



**T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SÜLÜK SALGI EKSTRAKTI, PROPOLİS VE
CARVACROLÜN *BLASTOCYSTİS HOMİNİS*
ÜZERİNE İN VİTRO ORTAMDA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

GÜLŞAH ÖZKULA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KIRŞEHİR / 2026



T.C.
KIRŞEHİR AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SÜLÜK SALGI EKSTRAKTI, PROPOLİS VE
CARVACROLÜN *BLASTOCYSTIS HOMINIS*
ÜZERİNE İN VİTRO ORTAMDA ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Gülşah ÖZKULA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Muttalip ÇİÇEK**

KIRŞEHİR-HAZİRAN/2026

KABUL VE ONAY

“Sülük Salgı Ekstratı, Propolis ve Carvacrolün *B. hominis* Üzerine İn Vitro Ortamda Etkisinin Araştırılması” adlı bu çalışma 25/06/2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Muttalip ÇİÇEK (Danışman)

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Hanifi KÖRKOCA

Niğde Ömer Halis Demir Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Kenan KARADAĞLI

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Tıp Fakültesi

ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Bu çalışma Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri biriminin TIP.A4.24.006 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

GÜLŞAH ÖZKULA

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında, engin bilgi birikimi, değerli öneri ve yönlendirmeleriyle bana ışık tutan; süreç boyunca sabrını ve desteğini benden esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Muttalip ÇİÇEK'e,

Yüksek Lisans tezimin laboratuvar süreçlerinde bilgi, deneyim ve desteklerini eksik etmeyen değerli Prof. Dr. Tülin DEMİR, Dr. Öğr. Üyesi Alican BİLDEN, Uz.Dr. Rukiye AKYOL'a, Arş. Gör. Merve KAHRAMAN, Nazife GENCER'e ve laboratuvarın ekmektarları tüm çalışma arkadaşlarıma,

Yüksek Lisans tezimin istatistik süreçlerinde bilgisini ve desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Güney GÜRSOY'a,

Propolis temini konusunda bizden desteğini esirgemeyen Eğriçayır organik bal ve arı ürünleri firmasına,

Bu zorlu ve uzun yolculuğun her anında sonsuz sevgileri, saygıları, tükenmeyen hoşgörülerini ve sabırlarıyla sarmalayan; varlıklarıyla bana her zaman güç veren sevgili eşim Bahadır ÖZKULA'ya ve canım çocuklarım Burak ÖZKULA ile Gökçe ÖZKULA'ya

Sonsuz teşekkür ederim.

Haziran 2026

Gülşah ÖZKULA

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma	4
2.2. Morfolojisi	4
2.2.1. Vakuoler form	5
2.2.2. Granüler form	5
2.2.3. Ameboid form	5
2.2.4. Kist Formu	5
2.2.5. Multivakuoler Form	6
2.2.6. Avakuoler Form	6
2.3. Yaşam Döngüsü	7
2.4. Patogenezi ve Klinik Önemi	8
2.5. Tanı Yöntemleri	9
2.6. Tedavi	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM	12
3.1. Jones Medium Besi Yerinin Hazırlanması	12
3.2. <i>B. hominis</i> 'in Temini ve Ekimi	12
3.3. Carvakrolün Elde Edilmesi ve Konsantrasyonların Hazırlanması	13
3.4. Propolisin Elde Edilmesi ve Konsantrasyonların Hazırlanması	13
3.5. Sülük Salgı Ekstraktının Elde Edilmesi ve Konsantrasyonların Hazırlanması	13
3.6. Metronidazolün Elde Edilmesi ve Konsantrasyonların Hazırlanması	14

3.7. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) Test Kiti Yöntemi	14
3.8. Deneysel Çalışma ve Hücre Sayımı	15
3.9. İstatistiksel Analiz	15
4. BULGULAR	16
4.1. Mikroskopik Yöntem Bulguları	16
4.1.1. Carvacrolün Mikroskopik Yöntem Bulguları	17
4.1.2. Propolisin Mikroskopik Yöntem Bulguları	21
4.1.3. Sülük Salgı Ekstraktının Mikroskopik Yöntem Bulguları	25
4.1.4. Metronidazolün Mikroskopik Yöntem Bulguları	29
4.2. Absorbans Ölçümü ile İstatistiksel Analiz Bulguları	33
4.2.1. Carvakrolün Absorbans Ölçümü ile İstatistiksel Analiz Bulguları	31
4.2.2. Propolisin Absorbans Ölçümü ile İstatistiksel Analiz Bulguları	35
4.2.3. Sülük Salgı Ekstraktının Absorbans Ölçümü ile İstatistiksel Analiz Bulguları	36
4.2.4. Metronidazolün Absorbans Ölçümü ile İstatistiksel Analiz Bulguları	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	39
KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ	51

SEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: <i>B. hominis</i> 'in yaşam döngüsü	7
Şekil 4.1: <i>B. hominis</i> 'in 72 saatin sonunda ışık mikroskobunda görünümü	16
Şekil 4.2: <i>B. hominis</i> 'in 24 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü	17
Şekil 4.3: <i>B. hominis</i> 'in 48 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü	17
Şekil 4.4: Carvacrolün 24 saatte 18,75 µg/mL konsantrasyonda görünüm	18
Şekil 4.5: Carvacrolün 48 saatte 18,75 µg/mL konsantrasyonda görünüm	18
Şekil 4.6: Carvacrolün 24 saatte 37,5 µg/mL konsantrasyonda görünüm	18
Şekil 4.7: Carvacrolün 48 saatte 37,5 µg/mL konsantrasyonda görünüm	18
Şekil 4.8: Carvacrolün 24 saatte 75 µg/mL konsantrasyonda görünüm	19
Şekil 4.9: Carvacrolün 48 saatte 75 µg/mL konsantrasyonda görünüm	19
Şekil 4.10: Carvacrolün 24 saatte 150 µg/mL konsantrasyonda görünüm	19
Şekil 4.11: Carvacrolün 48 saatte 150 µg/mL konsantrasyonda görünüm	19
Şekil 4.12: Carvacrolün 24 saatte 300 µg/mL konsantrasyonda görünüm	20
Şekil 4.13: Carvacrolün 48 saatte 300 µg/mL konsantrasyonda görünüm	20
Şekil 4.14: Carvacrolün 24 saatte 600 µg/mL konsantrasyonda görünüm	20
Şekil 4.15: Carvacrolün 48 saatte 600 µg/mL konsantrasyonda görünüm	20
Şekil 4.16: <i>B. hominis</i> 'in 24 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü	21
Şekil 4.17: <i>B. hominis</i> 'in 48 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü	21
Şekil 4.18: Propolisin 24 saatlik 31,25 µg/mL konsantrasyonda görünümü	22
Şekil 4.19: Propolisin 48 saatlik 31,25 µg/mL konsantrasyonda görünümü	22
Şekil 4.20: Propolisin 24 saatlik 62,25 µg/mL konsantrasyonda görünümü	22
Şekil 4.21: Propolisin 48 saatlik 62,25 µg/mL konsantrasyonda görünümü	22
Şekil 4.22: Propolisin 24 saatlik 125 µg/mL konsantrasyonda görünümü	23
Şekil 4.23: Propolisin 48 saatlik 125 µg/mL konsantrasyonda görünümü	23
Şekil 4.24: Propolisin 24 saatlik 250 µg/mL konsantrasyonda görünümü	23
Şekil 4.25: Propolisin 48 saatlik 250 µg/mL konsantrasyonda görünümü	23
Şekil 4.26: Propolisin 24 saatlik 500 µg/mL konsantrasyonda görünümü	24

Şekil 4.27: Propolisin 48 saatlik 500 µg/mL konsantrasyonda görünümü	24
Şekil 4.28: Propolisin 24 saatlik 1000 µg/mL konsantrasyonda görünümü	24
Şekil 4.29: Propolisin 48 saatlik 1000 µg/mL konsantrasyonda görünümü	24
Şekil 4.30: <i>B. hominis</i> 'in 24 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü	25
Şekil 4.31: <i>B. hominis</i> 'in 48 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü	25
Şekil 4.32: Sülük Salgı Ekstraktının 24 saatlik 3,125 mg/mL konsantrasyonda görünümü	26
Şekil 4.33: Sülük Salgı Ekstraktının 48 saatlik 3,125 mg/mL konsantrasyonda görünümü	26
Şekil 4.34: Sülük Salgı Ekstraktının 24 saatlik 6,25 mg/mL konsantrasyonda görünümü	26
Şekil 4.35: Sülük Salgı Ekstraktının 48 saatlik 6,25 mg/mL konsantrasyonda görünümü	26
Şekil 4.36: Sülük Salgı Ekstraktının 24 saatlik 12,5 mg/mL konsantrasyonda görünümü	27
Şekil 4.37: Sülük Salgı Ekstraktının 48 saatlik 12,5 mg/mL konsantrasyonda görünümü	27
Şekil 4.38: Sülük Salgı Ekstraktının 24 saatlik 25 mg/mL konsantrasyonda görünümü	27
Şekil 4.39: Sülük Salgı Ekstraktının 48 saatlik 25 mg/mL konsantrasyonda görünümü	27
Şekil 4.40: Sülük Salgı Ekstraktının 24 saatlik 50 mg/mL konsantrasyonda görünümü	28
Şekil 4.41: Sülük Salgı Ekstraktının 48 saatlik 50 mg/mL konsantrasyonda görünümü	28
Şekil 4.42: Sülük Salgı Ekstraktının 24 saatlik 100 mg/mL konsantrasyonda görünümü	28
Şekil 4.43: Sülük Salgı Ekstraktının 48 saatlik 100 mg/mL konsantrasyonda görünümü	28
Şekil 4.44: <i>B. hominis</i> 'in 24 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü	29
Şekil 4.45: <i>B. hominis</i> 'in 48 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü	29
Şekil 4.46: Metronidazolün 24 saatlik 3,125 µg/mL konsantrasyonda görünümü	30
Şekil 4.47: Metronidazolün 48 saatlik 3,125 µg/mL konsantrasyonda görünümü	30

Şekil 4.48: Metronidazolün 24 saatlik 6,25 µg/mL konsantrasyonda görünümü	30
Şekil 4.49: Metronidazolün 48 saatlik 6,25 µg/mL konsantrasyonda görünümü	30
Şekil 4.50: Metronidazolün 24 saatlik 12,5 µg/mL konsantrasyonda görünümü	31
Şekil 4.51: Metronidazolün 48 saatlik 12,5 µg/mL konsantrasyonda görünümü	31
Şekil 4.52: Metronidazolün 24 saatlik 25 µg/mL konsantrasyonda görünümü	31
Şekil 4.53: Metronidazolün 48 saatlik 25 µg/mL konsantrasyonda görünümü	30
Şekil 4.54: Metronidazolün 24 saatlik 50 µg/mL konsantrasyonda görünümü	32
Şekil 4.55: Metronidazolün 48 saatlik 50 µg/mL konsantrasyonda görünümü	32
Şekil 4.56: Metronidazolün 24 saatlik 100 µg/mL konsantrasyonda görünümü	32
Şekil 4.57: Metronidazolün 48 saatlik 100 µg/mL konsantrasyonda görünümü	32
Şekil 4.58: Carvacrolün farklı konsantrasyonlarda <i>B. hominis</i> canlılığı üzerine etkisi (CCK-8 yöntemi ile ölçülen absorbans değerleri)	33
Şekil 4.59: Propolisin farklı konsantrasyonlarda <i>B. hominis</i> canlılığı üzerine etkisi (CCK-8 yöntemi ile ölçülen absorbans değerleri)	35
Şekil 4.60: Sülük Salgı Ekstraktının farklı konsantrasyonlarda <i>B. hominis</i> canlılığı üzerine etkisi (CCK-8 yöntemi ile ölçülen absorbans değerleri)	36
Şekil 4.61: Metronidazolün farklı konsantrasyonlarda <i>B. hominis</i> canlılığı üzerine etkisi (CCK-8 yöntemi ile ölçülen absorbans değerleri)	37

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler		Açıklama
°C	:	Santigrat Derece
dk	:	Dakika
g	:	Gram
IU/mL	:	Uluslararası Birim/Mililitre
mg	:	Miligram
mg/L	:	Miligram/Litre
mIU/mL	:	Mili-Uluslararası Birim/Mililitre
mL	:	Mililitre
µg	:	Mikrogram
µL	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre
µS/cm	:	Mikrosiemens/Santimetre

Kısaltmalar		Açıklama
CCK-8	:	Cell Counting Kit-8
DMSO	:	Dimetil Sülfoksit
DNA	:	Deoksiriboz Nükleik Asit
ELISA	:	Enzim Bağlı Immünosorbent Testi
IBS	:	İnflamatuvar Bağırsak Sendromu
IL-8	:	İnterlökin-8
KH ₂ PO ₄	:	Dipotasyum Hidrojen Fosfat
Na ₂ HPO ₄	:	Sodyum Fosfat
NaCl	:	Sodyum klorür
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TMP-SMX	:	Trimetoprim-Sülfametoksazol
TNF-α	:	Tümör Nekroz Faktörü

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SÜLÜK SALGI EKSTRAKTI, PROPOLİS VE CARVACROLÜN *BLASTOCYSTIS HOMINIS* ÜZERİNE İN VİTRO ORTAMDA ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

GÜLŞAH ÖZKULA

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muttalip ÇİÇEK

Dünyada yaygın görüldüğü gibi ülkemizde de yaygın görülen *Blastocystis hominis*, insan bağırsağında yaşamaktadır. *B. hominis* insanlarda gastro enterite yol açmaktadır. Metronidazol, blastocytosisli hastaların tedavisinde sık tercih edilen ilaçlardandır. Metronidazol'un başlıca dezavantajı *B. hominis* tarafından direnç geliştirilmesiyle uzun terapötik tedavi süreci gerektirmektedir. Geleneksel ve tamamlayıcı tedavi uygulamalarından olan tıbbi sülük tedavisinin (Hirudoterapi) konvansiyonel tedaviye destek olarak birçok hastalıkta terapötik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Günümüzde sülüklerin kan emmeleri esnasında uygulandığı bölgeye verdiği salgıda biyolojik ve farmakolojik açıdan çok sayıda etkili biyoaktif madde tespit edilmiştir. Bu biyoaktif maddelerden bazıları geniş spektrumlu antibakteriyel peptidler içermektedir. Kekikten elde edilen carvacrolün bakteriler, mantarlar ve parazitler üzerinde geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu yönünde çalışmalar yapılmaktadır. Propolis apiterapide; antibakteriyel, antiviral, antifungal, antitümöral ve analjezik olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışma sülük salgı ekstraktı, propolis ve carvacrolün *B. hominis*'in in vitro ortamda çoğalması üzerindeki olası etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmada Ahi Evran Üniversitesi Parazitoloji laboratuvarı parazit bankasında in vitro ortamda saklanan suptip

3 suşları olduğu bilinen *B. hominis*'ler kullanılmıştır. *B. hominis* kültürü için parazitin daha iyi büyümesini desteklediği için Jones medium besiyeri kullanılmıştır. Besiyerlerine ekimi yapılan *B. hominis*'ler 24, 48 ve 72 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürelerinin sonunda parazit yoğunluğu mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. 72 saatin sonunda üreme yoğunluğu gözlenen *B. hominis*'ler 15 ml'lik falkonda santrifüj edildikten sonra süper latentin üzerine 1 ml'lik Jones medium besiyeri eklenerek Tripan blue ile Toma lamı sayımı yapıldı. 5.10^4 hücrenin 96 kuyulu hücre kültürü besiyerinde sülük salgı ekstraktı, propolis, carvacrol ve metronidazol'ün farklı konsantrasyonları 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri elisa testi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular kontrol grubu ile karşılaştırılarak antiparaziter etkisi belirlenmiştir. Elde edilen bulgular her bir madde de değişiklik göstermekte bu durum zamana ve doz artışına bağlı olarak da farklılık göstermektedir. Elde edilen sonuçlar sülük salgı ekstraktı, propolis ve carvacrolün *B. hominis*'in in vitro gelişimini inhibe edeceğini göstermektedir. Bu çalışma; son yıllarda etkenin bu ilaca karşı direnç gelişme mekanizmaları da göz önünde bulundurularak *B. hominis* gibi parazit enfeksiyonların tedavisinde sülük salgı ekstraktı, propolis ve carvacrolün etkinliğinin alternatif biyolojik ajanların kullanımına yönelik gelecekte yapılacak çalışmalara ışık tutabilir.

Haziran 2026, 66 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Blastocystis hominis*, sülük salgı ekstraktı, propolis, carvacrol, Antiprotozoal etki

ABSTRACT

M. Sc. THESIS

**INVESTIGATION OF THE IN VITRO EFFECTS OF LEECH SALIVA
EXTRACT, PROPOLIS, AND CARVACROL ON THE GROWTH OF
*BLASTOCYSTIS HOMINIS***

GÜLŞAH ÖZKULA

**Kırsehir Ahi Evran University
Graduate School of Health Sciences
Medical Microbiology Department**

Supervisor: Prof. Dr. Muttalip ÇİÇEK

Blastocystis hominis, commonly found both worldwide and in our country, lives in the human intestine. *B. hominis* causes gastroenteritis in humans. Metronidazole is a frequently preferred drug in the treatment of blastocytosis patients. The main disadvantage of metronidazole is the development of resistance by *B. hominis*, requiring a long therapeutic treatment process. Medical leech therapy (Hirudotherapy), a traditional and complementary treatment practice, is known to have therapeutic effects in many diseases as a support to conventional treatment. Currently, numerous bioactive substances with biological and pharmacological effects have been identified in the secretions released by leeches during blood sucking. Some of these bioactive substances contain broad-spectrum antibacterial peptides. Studies are being conducted on the fact that carvacrol, obtained from thyme, has broad antimicrobial activity against bacteria, fungi, and parasites. Propolis is used in apitherapy as an antibacterial, antiviral, antifungal, antitumor, and analgesic.

This study was conducted to investigate the possible effects of leech secretion extract, propolis, and carvacrol on the in vitro growth of *B. hominis*. In this study, *B. hominis* strains known to be subtype 3, stored in the parasite bank of the Ahi Evran University Parasitology

Laboratory, were used. Jones medium was used for *B. hominis* culture because it supports better parasite growth. *B. hominis* cultured on the medium were incubated at 37°C for 24, 48, and 72 hours. At the end of the incubation periods, parasite density was evaluated microscopically. After 72 hours, *B. hominis* showing high growth density were centrifuged in 15 ml Falcon, then 1 ml of Jones medium was added to the superlatent, and counting was performed using Trypan blue on a Toma slide. Different concentrations of leech secretion extract, propolis, carvacrol, and metronidazole were evaluated in 96-well cell culture medium containing 5.10^4 cells after 24 and 48 hours of incubation using the ELISA test. The results were compared with a control group to determine the antiparasitic effect. The results varied for each substance, and this also differed depending on the time and dose increase. The results show that leech secretion extract, propolis, and carvacrol inhibit the in vitro growth of *B. hominis*. This study, considering the mechanisms of resistance development of this pathogen against these drugs in recent years, may shed light on future studies on the use of alternative biological agents such as leech secretion extract, propolis, and carvacrol in the treatment of parasitic infections such as *B. hominis*.

June 2026, 66 Pages

Keywords: *Blastocystis hominis*, leech saliva extract, propolis, carvacrol, Antiprotozoal effect,

1. GİRİŞ

Blastocystis hominis, dünya genelinde hem insanlarda hem de çeşitli hayvan türlerinde bağırsaklarda sıkça görülen tek hücreli bir protozoonudur ve fekal-oral yol ile bulaşır (1,2). Enfeksiyonun prevalansı farklı coğrafi bölgelerde değişiklik gösterse de hem asemptomatik bireylerde hem de gastrointestinal semptomlar gösteren hastalarda yaygın olarak saptanmıştır (3,4). Bazı klinik çalışmalarda *B. hominis* pozitif olgularda karın ağrısı, ishal, bulantı ve şişkinlik gibi gastrointestinal semptomlar bildirilmiş olmakla birlikte, enfeksiyonun patojenik rolü hâlâ tartışmalı bir konudur, çünkü organizmanın birçok asemptomatik bireyde de bulunması bu ilişkiyi kesinleştirmemektedir (1,4).

B. hominis morfolojik olarak oldukça değişken bir yapıya sahiptir ve dört temel form ile iki tane de ara formda gözlemlenmektedir. Temel morfolojik formlar vakuoler, granüler, ameboid ve kist formu olarak tanımlanırken; avakuoler ve multivakuoler formlar ara geçiş tipleri olarak bildirilmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemeler, özellikle taze dışkı örneklerinde bu ara formların da bulunabileceğini göstermiştir (5,6). *B. hominis* anaerobik özellik göstermesi nedeniyle, dışkı uzun süre bekletildiğinde oksijenin etkisiyle hücre duvarının yapısında değişikliklere neden olmakta ve yüzeyde pürüzlü bir görünüm ortaya çıkarmaktadır (7).

B. hominis'in taksonomik sınıflandırması uzun yıllar tartışmalı olmuştur; geçmişte mayalar, mantarlar, amipler, kamçılılar ve sporozoon protozonlar grubuna dahil edilmiştir. Ancak, 18S rRNA dizileme çalışmaları ve modern filogenetik analizler, *B. hominis*'in Stramenopile alemi içinde yer almasının uygun olduğunu göstermiştir (8,9)

Blastocystosis tedavisinde kemoterapötik ajan olan metronidazol tercih edilmektedir (3). Metronidazol, nitroimidazol türevi antibiyotik olup, protozoonların ve anaerobik bakterilerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Metronidazol hücre içine girdikten sonra, hücrenin DNA'sına bağlanır ve DNA replikasyonunu durdurarak hücrenin ölümüne yol açar (10,11). Metronidazol'un başlıca dezavantajları ve hem *B. hominis* hemde *G. intestinalis* tarafından direnç geliştirilmesiyle uzun terapötik tedavi süreci gerektirmektedir (12,13). Bu yüzden metronidazole karşı oluşan direnç durumu, tekrarlayan nüksler, hem de mutajenik etkisi nedeniyle etkili olduğu mikroorganizmaların

üzerinde kullanılmak üzere sürekli yeni ajanların arayışı devam etmektedir. Bu araştırmanın bu yeni ajan arayışına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

Doğal kökenli bazı maddeler, bazı patojen mikroorganizmaların üremesini inhibe etmektedir (14). Bazı tıbbi bitkilerin insanlarda parazit enfeksiyonlarını etkili bir şekilde ortadan kaldırmaya yardımcı olan organik bileşikler içerdiğini gösteren çalışmalar vardır (15,16). Bu tıbbi bitkilerden biri olan kekikten elde edilen carvacrol, fenolik yapıda olan bileşiklerindendir (17). Bu bileşikler antimikrobiyal özelliklerini, fonksiyonel hidroksil grupları ve yüksek redoks potansiyelleri sayesinde göstermektedirler. Carvacrol tat verici ve iştah açıcı özelliklerinin yanında, protonların hücre dışı sıvısına geçişini sağlayarak, patojen mikroorganizmaların stoplazmik zarlarını parçalayıp ölmelerine neden olmaktadır (18). Timol ve carvacrol'un bakteriler (*metisiline dirençli S. aureus*, *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *E. coli* O157:H7, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Y. enterocolitica*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Serratia liquefaciens*, *Lactobacillus carvatus* ve *Lactobacillus sakei*) mantarlar (*Aspergillus spp.* ve *Candida spp.*) ve parazitler (*Blastocystis* ve *Endolimax nana*) üzerinde geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu öne sürülmüştür (19,20,21,22,23,24,25,26,27). Bu çalışmada, birçok mikroorganizma üzerinde etkinliği araştırılmış olan carvakrolün, *B. hominis* üzerine etkisi incelenmiştir.

Propolis; yapısında bulunan fenolik madde bileşikleri ile apiterapide; antibakteriyal, antiviral, antifungal, antitümöral, analjezik olarak kullanılmaktadır. Propolis yaralanma ve yanıklarda, egzamada, gastrointestinal hastalıklarda tedavi edici, karaciğer ve immün sistem hastalıklarında koruyucu unsur olarak bilinmektedir (28,29,30,31). Kahverengi propolisin (BP) *Plasmodium*, *Trypanosoma* ve *Leishmania* cinsi protozalara karşı etkili olduğu bildirilmiştir (32). Propolis etanol özütü leishmaniasis için aşı tasarımı da humoral bağışıklık tepkilerinin uyarılmasında yararlı olabilir (33). Başka bir çalışmada in vitro koşullarda %30'luk propolis etanol ekstraktının *H.pylori*'nin 38 klinik izolatına etkisi araştırılmıştır. Sonuçta, propolisin, *H.pylori*'ye karşı etkili antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu ve aynı zamanda *Campylobacter jejuni* ve *Campylobacter coli*'nin üremesini engelleyeceği bildirilmiştir (34). Yapılan bir çalışmada da propolis ekstraktlarının *T.brucei*'ye karşı nispeten en yüksek inhibitör etkiyi göstermesiyle birlikte orta düzeyde etkinliği ortaya koyulmuştur (29). Bu çalışmada, birçok mikroorganizma üzerinde etkinliği denenmiş ve olumlu etki aldığı bildirilmiş olan propolisin, *B. hominis* üzerine in vitro etkisi araştırılmıştır.

Sülükler çok eski çağlardan beri bazı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Eski dönemlerde olduğu gibi, günümüzde de tam kontrollü laboratuvarlarda hijyenik şartlar altında üretilen sülükler günümüzde de kullanılmaktadır. Tıpta sülüğün kendisi veya sülüklerden elde edilen biyoaktif maddeleri kullanılmaktadır (30). Yetişkin bir sülük tek bir beslenmede kendi vücut ağırlığının yaklaşık on katı kadar (ortalama 5 ila 15 ml) kan emebilmektedir. Tedavinin etkinliği, sülüğün emdiği kandan ziyade salgıladığı biyoaktif madde miktarı ile doğrudan ilişkilidir (31). Sülüklerin tükürük bezi salgıları 100'ün üstünde farklı biyoaktif madde içerir. Bu salgıların; vazodilatatör, bakteriyostatik, analjezik, anti-inflamatuarlar, antiparaziter, anti-koagulan, ödem çözücü, mikrosirkülasyon bozukluklarını önleyici, organ ve dokuların hasarlı vasküler permeabilitesini düzeltici, hipoksiyi düzenleyici, kan basıncını düşürücü ve immüniteyi arttırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (30,35). Yine yapılan başka bir çalışmada, Malezya sülüğünün tükürük salgısının hem gram pozitif (*S.aureus*) hem de gram negatif (*S. typhi* ve *E. coli*) bakteri suşlarına karşı geniş spektrumlu bir antibakteriyel aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur (35). Tarafımızca yapılan bu çalışmada tedavide kullanılan tıbbi sülük *Hirudo verbana*'nın tükürük salgısının *B. hominis* üzerindeki anti-paraziter etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe ve Sınıflandırma

B. hominis 'in tarihçesine bakıldığında çok eski dönemlere ait kayıtlar bulunmakta olup 1899 yılında Perroncito tarafından tespit edilmiş fakat isimlendirmesi yapılamamıştır. Taksonomik durumuda uzun süre netleştirelemeyen *B. hominis* bilimsel olarak ilk kez Alexeieff tarafından 1911 yılında maya mantarı olarak tanımlaması yapılmış ve *Blastocystis enterecola* ismi verilmiştir. Zamanla yapılan çalışmalarda sıçan, kobay, tavuk, sürüngen ve sülüklerden *Blastocystis* izole edilmiştir (37). Başta izole edildiği konağın (*B. ratti*, *B. anseri* vb.) ismine göre *Blastocystis*'in isimlendirilmesi yapılmış bu durum ise konak özgülüğü, hücre biyolojisi ve patojenite gibi konularda karmaşaya neden olduğu bildirilmiştir (38,39). *B. hominis*'in taksonomik sınıflandırması tartışmalı olup mayalar, mantarlar, amipler, kamçılılar ve sporozoon protozonlar grubuna dahil edildiği olmuştur. *B. hominis*'in, taksonomik sınıflandırması ancak son yıllarda yapılabilmiş ve 18s rRNA'nın araştırılması gibi modern filogenetik tekniklerin uygulanması sonucu Stramenopile aleminin içine yerleştirilmiştir (8,37). Diğer Stramenopiller arasında insanda yerleşebilen tek tür olması ve yaşam döngüsünde kamçılı bir formun bulunmaması *B. hominis*'i bu alemdeki diğer organizmalardan ayırmaktadır (5).

Sınıf	Blastocystea
Subphylum	Opalinata
Infrakingdom	Stramenopile (Heterokonta)
Subkingdom	Chromobiota
Kingdom	Chromista

2.2. Morfolojisi

B. hominis polimorfik bir protozoon olup vakuoler, granüler, ameboid, kist, avakuoler ve multivakuoler form olmak üzere 6 farklı formu tanımlanmıştır. Avakuoler ve multivakuoler formları diğer formlara nazaran daha az rastlanılan ara formlardır. Taze dışkı örneklerinde bu formlara ek olarak farklı morfolojik varyasyonların da ortaya çıkabildiği bildirilmiştir.

Morfolojik olarak görülen her bir yapıya ad vermek zor olduğundan ve karmaşaya yol açabileceğinden tercih edilmemektedir. Bu formlarındaki çeşitlilik *B. hominis*'in hücre biyolojisi çalışmalarını zorlaştırmakta, kimi zaman ise hatalı yorumlara dahi sebep olmaktadır (5). Elektron mikroskobu ile yapılan detaylı incelemeler, *Blastocystis* hücre zarının alt kısmında belirgin bir yüzey tabakası bulunduğunu ve bunun konağa tutunmada önemli rol oynayabileceğini göstermiştir. Ayrıca mitokondri benzeri organellerin varlığı, parazitin aerobik ve anaerobik metabolik süreçler arasında geçiş yapabilme yeteneğine sahip olduğunu ortaya koymuştur (40).

2.2.1. Vakuoler Form

B. hominis'in en yaygın gözlenen morfolojik şekli vakuoler formdur. Bu form, genellikle 5–30 µm çapında olup, küresel veya oval bir yapıya sahiptir. Hücrenin merkezinde büyük bir vakuol bulunur ve sitoplazma bu vakuolün etrafında ince bir halka oluşturur. Hücre zarına yakın bölgede bir veya daha fazla çekirdek yer alabilir. Vakuoler form hem dışkı örneklerinde hem de kültür ortamlarında en sık rastlanan şekil olarak bilinmektedir (38).

2.2.2. Granüler Form

Granüler form, vakuoler forma benzer bir yapıya sahip olmakla birlikte, sitoplazmasında yoğun elektron granülleri içerir. Bu granüllerin parazitin metabolik aktivite veya üreme süreçleriyle ilişkili olarak arttığı düşünülmektedir. (5,8).

2.2.3 Ameboid Form

Ameboid form ise genellikle kültür ortamlarında ortaya çıkan, düzensiz şekilli ve sitoplazmik uzantılar içeren bir yapıdır. Bu formun, parazitin konağın bağırsak epiteline tutunmada rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (5).

2.2.4 Kist Formu

Kist formu, *B. hominis*'in çevresel koşullara en dayanıklı morfolojik yapısıdır. Yaklaşık 3–5 µm çapında olup kalın bir hücre duvarına sahiptir ve konaktan dış ortama atıldığında uzun süre canlılığını koruyabilir. Kist formu, fekal-oral yolla bulaşmanın ana formu olarak kabul edilmektedir (7).

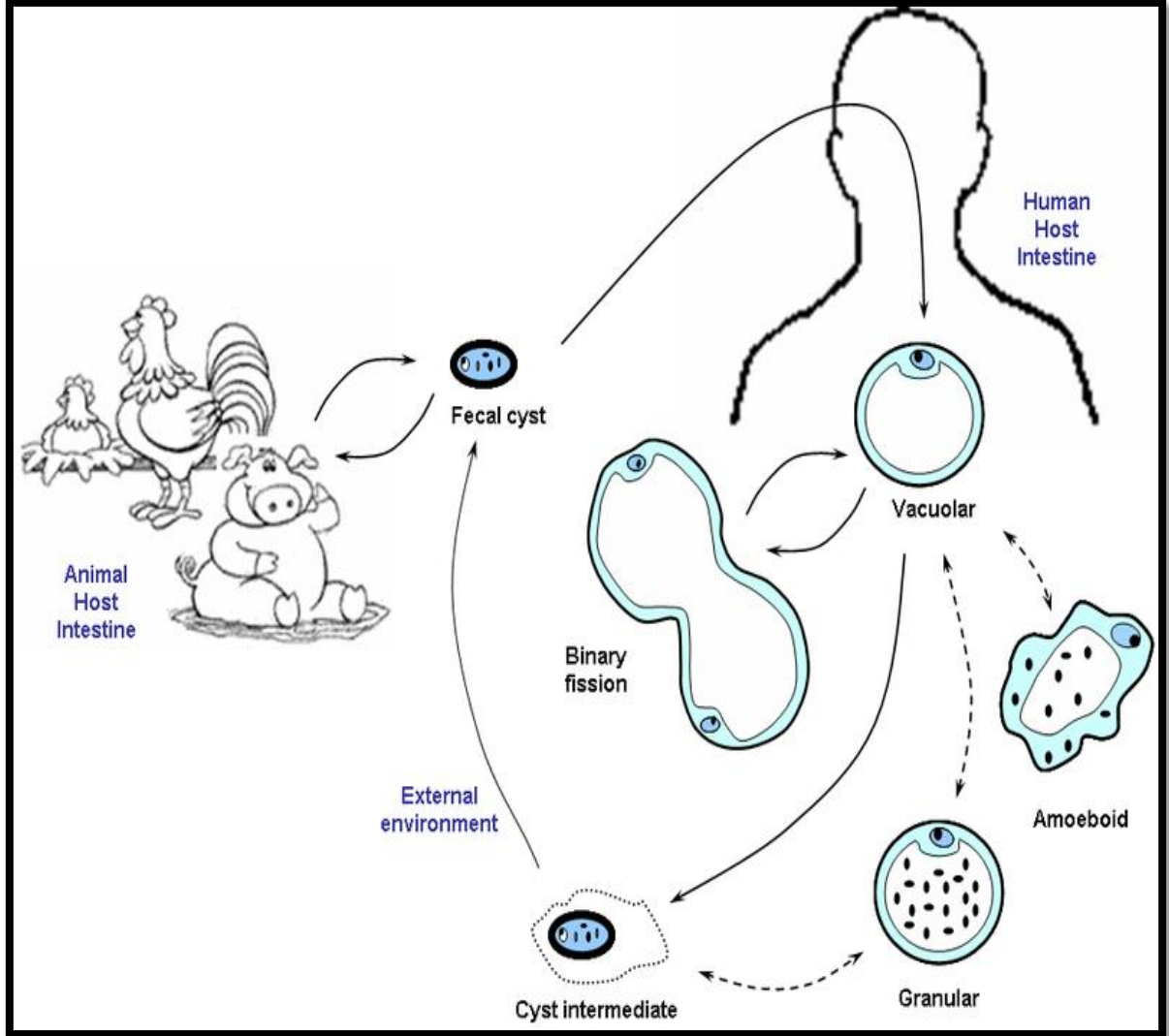
2.2.5 Multivakuoler Form

Multivakuoler form, genellikle vakuoler formun olgunlaşması sonucunda ortaya çıkar. Sitoplazmada birden fazla küçük vakuol bulunur ve çekirdekler bu vakuoller arasında dağılmıştır. Bu form, kistleşme sürecinden önceki ara evrelerden biri olarak düşünülmektedir (5).

2.2.6 Avakuoler Form

Bu Avakuoler form, merkezi vakuolünü kaybetmiş bir yapıdır. Bu form, kültür ortamlarında nadiren gözlemlenir ve kesecik şeklindedir. Işık mikroskobu ile tespit edilmesi oldukça güçtür. Morfolojik özellikleri ancak elektron mikroskobu (TEM) ile yapılan çalışmalar sonucu belirlenebilmiştir. Taze dışkı örneklerinde formun çapı genellikle 3–8 µm arasında değişmektedir (3,38).

2.3. Yaşam Döngüsü



Şekil 2.1: Blastocystis'in yaşam döngüsü (5).

Blastocystis türlerinin yaşam döngüsü tam olarak aydınlatılamamış olsa da, mevcut araştırmalar bu parazitin fekal-oral yolla bulaştığını ve gelişiminin insan veya hayvan gastrointestinal sisteminde gerçekleştiğini göstermektedir (5,38). Parazit konak dışına kist formu halinde atılır; uygun koşullarda ağız yoluyla alındığında yeni konağın bağırsak sisteminde gelişimini sürdürmeye başlar. Bulaşma genellikle kontamine su ve gıda maddeleri aracılığıyla ya da doğrudan fekal-oral temasla meydana gelmektedir. Kist formu, mide asidine dayanıklı yapısı sayesinde ince bağırsağa ulaşır; burada kistin duvarı çözülür ve içinden çıkan vakuoler veya multivakuoler formlar kolonun proksimal bölgesinde çoğalmaya başlar (7). Parazitin çoğalması genellikle aseksüel bölünme (binary fission) yoluyla gerçekleşir. Vakuoler form, bölünme sonucu yeni hücreler oluşturur. Bu hücrelerde gelişerek granüler, ameboid veya multivakuoler formlara dönüşebilir. Morfolojik dönüşümler, konağın bağırsak ortamındaki pH, oksijen düzeyi ve mikrobiyal flora gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (5). Bazı araştırmalar, kistleşmenin *Blastocystis* yaşam döngüsünde kritik bir evre olduğunu ve kalın duvarlı kistlerin oluşumuyla tamamlandığını belirtmektedir. Oluşan kistler dış ortama bırakıldıktan sonra uzun süre canlılığını korur ve yeni bir konağa geçtiğinde döngü yeniden başlar (8). Kist konağa girdikten sonra eksistasyon evresinde trofozoit benzeri formlar ortaya çıkar. Kolonik mukozaya tutunarak çoğalmaya başlar. Bu aşamada parazitin konağa zarar verme potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Özellikle amöboid formun bağırsak epiteline yakın bölgelerde bulunması, mukozal irritasyon ve inflamatuvar yanıtların oluşumuna katkıda bulunabilir (5).

2.4. Patogenezi ve Klinik Önemi

Blastocystis türlerinin patogenezi tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte, bazı alt tiplerin (özellikle ST1–ST4) patojen potansiyele sahip olduğu bilinmektedir (5,41). Klinik belirtilerin ortaya çıkması, konak tepkileri, genetik varyasyonlar ve bağırsak mikrobiyotası ile etkileşimlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. *Blastocystis*'in patojen etkisi, büyük ölçüde bağırsak mukozasına tutunması, metabolik ürünlerinin salınması ve immün yanıtın uyarılması ile ilişkilidir. Özellikle ameboid form, epitel hücrelerine yakın konumlanarak mukozal irritasyon, mukus artışı ve hücresel hasara yol açabilir (5). Ayrıca parazitin salgıladığı proteaz enzimleri, bağırsak bariyerini bozarak inflamatuvar yanıtları tetiklemekte ve IL-8, TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımını artırmaktadır (42). Klinikte *Blastocystis* enfeksiyonu, asemptomatik taşıyıcılıktan irritabl bağırsak sendromu (İBS) benzeri tablolara kadar geniş bir yelpazede seyredebilir. En sık görülen semptomlar

karın ağrısı, şişkinlik, ishal ve dışkılama değişiklikleridir. Bazı hastalarda, özellikle immünsüpresif bireylerde, semptomların daha şiddetli seyrettiği bildirilmiştir (43,44).

2.5. Tanı Yöntemleri

B. hominis enfeksiyonunun tanısı, klinik bulgular ve laboratuvar verilerinin birlikte değerlendirilmesine dayanır. Tanıda en sık mikroskopik dışkı incelemesi, kültür yöntemleri ve moleküler yöntemler (özellikle PCR) kullanılmaktadır; moleküler teknikler, özellikle kültür ve mikroskopiye göre daha yüksek duyarlılık göstermektedir (9,45). Mikroskopik inceleme, vacuolar, granular ve diğer formların hızlı ve düşük maliyetli değerlendirilmesini sağlasa da duyarlılığı göreceli olarak daha düşüktür ve deneyimli personel gerektirebilir (9). Dışkı kültürü, düşük parazit yoğunluğunda mikroskopiye göre daha duyarlıdır ve paraziti çoğaltarak ileri testler için materyal sağlar; ancak zaman alıcıdır ve kontaminasyon riski vardır. Antijen tespiti, ELISA veya immünokromatografik testlerle yapılabilir ve yüksek duyarlılık sunar, fakat maliyeti yüksektir ve her laboratuvarında uygulanamayabilir. Moleküler yöntemler, özellikle PCR ve DNA dizileme teknikleri hem tanı hem alt tip belirlemede altın standart olarak kabul edilir ve düşük parazit yoğunluğunda bile güvenilirdir; ancak yüksek maliyet ve ileri laboratuvar altyapısı gerektirir (5,9,45).

2.6. Tedavi

B. hominis ile enfekte bireylerin tedavisi, parazitin patojenitesinin tam olarak aydınlatılamamış olması ve enfeksiyonun çoğu zaman kendini sınırlayan bir seyir göstermesi nedeniyle halen tartışmalıdır. Asemptomatik bireylerde tedavi önerilmemekte, klinik bulguların belirgin olduğu veya bağışıklık sistemi zayıf olan bireylerde tedavi düşünülmektedir (5,9).

Farmakolojik tedavide öncelik olarak metronidazole kullanılmakta olup, bazı olgularda tedaviye yanıtın yetersiz kaldığı bildirilmiştir (5). Metronidazol tedavisine yanıt vermeyen *B. hominis* enfeksiyonu vakalarında, bazı alternatif ajanlar klinik olarak değerlendirilmiştir. Trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX) bazı çalışmalarda parazitin eradikasyonu ve semptomların hafifletilmesinde etkili bulunmuş, nitazoksanid ile yapılan randomize çalışmalarda ise semptomatik hastalarda hem parazitin eliminasyonu hem de klinik iyileşme sağlanmıştır. Bu ilaçların etkilerinin doğrudan parazite yönelik olmadığı, ağırlıklı olarak parazitin besin kaynağı olan bağırsak bakterilerini etkileyerek dolaylı yoldan paraziti sınırladığı düşünülmektedir (47,48).

Doğal kökenli bileşiklerin antimikrobiyal özelliklere sahip olduğu birçok araştırmada gösterilmiş olup, uçucu yağlar ve bitkisel ekstraktlar bazı patojen mikroorganizmaların gelişimini engelleyebilmektedir (49). Bazı tıbbi bitkilerde bulunan organik bileşiklerin, insanlarda görülen paraziter enfeksiyonların ortadan kaldırılmasına yardımcı olabileceği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (50,51). Bu bitkilerden biri olan kekikten elde edilen carvakrol, fenolik yapıda bir bileşik olup güçlü antimikrobiyal özellikler göstermektedir (17). Carvakrolün bu etkisi, yapısındaki fonksiyonel hidroksil grupları ve yüksek redoks potansiyeli sayesinde gerçekleşmektedir. Ayrıca hücre zarında proton geçirgenliğini artırarak patojen mikroorganizmaların zar bütünlüğünü bozmakta ve hücre ölümüne neden olmaktadır (18). Klinik bir çalışmada, 600 mg emülsifiye kekik yağı uygulanan 11 enfekte hastanın 8'inde parazitin tamamen kaybolduğu, kalan 3 hastada ise yoğunluğun belirgin biçimde azaldığı saptanmıştır (52). Kekik gibi tıbbi bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin antimikrobiyal aktivite gösterdiği laboratuvar ortamında ortaya konmuştur; ancak bu bileşiklerin *Blastocystis sp.* enfeksiyonlarının tedavisinde doğrudan klinik etkinliği konusunda halen yeterli kanıt bulunmamaktadır (20,24,53). Bu nedenle doğal ajanlar, farmakolojik tedavilere potansiyel destekçi olarak araştırılmaya devam etmektedir.

Bir diğ er doğal madde olan propolis, içeriğindeki fenolik bileşikler sayesinde antibakteriyel, antiviral, antifungal ve antiinflamatuvar özellikler göstermektedir. Ayrıca propolisin yara, yanık, egzama ve gastrointestinal hastalıkların tedavisinde, karaciğer ve bağışıklık sistemi hastalıklarında destekleyici bir ajan olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (28,29,30,31). Kahverengi propolisin (Brown Propolis), *Plasmodium*, *Trypanosoma* ve *Leishmania* gibi protozoonlara karşı etkili olduğu ve bazı çalışmalarda antiprotozoal ilaçlarla benzer düzeyde parazit inhibisyonu sağladığı gösterilmiştir (32,33). Ayrıca propolis ekstraktlarının *H. pylori*'ye karşı g    antibakteriyel etki gösterdiği, *Campylobacter* türlerinin üremesini de engelleyebildiği bildirilmiştir (34).

Sülüklerin tükürük bezi salgıları 100' n üstünde farklı biyoaktif madde içerir. Bu salgıların; vazodilatatör, bakteriyostatik, analjezik, anti-inflamatuarlar, antiparaziter, anti-koagulan,  dem çözücü, mikrosirkülasyon bozukluklarını önleyici, organ ve dokuların hasarlı vasküler permeabilitesini düzeltici, hipoksiyi düzenleyici, kan basıncını düşürücü ve immüniteyi arttırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir; ancak sülük salgısının *Blastocystis sp.* enfeksiyonlarının tedavisinde doğrudan klinik etkinliği konusunda halen yeterli kanıt bulunmamaktadır (30, 35)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Jones Medium Besi Yerinin Hazırlanması

230 ml distile suya

0,29 g Na₂HPO₄

0,09 g KH₂PO₄

1,68 g ml NaCl

Tamponlu solüsyona:

0,23 g maya ekstraktı

9 ml inaktif at serumu

Otoklavlanır.

Hazırlanan besiyeri 3 ml santrifüj tüplerine (vidalı kapaklı) aktarılır.

} Tampon

3.2. *B. hominis* Temini ve Ekimi

Blastocystis izolatlarının in vitro koşullarda kültüre alınarak -80°C’de kriyoprezervasyon yoluyla saklanabildiği literatürde bildirilmiştir (36). Çalışmamızda Ahi Evran Üniversitesi Parazitoloji Laboratuvarı Parazit Bankası’nda in vitro koşullarda -80°C’de saklanmakta olan, subtip 3 suşları olduğu bilinen *B. hominis* örnekleri kullanılmıştır. *B. hominis* kültürü için, parazitin optimum büyümesini desteklediği bilinen Jones medium besiyeri tercih edilmiştir. Besi yerlerine inokülasyonu yapılan *B. hominis*’ler sırasıyla 24, 48 ve 72 saat boyunca 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 72. saatinde, kültürden alınan örnekler lam-lamel arasına yerleştirilerek ışık mikroskopunda morfolojik incelemeye tabi tutulmuştur. Üreme yoğunluğu gözlenen kültürler zaman kaybetmeden 15 mL’lik falcon tüplerine aktarılmış, ardından santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 1 ml Jones medium eklenmiştir. Hücre canlılığının ve yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla tripan blue ile boyama yapılmış ve Toma lamı kullanılarak sayım gerçekleştirilmiştir. Bu aşamaların ardından deneysel sürece geçilmiştir.

3.3. Carvakrolün Elde Edilmesi ve Konsantrasyonların Hazırlanması

Carvacrol, %98 saflıkta olarak Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Elde edilen bileşik, %1 oranında dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülmüştür. Ardından, Jones medium besiyeri kullanılarak seri sulandırma yöntemi uygulanmış ve 600 µg/mL, 300 µg/mL, 150 µg/mL, 75 µg/mL, 37,5 µg/mL ve 18,75 µg/mL olmak üzere farklı konsantrasyonları hazırlanmıştır.

3.4. Propolisin Elde Edilmesi ve Konsantrasyonların Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan propolis, Eğriçayır Organik Arı Ürünleri Ltd. Şti.'nden temin edilmiştir. Propolis örnekleri, kullanılıncaya kadar +4°C'de, kuru ve karanlık koşullarda muhafaza edilmiştir. Deneysel uygulama öncesinde, 240 mg propolis küçük parçalara ayrılmış ve üzerine 80 mL %90'lık etil alkol eklenmiştir. Karışım, bir gece boyunca düşük sıcaklıkta manyetik karıştırıcıda homojen hale gelinceye kadar karıştırılmıştır. Elde edilen ekstrakt, Jones medium besiyeri ile karıştırılarak 6-8 saat boyunca düşük ısıda yeniden manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu işlemin ardından propolis ekstraktının konsantrasyonu 40 mg/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Hazırlanan stok çözelti, 0,22 µm por çapına sahip steril membran filtreden süzülerek steril hale getirilmiştir. Son aşamada, seri sulandırma yöntemi kullanılarak 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL ve 31,25 µg/mL olacak şekilde farklı propolis konsantrasyonları hazırlanmıştır.

3.5. Sülük Salgı Ekstraktının Elde Edilmesi ve Konsantrasyonların Hazırlanması

Elde edilen süpernatantın stok solüsyon 0,22 µm por gözenekli filtreden süzülerek steril hale getirildikten sonra -20°C'de bekletilmiş ve deneysel süreçlerde kullanılmıştır. Son olarak da kullanılan sülükler, 15-30 dk. süre ile 37°C ılık suda bekletilerek aktivitelerinin geri kazanılması sağlanmıştır. -20°C'de bekletilen sülük salgı ekstraktı deneysel süreç başlatıldığında oda ısısında çözündürülmüştür. Sülük salgı ekstraktına Jones medium besi yeri eklenerek yine seri sulandırım metodu ile 100 µg/mL'den 3,125 µg/mL'ye kadar değişen oranlarda 5 ayrı konsantrasyonu hazırlanmıştır. Deneysel çalışmada kullanılmak üzere, standart boyutlarda 10 adet *Hirudo verbana* türü tıbbi sülük kullanılmıştır. Sülükler deney öncesinde aç bırakılmış ve ardından daha önce proje ekibimiz tarafından geliştirilen steril sentetik solüsyon ile beslenmiştir. Sülüklerin solüsyonla tamamen beslenmesinin ardından,

buz kabı içerisine yerleştirilmiş kapalı plastik tüplerin içine alınmışlardır. Sülükler, buz içerisinde 15–20 dakika bekletilerek fel olmaları sağlanmıştır. Bu işlem sonucunda, sülüklerin emdikleri solüsyonu salgılarıyla birlikte geri çıkarmaları sağlanmıştır. Vakum yöntemiyle toplanan bu solüsyon, 50 mL’lik falcon tüplerine aktarılmış ve +4°C’de, 4500 RPM’de, 15 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant, 0,22 m por çapına sahip steril filtreden szlerek steril hale getirilmiş, ardından -20°C’de saklanmıştır. Bu stok solüsyon, deneysel süreç öncesinde oda sıcaklığında zdrlerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Deneysel uygulama öncesinde, sülük salgı ekstraktına Jones medium besiyeri eklenmiş ve seri sulandırma yöntemi kullanılarak 100 g/mL, 50 g/mL, 25 g/mL, 12,5 g/mL, 6,25 g/mL ve 3,125 g/mL olmak üzere farklı konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Son aşamada, kullanılan sülükler 37°C’deki ılık suda 15–30 dakika bekletilerek vücut aktivitelerinin geri kazanılması sağlanmıştır.

3.6. Metronidazolün Elde Edilmesi ve Konsantrasyonların Hazırlanması

Eczaneden hazır preparatı alınan metronidazole preparatı deneysel uygulamalarda kullanılacak stok solüsyon hazırlamak için, ilaç %1 oranında dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde zdrlmştir. Elde edilen stok solüsyon, Jones medium besiyeri kullanılarak seri sulandırma yöntemi ile seyreltilmiştir. Bu işlem sonucunda, 100 g/mL, 50 g/mL, 25 g/mL, 12,5 g/mL, 6,25 g/mL ve 3,125 g/mL olmak üzere farklı konsantrasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlar, deneysel sürece alınmadan önce steril koşullar altında çalışılmış ve her bir çözelti 0,22 m por çapına sahip steril filtreden szlerek sterilizasyonu sağlanmıştır.

3.7. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) Test Kiti Yöntemi

Hücre canlılığını ve proliferasyonunu belirlemek amacıyla, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) testi kullanılmıştır. Bu yöntem, canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri aracılığıyla WST-8 tuzunu suda çözünür formazan bileşiğine dönüştürmesine dayanır. Oluşan renk değişimi, hücre sayısı ile doğru orantılıdır ve 450 nm kolorimetrik olarak ölçülebilmektedir. Bu yöntem sayesinde, *B. hominis* kültürleri üzerine uygulanan test maddelerinin (Carvacrol, Propolis, Sülük salgı ekstraktı ve Metronidazol) sitotoksik veya proliferatif etkileri belirlenebilmiştir. Analizler, retici firmanın (Dojindo, Japonya) kullanım talimatına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.8. Deneysel Çalışma ve Hücre Sayımı

Deneysel çalışmalarda, 96 çukurlu U-tabanlı steril hücre kültür plakaları kullanılmıştır. Her kuyucuğa öncelikle 100 µL Jones medium besiyeri ve 10 µL (5×10^4) hücre eklenmiştir. Daha sonra, önceden hazırlanan test maddeleri veya kontrol solüsyonları, seri sulandırma yöntemi ile her kuyuya ayrı ayrı eklenmiştir. Deney grupları, 24 saatlik ve 48 saatlik iki farklı inkübasyon süresi olacak şekilde hazırlanmıştır. Kültür plakaları, 37°C’de ilgili süreler boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından, her kuyudaki parazit yoğunluğunu belirlemek amacıyla 10 µL Cell Counting Kit-8 (CCK-8) test kiti eklenmiştir. Eklemeyi takiben 2–4 saat beklenmiş ve bu süre sonunda her deney grubunda renk değişimi gözlemlenmiştir. Renk değişimi sonrası, hücrelerin morfolojik özellikleri inverted mikroskop ile incelenmiş ve resmi kaydedilmiştir. Son olarak, mikropilaka okuyucu kullanılarak absorbans ölçümleri alınmış ve veriler istatistiksel analiz için kaydedilmiştir.

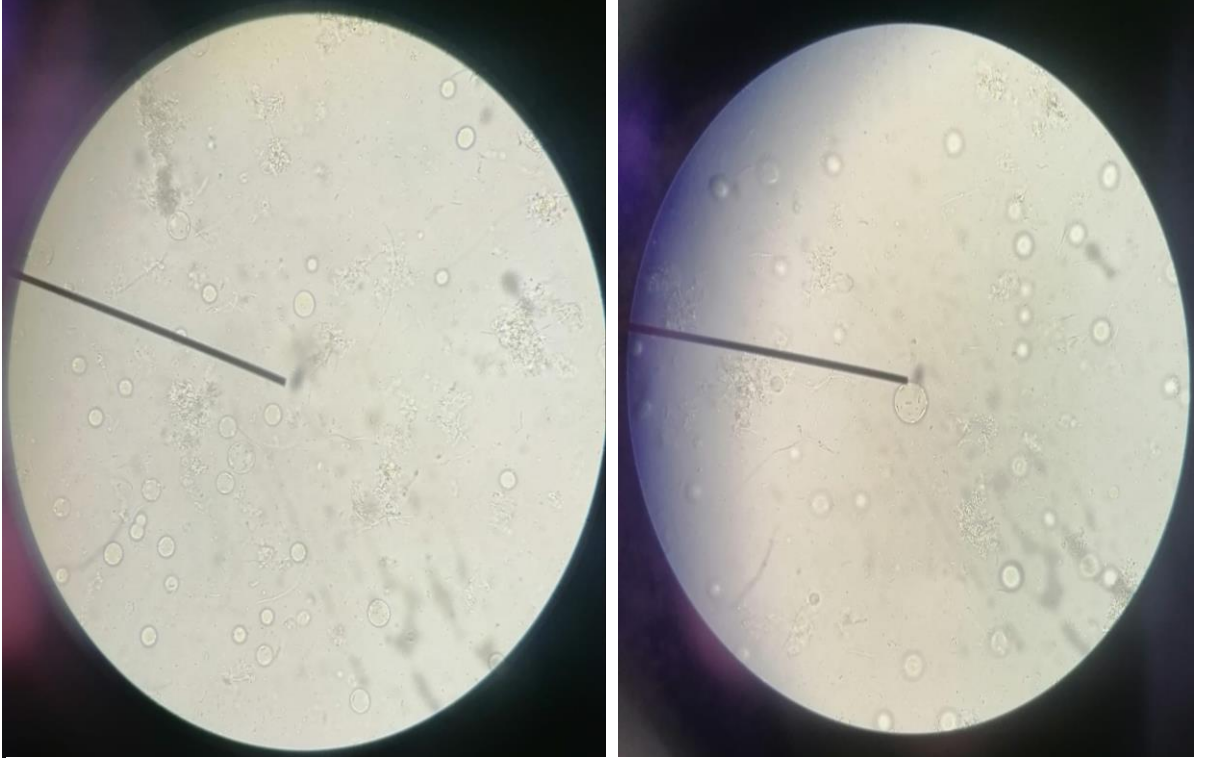
3.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler GraphPad Prism kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Tüm deneyler beş bağımsız tekrar ile gerçekleştirilmiş ve veriler ortalama $\pm$ standart sapma (mean $\pm$ SD) şeklinde sunulmuştur. Gruplar arasındaki farkların istatistiksel olarak anlamlılığı $p < 0,05$ düzeyinde kabul edilmiştir. Grafikler ve tablolar, ilgili test sonuçlarına göre hazırlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Mikroskopik Yöntem Bulguları

B. hominis'lerin 37°C'de 72 saatteki inkübasyonunun sonunda kültürden alınan örnekler lam-lamel arasına yerleştirilerek ışık mikroskopunda morfolojik incelemeye tabi tutulmuştur. (Şekil 4.1).

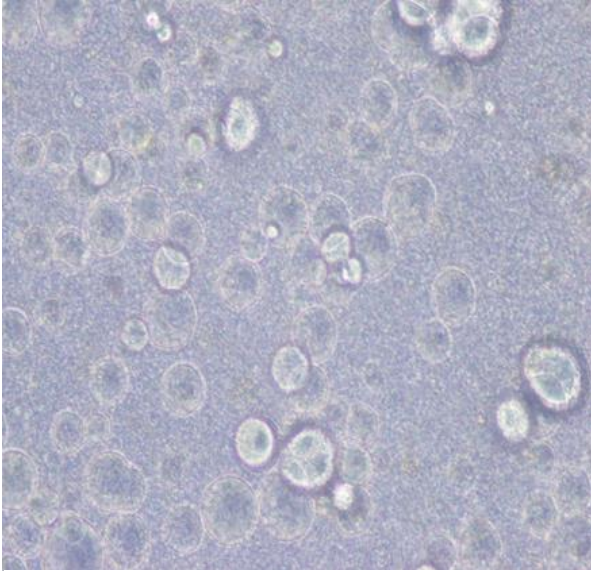


Şekil 4.1: *B. hominis*'in 72 saatin sonunda ışık mikroskopunda görünümü.

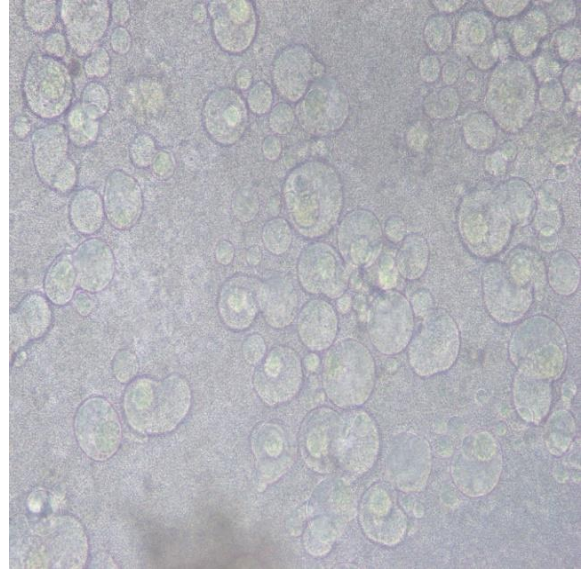
4.1.1 Carvacrolün Mikroskopik Yöntem Bulguları

Carvacrolün *B. hominis* üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan mikroskopik incelemelerde, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda inverted mikroskop altında 20'lik ve 40'luk objektiflerle bakıldı. Gözlem bulguları;

- Kontrol grubuna ait kültür plaklarında, 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.2-4.3).

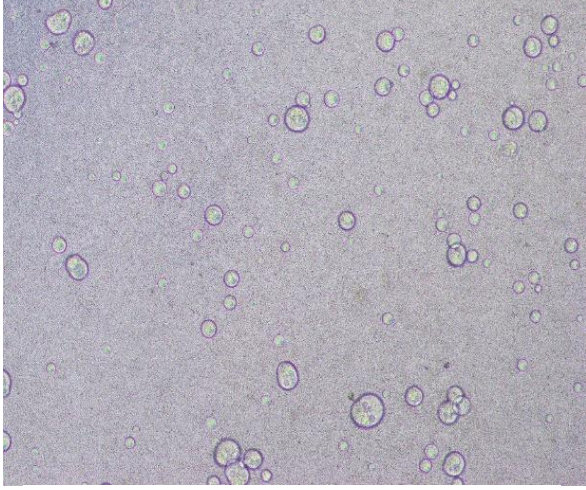


Şekil 4.2: *B. hominis*'in 24 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü.

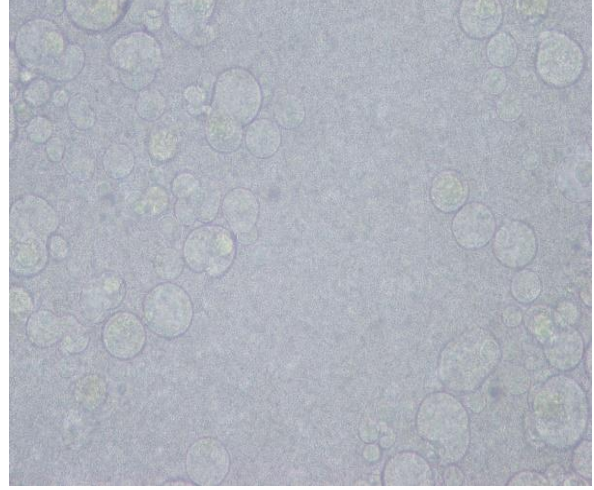


Şekil 4.3: *B. hominis*'in 48 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü.

- 18,75 µg/mL konsantrasyondaki carvacrol uygulamasında, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonunda parazitlerin canlılık oranının yüksek olduğu belirlendi(Şekil 4.4-4.5).

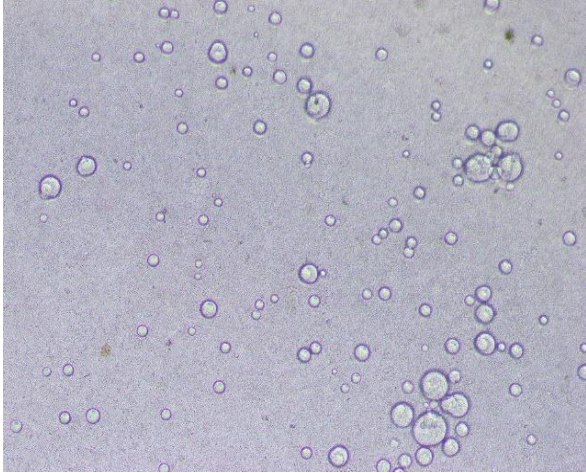


Şekil 4.4: 24 saatte 18,75 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

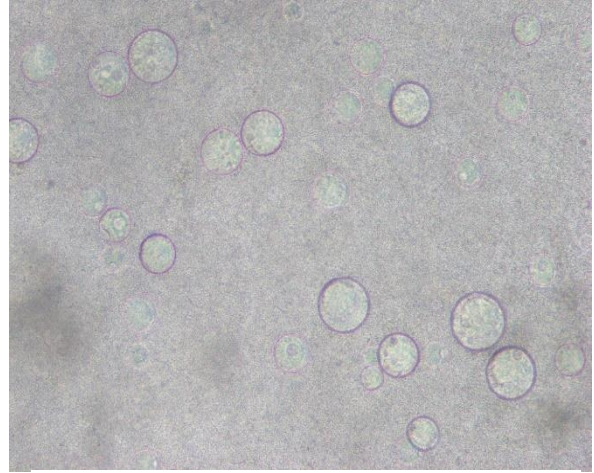


Şekil 4.5: 48 saatte 18,75 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

- 37,5 µg/mL konsantrasyonda, 24 saatlik inkübasyon sonunda parazitlerin canlılık oranının yüksek olduğu belirlendi. Ancak 48 saatlik inkübasyonun ardından canlılık oranında belirgin bir azalma ve hücre büyümesi gözlemlendi (Şekil 4.6-4.7).

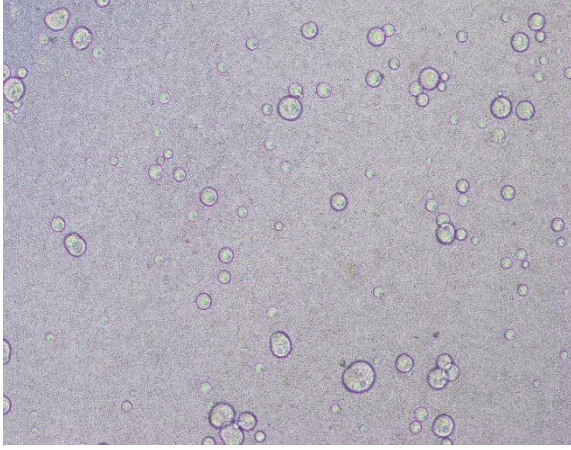


Şekil 4.6: 24 saatte 37,5 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

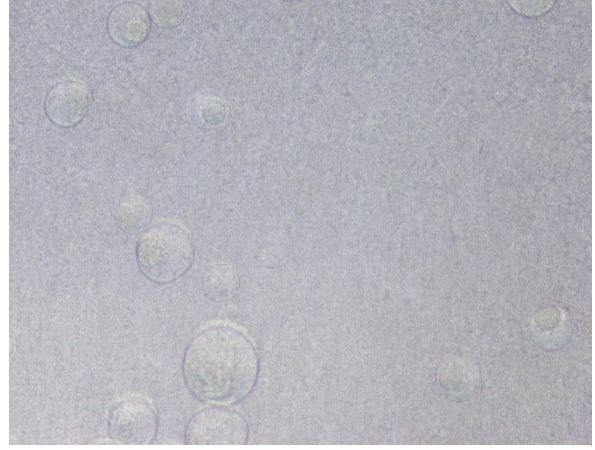


Şekil 4.7: 48 saatte 37,5 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

- 75 µg/mL konsantrasyonda, 24 saat sonunda parazitlerin canlılık oranının kontrol grubuna göre azalmaya başladığı gözlemlendi. 48 saatlik inkübasyon sonunda ise canlılık oranında daha belirgin bir düşüş meydana geldi (Şekil 4.8-4.9).

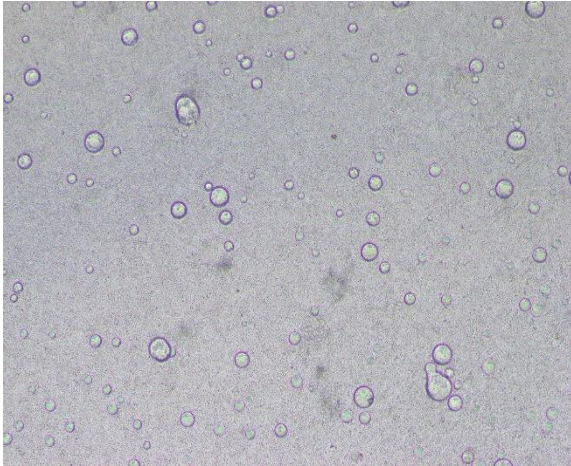


Şekil 4.8: 24 saatte 75 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

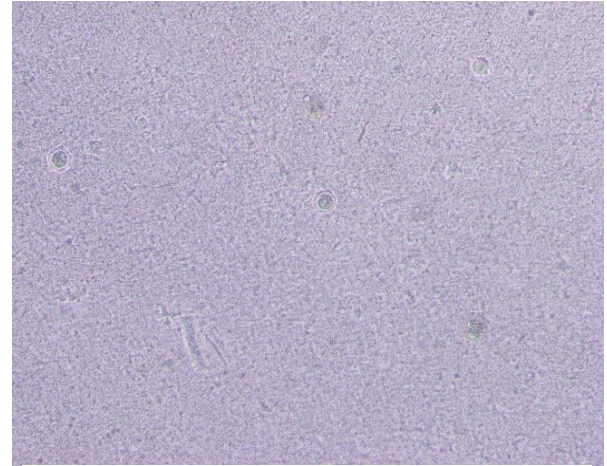


Şekil 4.9: 48 saatte 75 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

- 150 µg/mL konsantrasyonda, 24 saat sonunda canlılık oranının kontrol grubuna kıyasla azalmaya başladığı, 48 saat sonunda ise bu azalmanın daha belirgin hale geldiği görülmüştür (Şekil 4.10-4.11).

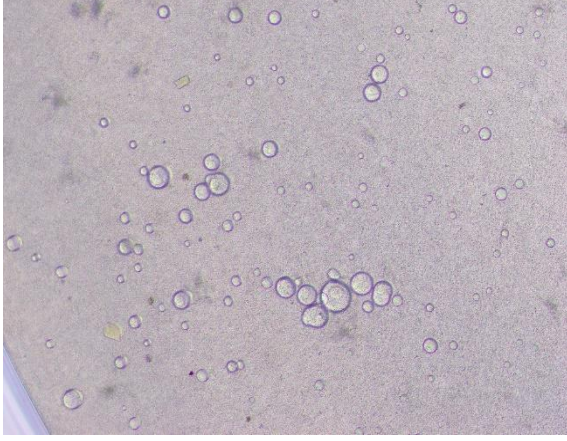


Şekil 4.10: 24 saatte 150 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

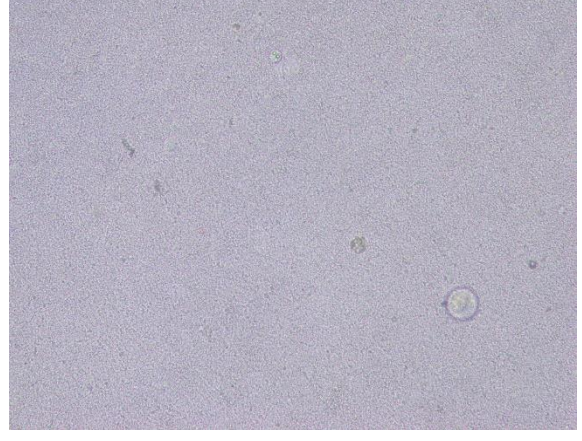


Şekil 4.11: 48 saatte 150 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

•300 µg/mL konsantrasyonda, 24 saatlik inkübasyon sonunda parazit canlılığında belirgin bir azalma gözlemlenirken, 48 saat sonunda canlılık oranının oldukça düşük seviyelere indiği belirlendi (Şekil 4.12-4.13).



Şekil 4.12: 24 saatte 300 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

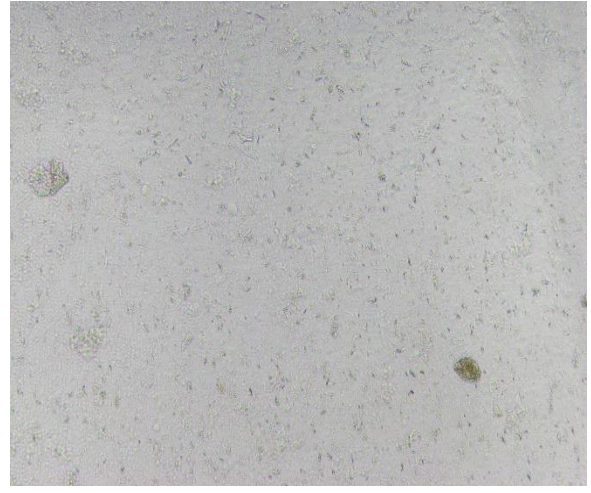


Şekil 4.13: 48 saatte 300 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

• 600 µg/mL konsantrasyonda ise 24 saat sonunda parazit canlılığının kontrol grubuna göre ciddi şekilde azaldığı, 48 saat sonunda ise canlılığın neredeyse tamamen ortadan kalktığı tespit edildi (Şekil 4.14-4.15)



Şekil 4.14: 24 saatte 600 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

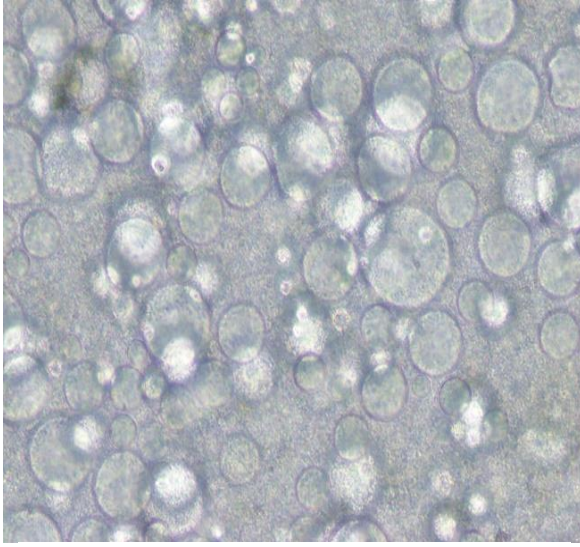


Şekil 4.15: 48 saatte 600 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

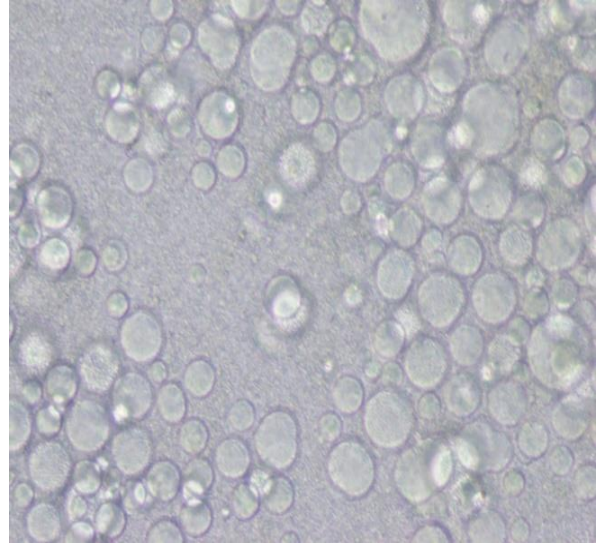
4.1.2. Propolisin Mikroskopik Yöntem Bulguları

Propolisin *B. hominis* üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan mikroskopik incelemelerde, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda inverted mikroskop altında 20'lik ve 40'luk objektiflerle bakıldı. Gözlem bulguları;

- Kontrol grubuna ait kültür plaklarında, 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.16-4.17)

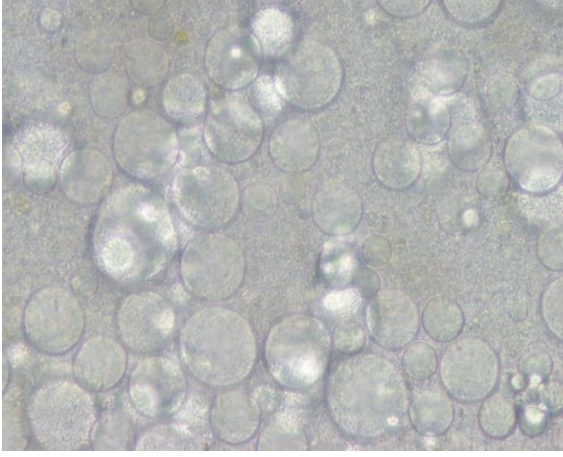


Şekil 4.16: *B. hominis*'in 24 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü.

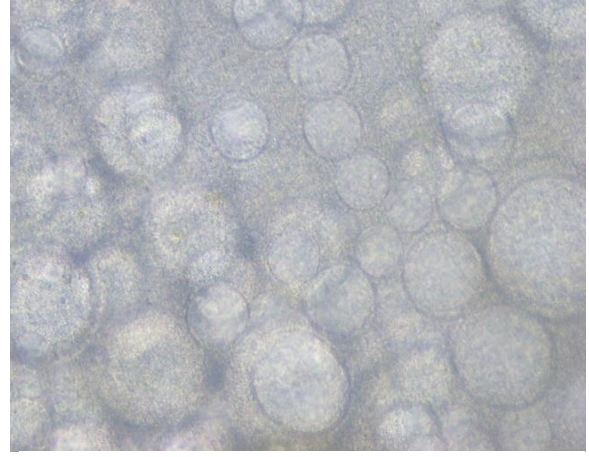


Şekil 4.17: *B. hominis*'in 48 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü.

- 31,25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda; 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.18-4.19).

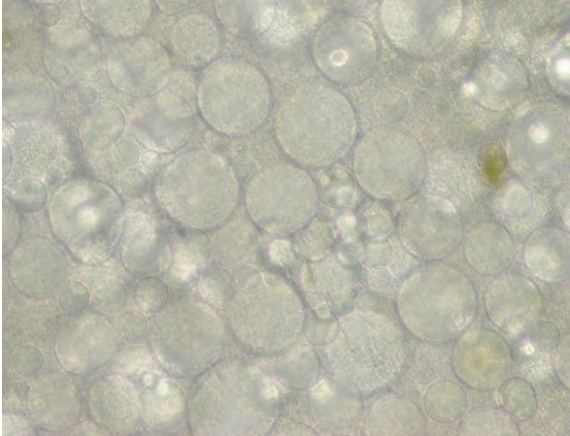


Şekil 4.18: 24 saatte 31,25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda görünüm.

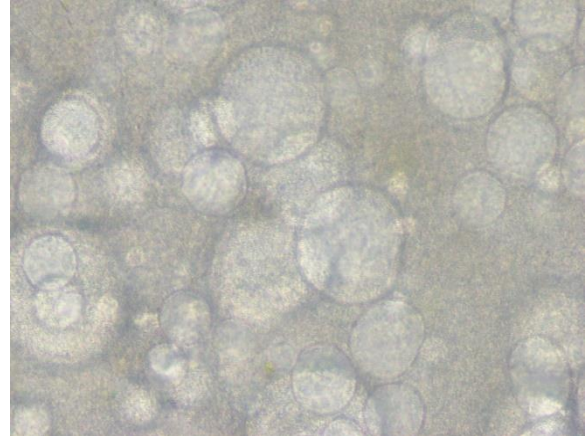


Şekil 4.19: 48 saatte 31,25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda görünüm.

- 62,5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda; 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.20-4.21).

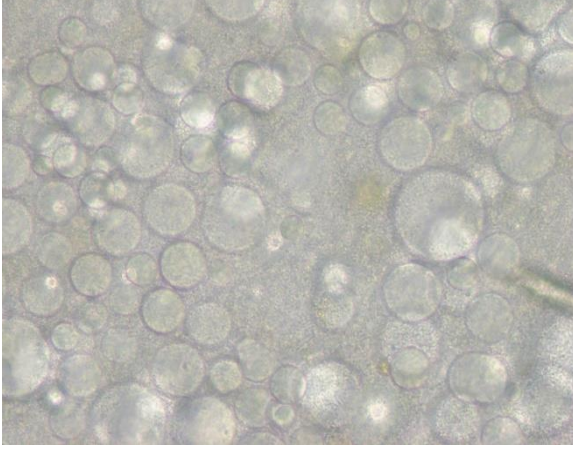


Şekil 4.20: 24 saatte 62,5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda görünüm.

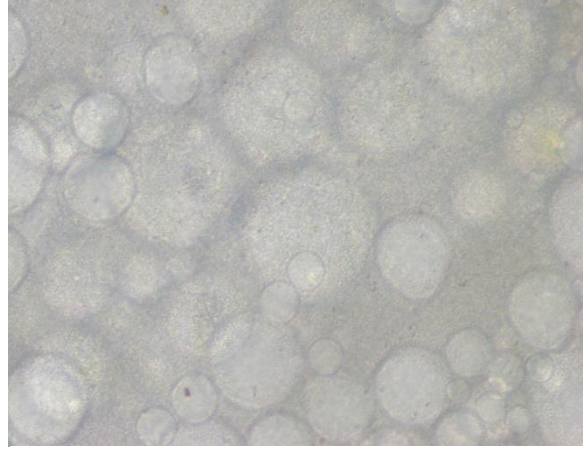


Şekil 4.21: 48 saatte 62,5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda görünüm.

- 125 µg/mL konsantrasyonunda; 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.22-4.23).

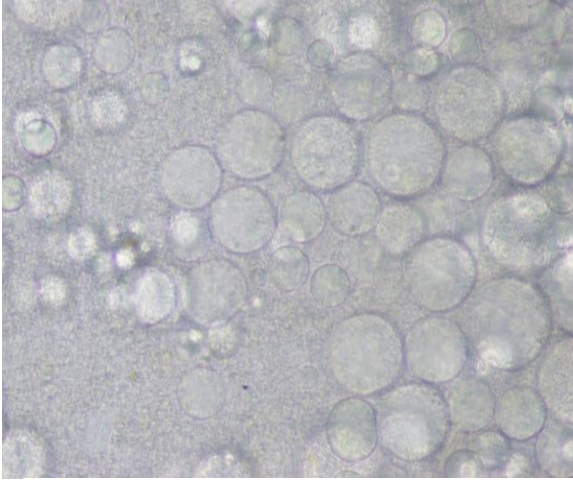


Şekil 4.22: 24 saatte 125 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

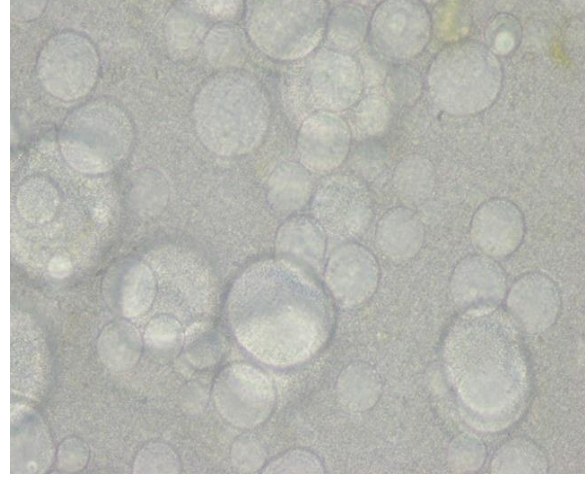


Şekil 4.23: 48 saatte 125 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

- 250 µg/mL konsantrasyonunda; 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.24-4.25).

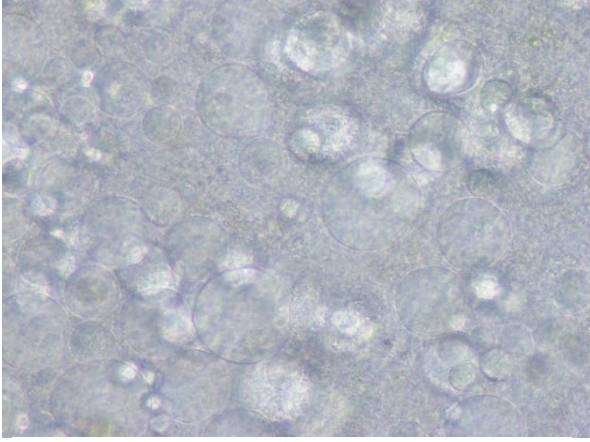


Şekil 4.24: 24 saatte 250 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

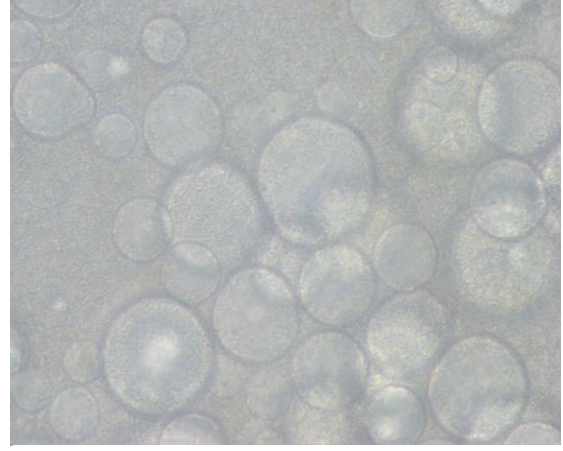


Şekil 4.25: 48 saatte 250 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

- 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda; 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.26-4.27).

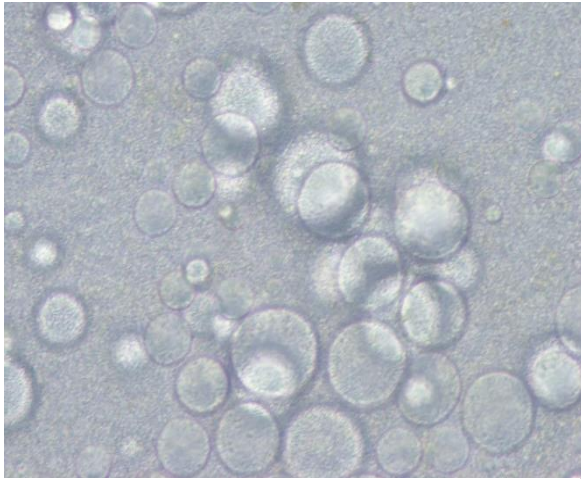


Şekil 4.26: 24 saatte 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda görünüm.

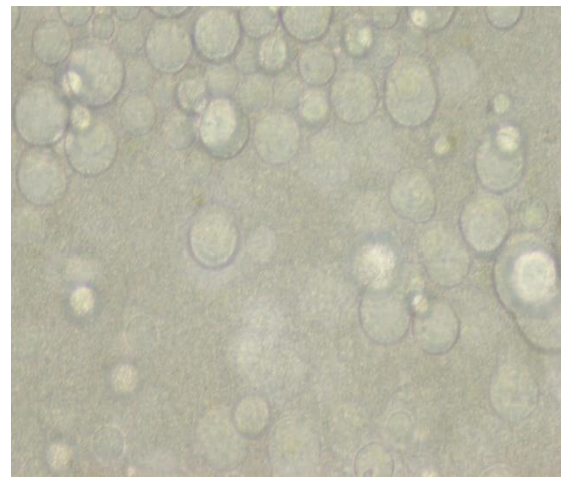


Şekil 4.27: 48 saatte 500 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda görünüm.

- 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda; 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.28-4.29).



Şekil 4.28: 24 saatte 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda görünüm.

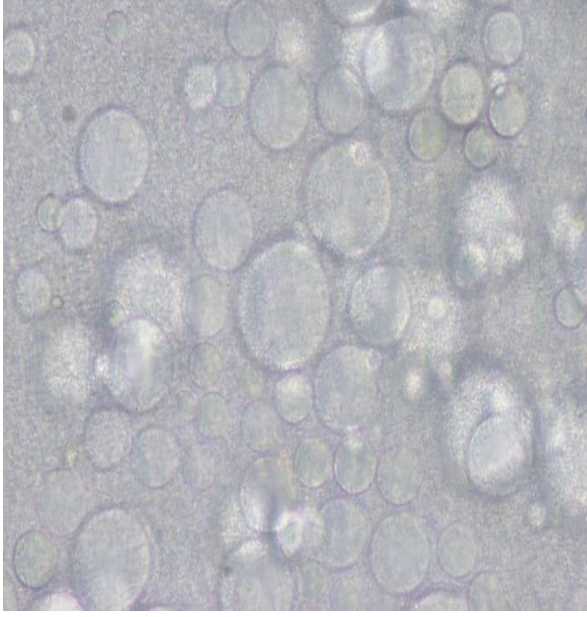


Şekil 4.29: 48 saatte 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda görünüm.

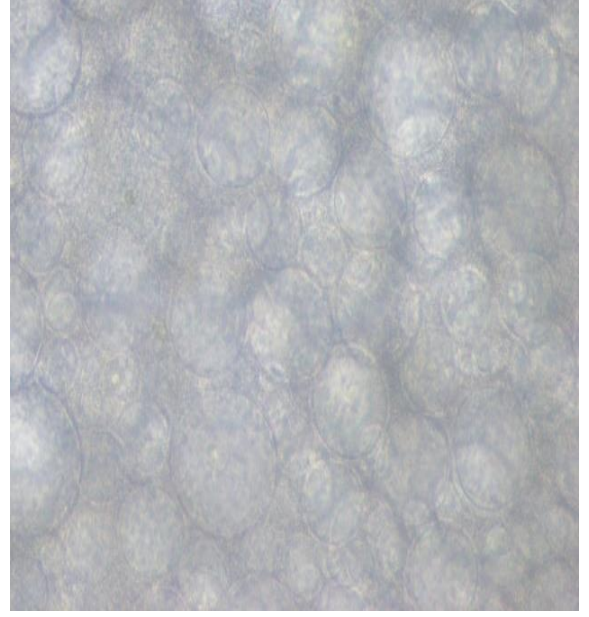
4.1.3. Sülük Salgı Ekstraktının Mikroskopik Yöntem Bulguları

Sülük salgı ekstraktının *B. hominis* üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan mikroskopik incelemelerde, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda inverted mikroskop altında 20'lik ve 40'lık objektiflerle bakıldı. Gözlem bulguları;

- Kontrol grubuna ait kültür plaklarında, 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.30-4.31).

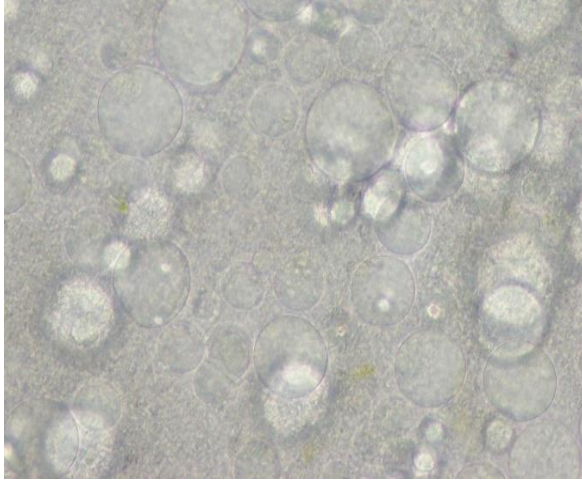


Şekil 4.30: *B. hominis*'in 24 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü.

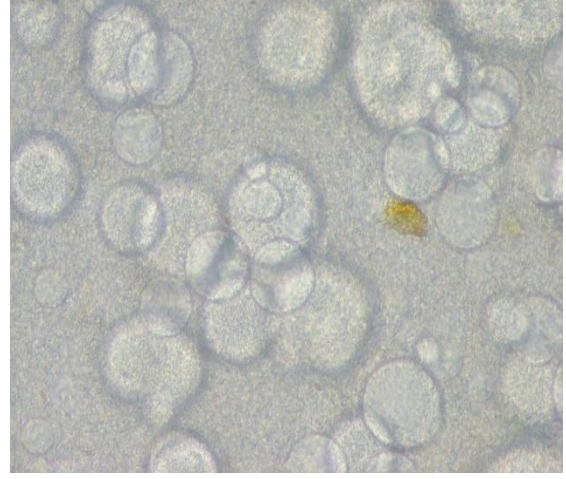


Şekil 4.31: *B. hominis*'in 48 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü.

- 3,125 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda ki sülük salgı ekstraktının uygulamasında, 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.32-4.33).

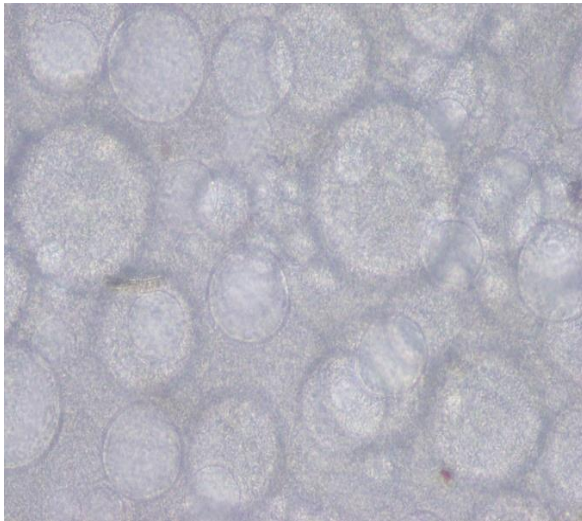


Şekil 4.32: 24 saatte 3,125 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda görünüm.

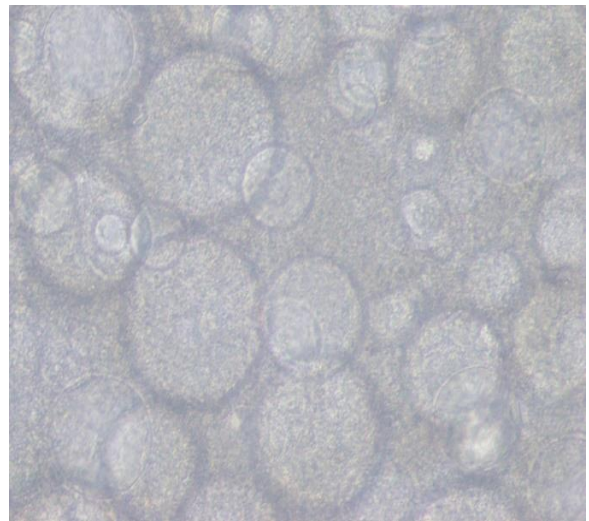


Şekil 4.33: 48 saatte 3,125 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda görünüm.

- 6,25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonunda; 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.34-4.35).

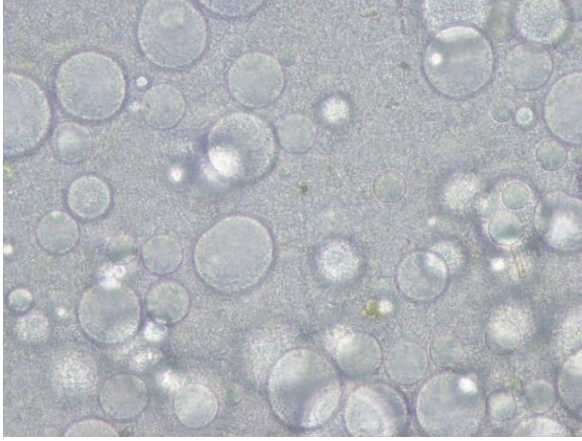


Şekil 4.34: 24 saatte 6,25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda görünüm.

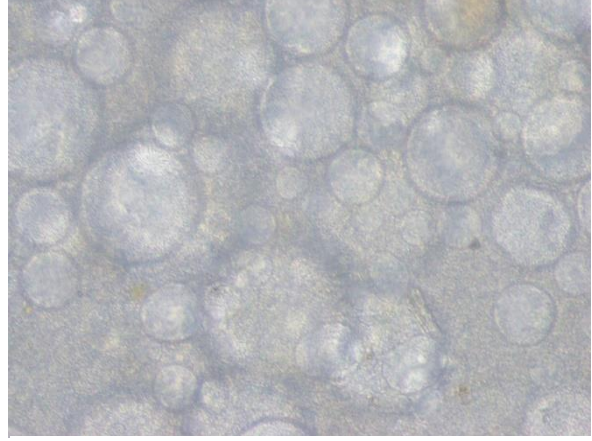


Şekil 4.35: 48 saatte 6,25 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda görünüm.

- 12,5 µg/mL konsantrasyonunda; 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.36-4.37).

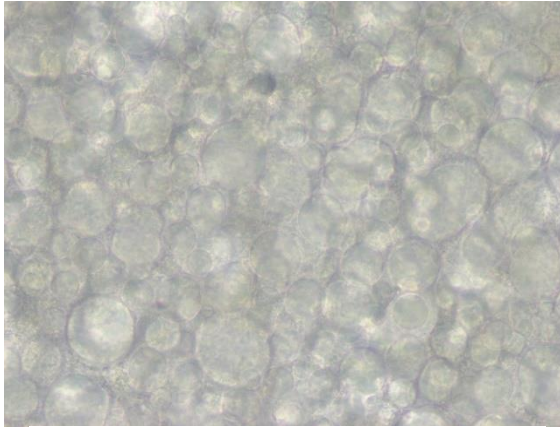


Şekil 4.36: 24 saatte 12,5 µg/mL konsantrasyonda görünüm

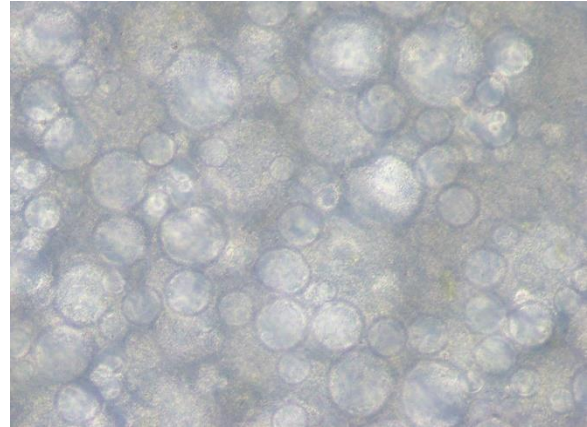


Şekil 4.37: 48 saatte 12,5 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

- 25 µg/mL konsantrasyonunda; 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.38-4.39).

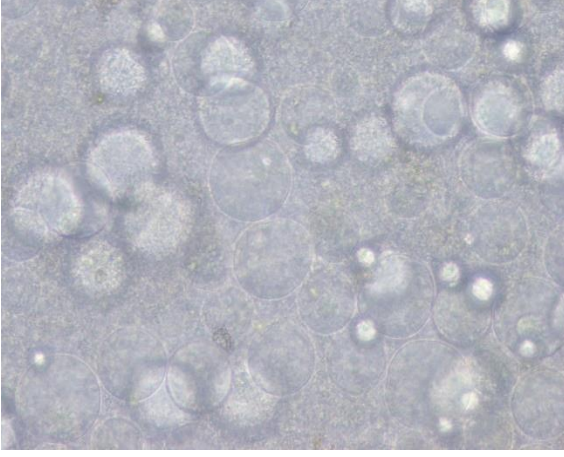


Şekil 4.38: 24 saatte 25 µg/mL konsantrasyonda görünüm

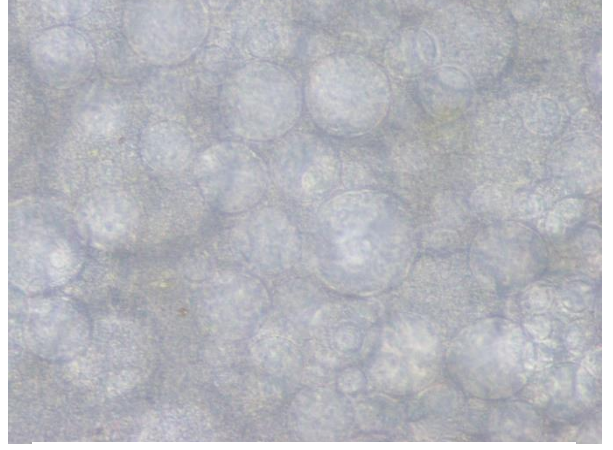


Şekil 4.39: 48 saatte 25 µg/mL konsantrasyonda görünüm

- 50 µg/mL konsantrasyonda, 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.40-4.41).

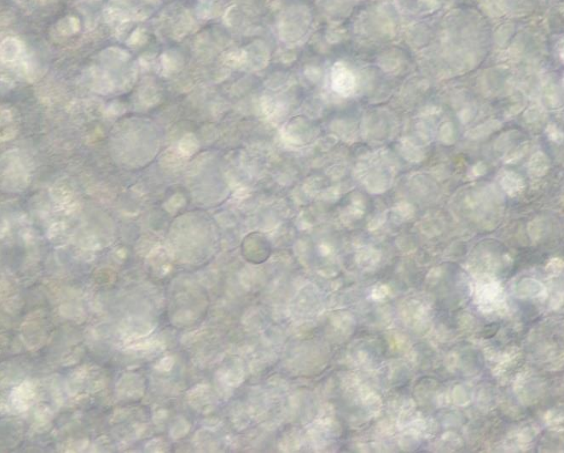


Şekil 4.40: 24 saatte 50 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

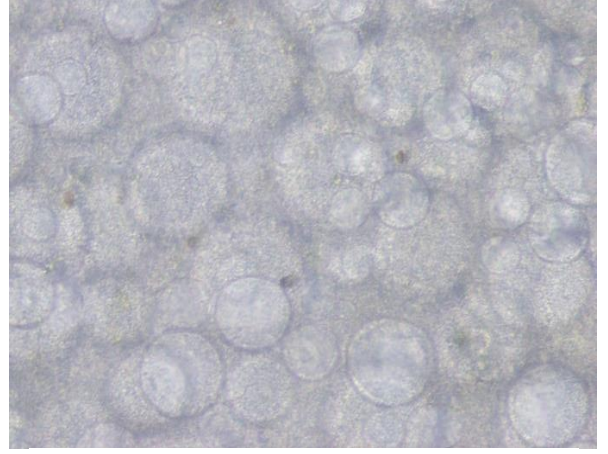


Şekil 4.41: 48 saatte 50 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

- 100 µg/mL konsantrasyonda, 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.42-4.43).



Şekil 4.42: 24 saatte 100 µg/mL konsantrasyonda görünüm

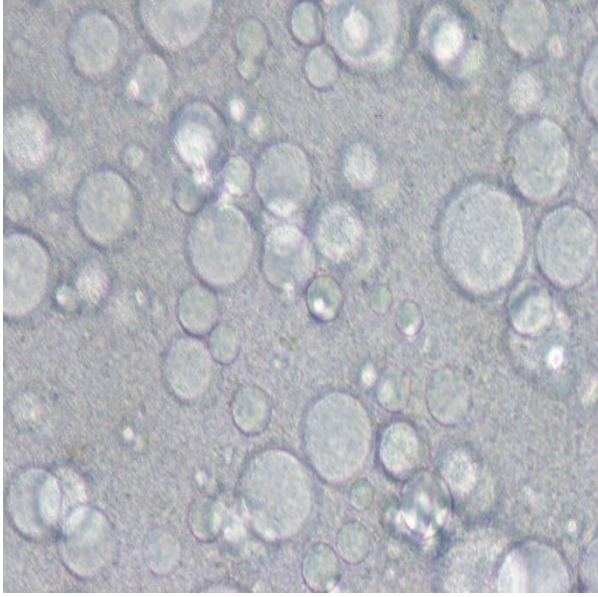


Şekil 4.43: 24 saatte 100 µg/mL konsantrasyonda görünüm

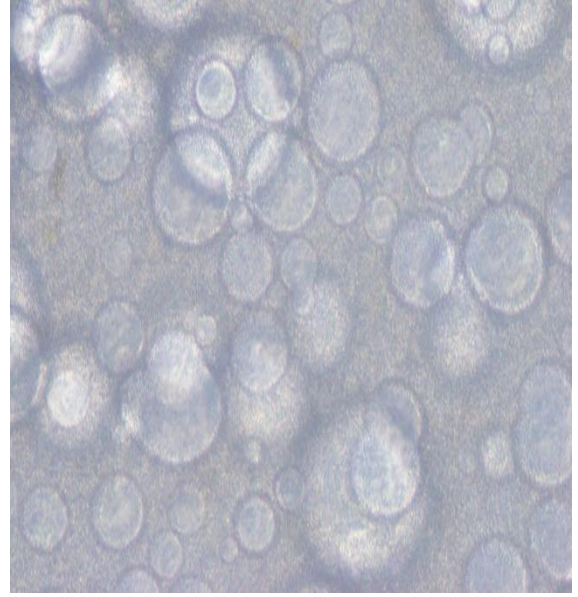
4.1.4. Metronidazolün Mikroskopik Yöntem Bulguları

Metronidazolün *B. hominis* üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan mikroskopik incelemelerde, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda inverted mikroskop altında 20'lik ve 40'luk objektiflerle bakıldı. Gözlem bulguları;

- Kontrol grubuna ait kültür plaklarında, 24 ve 48 saat sonunda yoğun bir hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlemlendi (Şekil 4.44-4.45).

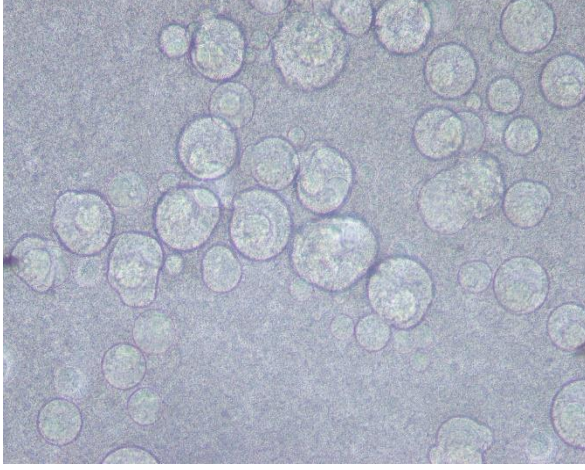


Şekil 2.44: *B. hominis*'in 24 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü.

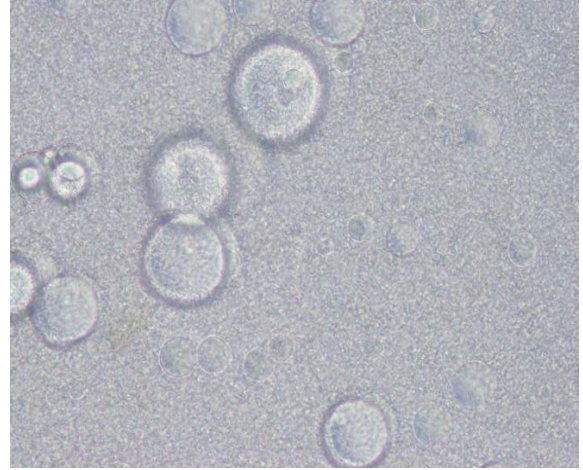


Şekil 2.45: *B. hominis*'in 48 saatlik inverted mikroskoptaki görünümü.

- 3,125 µg/mL konsantrasyonunda ki metronidazolün uygulamasında, 24 saatlik inkübasyon sonunda parazitlerin canlılık oranının yüksek olduğu gözlemlendi. Ancak 48 saatlik inkübasyonun ardından canlılık oranında belirgin bir azalma tespit edildi (Şekil 4.46-4.47).

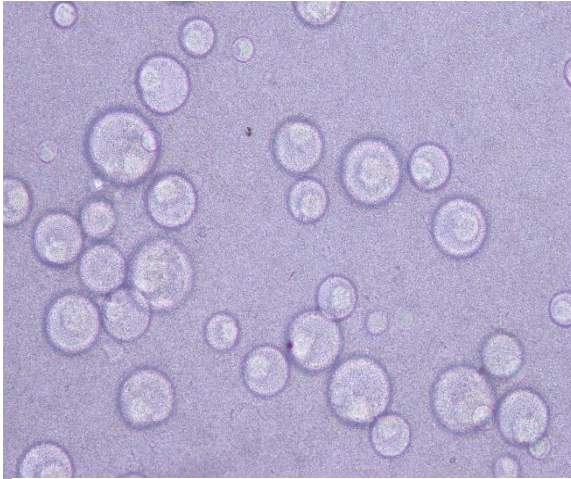


Şekil 4.46: 24 saatte 3,125 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

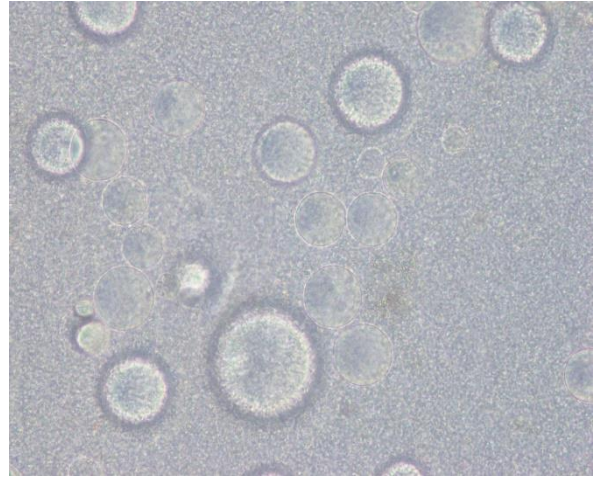


Şekil 4.47: 48 saatte 3,125 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

- 6,25 µg/mL konsantrasyonunda; 24 ve 48 saat sonunda canlılık oranında azalmalar olduğu gözlemlendi (Şekil 4.48-4.49).

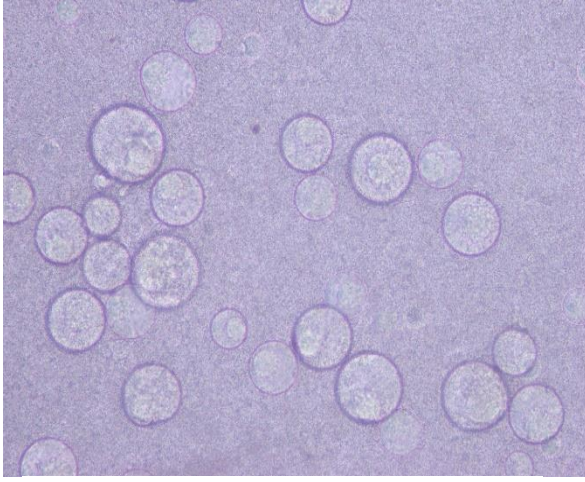


Şekil 4.48: 24 saatte 6,25 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

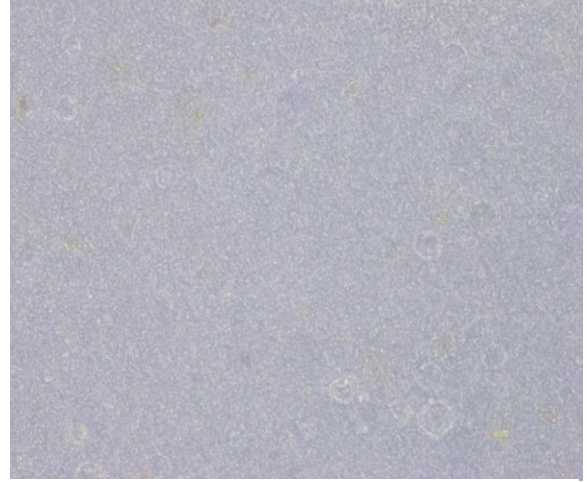


Şekil 4.49: 48 saatte 6,25 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

- 12,5 µg/mL konsantrasyonunda; 24 saat sonunda canlılık oranının orta yoğunlukta olduğu, 48 saat sonunda canlılık oranında azalmalar olduğu gözlemlendi (Şekil 4.50-4.51).

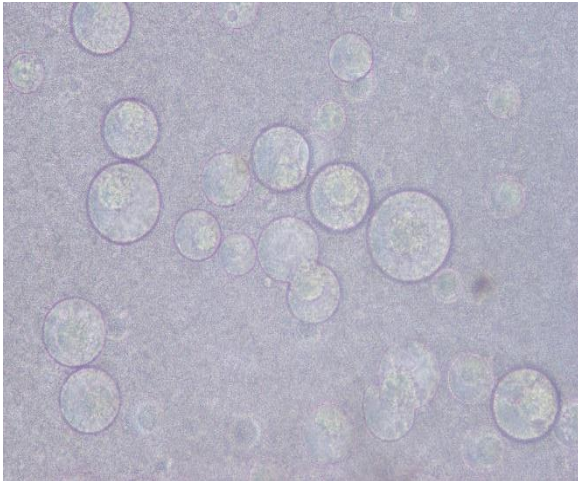


Şekil 4.50: 24 saatte 12,5 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

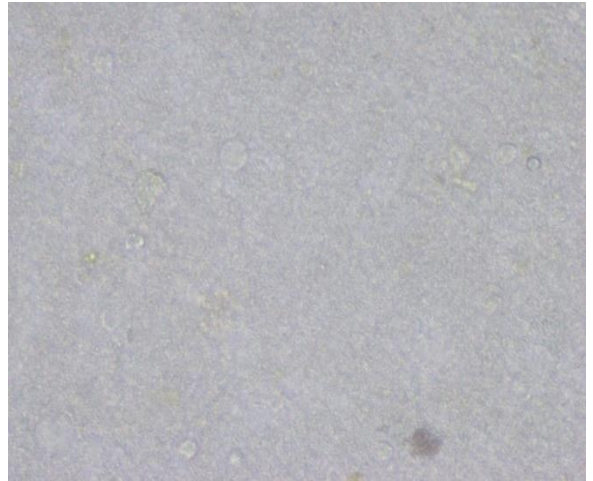


Şekil 4.51: 48 saatte 12,5 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

- 25 µg/mL konsantrasyonunda; 24 saat sonunda canlılık oranında belirgin bir değişiklik olmadığı ve 48 saat sonunda canlılık oranında azalmalar olduğu gözlemlendi (Şekil 4.52-4.53).

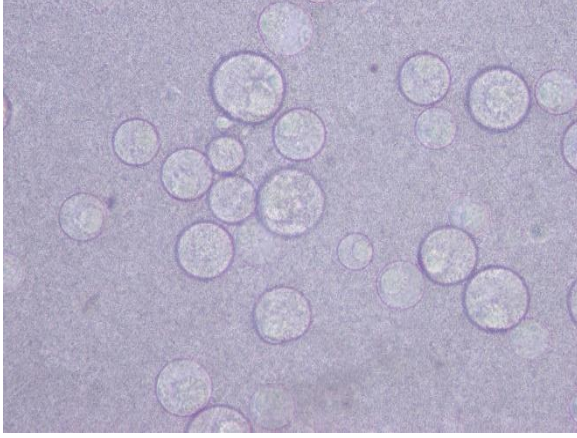


Şekil 4.52: 24 saatte 25 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

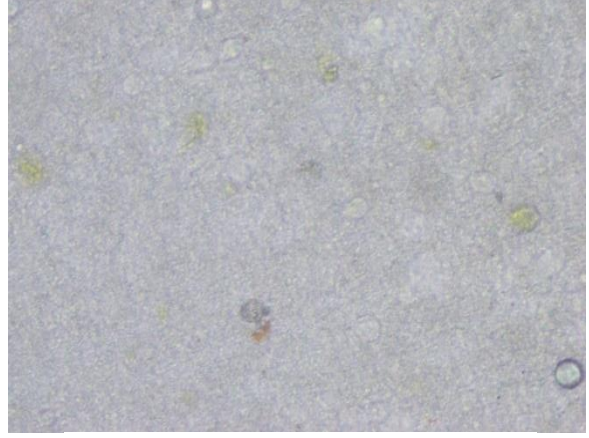


Şekil 4.53: 48 saatte 25 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

- 50 µg/mL konsantrasyonunda; 24 saat sonunda canlılık oranında belirgin bir değişiklik olmadığı ve 48 saat sonunda canlılık oranında azalmalar olduğu gözlemlendi (Şekil 4.54-4.55).

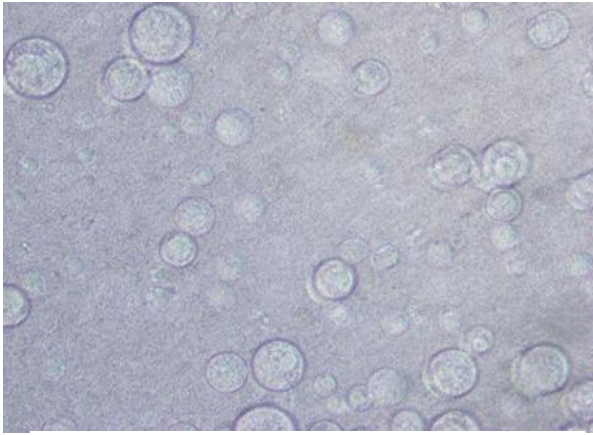


Şekil 4.54: 24 saatte 50 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

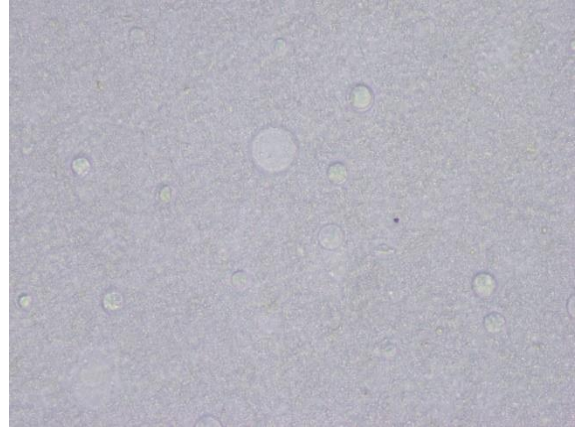


Şekil 4.55: 48 saatte 50 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

- 100 µg/mL konsantrasyonunda; 24 saat sonunda canlılık oranında belirgin bir değişiklik olmadığı ve 48 saat sonunda canlılık oranında azalmalar olduğu gözlemlendi (Şekil 4.56-4.57).



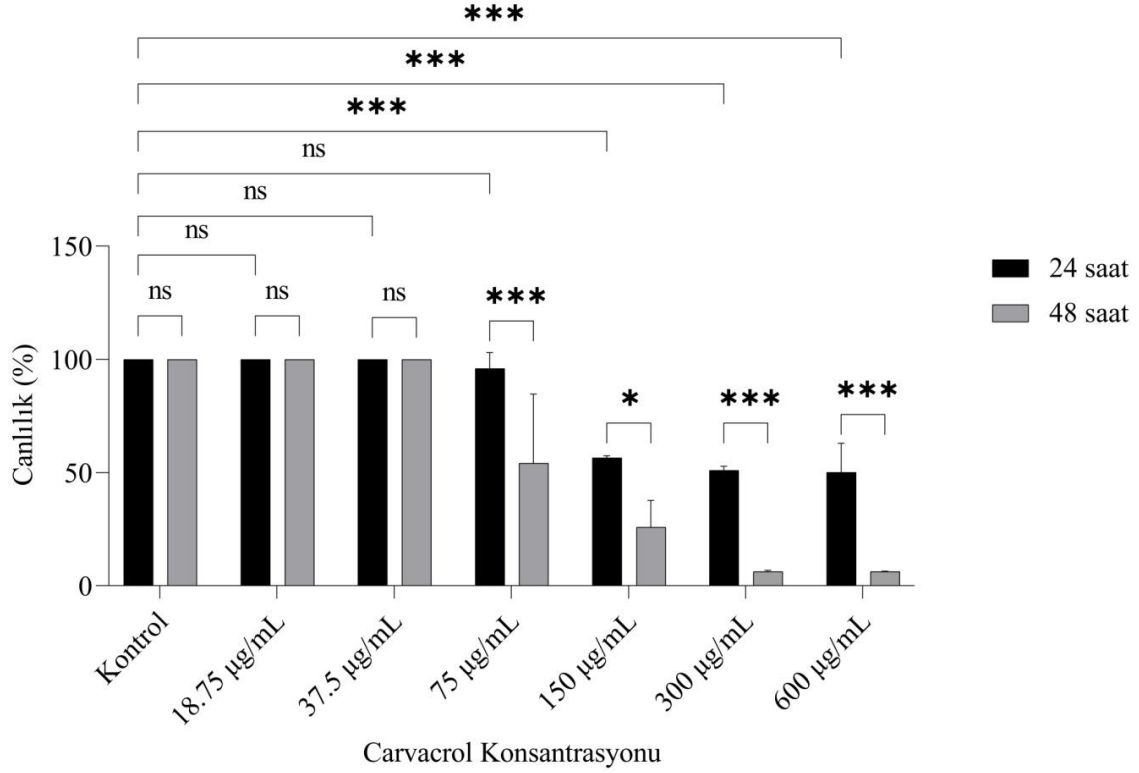
Şekil 4.56: 24 saatte 100 µg/mL konsantrasyonda görünüm.



Şekil 4.57: 48 saatte 100 µg/mL konsantrasyonda görünüm.

4.2. Absorbans Ölçümü ile İstatistiksel Analiz Bulguları

4.2.1 Carvacrolün Absorbans Ölçümü ile İstatistiksel Analiz Bulguları



Şekil 4.58: Carvacrolün farklı konsantrasyonlarda *B. hominis* canlılığı üzerine etkisi (CCK-8 yöntemi ile ölçülen absorbans değerleri).

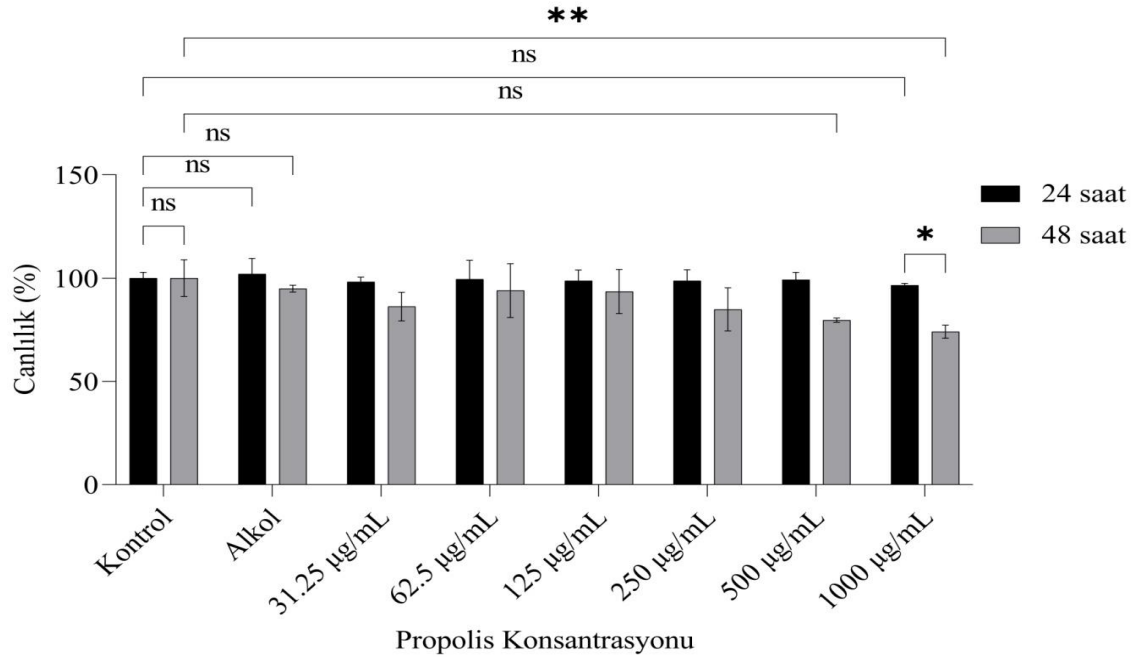
24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda CCK-8 testi ile elde edilen absorbans değerlerine göre canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. Siyah sütunlar 24 saatlik, gri sütunlar ise 48 saatlik inkübasyon süresini temsil etmektedir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: ns: $p>0,05$ (anlamsız), *: $p<0,05$, **: $p<0,001$.

Carvacrolün farklı konsantrasyonlarının *B. hominis* canlılığı üzerindeki etkisi, CCK-8 (Cell Counting Kit-8, WST-8 bazlı) yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Bu yöntem, canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından WST-8 substratının suda çözünebilen formazan bileşiğine dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan formazanın miktarı, hücre canlılığı ile doğru orantılı olup mikropłaka okuyucuda 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri doğrultusunda 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde carvacrolün farklı konsantrasyonlara ait ortalama canlılık oranları istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Düşük doz konsantrasyonları olan 18,75 ve 37,50 µg/mL gruplarında, her iki inkübasyon süresinde de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ($p > 0,05$). Bu sonuç, carvacrolün düşük dozlarda *B. hominis* canlılığı üzerinde belirgin bir inhibitör etki göstermediğini ortaya koymaktadır. Buna karşın, 75 µg/mL konsantrasyonunda ise iki zaman arasında belirgin bir ayrışma meydana gelmiştir. 24 saat sonunda canlılık kontrol düzeyine yakın seyrederken, 48 saatlik inkübasyon sonunda canlılık oranında anlamlı bir azalma tespit edildi ($p < 0,001$). Bu durum, carvacrolün belirli bir eşik konsantrasyonun üzerinde zamana bağlı antiparaziter etki göstermeye başladığını göstermektedir. Carvacrolün etkisinin belirgin hale geldiği konsantrasyon 150 µg/mL olmuştur. Bu dozda 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda canlılıkta azalma izlendi; 48 saatlik inkübasyonda ise bu azalma istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı hale geldi ($p < 0,001$). En yüksek dozlar olan 300 ve 600 µg/mL konsantrasyonlarında hem 24 saat hem de 48 saat sonunda canlılık oranlarında kontrol grubuna göre çok yüksek düzeyde anlamlı azalmalar tespit edildi ($p < 0,001$). Özellikle 600 µg/mL 48 saat uygulamasında canlılık oranının neredeyse sıfır düzeyine kadar düştüğü belirlendi. Bu sonuç, carvacrolün yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antiparaziter aktiviteye sahip olduğunu desteklemektedir.

Genel olarak elde edilen veriler, carvacrolün doza ve zamana bağımlı olarak *B. hominis* canlılığını anlamlı biçimde azalttığını ve yüksek konsantrasyonlarda etkili bir antiparaziter potansiyele sahip olduğunu desteklemektedir.

4.2.2 Propolisin Absorbans Ölçümü ile İstatistiksel Analiz Bulguları



Şekil 4.59: Propolisin farklı konsantrasyonlarda *B. hominis* canlılığı üzerine etkisi (CCK-8 yöntemi ile ölçülen absorbans değerleri).

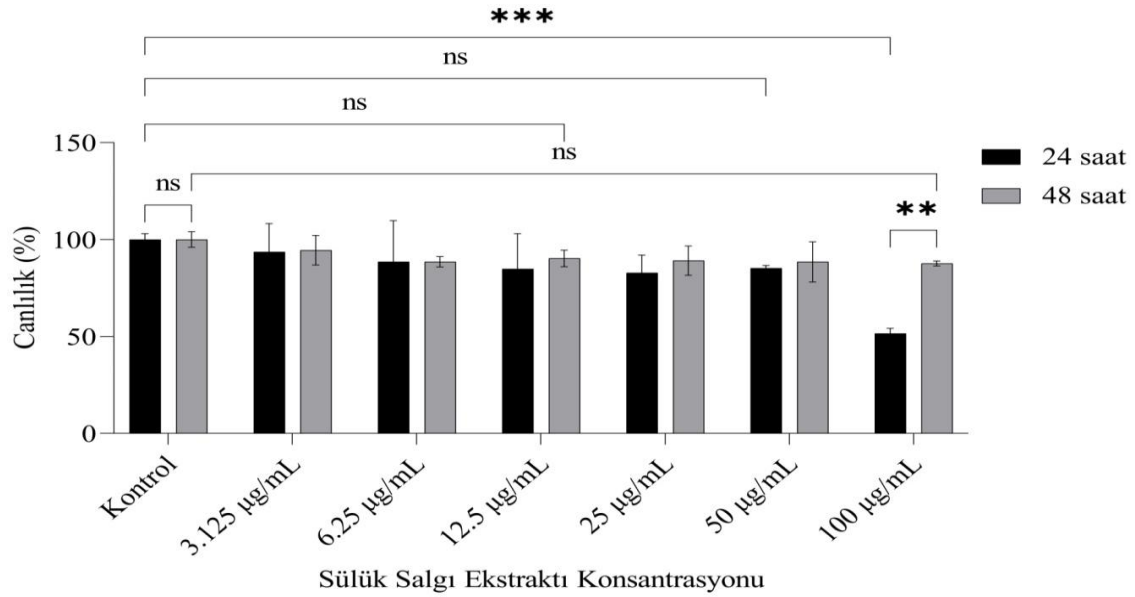
24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda CCK-8 testi ile elde edilen absorbans değerlerine göre canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. Siyah sütunlar 24 saatlik, gri sütunlar ise 48 saatlik inkübasyon süresini temsil etmektedir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: ns: $p > 0,05$ (anlamsız), : $p < 0,05$, **: $p < 0,001$.

Propolisin farklı konsantrasyonlarının *B. hominis* canlılığı üzerindeki etkisi, CCK-8 (Cell Counting Kit-8, WST-8 bazlı) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu yöntem, canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından WST-8 substratının suda çözünebilen formazan bileşiğine dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Elde edilen formazan miktarı, hücrelerin metabolik aktivitesiyle orantılı olup, 450 nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda ölçüldü. Ölçülen absorbans değerleri kullanılarak 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde propolisin farklı konsantrasyonlarına ait ortalama canlılık oranları istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Uygulamalar 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde gerçekleştirildi, elde edilen absorbans değerleri kontrol grubuna göre yüzde canlılık oranına dönüştürüldü. Sonuçlar incelendiğinde, 24 saatlik inkübasyon süresinde tüm propolis konsantrasyonlarında hücre canlılığı oranları kontrol grubuna benzer bulunmuş ($p > 0,05$). 48 saatlik inkübasyon süresinde ise özellikle 500 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında

canlılık oranında azalma gözlemlendi. Bu azalma yalnızca 1000 µg/mL konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$).

Elde edilen bulgular, propolisin düşük ve orta konsantrasyonlarda hücre canlılığını etkilemediğini; ancak yüksek konsantrasyonlarda ve uzun süreli uygulamalarda doza ve zamana bağlı sitotoksik etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

4.2.3 Sülük Salgı Ekstraktının Absorbans Ölçümü ile İstatistiksel Analiz Bulguları



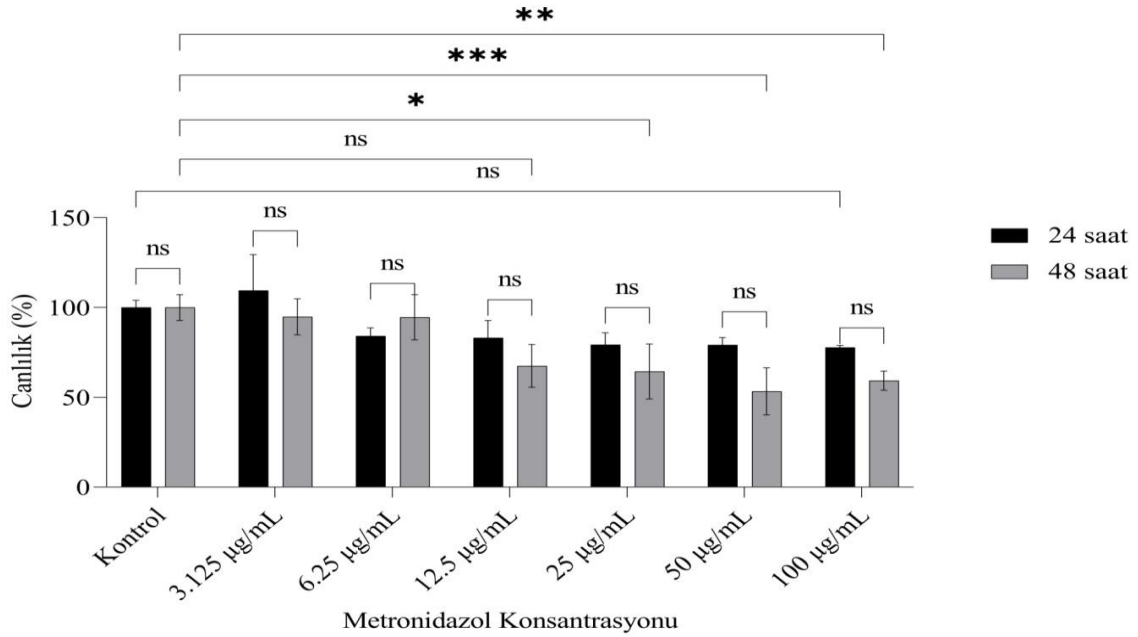
Şekil 4.60: Sülük Salgı Ekstraktının farklı konsantrasyonlarda *B. hominis* canlılığı üzerine etkisi (CCK-8 yöntemi ile ölçülen absorbans değerleri).

24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda CCK-8 testi ile elde edilen absorbans değerlerine göre canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. Siyah sütunlar 24 saatlik, gri sütunlar ise 48 saatlik inkübasyon süresini temsil etmektedir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: ns: $p>0,05$ (anlamsız), : $p<0,05$, **: $p<0,001$.

Sülük salgı ekstraktının farklı konsantrasyonlarının *B. hominis* canlılığı üzerindeki etkisi, CCK-8 (Cell Counting Kit-8, WST-8 bazlı) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu yöntem, canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından WST-8 substratının suda çözünebilir formazan bileşiğine dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Elde edilen formazan miktarı, hücrelerin metabolik aktivitesiyle orantılı olup, 450 nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri kontrol grubuna göre yüzde canlılık oranına dönüştürüldü. Uygulamalar 24 ve 48 saatlik inkübasyon

sürelerinde gerçekleştirildi. Elde edilen bulgulara göre 3,125–50 µg/mL konsantrasyon aralığında her iki inkübasyon süresinde de kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanmadı ($p > 0,05$). En yüksek doz olan 100 µg/mL konsantrasyonunda 24 saatlik inkübasyon sonunda canlılık oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p < 0,01$). Ancak aynı konsantrasyonun 48 saatlik inkübasyonunda canlılık oranlarının tekrar kontrol grubuna yakın seviyelere yükseldiği belirlenmiştir. Genel olarak sonuçlar, sülük salgı ekstraktının *B. hominis* üzerinde kalıcı ve doz-bağımlı bir antiparaziter etki göstermediğini, yalnızca yüksek dozda kısa süreli bir etki oluşturduğunu ancak bu etkinin uzun inkübasyon süresinde sürdürülebilir olmadığını ortaya koymaktadır.

4.2.4 Metronidazolün Absorbans Ölçümü ile İstatistiksel Analiz Bulguları



Şekil 4.61: Metronidazolün farklı konsantrasyonlarda *B. hominis* canlılığı üzerine etkisi (CCK-8 yöntemi ile ölçülen absorbans değerleri).

24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda CCK-8 testi ile elde edilen absorbans değerlerine göre canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. Siyah sütunlar 24 saatlik, gri sütunlar ise 48 saatlik inkübasyon süresini temsil etmektedir. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: ns: $p > 0,05$ (anlamsız), : $p < 0,05$, **: $p < 0,001$.

Metronidazolün farklı konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerindeki etkisi CCK-8 (WST-8 temelli) hücre proliferasyon testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Canlı hücreler tarafından

indirgenen WST-8 substratının oluşturduğu formazan miktarı 450 nm dalga boyunda ölçülmüş ve elde edilen absorbans değerleri kontrol grubuna göre yüzde canlılık oranına dönüştürüldü. Uygulamalar 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde gerçekleştirildi. Düşük konsantrasyonlarda (3,125, 6,25 ve 12,5 µg/mL) metronidazol uygulamasının hem 24 saat hem de 48 saat sonunda parazit canlılığı üzerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir etki oluşturmadığı belirlendi ($p > 0,05$). Bu bulgu, düşük doz metronidazolün *B. hominis* üzerinde belirgin bir inhibitör etki göstermediğini ortaya koymaktadır. Orta konsantrasyonlarda (25 ve 50 µg/mL) canlılık oranlarında kademeli bir azalma eğilimi gözlenmiş olmakla birlikte, bu düşüşlerin çoğu istatistiksel olarak sınırlı düzeyde kaldı. Buna karşın, en yüksek konsantrasyon olan 100 µg/mL uygulamasında özellikle 48 saatlik inkübasyon sonunda canlılık oranında belirgin ve istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı bir azalma saptandı ($p < 0,001$). Genel olarak metronidazolün *B. hominis* üzerindeki etkisinin doza ve zamana bağımlı olduğu; düşük dozlarda yetersiz kalırken yüksek doz ve uzun süreli maruziyette belirgin antiparaziter aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

B. hominis enfeksiyonlarının klinik önemi, parazitin geniş alt tip çeşitliliği, patojenite potansiyelindeki farklılıklar ve konvansiyonel tedavi seçeneklerine karşı gelişen yanıt sorunları nedeniyle son yıllarda giderek artmaktadır. Özellikle metronidazolün blastocystosis tedavisinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, klinik yanıt oranlarının değişkenlik göstermesi, nükslerin sık görülmesi ve ilaca bağlı yan etkiler, alternatif ve tamamlayıcı tedavi ajanlarının araştırılmasını gerekli kılmaktadır (13,16). Ayrıca *Blastocystis* alt tipleri arasındaki biyolojik farklılıkların, tedavi başarısını doğrudan etkileyebileceği ve standart tedavi yaklaşımlarının her hastada aynı etkiyi göstermediği bildirilmektedir (46).

Bu bağlamda, doğal kökenli biyolojik ve bitkisel bileşiklerin protozoonlara karşı gösterdiği antiprotozoal aktiviteler, son yıllarda yapılan deneysel ve klinik çalışmalarla giderek daha ayrıntılı biçimde ortaya konulmaktadır. Fenolik bileşikler başta olmak üzere bazı doğal ajanların, protozoonların hücre zarı bütünlüğünü bozarak, metabolik süreçlerini inhibe ederek ve oksidatif stres üzerinden etki göstererek antiparaziter aktivite sergilediği bildirilmektedir. Bu tür ajanların, klasik kemoterapötiklere kıyasla hücre zarı ve metabolik süreçler gibi birden fazla hedef üzerinden etki göstermesi, literatürde direnç gelişimi açısından potansiyel bir avantaj sağlayabileceği yönünde yorumlanmaktadır (17,49). Bu çalışmada, sülük salgı ekstraktı, propolis ve carvacrolün *B. hominis*'in in vitro gelişimi üzerindeki etkileri hem mikroskopik inceleme hem de CCK-8 temelli absorbans ölçümleri ile değerlendirilmiştir.

Kekikten elde edilen carvacrol, fenolik yapıda bir monoterpen bileşik olup güçlü antimikrobiyal ve antiprotozoal özellikler göstermektedir (17). Carvacrolün bu biyolojik aktivitesinin, molekül yapısında bulunan fonksiyonel hidroksil grupları ve yüksek redoks potansiyeli ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Bu yapısal özellikler sayesinde carvacrol, mikroorganizmaların hücre zarında proton geçirgenliğini artırarak zar potansiyelini bozmakta, membran bütünlüğünün kaybına ve hücresel homeostazın bozulmasına yol açmaktadır. Bu süreçlerin, enerji metabolizmasının baskılanması ve hücre içi denge mekanizmalarının işlevini yitirmesiyle birlikte hücre canlılığında belirgin bir azalma ile

ilişkili olduğu bildirilmektedir (18). Yapılan çalışmalarda kekik ve ana bileşenleri olan thymol ve carvacrol dâhil olmak üzere çeşitli uçucu yağların protozoonlar üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. *Cryptosporidium parvum* üzerine yapılan in vitro çalışmalarda thymol ve türevinin parazitin enfektifliğini ve büyümesini doz-bağımlı olarak inhibe ettiği rapor edilmiştir (50). *Giardia lamblia* ile yürütülen in vitro çalışmalarda carvacrol ve thymolün trophozoit proliferasyonunu, hücre motilitesini ve adezyon yeteneğini belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir (51). Ayrıca *Leishmania infantum* promastigotları üzerinde yapılan deneysel araştırmalarda carvacrol ve thymolün antileishmanial aktivite gösterdiği bildirilmiştir (52).

Çalışmamızda elde edilen bulgular, özellikle carvacrolün *B. hominis* üzerinde doz ve zamana bağlı olarak belirgin bir antiparaziter etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Kontrol grubunda, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda yoğun hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı izlenmiş olup, bu durum *B. hominis*'in kültür koşullarında proliferasyonunu sürdürdüğünü göstermektedir. Buna karşılık, carvacrol uygulanan gruplarda hem hücre canlılığı hem de CCK-8 yöntemiyle elde edilen absorbans değerlerinin konsantrasyon ve inkübasyon süresine bağlı olarak anlamlı biçimde azaldığı saptanmıştır. Carvacrolün *B. hominis* üzerindeki etkileri hem inverted mikroskopik incelemeler hem de absorbans ölçümleri değerlendirildiğinde, 75 µg/mL konsantrasyondan itibaren antiparaziter etkinin gerçekleştiği görülmüştür. Bu konsantrasyonda, 24 saatlik inkübasyon sonunda parazit canlılığının kontrol grubuna kıyasla azalmaya başladığı, 48 saatlik inkübasyon sonunda ise canlılık oranındaki düşüşün belirgin hale geldiği tespit edilmiştir. Konsantrasyon artışı ile antiparaziter etkinin arttığı, özellikle 300 ve 600 µg/mL dozlarında parazit canlılığının ciddi düzeyde baskılandığı gözlemlenmiştir. En yüksek konsantrasyon olan 600 µg/mL'de, 24 saat sonunda parazit canlılığının kontrol grubuna göre belirgin şekilde azaldığı, 48 saatlik inkübasyon sonunda ise canlılığın neredeyse tamamen ortadan kalktığı hem mikroskopik bulgular hem de absorbans ölçümleri ile ortaya konmuştur. Yapılan çalışmada, *B. hominis* izolatları %10 at serumu ile desteklenmiş Jones besiyerinde üreyen vakuoler ve granüler formları Thoma lamı kullanılarak sayılmış ve canlılık değerlendirmesi %0.01 eozin boyaması ile gerçekleştirilmiştir. *T. vulgaris* etanol ekstraktı, 0,5–4 mg/mL konsantrasyon aralığında uygulanmış 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyon süreleri sonunda parazit canlılığı değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, kekik ekstraktının doz ve zamana bağlı olarak *B. hominis* canlılığını anlamlı düzeyde azalttığını ve yüksek konsantrasyonlarda canlı organizmanın gözlenmediği minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerlerine

ulaşıldığını ortaya koymuştur. Ayrıca mikroskopik incelemelerde etkenin morfolojik yapısında dejeneratif değişiklikler ve proliferasyon kapasitesinde belirgin azalma bildirilmiştir (15). Bulgularımız, El-Sayed [16] tarafından gerçekleştirilen ve *Thymus vulgaris* etanol ekstraktının *B. hominis* üzerindeki in vitro etkisini değerlendiren çalışma ile uyum göstermektedir. Her iki çalışmada elde edilen bulgular, kekik kaynaklı bileşiklerin *B. hominis* canlılığı üzerinde doz ve zamana bağlı inhibitör etki oluşturduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, tarafımızca yapılan çalışmada inverted mikroskopik incelemelere ek olarak CCK-8 temelli absorbans ölçümlerinin kullanılması, antiparaziter etkinin nicel olarak daha duyarlı biçimde ortaya konulmasına olanak sağlamış, carvacrolün *B. hominis* üzerindeki etkisinin konsantrasyon artışı ve inkübasyon süresiyle birlikte belirgin biçimde arttığını göstermiştir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular, carvacrolün doz ve zamana bağlı belirgin antiparaziter etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Kontrol grubunda, 24 ve 48 saat sonunda yoğun hücre üremesi ve yüksek canlılık oranı gözlenirken, carvacrol uygulanan gruplarda hücre canlılığı ile CCK-8 yöntemiyle ölçülen absorbans değerlerinin konsantrasyon ve inkübasyon süresine bağlı olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır. Düşük konsantrasyonlarda (18,75–37,5 µg/mL), hem mikroskopik incelemelerde hem de absorbans ölçümlerinde canlılığın kontrol grubuna benzer düzeyde olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık, orta ve yüksek konsantrasyonlarda (75–600 µg/mL), özellikle 48 saatlik inkübasyon sonunda, parazit canlılığında belirgin azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar, carvacrolün antiparaziter etkisinin doz ve süreye bağımlı olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, carvacrolün daha önce farklı bazı protozoon türleri üzerindeki etkinliğini ortaya koyan çalışmalara (50,51,52) paralel olup, doğal fenolik bileşiklerin *B. hominis* tedavisinde potansiyel alternatif ajanlar olarak değerlendirilebileceğini desteklemektedir.

Propolis, fenolik bileşikler ve flavonoidler bakımından zengin doğal bir ürün olup güçlü antibakteriyel, antiviral, antifungal ve antiparaziter özellikler göstermektedir (56). Propolisin antiprotozoal biyolojik aktivitesinin, içerdiği fenolik bileşikler ve flavonoidlerden kaynaklandığı bildirilmektedir. Bu bileşenlerin protozoon hücre zarında geçirgenliği artırarak membran bütünlüğünü bozmakta, iyon dengesini ve zar potansiyelini değiştirmekte, buna bağlı olarak da hücre homeostazı bozmaktadır. Bu yapısal hasarın enerji metabolizmasının baskılanmasına ve proliferasyon yeteneğinin azalmasına yol açarak hücre canlılığında belirgin düşüşe neden olduğu bildirilmektedir. (61).

Yapılan çalışmalarda propolis ve içerdiği biyolojik olarak aktif bileşenler dâhil olmak üzere çeşitli propolis ekstraktlarının protozoonlar üzerinde inhibitör etki oluşturduğu bildirilmiştir. *Giardia lamblia* üzerine yapılan bir çalışmada, *Giardia lamblia* üzerine yapılan çalışmada Sonoran bölgesine ait propolis örnekleri 25–500 µg/mL konsantrasyon aralığında uygulanmış; 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda trofozoit proliferasyonu hem mikroskopik sayım hem de canlılık testleri ile değerlendirilmiştir. (57). Benzer şekilde, başka bir çalışmada ethanolic propolis ekstraktının *Giardia duodenalis* trophozoitlerinin motilitesini ve adezyon yeteneğini azalttığı bulunmuştur (58). Ayrıca *Blastocystis spp.* üzerine yapılan in vitro değerlendirmelerde propolisin yüksek konsantrasyonlarda parazitin büyümesini inhibe ettiği ve metronidazole benzer inhibisyon etkisi gösterdiği bildirilmiştir (56). Yine propolis ile yapılan çalışmalarda, Hatay ve Bursa bölgelerinden elde edilen propolis örneklerinin, *Leishmania infantum* ve *Leishmania tropica* promastigotlarının büyümesini in vitro ortamda konsantrasyona bağlı olarak anlamlı şekilde inhibe ettiği, özellikle yüksek konsantrasyonlarda parazitik proliferasyonun belirgin şekilde azaldığı rapor edilmiştir (60).

Etanolik propolis ekstraktı *Giardia duodenalis* trofozoitlerine 125, 250 ve 500 µg/mL konsantrasyonlarda uygulanmış; 24–96 saatlik inkübasyon süresince parazit proliferasyonu mikroskopik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, propolisin doz artışıyla birlikte trofozoit büyümesini anlamlı şekilde baskıladığını; ayrıca parazitlerin motilitesinde belirgin azalma ve hücre yüzeyine tutunma yeteneğinde bozulma meydana geldiğini ortaya koymuştur (58). Başka bir çalışmada *Blastocystis spp.* üzerine in vitro ortamda etanolik propolis ekstraktının 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat boyunca uygulandığı; düşük ve orta dozlarda sınırlı etki gözlenirken özellikle 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarında parazit büyümesinde belirgin inhibisyon olduğu bildirilmiştir (56).

Ayrıca *Leishmania* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda propolis ekstraktlarının 10–500 µg/mL aralığında uygulanarak promastigot çoğalmasının zamana ve doza bağlı olarak değerlendirildiği; yüksek konsantrasyonlarda morfolojik bozulmalar ve proliferasyon baskılanması meydana geldiği rapor edilmiştir (60).

Çalışmamızdan propolis için elde edilen bulgular değerlendirildiğinde absorbans ölçüm sonucunda 31,25–500 µg/mL konsantrasyon aralığında 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda parazit canlılığının kontrol grubuna benzer düzeylerde seyrettiği ve en yüksek konsantrasyon olan 1000 µg/mL uygulamasında özellikle 48 saat sonunda canlılık oranında

istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,05$). Ancak bu konsantrasyonda dahi parazitin tamamen ortadan kalkmadığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular Alday-Provencio ve ark. [57], Freitas ve ark. [58], Mokhtar AB ve ark. [59] ve Duran ve ark. [60] çalışmalarına benzer şekilde doz ve zamana bağlı inhibitör etki oluşturduğunu göstermektedir. Buna karşın çalışmamızın mikroskobik incelemelerinde tüm doz aralığında yoğun hücre üremesi ve yüksek canlılık oranlarının korunduğu belirlenmiştir.

Tarafımızca yapılan çalışmada inverted mikroskobik incelemelere ek olarak CCK-8 temelli absorbans ölçümlerinin kullanılması, antiparaziter etkinin nicel olarak daha duyarlı biçimde ortaya konulmasına olanak sağlamış; özellikle propolisin *B. hominis* üzerindeki etkisinin güçlü ve spesifik bir antiparaziter ajan olmaktan ziyade yüksek dozlarda ve uzun süreli uygulamalarda sınırlı sitotoksik etki gösterebildiğini ortaya çıkarmıştır.

Sülük salgısının biyolojik etkilerinin ağırlıklı olarak antikoagülan, antiinflamatuvar, analjezik ve mikrosirkülasyonu düzenleyici özellikler üzerine yoğunlaştığı bildirilmektedir (5,30). *Acanthamoeba* üzerine Bilden ve ark. [63] tarafından yürütülen çalışmada, besi ortamına sülük salgısının eklenmesinin üremeyi hızlandırdığı ve proliferasyonu artırdığı rapor edilmiştir. Bu bulgu, sülük salgısının bazı mikroorganizmalar üzerinde büyümeyi destekleyici etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, sülük salgı ekstraktının protozoonlar üzerindeki etkilerine ilişkin çalışmalar literatürde oldukça sınırlıdır. Mevcut çalışmamızın bulguları, sülük salgısının belirgin bir antiparaziter etki ortaya koymadığını, ancak biyolojik süreçleri destekleyici veya modülatör etkiler gösterebilen doğal bir ürün niteliği taşıdığını ortaya koymaktadır.

Sülük salgı ekstraktının *B. hominis* üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde, uygulanan geniş konsantrasyon aralığında parazit canlılığı üzerinde belirgin ve kalıcı bir antiparaziter etki oluşturmadığı görülmüştür. Düşük ve orta konsantrasyonlarda 24 ve 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda canlılık oranlarının kontrol grubuna benzer düzeylerde seyrettiği; mikroskobik incelemelerde yoğun hücre üremesinin sürdüğü tespit edilmiştir. Yalnızca en yüksek konsantrasyonda 24 saatlik inkübasyon sonunda sınırlı bir canlılık azalması gözlenmiş, ancak bu etkinin 48 saatlik inkübasyon süresinde ortadan kalktığı belirlenmiştir. Bu bulgular, sülük salgı ekstraktının *B. hominis* üzerinde geçici bir biyolojik stres oluşturabileceğini, ancak doğrudan ve sürdürülebilir bir antiparaziter etki göstermediğini ortaya koymaktadır.

Genel olarak elde edilen sonuçlar, carvacrolün *B. hominis*'e karşı propolise kıyasla çok daha güçlü, hızlı ve etkili bir antiparaziter ajan olduğunu göstermektedir. Carvacrolün düşük

konsantrasyonlardan itibaren belirgin inhibitör etki oluşturmaya karşın, propolisin ancak yüksek konsantrasyonlarda sınırlı etki göstermesi, iki bileşiğin hücresel etki mekanizmalarındaki farklılıklarla açıklanabilir. Bu bağlamda carvacrolün doğrudan hücre zarını hedef alarak hızlı membran hasarı oluşturduğu; propolisin ise daha dolaylı metabolik baskı yoluyla etki gösterdiği düşünülmektedir. Sonuçlar, carvacrolün *B. hominis* kontrolünde daha etkili bir doğal bileşik potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Çalışmanın sınırlılıkları arasında yalnızca belirli konsantrasyon aralıklarının test edilmesi, daha yüksek konsantrasyonlarda değerlendirilmesi gerektiğini ve inkübasyon süresinin kısa tutulması sayılabilir. İleri çalışmalarda, daha geniş konsantrasyon aralıkları ve uzun inkübasyon sürelerinin değerlendirilmesi önerilmektedir.

Bu çalışmada carvacrol, propolis ve sülük salgı ekstraktının *B. hominis* üzerindeki in vitro antiparaziter etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, doğal ajanlar arasında antiparaziter etkinliğin belirgin farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Carvacrol, düşük konsantrasyonlardan itibaren doz ve zamana bağımlı olarak güçlü inhibitör etki oluşturmuş; özellikle yüksek konsantrasyonlarda parazit canlılığını neredeyse tamamen ortadan kaldırmıştır. Buna karşılık propolis uygulamalarında yalnızca yüksek konsantrasyonlarda sınırlı bir canlılık azalması gözlenmiş, düşük ve orta dozlarda belirgin bir inhibitör etki saptanmamıştır. Sülük salgı ekstraktı ise geniş konsantrasyon aralığında kalıcı bir antiparaziter etki göstermemiştir.

Sonuçlar, carvacrolün *B. hominis* kontrolünde güçlü bir doğal antiparaziter ajan aday olduğunu; propolisin ise sınırlı etkiye sahip destekleyici bir biyolojik ürün niteliği taşıdığını ortaya koymaktadır. Sülük salgısının bilinen biyolojik özellikleri dikkate alındığında, antiparaziter potansiyelinin düşük olması biyolojik açıdan beklenen bir durum olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışma, bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin protozoon enfeksiyonlarının kontrolünde önemli bir potansiyele sahip olabileceğini göstermekte olup, carvacrolün etki mekanizmalarının ileri moleküler çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Doyle PW, Helgason MM, Mathias RG, Proctor EM. Epidemiology and pathogenicity of *Blastocystis hominis*. J Clin Microbiol. 1990;28(1):116-21. doi:10.1128/JCM.28.1.116-121.1990.
2. Kaya S, Çetin ES, Cicioğlu Arıdoğan B, Arıkan S, Demirci M. Pathogenicity of *Blastocystis hominis*: a clinical reevaluation. Türkiye Parazitol Derg. 2007;31(3):184-7.
3. İnceboz T, Usluca S. *Blastocystis hominis* bağırsak hastalığı için potansiyel bir tehlike olabilir mi? Dokuz Eylül Üniv Tıp Fak Derg. 2009;23(1):37-45.
4. Zhang FQ, Wang P, Feng X, Mi QM, Mei XF, Zhang ZC, Li XR, Wang S. Progress of researches on global prevalence of *Blastocystis hominis* human infections and its subtypes. Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi. 2020;33(1):84-94.
5. Tan KSW. *Blastocystis* in humans and animals: morphology, taxonomy, and clinical relevance. Clin Microbiol Rev. 2008;21(4):639-65. doi:10.1128/CMR.00022-08.
6. Moe K, Smith J, Lee R. Ultrastructure of *Blastocystis hominis* from human stools. Parasitol Res. 1996;82(8):636-42.
7. Zaman V, Howe J, Ng M, Goh TK. Scanning electron microscopy of the surface coat of *Blastocystis hominis*. Parasitol Res. 1999;85:974-6.
8. Zierdt CH. *Blastocystis hominis*: past and future. Clin Microbiol Rev. 1991;4(1):61-79. doi:10.1128/CMR.4.1.61.
9. Stensvold CR, Brillowska-Dabrowska A, Nielsen HV, Cavling Arendrup M. Detection of *Blastocystis hominis* in unpreserved stool specimens by using polymerase chain reaction. J Parasitol. 2006;92(5):1081-7. doi:10.1645/GE-840R.1.
10. Ferreira GS, Badias LC, Lopez-Nigro M, Palermo A, Mudry M, Elio PG, Carballo MA. DNA single strand breaks in peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazole derivatives. Toxicol Lett. 2002;132:109-15. doi:10.1016/S0378-4274(02)00039-5.
11. Gardner TB, Hill DR. Treatment of giardiasis. Clin Microbiol Rev. 2001;14(1):114-28. doi:10.1128/CMR.14.1.114-128.2001.

12. Sekar U, Shanthi M. Blastocystis: consensus of treatment and controversies. *Trop Parasitol.* 2013;3(1):35-9. doi:10.4103/2229-5070.113901.
13. Lalle M, Hanevik K. Treatment-refractory giardiasis: challenges and solutions. *Infect Drug Resist.* 2018;11:1921-33. doi:10.2147/IDR.S141468.
14. Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med.* 2017;15:73. doi:10.1186/s12967-017-1175-y.
15. El-Sayed NM, Masoud NG. Medicinal plants as natural anti-parasitic agents against Blastocystis species. *Recent Adv Anti Infect Drug Discov.* 2023;18:2-15. doi:10.2174/27722434418666221124123445.
16. Lepczyńska M, Białkowska J, Dzika E, Piskorz-Ogórek K, Korycińska J. Blastocystis: how do specific diets and human gut microbiota affect its development and pathogenicity? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36:1531-40. doi:10.1007/s10096-017-2965-0.
17. Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 1998;26:118-22. doi:10.1046/j.1472-765X.1998.00303.x.
18. Sagdic O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. *LWT Food Sci Technol.* 2003;36:467-73. doi:10.1016/S0023-6438(03)00037-9.
19. Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Mikail C, Abou L, Portugal H. Antifungal effect of various essential oils against Candida albicans: potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from Thymus vulgaris. *Phytother Res.* 2004;18:990-5. doi:10.1002/ptr.1594.
20. Pina-Vaz C, Goncalves-Rodrigues A, Pinto E, Costa-de-Oliveira S, Tavares C, Salgueiro L. Antifungal activity of Thymus oils and their major components. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2004;18:73-8. doi:10.1111/j.1468-3083.2004.00886.x.
21. Tohidi B, Rahimmalek M, Arzani A, Trindade H. Sequencing and variation of terpene synthase gene (TPS2) as the major gene in biosynthesis of thymol in different Thymus species. *Phytochemistry.* 2020;169:112126. doi:10.1016/j.phytochem.2019.112126.

22. Cornara L, Biagi M, Xiao J, Burlando B. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. *Front Pharmacol.* 2017;8:412. doi:10.3389/fphar.2017.00412.
23. Demirseren DD. New therapeutic options in the management of superficial fungal diseases. *Dermatol Ther.* 2020;33(6). doi:10.1111/dth.12855.
24. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:1259510. doi:10.1155/2017/1259510.
25. Onur E, Nalbantsoy A, Kışla D. İmmünoterapi ve propolisin kanser immünoterapisinde kullanım potansiyeli. *Food Health.* 2018;4(4):231-46. doi:10.3153/FH18023.
26. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol.* 2004;94(3):223-53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
27. Maćzka W, Twardawska M, Grabarczyk M, Wińska K. Carvacrol: a natural phenolic compound with antimicrobial properties. *Antibiotics (Basel).* 2023;12(5):824. doi:10.3390/antibiotics12050824.
28. Vaz CLG, Bastos EMAF, Resende Silva P, Mirra C, Sanches F, Trindade OR. Brazilian green propolis on *Helicobacter pylori* infection: a pilot clinical study. *Helicobacter.* 2007;12(5):572-4. doi:10.1111/j.1523-5378.2007.00525.x.
29. Falcão SI, Vale N, Cos P, Gomes P, Freire C, Maes L, Vilas-Boas M. In vitro evaluation of Portuguese propolis and floral sources for antiprotozoal, antibacterial and antifungal activity. *Phytother Res.* 2014;28(3):437-43. doi:10.1002/ptr.5013.
30. Gödekmerdan A, Arusan S, Bayar B, Sağlam N. Medicinal leeches and hirudotherapy. *Turkiye Parazitol Derg.* 2011;35(4):234-9. doi:10.5152/tpd.2011.60.
31. Singh AP. Medicinal leech therapy (hirudotherapy): a brief overview. *Complement Ther Clin Pract.* 2010;16(4):213-5. doi:10.1016/j.ctcp.2009.11.005.
32. Monzote L, Cuesta-Rubio O, Fernandez MC, Hernandez IM, Fraga J, Pérez K, Kerstens M, Maes L, Cos P. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107:978-84. doi:10.1590/s0074-02762012000800003.

33. Rasouli M, Keshavarz M, Kalani M, Asaei S. The effect of propolis ethanol extract on humoral and cellular responses of mice immunized with *Leishmania* recombinant GP63 protein. *Int J Infect Dis.* 2012;16(Suppl 1). doi:10.1016/j.ijid.2012.05.1010.
34. Boyanova L, Derejian S, Koumanova R, Katsarov N, Gergova G, Mitov I, Nikolov R, Krastev Z. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. *J Med Microbiol.* 2003;52(Pt 5):417-9. doi:10.1099/jmm.0.04895-0.
35. Abdulkader AM, Merzouk A, Ghawi AM, Alaama M. Some biological activities of Malaysian leech saliva extract. *IIUM Eng J.* 2011;12(4):1-9. <https://doi.org/10.31436/iiumej.v12i4.156>.
36. Clark CG, Stensvold CR. Blastocystis: isolation, xenic cultivation, and cryopreservation. *Curr Protoc Microbiol.* 2016;43:20A.1.1-20A.1.8. doi:10.1002/cpmc.18.
37. Zierdt C, Donnelly C, Muller J, Constantopoulos G. Biochemical and ultrastructural study of *Blastocystis hominis*. *J Clin Microbiol.* 1988;26(5):965-70. doi:10.1128/jcm.26.5.965-970.1988.
38. Stenzel DJ, Boreham PF. *Blastocystis hominis* revisited. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9(4):563-84. doi:10.1128/CMR.9.4.563.
39. Clark CG, van der Giezen M, Alfellani MA, Stensvold CR. Recent developments in *Blastocystis* research. *Adv Parasitol.* 2013;82:1-32. doi:10.1016/B978-0-12-407706-5.00001-0.
40. Stechmann A, Hamblin K, Pérez-Brocal V, Gaston D, Richmond GS, van der Giezen M, Clark CG, Roger AJ. Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Biol.* 2008;18(8):580-5. doi:10.1016/j.cub.2008.03.037.
41. Scanlan PD. Blastocystis: past pitfalls and future perspectives. *Trends Parasitol.* 2012;28(5):327-34. doi:10.1016/j.pt.2012.05.001.
42. Puthia MK, Lu J, Tan KSW. *Blastocystis ratti* contains cysteine proteases that mediate interleukin-8 response from human intestinal epithelial cells. *Eukaryot Cell.* 2008;7(3):435-43. doi:10.1128/ec.00371-07.
43. Boorom KF, Smith HV, Nimri LF. Irritable bowel syndrome, *Blastocystis* and other intestinal parasites. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(4):639-65.

44. Khorshidvand Z, et al. Worldwide prevalence of Blastocystis in immunocompromised patients: systematic review and meta-analysis. *Parasitology International*. 2021;82:102395. doi:10.1016/j.parint.2021.102395.
45. Verweij JJ, Stensvold CR. Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(2):371-418. doi:10.1128/CMR.00122-13.
46. Stensvold CR, Clark CG. Current status of Blastocystis: a review of molecular epidemiology and clinical relevance. *Trends Parasitol*. 2016;32(1):12-25. doi:10.1016/j.pt.2016.05.001.
47. Rossignol JF, Kabil SM, Said M, Samir H, Younis AM. Effect of nitazoxanide in persistent diarrhea and enteritis associated with Blastocystis hominis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3(10):987-91. doi:10.1016/S1542-3565(05)00427-1.
48. Ertuğ S, Dost T, Ertabaklar H, Gültekin B. Blastocystis hominis infeksiyonunda trimethoprim-sulfamethoxazole'un etkisi. *Türkiye Parazitol Derg*. 2009;33(4):270-2.
49. Botsoglou NA, Fletouris DJ, Florou-Paneri P, Christaki E, Spais AB. Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation. *Food Res Int*. 2003;36:207-13. doi:10.1016/S0963-9969(02)00095-9.
50. Dominguez-Uscanga A, Aycart DF, Li K, Witola WH, Andrade Laborde JE. Anti-protozoal activity of thymol and a thymol ester against *Cryptosporidium parvum* in cell culture. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2021;15:126-33. doi:10.1016/j.ijpddr.2021.02.003.
51. Machado M, Silva A, Linhares R, Cavaleiro C, Sousa MC. Volatile compounds as upcoming anti-giardial agents: in vitro action of carvacrol, thymol and p-cymene on *Giardia lamblia* trophozoites. *Pharmaceutics*. 2025;17(11):1380. doi:10.3390/pharmaceutics17111380.
52. Youssefi MR, Moghaddas E, Abouhosseini Tabari M, Moghadamnia AA, et al. In vitro and in vivo effectiveness of carvacrol, thymol and linalool against *Leishmania infantum*. *Molecules*. 2019;24(11):2072. doi:10.3390/molecules24112072.
53. Wink M. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules*. 2012;17(11):12771-91. doi:10.3390/molecules171112771.

54. Yamazaki K, Yamamoto T, Kawai Y, Inoue N. Enhancement of antilisterial activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester. *Food Microbiol.* 2004;21:283-9. doi:10.1016/j.fm.2003.08.009.
55. Force M, Sparks WS, Ronzio RA. Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano in vivo. *Phytother Res.* 2000;14(3):213-4. doi:10.1002/(SICI)1099-1573(200005)14:3<213::AID-PTR583>3.0.CO;2-U.
56. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol.* 2011;133(2):253-60. doi:10.1016/j.jep.2010.10.032.
57. Alday-Provencio S, Díaz G, Rascón L, Quintero J, Astiazarán H, Hernández J, Velázquez C. Sonoran propolis and some of its chemical constituents inhibit in vitro growth of *Giardia lamblia* trophozoites. *Planta Med.* 2015;81(9):742-7. doi:10.1055/s-0035-1545982.
58. Freitas SF, Shinohara L, Sforcin JM, Guimarães S. In vitro effects of propolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Phytomedicine.* 2006;13(3):170-5. doi:10.1016/j.phymed.2004.07.008.
59. Mokhtar AB, El-Gayar EK, Habib ES. In vitro antiprotozoal activity of propolis extract and cysteine protease inhibitor on *Blastocystis* species. *J Egypt Soc Parasitol.* 2016;46(2):261-72.
60. Duran N, Muz M, Culha G, Duran G, Ozer B. GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitol Res.* 2011;108(1):95-105. doi:10.1007/s00436-010-2039-z.
61. Zülhendri F, Chandrasekaran K, Kowacz M, et al. Antiviral, antibacterial, antifungal, and antiparasitic properties of propolis: a review. *Foods.* 2021;10(6):1360. doi:10.3390/foods10061360.
62. El-Sayed NM. Evaluation of the in vitro effects of ethanol extracts of *Ocimum basilicum* and *Thymus vulgaris* for anti-*Blastocystis hominis* activity. *Egypt J Med Sci.* 2009;30(2):1229-43.
63. Bilden A, Ertaş E, Kahraman M, Tural S, Tural B, Çiçek M. Rapid cultivation of *Acanthamoeba* spp. isolated from environmental samples using nanocomposite and leech saliva. *Acta Parasitol.* 2025;70(3):104. doi:10.1007/s11686-025-01053-8.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	GÜLŞAH ÖZKULA
Doğum Tarihi	*****
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	*****@hotmail.com

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	SAMSUN ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
Fakülte	SAĞLIK YÜKSEK OKULU
Bölümü	EBELİK
Mezuniyet Yılı	2010

Yüksek Lisans	
Üniversite	AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
Enstitü Adı	SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
Anabilim Dalı	TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
Programı	TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
Mezuniyet Tarihi	2026