Arı Ürünlerinin (Bal, Propolis) *Leishmania tropica* Promastigotları Üzerine Antileişmanyal Etkilerinin Araştırılması

Investigation of Anti-leishmanial Effects of Bee Products (Honey, Propolis) on *Leishmania tropica* Promastigotes

Tülay AKSOY¹(ID), Eda SIVCAN²(ID), Fatma DOĞAN²(ID), Songül ÇETİN²(ID),
Türkan Mutlu YAR¹(ID)

¹ İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Malatya.

¹ Inönü University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Malatya, Turkey.

² Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

² Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Medical Parasitology, Kayseri, Turkey.

Makale Atfı: Aksoy T, Sivcan E, Doğan F, Çetin S, Yar TM. Arı ürünlerinin (bal, propolis) *Leishmania tropica* promastigotları üzerine antileişmanyal etkilerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2020;54(3):479-489.

ÖZ

Bu çalışma, kutanöz leişmanyazis etkeni *Leishmania tropica* promastigotları kullanılarak arı ürünlerinin (bal, propolis) antileişmanyal etkilerinin in vitro kültür ortamında araştırılması amacıyla yapılmıştır. Çalışmada kullanılan bal (çam, çiçek ve kestane) ve propolis in vitro antileişmanyal etkinliği mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Arı ürünlerinden olan bal %10 “fetal calf serum (FCS)” içeren RPMI besiyeri ile çözündürülmüş ve aynı besiyeri içerisinde sulandırılmış olup, 62.5-1000 mg/ml arasındaki konsantrasyonlarda seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Propolis ise etil alkol ile çözündürülmüş, hazırlanmış olan bu konsantrasyonlarda alkol oranının %50’den fazla olmasından ve bu oranın parazit gelişimini olumsuz etkileyeceğini düşündüğümüzden dolayı, tüm bu konsantrasyonlardan yalnız 2.5 µl kullanılarak %10 FCS içeren RPMI besiyeri içerisinde sulandırılmış ve ardından 50-800 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan dilüsyonların üzerine, kuyucuklardaki son konsantrasyonları 1×10^6 promastigot/ml olacak şekilde promastigot süspansiyonu ilave edilmiş ardından 26°C’lik etüvde 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra promastigotlar morfoloji, hareketlilik ve canlı parazit yoğunluğu yönünden mikroskopik olarak, hücre canlılığı ise MTS yöntemi ile incelenerek %50 inhibitör konsantrasyonları (IC_{50}) kontrol grupları ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Propolisin (50, 100, 200, 400 ve 800 µg/ml) ve balların (62.5, 125, 250, 500 ve 1000 mg/ml) beş farklı konsantrasyonu promastigotlar üzerine antileişmanyal aktivitesi in vitro ortamda değerlendirilmiş ve mikroskopik incelemelerde çam balının 62.5 mg/ml, çiçek balının 250 mg/ml, kestane balının ise 125 mg/ml konsantrasyonlarından itibaren antileişmanyal etkinlik gösterdiği, çam balının promastigotlar üzerine daha etkin olduğu ($p < 0.05$), propolisin ise 100 µg/ml konsantrasyonundan itibaren etki ettiği gözlemlenmiştir. Propolisin çok düşük konsantrasyonlarının özellikle parazitlerin morfolojik yapılarında değişmelere sebep olduğu ve bu konuda diğer arı ürünlerinden daha etkin olduğu belirlenmiştir. *L. tropica* promastigot hücre kültürü üzerine uygulanan çam balı ($IC_{50} = 109.28$ mg/ml), çiçek balı ($IC_{50} = 248.07$ mg/ml), kestane balı ($IC_{50} = 147.65$ mg/ml) ve propolisin ($IC_{50} = 82.98$ µg/ml) hücre çoğalmasını engellediği ($p < 0.05$) ve IC_{50} değerlerinin

zamana bağlı olarak azaldığı MTS yöntemiyle tespit edilmiştir. Yapılan bu çalışmada çam balı, çiçek balı, kestane balı ve propolisin çeşitli konsantrasyonlarının *L. tropica* promastigotları üzerine antileşmanyal etkinlik gösterdiği tespit edilmiş, bunlardan çam balının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda promastigotlar üzerinde daha etkin olduğu, propolisin ise çok düşük konsantrasyonlarında dahi parazitlerin hem morfolojisinde hem de hücre inhibisyonunda daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bu veriler doğrultusunda arı ürünlerinin kutanöz leşmanyazis enfeksiyonlarına karşı alternatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği ve ileri çalışmaların yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *Leishmania tropica*; bal; propolis; antileşmanyal etki

ABSTRACT

This study was aimed to investigate the anti-leishmanial effects of bee products (honey and propolis) by using the causative agent of cutaneous leishmaniasis *Leishmania tropica* promastigotes, in in vitro culture. In vitro anti-leishmanial efficacy of honey (pine, flower and chestnut) and propolis used in the study were evaluated using the microdilution method. Honey, which is a bee product, was dissolved with RPMI medium containing fetal calf serum (FCS) and diluted in the same medium, and serial dilutions were prepared in concentrations between 62.5-1000 mg/ml. Propolis, on the other hand, was dissolved with ethyl alcohol and only 2.5 µl was used from all these concentrations since the alcohol content was more than 50% in these concentrations prepared and we thought that this rate would negatively effect the parasite development. Then, RPMI containing FCS was diluted in the medium and serial dilutions were prepared at concentrations between 50-800 µg/ml. To the dilutions prepared, the promastigot suspension was added so that their final concentrations in the wells were 1×10^6 promastigot/ml and then the medium was incubated for 24 and 48 hours in 26°C. After the incubation, promastigotes were determined microscopically for morphology, mobility and live parasite density, and cell viability was determined by MTS method and 50% inhibitor concentrations (IC_{50}) were compared with control groups. Anti-leishmanial activity of propolis (50, 100, 200, 400 and 800 µg/ml) and honey (62.5, 125, 250, 500 and 1000 mg/ml) on promastigotes was evaluated in vitro. In microscopic examinations, pine honey showed anti-leishmanial activity starting from 62.5 mg/ml, flower honey 250 mg/ml, and chestnut honey 125 mg/ml, and pine honey was more effective on promastigotes ($p < 0.05$), and propolis was effective from 100 µg/ml concentration. It has been determined that very low concentrations of propolis caused changes in the morphological structure of the parasites and were more effective than the other bee products. The prevention of cell proliferation and decreasing of the IC_{50} values according with the time of pine honey ($IC_{50} = 109.28$ mg/ml), flower honey ($IC_{50} = 248.07$ mg/ml), chestnut honey ($IC_{50} = 147.65$ mg/ml) and propolis ($IC_{50} = 82.98$ µg/ml) applied on *L. tropica* promastigot cell culture was determined by MTS method. In this study, it was found that various concentrations of pine, flower, chestnut honey and propolis showed anti-leishmanial activity on *L. tropica* promastigotes. It has been observed that pine honey is more effective on promastigotes after 48 hours of incubation period, and propolis is more effective in both morphology and cell inhibition of the parasites even at very low concentrations. It is believed that these data can be used as an alternative treatment method against cutaneous leishmaniasis infections and further studies are required.

Keywords: *Leishmania tropica*; honey; propolis; anti-leishmanial effect

GİRİŞ

Leishmania türleri, *Kinetoplastea* sınıfında ve *Trypanosomatidae* ailesinde yer alan intraselüler yaşayan doku parazitleri olup leşmanyazis hastalığına neden olmaktadır. Leşmanyazis dünyada sıtmadan sonra mortalite sıralamasında ikinci, tropikal parazitler hastalıklar içerisinde morbidite sıralamasında ise dördüncü sırada bulunmaktadır¹. Leşmanyazis ile dünya çapında 12 milyon insanın enfekte olduğu, tropikal ve subtropikal 98 ülke/bölgede 350 milyon insanın tehdit altında olduğu, ayrıca her yıl 1-2 milyon yeni olgunun eklendiği

bildirilmiştir. Bu olguların 1.5 milyonu kutanöz leşmanyazis (KL) iken 500.000'inin visceral leşmanyazis (VL)'e ait olduğu tespit edilmiştir². *Leishmania* spp. enfeksiyonlarında ilk tedavi seçeneği olarak beş değerli antimon bileşikler uzun süreli ve günlük enjeksiyon şeklinde uygulanmaktadır. *Leishmania* spp.'ye karşı daha etkili ve daha az toksik bir ilaç henüz geliştirilememiş olmasına rağmen, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından meglumin antimonat ve sodyum stiboglukonat önerilmektedir³. Tedavide kullanılan pentavalan antimon bileşiklerinin ve diğer tedavi edici ilaçların yan etkilerinin ve toksisitesinin olmasının, yüksek maliyete sahip olması ve bu ilaçlara karşı konakta bir direncin oluşması aşı geliştirme çalışmaları ve alternatif tedavi yöntemlerinin gerekliliğini gündeme getirmiştir⁴. Bu nedenle, insanlar doğal ürünleri bir ilaç olarak kullanmaya yönelmişlerdir. Kullanılan bu doğal ürünler arasında en çok tercih edilenler arı ürünleri olmaktadır. Arı ürünlerinin (bal, propolis, arı sütü, arı zehri ve bal mumu vb.) tıbbi amaçlı kullanımına apiterapi denilmektedir⁵. Apiterapi uygulamalar son yıllarda tıp alanında çok fazla gelişim göstermektedir. Arı ürünlerinin bir besin maddesi olması ve içerisinde yer alan fenolik karaktere sahip bileşiklerden dolayı birçok biyolojik aktif özelliği bulunmaktadır⁶.

Türkiye'de günümüze kadar parazitler üzerine, özellikle de *Leishmania* paraziti üzerine arı ürünlerinin (bal, propolis) birlikte kullanıldığı çalışmaların bulunmaması nedeniyle çalışmamız bu açıdan oldukça özgündür. Bu çalışmada bal ve propolisten oluşan arı ürünlerinin KL etkeni *Leishmania tropica* promastigotları üzerine in vitro antileşmanyal etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada Kullanılacak Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanması

Laboratuvarımızda bulunan "fetal calf serum (FCS)", penisilin (10.000 U/ml)-streptomisin (10 mg/ml) çözeltisi, L-glutamin çözeltisi ve RPMI-1640 besiyeri uygun koşullarda hazırlanarak kullanılıncaya kadar uygun koşullarda saklandı.

L.tropica Promastigot Kültürü

Kriyoprezervasyon uygulanarak sıvı azotta saklanan promastigotlar çıkartılarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözündürüldü ve daha sonra RPMI-1640 besiyerinde kültüre alındı. Kültür flakları, promastigotların gelişmesi ve çoğalması için 26°C'de inkübasyona bırakıldı. Promastigotların gelişimi invert mikroskopta gün aşırı kontrol edildi. Besiyeri, promastigotların çoğalma yoğunluğuna göre pasaj yapılarak değiştirildi.

Thoma Lamı ile Promastigot Sayımı

L.tropica promastigotlarının sayımında thoma lamı kullanıldı. Flaklarda üretilen ve logaritmik faza giren *L.tropica* promastigot kültüründen 50 ml'lik konik tabanlı steril Falcon tüplerine alınarak 2000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj edildikten sonra süpernatant atılıp çökelti, 5 ml hücre besiyeri ile süspanse edildi. Süspanse *L.tropica* promastigot kültüründen 10 µl, 40 µl tripan mavis ve 50 µl %20'lik formaldehit eklenerek 1 dakika bekletildi. Elde edilen bu süspansiyondan thoma laminin sayım kamarasına eklenerek lamel kapatıldı ve lamin her bir köşesinde bulunan toplam dört kare ve orta alandaki kare içeri-

sinde bulunan promastigotlar sayıldı. Daha sonra parazit yoğunluğunun her bir kuyucukta 1×10^6 promastigot/ml parazit olacak şekilde sayılarak promastigot içeren süspansiyon hazırlandı.

Bal ve Propolis Konsantrasyonlarının Hazırlanması

Bal ve propolis, Zonguldak ili Arı Yetiştiricileri Birliği (ZAYBİR)'den temin edildi. Propolis kullanılacağı zamana kadar -20°C , bal ise oda ısısında saklandı. Propolis örnekleri, Özbilge ve arkadaşları⁷ tarafından verilen talimata göre etanol ekstraktı hazırlandı. Elde edilen ekstraktlar, $0.2 \mu\text{m}$ por gözenekli filtreden geçirilerek $50-800 \mu\text{g/ml}$ arasındaki konsantrasyonlarda seri dilüsyonları hazırlandı. Çalışmada çözücü olarak kullanılan etanol oranı, parazit gelişimini olumsuz etkileyeceğinden dolayı son konsantrasyonda %0.3 olarak ayarlandı. Çalışmada kullanılan bal örnekleri ise RPMI besiyeri ile çözdürüldü, aynı besiyeri içerisinde sulandırıldı ve $0.2 \mu\text{m}$ por gözenekli filtreden geçirilerek $1000-62.5 \text{ mg/ml}$ arasındaki konsantrasyonlarda seri dilüsyonları hazırlandı. Hazırlanan propolis ve bal konsantrasyonları kullanıma kadar oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda saklandı.

in vitro Antileşimanyal Aktivite

Çalışmamızda, arı ürünlerinin *L. tropica* promastigotları üzerindeki antiparaziter etkinlikleri mikropalak dilüsyon yöntemi kullanılarak in vitro olarak test edildi. Düz tabanlı 96 kuyucuklu hücre kültür plağı yatay olarak kullanıldı ve 12 sıranın üçü ilaçsız parazit kontrol, üçü "blank" geri kalan kuyucuklar ise bal ve propolis konsantrasyonları için belirlendi. Her bir kuyucuğa %10 inaktive edilmiş FCS, %1 streptomisin-penisilin ve %1 L-glutamin içeren RPMI-1640 besiyerinden $100 \mu\text{l}$ dağıtıldı. Bal ve propolis konsantrasyonları için ayrılmış olan bölmeler, her birinin ilk kuyucuğuna istenilen bal, propolis konsantrasyonunun iki katı olacak şekilde standart besiyerine eklenerek $100 \mu\text{l}$ hazırlandı. Bu çalışmada propolis için ilk doz $800 \mu\text{g/ml}$ bu nedenle $1600 \mu\text{g/ml}$ olacak şekilde bal örnekleri için ise ilk doz 1000 mg/ml bu nedenle 2000 mg/ml olacak şekilde hazırlandı. Hazırladığımız bal ve propolisli besiyeri ilk kuyucuklara eklendi. Ardından çok kanallı pipet yardımıyla ilk kuyucuktan $100 \mu\text{l}$ alınıp diğer kuyucuklara aktarım yapılarak seri dilüsyonlar hazırlandı (propolis için $800-50 \mu\text{g/ml}$, bal için $1000-62.5 \text{ mg/ml}$). Daha sonra sayımını yaptığımız ve hazırladığımız 1×10^6 promastigot/ml parazit süspansiyonundan $100 \mu\text{l}$ olacak şekilde tüm kuyucuklara eklendi (Blank kuyucuklarına parazit süspansiyonu eklenmedi). Hazırlanan 96 kuyucuklu hücre kültür plağının kapağı kapatılarak etrafı parafilmle kaplandı ve etüvde 26°C 'de 48 saat inkübe edildi. Inkübasyona bırakılan hücre kültür plakları 24 ve 48. saatlerde ışık ve invert mikroskopta incelenerek promastigotların morfolojisi, hareketlilikleri ve yoğunlukları kayıt altına alındı.

MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-)2H] Yöntemi

Inkübasyona bırakılan 96 kuyucuklu hücre kültür plakları 24 ve 48. saatlerde etüvden çıkartılarak her bir kuyucuktan $100 \mu\text{l}$ alındı ve yeni bir 96 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültür plağına aktarıldı. Aynı yerde MTS yöntemi için, tetrazolyum bileşiği olan tek solüsyonlu MTS [CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent (MTS ayracı)] kullanıldı. -20°C 'de muhafaza edilen MTS solüsyonu, 37°C 'de su banyosunda 10 dakika inkübe edilerek çöz-

dürüldü. Yeni 96 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültür plağına aktarılan 100 µl'lik hücre süspansiyonu üzerine 20 µl MTS ayırıcı eklendi. Ardından da 1-4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası plaklar spektrofotometrede 490 nm'de okutuldu. Okuma sonrası elde edilen absorbans değerleri kaydedilerek canlılık hesaplaması yapıldı ve IC₅₀ (maksimum inhibisyon konsantrasyonu) değerleri belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler GraphPad Prism version 8.2.1 kullanılarak analiz edildi. IC₅₀ değerleri "dose-response-inhibition" kullanılarak hesaplandı. Veriler iki yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak analiz edildi.

BULGULAR

Propolis (50, 100, 200, 400 ve 800 µg/ml) ve balların (62.5, 125, 250, 500 ve 1000 mg/ml) beş farklı konsantrasyonu promastigotlar üzerine antileşmanyal aktivitesi in vitro hücre kültür ortamında değerlendirilmiştir. Yirmi dört ve 48 saatlik inkübasyondan sonra parazit sayısı, hücre canlılığı (parazitlerin hareketliliği) ve hücre morfoloji açısından mikroskobik ve antileşmanyal etkinliği açısından da MTS yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Propolis örnekleri %96 konsantrasyonda etanol içerisinde hazırlanmıştır. Kullanılan etanol oranının parazit üzerine inhibisyon etkisini değerlendirmek için kontrol deneyleri yapılmıştır. Seçilen alkol oranı (%0.3) kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında parazit hücrelerinin büyümesini engellemediği vesitopatolojik değişiklikler oluşturmadığı gözlemlenmiştir. Parazit hücreleri morfoloji açısından değerlendirildiğinde, propolis örneklerinin 100 µg/ml'ye (100 µg/ml dahil) kadar konsantrasyonlarda kullanıldığı deneylerde, parazit hücreleri üzerinde patolojik bir etki bulunmamıştır. Hücreler üzerinde herhangi bir nükleer ve sitoplazmik değişiklik saptanmamıştır. Ayrıca, 24 ve 48 saatlik inkübasyonun sonunda kontrol grubundan (parazit kontrol) alınan örneklerde parazit sayısında bir artış olduğu belirlenmiştir. Propolisin 200 µg/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarında parazitlerin yuvarlaklaşması, çekirdeğin genişlemesi ve granülasyon gibi belirgin patolojik değişiklikleri indüklediği gözlemlenmiştir (Resim 1). 200, 400 ve 800 µg/ml konsantrasyonlarında propolis, *L.tropica* promastigotlarının hücresel büyümesini tamamen ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca inkübasyon süresinin artışıyla birlikte propolisin antileşmanyal etkisinin de arttığı, hücre çoğalmasını engellediği hem mikroskobik olarak gözlemlenmiş hem de IC₅₀ değerlerinin (IC₅₀= 82.98 µg/ml) zamana bağlı olarak azaldığı MTS yöntemiyle tespit edilmiştir (Şekil 1).

Mikroskobik incelemelerde 24 saatlik inkübasyon sonunda çam balı 125 mg/ml, çiçek balı 250 mg/ml, kestane balı 125 mg/ml konsantrasyondan itibaren (Şekil 2), 48 saatlik inkübasyon sonunda ise çam balı 62.5 mg/ml, çiçek balı 250 mg/ml, kestane balı ise 125 mg/ml konsantrasyondan itibaren (Şekil 3) canlı promastigot sayısında azalma, kamçı hareketinde yavaşlama, promastigot morfolojisinde değişimler ve çok miktarda yuvarlak ve kümelenmiş parazitler gözlenmiştir (Resim 2). *L.tropica* promastigot hücre kültürü üzerine uygulanan çam balı (IC₅₀= 109.28 mg/ml), çiçek balı (IC₅₀= 248.07 mg/ml) ve kestane balı (IC₅₀= 147.65 mg/ml) hücre çoğalmasını engellediği (p< 0.05) ve IC₅₀ değerlerinin zamana bağlı olarak azaldığı MTS yöntemiyle tespit edilmiştir.

Resim 1. Propolisin promastigotlar üzerindeki morfolojik etkisi (A-B: Propolis + promastigot, C: Kontrol promastigot).

Şekil 1. Propolis örneklerinin 24-48. saat inkübasyon sonrası promastigotlar üzerindeki antileşmaniyal etkisi.

Şekil 2. Bal örneklerinin 24. saat inkübasyon sonrası promastigotlar üzerindeki antileşmaniyal etkisi.

Şekil 3. Bal örneklerinin 48. saat inkübasyon sonrası promastigotlar üzerindeki antileşmanyal etkisi.

Resim 2. Çam balının promastigotlar üzerindeki morfolojik etkisi.

TARTIŞMA

Dünyanın ve ülkemizin önemli halk sağlığı problemlerinden birisi olan leşmanyazis, dünyada sıtmadan sonra mortalite sıralamasında ikinci, tropikal paraziter hastalıklar içerisinde morbidite sıralamasında ise dördüncü sırada bulunmaktadır. Leşmanyazisin genellikle ölüm ile sonuçlanan VL'den kendi kendine iyileşebilen KL ve mukokutanöz leşmanyazis (MKL) olmak üzere üç farklı klinik formu bulunmaktadır. KL, çoğunlukla deri ve deri mukozalarında skar bırakarak kendiliğinden iyileşebilen lezyon ya da lezyonlar ile kendini gösteren bir deri hastalığıdır. Bu lezyonlar kişilerde kendiliğinden veya tedavi ile iyileştikten sonra ömür boyu bir bağışıklık bırakmaktadır. İyileşme bir yıl ya da daha fazla sürdüğü için özellikle endemik bölgelerde iyileşme süresini hızlandırmak için lezyonun tedavi edilmesi önerilmektedir⁸. *Leishmania* spp. enfeksiyonlarında ilk tedavi seçeneği olarak beş değerli antimon bileşikler uzun süreli ve günlük enjeksiyon şeklinde uygulanmaktadır. Tedavide kullanılan pentavalan antimon bileşiklerinin ve diğer tedavi edici ilaçların, yan etkilerinin ve toksisitesinin olması, yüksek maliyete sahip olmaları ve

bu ilaçlara karşı canlıda bir direncin oluşması gibi olumsuz özelliklerinden dolayı aşı geliştirme çalışmaları ve alternatif tedavi yöntemlerinin gerekliliğini gündeme getirmiştir⁴. Alternatif tedavi yöntemlerinden olan arı ürünlerinin (bal, propolis, arı sütü, arı zehri ve bal mumu vb.) tıbbi amaçlı kullanımına apiterapi denilmektedir⁵.

Arı ürünlerinin yüksek biyolojik aktif özelliğe sahip olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Ancak parazitler üzerine, özellikle de *Leishmania* paraziti üzerine arı ürünlerinin (bal, propolis) bir arada olduğu çalışmaların bulunmaması çalışmamızı özgün kılmaktadır. Mevcut çalışmamızda çam balı, çiçek balı, kestane balı ve propolisten oluşan arı ürünlerinin KL etkeni *L.tropica* promastigotları üzerine in vitro antileşmanyal etkinliği araştırılmıştır.

Balın hem doğal bir gıda maddesi ve önemli bir enerji kaynağı olması hem de içerisinde yer alan fenolik bileşikler ve diğer birçok madde sayesinde biyolojik aktif özellik kazandırması onu değerli yapmaktadır. Klinik ve laboratuvar çalışmaları da balın; mikro-organizmalar, mantarlar, protozoalar ve virüslere karşı antimikrobiyal özellik taşıdığını göstermektedir⁹. Leşmanyazis lezyonlarının kronik olduğu ve enfeksiyonlara karşı duyarlı olduğu göz önüne alındığında çalışmamız, balın yukarıda belirtilen özelliklerinden yararlanılarak leşmanyazis lezyonlarının tedavisi üzerine yapılacak daha sonraki çalışmalara zemin hazırlamak amacıyla yapılmıştır.

Nilforushzadeh ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada¹⁰, KL'li 90 hasta seçerek iki grup oluşturmuştur. Birinci gruba meglumin antimonat ve tropik bal birlikte verilirken, ikinci gruba altı hafta boyunca sadece meglumin antimonat vermişlerdir. Sadece meglumin antimonat ile tedavi edilen grupta 32 (%71.1) hasta tam iyileşme gösterirken, hem meglumin antimonat hem de bal ile tedavi edilen grupta 23 (%51.1) hasta tam iyileşme göstermiştir. Bu sonuç, istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve araştırmacılar balın standardize edilmiş oranının sahip olduğu antibakteriyel etkinliğinden dolayı KL enfeksiyonlarının tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda farklı bal çeşitlerinin antimikrobiyal özelliklerinin farklı olmasından ve bu nedenle tıbbi olarak bal ve meglumin antimonatın birlikte uygulanmasının balın etkinliğinin azalmasına neden olabileceğini bildirmişlerdir.

Bassam ve arkadaşları¹¹ *Leishmania* parazitleri üzerine balın in vitro etkinliği üzerine ilk çalışmayı yapmış ve bu çalışma ile *Leishmania major*, *L.tropica* ve *Leishmania infantum* parazitleri üzerine bal dilüsyonlarının etkinliğini aynı konsantrasyonlardaki şeker dilüsyonları ile karşılaştırmışlardır. Bunun için hücre besiyeri içerisine 10^4 , 10^5 ve 10^6 parazit/ml olacak şekilde, bal ve şeker dilüsyonları da 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 ve 1:64 g/ml konsantrasyonlarında hazırlanıp eklenerek 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bal ve şekerin tüm konsantrasyonları 24 saat sonunda 10^4 ve 10^5 parazit/ml parazit yüküne etki etmiş ancak 1×10^6 parazit/ml parazit yüküne balın tüm konsantrasyonları etki etmesine rağmen, şekerin sadece 1:1 ve 1:2 dilüsyonları etki edebilmiştir. Çalışma ile bal ve şekerin antileşmanyal etkinliğe sahip olduğu, fakat elde edilen sonuçlar ile balın şekerden daha

üstün olduğunu ve balın düşük konsantrasyonlarının dahi parazit hareketini engelleme yeteneğinin olduğu sonucuna varmışlardır. Çalışmamızda, 1×10^6 promastigot/ml parazit üzerine 1000, 500, 250, 125 ve 62.5 mg/ml konsantrasyonlarındaki üç bal (çam, çiçek ve kestane) çeşidinin 24 ve 48 saatteki etkinliği araştırılmıştır. Yirmi dört saatlik inkübasyondan sonra çam balı 125 mg/ml, çiçek balı 250 mg/ml ve kestane balında ise 125 mg/ml konsantrasyondan sonra parazitlerin morfolojisinde, hareketliliğinde ve yoğunluğunda değişimler gözlemlenmiştir. Kırk sekizinci saatte ise bu durum daha düşük konsantrasyonlarda oluşmuştur. Zaman ilerledikçe balın parazit üzerine olan etkisinin doğru orantılı olarak değiştiği gözlemlenmiştir. Ayrıca üç çeşit balı karşılaştırdığımızda çam balının diğer iki bal çeşidine göre parazit üzerindeki etkisinin daha fazla olduğu görülmüştür.

Doğal bir ürün olan propolis, toksik olmaması, geniş bir biyolojik aktiviteye sahip olması ve kolay elde edilebilir olması gibi özelliklerinden dolayı tedavi amacıyla kullanımı gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Propolisin, *Leishmania* türleri üzerine antileişmanyal aktivitesinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Çeşitli çalışmalarda, propolisin antiprotozoal aktiviteleri incelenmiştir^{12,13}. Bu çalışmalar, propolisin *Leishmania* türlerine karşı potansiyel antileişmanyal aktiviteye sahip olma olasılığını desteklemektedir. Propolis, leişmanyazise karşı potansiyel bir antiprotozoal ilaç olarak umut verici görünse de, geniş bir şekilde araştırılmamıştır. *Leishmania*'nın farklı türleri ve formları üzerine çeşitli çalışmalar bulunmakla birlikte, propolisin *L.tropica* üzerine etkinliğinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle, bu çalışma propolis ekstraktının *L.tropica* promastigotları üzerine in vitro aktivitesini değerlendirmek için yapılmıştır.

Duran ve arkadaşları¹⁴ Adana propolis ekstraktının *L.tropica*'nın büyümesi üzerindeki in vitro etkinliğini araştırmışlardır. Bunun için parazit hücreleri, propolisin 25, 50, 100, 250, 500 ve 750 µg/ml konsantrasyonları ile muamele edilerek 24, 48 ve 72 saat inkübasyona bırakılmış ve süre sonunda hemasitometre ile hücre sayımı yapılmıştır. Bunun sonucunda propolisin 100 µg/ml'ye kadar olan konsantrasyonlarının parazit hücrelerine karşı antileişmanyal aktivite göstermediği ve bu konsantrasyonlarda parazitlerin morfolojisinde herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. Aynı zamanda Adana propolisinin 250, 500 ve 750 µg/ml konsantrasyonlarının *L.tropica* parazitlerinin çoğalmasında önemli ölçüde azalttığı, hatta bu durumun 48 saatlik inkübasyonda daha düşük konsantrasyonlarda gerçekleştiği bildirilmiştir. Çalışmamızda ise, 24 saatlik inkübasyonun ardından propolisin 200 µg/ml konsantrasyonda ve 48 saatlik inkübasyondan sonra ise 100 µg/ml konsantrasyondan itibaren *L.tropica* promastigotları üzerine hem morfolojik hem de canlı sayısında azalma gibi önemli etkileri olduğu tespit edilmiştir. Duran ve arkadaşları¹⁴, propolis örneklerini dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlamış ve DMSO'nun çalışılan konsantrasyonlardaki parazitler üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı bildirmiştir. Çalışmamızda ise, propolis için en iyi çözücülerden biri olan %96'lık etil alkol kullanılmış ve böylece propolisin *L.tropica* promastigotları üzerindeki etkisini artırmada etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Çünkü propolis, kloroform, eter, aseton gibi çözücülerde kısmen,

alkolde oldukça fazla çözünürlük göstermekte, suda ise çok az ya da hiç çözünmemektedir. Çeşitli çalışmalarda etanol dışında metanol, glikol ve yağ gibi çözücülerde de çözündüğü bildirilmiştir. Eğer çözücü olarak etanol dışında bir madde kullanılırsa, propolisten elde edilecek birçok bileşenin izole edilemediği ve izole edilecek maddelerin farklılaştığı saptanmıştır¹⁵.

Machado ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada¹⁶ Brezilya ve Bulgaristan orijinli propolis ekstraktlarının 2.8 ile 229.3 µg/ml konsantrasyonlarının, *L.major*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* ve *Leishmania chagasi* suşları üzerine inhibitör etkisinin olduğunu, propolisin ekstrete edildiği yere göre etkinliğinin değiştiğini bu nedenle de Bulgaristan propolisinin düşük konsantrasyonlarının parazitler üzerinde daha etkin olduğu ayrıca propolisin bileşimindeki değişiklikten dolayı parazit üzerindeki etkisinin de değiştiğini bildirmişlerdir. Yine benzer bir şekilde, Ayres ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada¹² Brezilya propolisinin, *L.amazonensis* promastigotları, hücre dışı amastigotlar ve enfekte peritoneal makrofajlar üzerindeki etkinliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar etanolik ekstraktlarının makrofajlardaki *L.amazonensis* enfeksiyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Çalışma ile farklı coğrafik bölgelerden toplanılan propolis örneklerinin biyolojik aktivitesinin, içerisinde yer alan tamamen farklı kimyasal bileşenlere sahip olmasından kaynaklandığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde kullandığımız Karadeniz bölgesi orijinli propolisin, parazitin promastigot formuna karşı antileşmanyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile KL etkeni *L.tropica* promastigotlarına karşı arı ürünlerinden çam, çiçek, kestane balı ve propolisin çeşitli konsantrasyonlarının *L.tropica* promastigotları üzerine antileşmanyal etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen bu veriler doğrultusunda arı ürünlerinin KL enfeksiyonlarına karşı alternatif bir tedavi yöntemi olarak kullanılabileceği ve daha sonra yapılacak çalışmalar için iyi bir yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Chakravarty J, Sundar S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. Expert Opin Pharmacother 2019; 20(10): 1251-65.
2. Passero LFD, Cruz LA, Santos-Gomes G, Rodrigues E, Laurenti MD, Lago JHG. Conventional versus natural alternative treatments for leishmaniasis: a review. Curr Top in Med Chem 2018; 18(15): 1275-86.
3. Machado PA, Carneiro MPD, Sousa-Batista AJ, Lopes FJP, Lima APCA, Chaves SP, et al. Leishmanicidal therapy targeted to parasite proteases. Life Sci 2019; 219: 163-81.
4. Ergüven S. Kan ve doku protozoonlarına karşı kullanılan yeni ilaçlar. Ankem Derg 2012; 26(Ek 2): 108-15.

5. Cooper R. Honey as an effective antimicrobial treatment for chronic wounds: is there a place for it in modern medicine? *Chronic Wound Care Man and Res* 2014; 1: 15-22
6. Tezcan F, Kolaylı S, Ulusoy H, Erim FB. Evaluation of organic acid, saccharide composition and antioxidant properties of some authentic Turkish honeys. *J Food Nutr Res* 2011; 50(1): 33-40.
7. Özbilge H, Kaya E, Albayrak S, Silici S. Anti-leishmanial activities of ethanolic extract of Kayseri propolis. *Afr J Microbiol Res* 2010; 4(7): 556-60.
8. Berman J. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16(5): 397-401.
9. Gürdal M, Kireççi S, Piriñçi N, Sakiz D, Karaman M. Greft ve flep tedavisinde doğal balın yara iyileşmesindeki etkisi. *Türk J Urol* 2003; 29(3): 245-9.
10. Nilforoushzadeh MA, Jaffary F, Moradi S, Derakhshan R, Haftbaradaran E. Effect of topical honey application along with intralesional injection of glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *BMC Complement Altern Med* 2007; 7(1): 13.
11. Bassam Z, Zohra BI, Saada AA. The effects of honey on *Leishmania* parasites: an in vitro study. *Trop Doct* 1997; 27(Suppl 1): 36-8.
12. Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(2): 215-20.
13. Bankova V, De Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 2000; 31(1): 3-15.
14. Duran G, Duran N, Çulha G, Özcan B, Öztas H, Özer B. In vitro anti-leishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. *Parasitol Res* 2008; 102(6): 1217-25.
15. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 1998; 36(4): 347-63.
16. Machado GMC, Leon LL, Castro SL. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(1): 73-7.