of four cases of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania donovani* in Cyprus: a case series. J Med Case Rep 2014; 8: 354.
12. Sayili A, Ozkan AT, Schallig HD. Pediatric Visceral Leishmaniasis Caused by *Leishmania infantum* in Northern Cyprus. Am J Trop Med Hyg 2016; 95: 1386-8.
13. De Queiroz AC, Dias Tde L, Da Matta CB, Cavalcante Silva LH, de Araújo-Júnior JX, de Araújo GB, et al. Antileishmanial activity of medicinal plants used in endemic areas in northeastern Brazil. Evid Based Complement Alternat Med 2014; 2014: 478290.
14. Malatyah E, Özçelik S, Gürsoy N. In vitro Antileishmanial Activity of Essential Oils Obtained from Thyme (*Thymus vulgaris*), Cummin (*Cuminum cyminum*) and Mersin (*Myrtus communis*) Plants. Turk Hij Den Biyol Derg 2009; 66: 7-13.
15. Comandolli-Wyrepkowski CD, Jensen BB, Grafova I, Santos PA, Barros AMC, Soares FV et al. Antileishmanial activity of extracts from *Libidibia ferrea*: development of *in vitro* and *in vivo* tests. Acta Amaz 2017; 47: 331-40.
16. 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. Ann Med Surg (Lond) 2017; 21: 63-80.
17. Ozbilgin A, Durmuskahya C, Kayalar H, Ertabaklar H, Gunduz C, Ostan Ural İ, et al. Antileishmanial Activity of Selected Turkish Medicinal Plants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2014; 13: 2047-55.
18. Wink M. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. Molecules 2012; 17: 12771-91.
19. Sidana A, Farooq U. Evaluation of antileishmanial activity of plants used in Indian traditional medicine. Bangladesh J Pharmacol 2015; 10: 423-6.
20. Jihene A, Rym E, Ines KJ, Majdi H, Olfat T, Abderrabba M. Antileishmanial Potential of Propolis Essential Oil and Its Synergistic Combination With Amphotericin B. Natural Product Communications 2020; 15: 1-8.
21. Tasdemir D, Kaiser M, Demirci B, Demirci F, Baser KHC. Antiprotozoal Activity of Turkish *Origanum onites* Essential Oil and Its Components. Molecules 2019; 24: 4421.
22. Machado M, Santoro G, Sousa MC, Salgueiro L, Cavalerio C. Activity of essential oils on the growth of *Leishmania infantum* promastigotes. Flavour Fragr J 2010; 25: 156-60.
23. Teles AM, Rosa TDDS, Mouchrek AN, Abreu-Silva AL, Calabrese KDS, Almeida-Souza F. *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare*, and *Curcuma longa* Essential Oils: Chemical Composition, Antimicrobial and Antileishmanial Activity. Evid Based Complement Alternat Med 2019; 2019: 2421695.
24. Silva ARST, Scher R, Santos FV, Ferreira SR, Cavalcanti SCH, Correa CB, et al. Leishmanicidal Activity and Structure-Activity Relationships of Essential Oil Constituents. Molecules 2017; 22: 815.
25. Monzote L, Herrera I, Satyal P, Setzer WN. In-Vitro Evaluation of 52 Commercially-Available Essential Oils Against *Leishmania amazonensis*. Molecules 2019; 24: 1248.
26. Hamarsheh O, Azmi K, Amro A, Schultheis M, Abdeen Z, Firdessa R et al. Antileishmanial Potential of Crude Plant Extracts Derived from Medicinal Plants in Palestine. Ann Clin Cytol Pathol 2017; 3: 1065.
27. İpek A, Gürbüz B. Türkiye Florasında Bulunan *Salvia* Türleri ve Tehlike Durumları. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi 2010; 19: 30-5.
28. Aşkun T, Başer KHC, Tümen G, Kürkçüoğlu M. Characterization of essential oils of some *Salvia* species and their antimycobacterial activities. Turk J Biol 2010; 34: 89-95.
29. Fu Z, Wang H, Hu X, Sun Z, Han C. The Pharmacological Properties of *Salvia* Essential Oils. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2013; 3: 122-7.
30. Llorba-Montesino N, Schmidt TJ. *Salvia* Species as Sources of Natural Products with Antiprotozoal Activity. Int J Mol Sci 2018; 19: 264.
31. Amin GZ. Popular Medical Plants of Iran: 1. Iranian Research Institute of Medical Plants 1991. s. 1-66.
32. Essid R, Rahali FZ, Msaada K, Sghair I, Hammami M, Bouratbine A, et al. Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medical plants in Northern Tunisia. Industrial Crops and Products 2015; 77: 795-802.
33. Nikmehr B, Ghaznavi H, Rahbar A, Sadr S, Mehrzadi S. In vitro antileishmanial activity of methanolic extracts of *Calendula officinalis* flowers, *Datura stramonium* seeds, and *Salvia officinalis* leaves. Chin J Nat Med 2014; 12: 423-7.
34. Khan AR, Khan MJ. *In vitro* Antileishmanial, Cytotoxic and Antioxidant activities of *Salvia bucharica* leaves extract and its fractions. IJBAS-IJENS 2013; 13: 74-8.
35. Kank Ü, Çiçek F, Oğur E, Tutar M, Ayas F. Essential Oil Compounds of Turkey Laurel (*Laurus nobilis* L.) Populations. ANADOLU J of AARI 2015; 25: 1-16.
36. Caputo L, Nazzaro F, Souza LF, Aliberti L, De Martino L, Fratianni F, et al. *Laurus nobilis*: Composition of Essential Oil and Its Biological Activities. Molecules 2017; 22: 930.
37. Yalçın H, Anik M, Sanda MA, Cakir A. Gas chromatography/mass spectrometry analysis of *Laurus nobilis* essential oil composition of northern Cyprus. J Med Food 2007; 10: 715-9.
38. Binh Le T, Beaufay C, Bonneau N, Mingeot-Leclercq MP, Quetin-Leclercq J. Anti-protozoal activity of essential oils and their constituents against *Leishmania*, *Plasmodium* and *Trypanosoma*. ISTE OpenScience 2018; 18: 1-33.