

Trypanosoma cruzi ile Mücadelede Yenilikçi Bir Kombinasyon: Benznidazol ve Uçucu Yağ Bileşenlerinin Sinerjik Etkisi

An Innovative Combination in the Combat Against *Trypanosoma cruzi*: The Synergistic Effect of Benznidazole and Essential Oil Components

Yener ÖZEL¹(ID), İbrahim ÇAVUŞ²(ID), Umut YILMAZ¹(ID), Mehmet ÜNLÜ¹(ID)

¹Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.

¹Balıkesir University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Balıkesir, Türkiye.

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

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

*Bu çalışma, Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2023/207 numaralı BAP projesi ile desteklenmiştir

Makale Atfı: Özel Y, Çavuş İ, Yılmaz U, Ünlü M. *Trypanosoma cruzi* ile mücadelede yenilikçi bir kombinasyon: Benznidazol ve uçucu yağ bileşenlerinin sinerjik etkisi. *Mikrobiyol Bul* 2025;59(3):386-403.

ÖZ

Chagas hastalığı, protozoan bir parazit olan *Trypanosoma cruzi*'nin neden olduğu bulaşıcı bir hastalık olup ihmal edilen tropikal hastalıkların başında gelmektedir. Dünya çapında yaklaşık 6-7 milyon insanın *T.cruzi* ile enfekte olduğu ve her yıl yaklaşık 12000 kişinin bu hastalık nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir. Chagas hastalığı, ülkemizde hastalığı taşıyan vektörlerin bulunmaması nedeniyle doğal yolla bulaşmamaktadır. Ancak endemik bölgelere yapılan turistik veya ticari seyahatlerle bu bölgelere ülkemize gerçekleşen göç hareketleri, hastalığın ülkemizde görülme olasılığını artırmaktadır. *T.cruzi*'nin neden olduğu Chagas hastalığının tedavisinde benznidazol (BENZ) ve nifurtimoks olmak üzere sadece iki ilaç kullanılmaktadır. Bu ilaçların, sadece akut veya erken enfeksiyon evrelerinde etkili olmaları, kullanımları sırasında yan etkilerinin olması ve parazitin bu ilaçların etkinliğine karşı direnç geliştirmesi gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle, Chagas hastalığını tedavi etmek için yeni, güvenli ve etkili tedavi alternatiflerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, alfa-pinen, isoborneol, karvakrol, kumarin ve öjenol gibi uçucu yağ bileşenleri (UYB)'nin *T.cruzi*'ye karşı etkinliği, sitotoksitesi ve BENZ ile kombinasyonunun araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada, *T.cruzi* ATCC 50825 referans suşu kullanılmıştır. Referans ilaç olarak BENZ; UYB olarak ise alfa-pinen, isoborneol, karvakrol, kumarin ve öjenol seçilmiştir. Sitotoksik aktivite çalışmalarında L929 fare fibroblast hücre hattı kullanılmıştır. Antitripanozomal ve sitotoksik aktivite çalışmaları sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle, benznidazol ve UYB'ler arasındaki etkileşimler ise dama tahtası (checkerboard) yöntemiyle belirlenmiştir. UYB'lerin ve BENZ'in fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik etkinliklerini ifade eden IC₅₀ değerleri 24, 48 ve 72. saatlerde, sırasıyla, alfa-pinen için 26.68-20.79 µg/mL, isoborneol için 128.7-73.63 µg/mL, karvakrol için 4.56-2.49 µg/mL, kumarin için 169.3-108.6 µg/mL, öjenol için 6.04-1.65 µg/mL ve BENZ için ise 1011-806.9 µg/mL aralığında saptanmıştır. UYB'lerin ve BENZ'in antitripanozomal aktivitelerini ifade eden IC₅₀ değerleri 48. saatte aynı sırayla, 11.8 µg/mL, 114.6 µg/mL, 3.9 µg/mL, 268.6 µg/mL, 19.5 µg/mL ve 11.7 µg/mL olarak tespit edilmiştir. En etkili UYB'nin karvakrol, alfa-pinen ve öjenol olduğu ve özellikle karvakrol ve alfa-pinenin referans ilaç

BENZ ile kıyaslanabilir olduğu saptanmıştır. Selektif indeks (SI) değerleri hesaplandığında BENZ ve alfa-pinenin seçici etkinliğinin yüksek ($SI > 1$), diğer UYB'lerin ise seçici etkinliğinin düşük olduğu gözlenmiştir ($SI < 1$). Buna karşılık UYB'ler ile BENZ kombinasyonlarının tamamında sinerjik etkileşimler tespit edilmiştir. *T. cruzi*'de görülen ilaç direncinin mekanizması henüz anlaşılmış değildir. Çoklu biyolojik etkilere sahip doğal bileşikler, yeni ilaç formülasyonları ve yeni kombinasyonlar, ilaç direncinin üstesinden gelme çabalarına destek olabilir. Bu stratejiler içinde çeşitli mikroorganizmalara karşı biyolojik aktiviteleri gösterilmiş olan UYB'ler iyi birer alternatif oluşturabilir. UYB'lerin güçlü antitripanozomal etkinlikleri yanında BENZ ile sinerjik etkileşim göstermesinin; yeni nesil ilaç kombinasyonlarının tasarlanması, yan etkilerin azaltılması ve direnç gelişiminin önlenmesi adına literatürdeki önemli boşlukları doldurabileceği ve gelecek çalışmalara yön verebileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Alfa-pinen; isoborneol; karvakrol; kumarin; öjenol; *T. cruzi*; sinerji.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is one of the most significant neglected tropical diseases. Approximately 6-7 million people worldwide are estimated to be infected with *T. cruzi*, with about 12000 deaths annually attributed to the disease. In Türkiye, natural transmission does not occur due to the absence of vectors carrying the parasite. However, touristic or commercial travels to endemic areas and migration from these regions increase the risk of Chagas disease emergence in the country. Currently, only two drugs, benznidazole (BENZ) and nifurtimox, are available for the treatment of Chagas disease. These drugs have limitations, including effectiveness only during the acute or early stages of infection, adverse side effects and the potential for the parasite to develop resistance. Consequently, there is an urgent need for new, safe and effective therapeutic alternatives for treating Chagas disease. This study aimed to investigate the efficacy and cytotoxicity of essential oil components (EOCs) such as α -pinene, isoborneol, carvacrol, coumarin and eugenol against *T. cruzi* and their synergy with BENZ. In this study, the *T. cruzi* ATCC 50825 reference strain was used. BENZ was selected as the reference drug and α -pinene, isoborneol, carvacrol, coumarin, and eugenol were chosen as EOCs. Cytotoxic activity was evaluated using the L929 mouse fibroblast cell line. Antitrypanosomal and cytotoxic activities were determined using the broth microdilution method and interactions between BENZ and EOCs were assessed using the checkerboard method. The IC_{50} values indicating the cytotoxic effects of EOCs and BENZ on fibroblast cells at 24, 48, and 72 hours were as follows: α -pinene (26.68-20.79 μ g/mL), isoborneol (128.7-73.63 μ g/mL), carvacrol (4.56-2.49 μ g/mL), coumarin (169.3-108.6 μ g/mL), eugenol (6.04-1.65 μ g/mL), and BENZ (1011-806.9 μ g/mL). The IC_{50} values for antitrypanosomal activity at 48 hours were 11.8 μ g/mL, 114.6 μ g/mL, 3.9 μ g/mL, 268.6 μ g/mL, 19.5 μ g/mL, and 11.7 μ g/mL for the same compounds, respectively. Carvacrol, α -pinene and eugenol demonstrated the most potent activity and especially carvacrol and α -pinene being comparable to the reference drug BENZ. Selectivity index (SI) calculations revealed high selective activity ($SI > 1$) for BENZ and α -pinene, while other EOCs exhibited lower selectivity ($SI < 1$). Nevertheless, synergistic interactions were identified in all combinations of EOCs with BENZ. The mechanisms underlying drug resistance in *T. cruzi* remain poorly understood. Natural compounds with multiple biological effects, new drug formulations and innovative combinations can contribute to overcoming drug resistance. Among these strategies, essential oil components, known for their biological activities against various microorganisms, offer promising alternatives. In addition to the strong antitrypanosomal activities of EOCs, their synergistic interaction with BENZ may fill important gaps in the literature and guide future studies in designing next-generation drug combinations, reducing side effects and preventing the development of resistance.

Keywords: Alpha-pinen; isoborneol; carvacrol; coumarin; eugenol; *T. cruzi*; synergy.

GİRİŞ

Chagas hastalığı, protozoan bir parazit olan *Trypanosoma cruzi*'nin neden olduğu bulaşıcı bir hastalık olup ihmal edilen tropikal hastalıkların başında gelmektedir. Dünya çapında yaklaşık 6-7 milyon insanın *T. cruzi* ile enfekte olduğu ve her yıl yaklaşık 12000

kişinin bu hastalık nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir. Chagas hastalığı, çoğunlukla Latin Amerika'da endemiktir ancak hastalık küresel olarak giderek yaygınlaşmaktadır¹. Chagas hastalığı, vektör yoluyla bulaşmanın yanı sıra kan transfüzyonu, anneden bebeğe dikey geçiş (vertikal bulaş), organ nakli ve kemik iliği transplantasyonu gibi yollarla da bulaşabilir². Chagas hastalığı, ülkemizde hastalığı taşıyan vektörlerin bulunmaması nedeniyle doğal yolla bulaşmamaktadır. Ancak endemik bölgelere yapılan turistik veya ticari seyahatlerle bu bölgelerden ülkemize gerçekleşen göç hareketleri, hastalığın ülkemizde görülme olasılığını artırmaktadır.

Hastalığın akut klinik döneminde, primer lezyonda çok sayıda histiyosit, enflamatuvar hücre ve yağ nekrozu alanları bulunmakla birlikte makrofajlarda çoğalan amastigot formlar düz ve kalp kaslarını, glial hücreleri, nöronları ve yağ hücrelerini istila ederler. Kronik evre ise genellikle ilk 10 ile 30 yıl boyunca süren belirsiz dönemin ardından kalp ve gastrointestinal sistemin tutulduğu ve ciddi klinik bulguların ortaya çıkmaya başladığı dönemi ifade etmektedir³.

T.cruzi'nin neden olduğu Chagas hastalığının tedavisinde benznidazol (BENZ) ve nifurtimoks olmak üzere sadece iki ilaç kullanılmaktadır. BENZ 1970'lerde geliştirilmiş bir nitroimidazol olup *Trypanosoma* tip 1 nitroredüktaz enzimleri tarafından aktive edilerek *T.cruzi* için toksik metabolitler üretir. Nifurtimoks da 1960'larda geliştirilen bir nitroimidazoldür ve BENZ gibi parazitin metabolik yollarını bozan toksik metabolitler üreterek çalışmaktadır. Her iki ilaç da sık yan etkilere neden olmakla birlikte tedavi süresince yakın klinik ve laboratuvar takibi gerektirmektedir. BENZ yan etkileri arasında hafif geçici döküntüden ekfoliyatif dermatit ve Stevens-Johnson sendromuna kadar değişen deri bulguları, gastrointestinal semptomlar, periferik nöropati ve nadiren lökopeni yer almaktadır. Nifurtimoks çoğu yetişkin hastada bulantı ve anoreksiye neden olmakta ve ayrıca diyare ve/veya kusma, baş ağrısı ve uykusuzluk ve depresyon gibi nöropsikiyatrik semptomlara neden olabilmektedir. Her iki ilaç da gebelik veya emzirme döneminde önerilmemektedir ancak bazı veriler emzirme döneminde her iki ilacın da güvenli olduğunu desteklemektedir^{4,5}. Bu ilaçların, sadece akut veya erken enfeksiyon evrelerinde etkili olmaları, kullanımları sırasında yan etkilerinin olması ve parazitin bu ilaçların etkinliğine karşı direnç geliştirmesi gibi bazı dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle, Chagas hastalığını tedavi etmek için yeni, güvenli ve etkili tedavi alternatiflerinin belirlenmesi gerekmektedir. Araştırma grupları, sorunun çözümüne yardımcı olabilecek bazı stratejiler üzerinde çalışmaktadır. Bunlardan bazıları geleneksel ilaç dozajlarının değiştirilmesi, ilaçların yeniden tasarlanması ve kombine tedavidir. Antiparazitik etkilere sahip bitkiler ve türetilmiş bileşikler de sürekli olarak araştırılmaktadır⁶.

Literatürde aromatik bitkilerden elde edilen uçucu yağların antimikrobiyal etkilerine yönelik çok sayıda çalışma yer almaktadır. Doğal ürünler, moleküler yapılarının çeşitliliği ve elde edilmelerinin kolaylığı/azaltılmış maliyeti nedeniyle umut verici adaylardır. Özellikle uçucu yağlar, çeşitli bitkilerden elde edilebilen ikincil metabolitlerin karışımları oldukları için dikkat çekmektedir. Bazı uçucu yağlar veya bileşenlerinin, in vitro ve in vivo

antitripanozomal etki de dahil olmak üzere protozoonlara karşı inhibitör aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir^{7,8}. Doğal bileşiklerin protozoon parazitlere karşı fiziksel hasar vermelerine ek olarak son dönemde yapılan bazı çalışmalarda, kinetoplastid grubunda olan *Trypanosoma* ve *Leishmania* türlerinin sahip olduğu benzersiz mitokondrilerin UYB'ler için önemli hedef bölgeler olabileceği belirtilmektedir⁹. Ancak yapılan çalışmaların çoğunda doğal aktif bileşiklerin toksisiteyi hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. Pek çok uçucu yağ bileşeni (UYB)'nin toksik özellikleri nedeniyle monoterapi şeklinde kullanımları sınırlı kalmaktadır¹⁰. Kombinasyon stratejileri böyle durumlarda yol gösterici olabilir. Kombinasyon uygulamalarında, aralarında sinerjik etkileşim gösterilen iki etken maddenin tek başlarına etkili oldukları dozlardan en az dört kat daha düşük dozlarda etkili olduğu kabul edilmektedir¹¹.

Bu çalışmada, alfa-pinen, isoborneol, karvakrol, kumarin ve öjenol gibi UYB'lerin *T.cruzi*'ye karşı etkinliği, sitotoksitesi ve BENZ ile kombinasyonunun araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada insan veya hayvan materyalleri kullanılmamış olup, deneyler sıvı azotta korunan parazit suşlarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle etik kurul onayı gerekmemektedir.

Parazit Suşu, Hücre Hattı, Uçucu Yağ Bileşenleri ve Referans İlaç

Bu çalışmada, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankası bünyesinde bulunan *T.cruzi* ATCC 50825 referans suşu ve L929 fare fibroblast hücre hattı kullanıldı. Çalışmada kullanılan alfa-pinen (147524), isoborneol (113901), karvakrol (232197), kumarin (C4261) ve öjenol (E51791) gibi UYB'lerle referans ilaç BEN (419656)'in saf ve analitik formu Sigma Aldrich (Amerika Birleşik Devletleri) firmasından sağlandı.

Karaciğer İnfüzyon Triptoz Besiyerinin Hazırlanması

T.cruzi izolatının canlandırılmasında ve üretilmesinde bifazik bir besiyeri olan karaciğer infüzyon triptoz "liver infusion tryptose (LIT)" besiyeri kullanıldı. Besiyerinin katı fazı için 1.5 g Difco-sığır eti ekstratı, 2.5 g Bacto-pepton, 4 g sodyum klorit ve 7.5 g Bacto-agar (Thermo-Fisher Scientific, ABD) tartılıp 500 mL distile su içinde çözdürüldü. Besiyerinin sıvı fazı için ise, 8 g sodyum klorit, 0.2 g potasyum klorit, 0.3 g potasyum dihidrojenfosfat, 0.2 g kalsiyum klorür ve 2.5 g glukoz 1000 ml distile su içinde çözdürüldü. Besiyerlerinin pH'ı 7.2-7.4 olacak şekilde ayarlandı ve 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. Otoklav işlemi sonrasında besiyerinin katı fazı 45 °C'ye soğutuldu ve içine %20 oranında inaktif tavşan kanı eklendi. Kan eklenmiş besiyerleri steril cam tüplere 5 mL hacimde aktarıldı ve yatık olarak katılaşmaya bırakıldı. Daha sonra tüplerde yatık olarak katılaşan besiyerine sıvı fazdan 2 mL eklenerek kapakları kapatıldı ve 4 °C'de kullanılacağı zamana kadar muhafaza edildi¹².

RPMI-1640 Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

Ticari olarak temin edilen RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium) (Thermo-Fisher Scientific, ABD) besiyeri içerisine %10 fetal sığır serumu "fetal calf serum

(FCS)", %1 penisilin/streptomisin ve %1 gentamisin eklenerek stok sıvı besiyeri hazırlandı ve besiyeri kullanılacağı zamana kadar 4 °C'de muhafaza edildi.

***T.cruzi* Suşunun Canlandırılması, Karaciğer İnfüzyon Triptoz Besiyerine Ekilmesi ve Sıvı Besiyerinde Çoğaltılması**

Sıvı azottan çıkarılan suş, 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda çözündürüldü ve üremeleri için LIT besiyerine ekildi. LIT besiyerleri 26 °C'de inkübasyona kaldırıldı. Üreme görülen besiyerlerinden, antitripanozomal etkinlik ve kombinasyon çalışmalarında kullanılmak üzere, RPMI-1640 sıvı besiyerine pasaj yapıldı. Epimastigot inoküle edilmiş RPMI-1640 sıvı besiyeri bulunan flaklara (hücre kültürü flakonları) 2-3 günde bir taze besiyeri eklenerek, yeterli miktarda epimastigot elde edildi. İlaç duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere yoğunluğu 10^7 epimastigot/mL olacak şekilde parazit süspansiyonu hazırlandı.

UYB'ler ve BENZ'in Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

UYB'ler ve BENZ'in stok çözeltileri uygun çözücü/sulandırıcılar ile Tablo 1'de belirtildiği şekilde hazırlandı. Hazırlanan stok çözeltiler 1 mL'lik miktarlarda test edilecekleri zamana kadar -20 °C'de saklandı.

Uçucu Yağ Bileşenleri ve Benznidazolün Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi

Sitotoksik aktivitenin belirlenmesi için L929 fare fibroblastları kullanıldı. Sıvı azotta muhafaza edilen fibroblastlar, RPMI-1640 ile yıkanarak, %10 fetal sığır serumu içeren RPMI-1640 besiyerine ekilerek 37 °C'de %5 CO₂ altında 48 saat inkübe edildi. Hücrelerin sayısı ve canlılığı, tripan mavisiyle boyanarak thoma lamında belirlendi. 10^5 /mL hücre içeren 100 µL hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu mikropklara dağıtıldı. UYB'lerden öjenol ve karvakrolün son konsantrasyonu 128-1 µg/mL aralığında, isoborneolün ve kumarinin son konsantrasyonu 5000-39 µg/mL aralığında, alfa-pinenin son konsantrasyonu 430-3 µg/mL aralığında ve BENZ'in ise 6200-48 µg/mL aralığında olacak şekilde seri dilüsyonları farklı bir mikropklakta yapıldı ve hücrelerin ekildiği mikropklara aktarıldı. Mikropklaklar, 37 °C'de %5 CO₂ altında 48 saat inkübe edildi. Hücre canlılığı, MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid] yöntemiyle belirlendi ve elde

Tablo 1. Uçucu Yağ Bileşenleri ve Benznidazol Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Örnek No	Çözücü	Sulandırıcı	Konsantrasyon
Alfa-pinen	DMSO	RPMI-1640	3351 µg/mL
İsoborneol	DMSO	RPMI-1640	10000 µg/mL
Karvakrol	DMSO	RPMI-1640	1000 µg/mL
Kumarin	DMSO	RPMI-1640	10000 µg/mL
Öjenol	DMSO	RPMI-1640	1000 µg/mL
BENZ	Metanol	RPMI-1640	1240 µg/mL

BENZ: Benznidazol.

edilen absorbans değerleri, Thermo marka Varioskan model (ABD) spektrofotometre ile 570 nm'de ölçüldü¹³. Sitotoksik aktiviteyi gösteren IC₅₀ değerleri, Graphpad Prism 8.4.2 programıyla belirlendi. Sitotoksik aktivite testleri, farklı günlerde üç kez tekrarlandı¹⁴.

Uçucu Yağ Bileşenleri ve Benznidazolün Antitripanozomal Aktivitesinin Belirlenmesi

UYB'ler ve BENZ'in antitripanozomal aktiviteleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle in vitro olarak belirlendi. İlaç duyarlılık testlerinde; steril, düz tabanlı 96 kuyucuklu hücre kültür plağındaki 12 sıranın biri pozitif kontrol, biri negatif kontrol, geri kalan kuyucuklar da ikili sıralar halinde etken maddeler için kullanıldı. Her bir kuyucuğa stok RPMI-1640 sıvı besiyesinden (%10 FCS + %1 penisilin/streptomisin + %1 gentamisin) 100 µL dağıtıldı. Mikroplağın etken maddeler için ayrılmış bölümlerinin ilk kuyucuklarına, etken madde süspansiyonundan 100 µL pipetlenerek seri dilüsyon yapıldı. Seri dilüsyon işlemi tamamlandıktan sonra 10⁷ epimastigot/mL yoğunluğundaki parazit süspansiyonundan negatif kontrol hariç tüm kuyucuklara 100 µL eklendi. Mikroplağın kapağı kapatılarak etrafı parafilmle kaplandı ve 26 °C'de 48 saat inkübasyona kaldırıldı. Etken maddelerin minimum parazitisidal konsantrasyon (MPK) değerleri invert mikroskopta yapılan incelemeyle belirlendi^{14,15}.

Uçucu Yağ Bileşenleri ve Benznidazolün IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

UYB'ler ve BENZ'in IC₅₀ değerleri, CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) canlılık tespit kitiyle in vitro olarak değerlendirildi. MPK değerinin belirlenmesinden sonra, mikroplaklardaki her bir kuyucuktan 100 µL alınarak yeni mikroplaklara aktarıldı ve üzerine CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay reaktifinden eşit hacimde eklendi. Mikroplaklar 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda Varioskan marka (Thermo Labssystem, Franklin, MA) okuyucuda okutulurak *T.cruzi* epimastigotlarına karşı relatif lüminesan birimi (RLU) değerleri elde edildi. RLU verileri, Graphpad Prism 8.4.2 programıyla analiz edilerek IC₅₀ değerleri hesaplandı^{14,15}.

Uçucu Yağ Bileşenleri ve Benznidazolün Selektif İndeks Değerinin Belirlenmesi

Selektif indeks (SI) değeri, aşağıdaki denklem kullanılarak fibroblast hücre (L929) hattına karşı elde edilen IC₅₀ değerinin *T.cruzi* epimastigotlarına karşı elde edilen IC₅₀ değerine bölünmesi ile hesaplandı:

$$SI = \text{Fibroblastların IC}_{50} \text{ değeri} / \text{T.cruzi epimastigotlarının IC}_{50} \text{ değeri}$$

SI değerlerinin 1.00'den yüksek olması, test edilen maddenin epimastigotlara karşı fibroblastlardan daha yüksek seçicilik sergilediğini göstermektedir¹⁶.

Uçucu Yağ Bileşenleri ve Benznidazolün Etkileşimlerinin Belirlenmesi

UYB'ler ve BENZ arasındaki etkileşim dama tahtası (checkerboard) yöntemiyle belirlendi. Bu amaçla her bir kombinasyon için iki adet 96 kuyucuklu düz tabanlı steril mikroplak kullanıldı. Birinci mikroplakların her bir kuyucuğuna RPMI-1640 sıvı besiyerinden 50 µL dağıtıldı. MPK değerinin üç sulandırım üstünden başlayıp beş sulandırım altına kadar, uçucu bileşenlerinin dikey düzlemde seri dilüsyonları yapıldı. İkinci mikroplağın

sekizinci sütununa kadar tüm kuyucuklarına 70 µL RPMI-1640 besiyeri dağıtıldı. Sekizinci sütundaki kuyucuklara 70 µL BENZ çözeltisi eklenerek, yatay düzlemde sağdan sola doğru seri dilüsyon yapıldı. İkinci mikropakta yapılan dilüsyonlar, birinci mikropakta birebir aynı kuyucuğa olmak üzere 50 µL aktarıldı, her kuyucukta her iki etken maddenin farklı kombinasyonları elde edildi^{17,18}.

Logaritmik faza girip yeterli yoğunlukta üreyen *T.cruzi* epimastigotlarından hazırlanan 10^7 epimastigot/mL yoğunluktaki parazit süspansiyonundan 100 µL, birinci mikropakın besiyeri ve sterilite kontrol kuyucukları hariç tüm kuyucuklarına eklendi. Üreme kontrolü (RPMI 1640 + epimastigot), besiyeri kontrolü (RPMI 1640) ve sterilite kontrolü (RPMI 1640 + BENZ/UYB) için dörder kuyucuk kullanıldı. Mikropaklar 26 °C'de 18-24 saat inkübe edildi.

UYB ile BENZ arasındaki etkileşim, fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) indeksi hesaplanarak belirlendi. Bu hesaplama için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{FİK indeksi} = \text{FİK UYB} + \text{FİK BENZ}$$

$$\text{FİK indeksi} = (\text{Kombinasyondaki UYB MPK}) / (\text{UYB MPK}) + (\text{Kombinasyondaki BENZ MPK}) / (\text{BENZ MPK})$$

Hesaplanan FİK indeksi değerleri, aşağıdaki sınır değerlere göre yorumlandı. Etkileşimler;

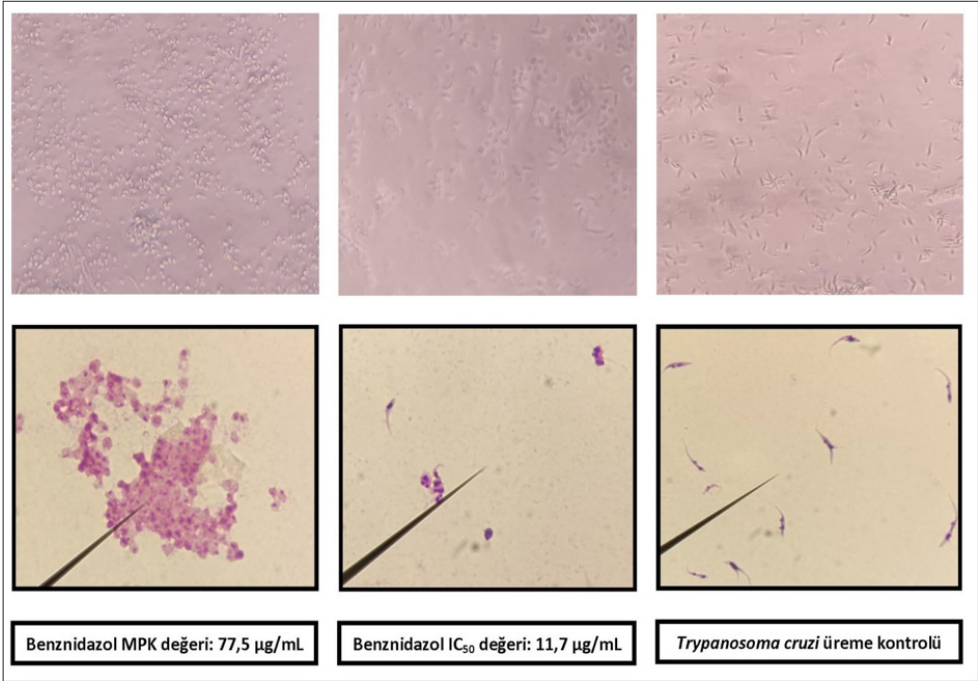
FİK_i ≤ 0.5 sinerji, FİK_i = 0.50-0.75 kısmi sinerji, FİK_i = 0.75-1 aditif, FİK_i = 1.00-4.00 etkisiz (indifferent), FİK_i = ≥ 4.00 antagonizma olarak değerlendirilmeye alındı¹⁹.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler, IBM SPSS 25.0 istatistik yazılımı (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak analiz edildi. Gruplar arasındaki anlamlı farklar, tek yönlü ANOVA ile analiz edildikten sonra, çoklu karşılaştırmalar Tukey testi ile değerlendirildi. p < 0.05 olduğunda gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

UYB'lerin ve BENZ'in MPK değerleri 48 saatlik inkübasyon sonunda invert mikroskopta belirlenmiştir. İnvirt mikroskop altında, epimastigotların hareketliliğinin durduğu, morfolojik yapılarının bozulup amastigot şeklini aldığı ya da parçalandığı ve epimastigotların tümünün öldüğü en düşük ilaç konsantrasyonu MPK olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1). UYB'ler ve BENZ'in 48 saatlik inkübasyondaki MPK ve IC₅₀ değerleri Tablo II ve Şekil 2'de verilmiştir. En etkili UYB'nin karvakrol, alfa-pinen ve öjenol olduğu ve özellikle karvakrol ve alfa-pinenin referans ilaç BENZ ile kıyaslanabilir olduğu saptanmıştır (p > 0.05). UYB'lerin ve BENZ'in fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik etkinliklerinin 24, 48 ve 72. saatlerdeki IC₅₀ değerleri Tablo III ve Şekil 3'te sunulmuştur. SI değerleri hesaplandığında BENZ ve alfa-pinenin seçici etkinliğinin yüksek (SI > 1) diğer UYB'lerin ise seçici etkinliğinin düşük olduğu saptanmıştır (SI < 1) (Tablo IV).



Şekil 1. Benznidazol etkisi altında *T.cruzi* epimastigotlarının invert ve ışık mikroskobu (Giemsa boyalı) görüntüleri.

Tablo II. Uçucu Yağ Bileşenlerin *T.cruzi* Suşuna Karşı IC_{50} ve MPK Değerleri ($\mu\text{g/mL}$)

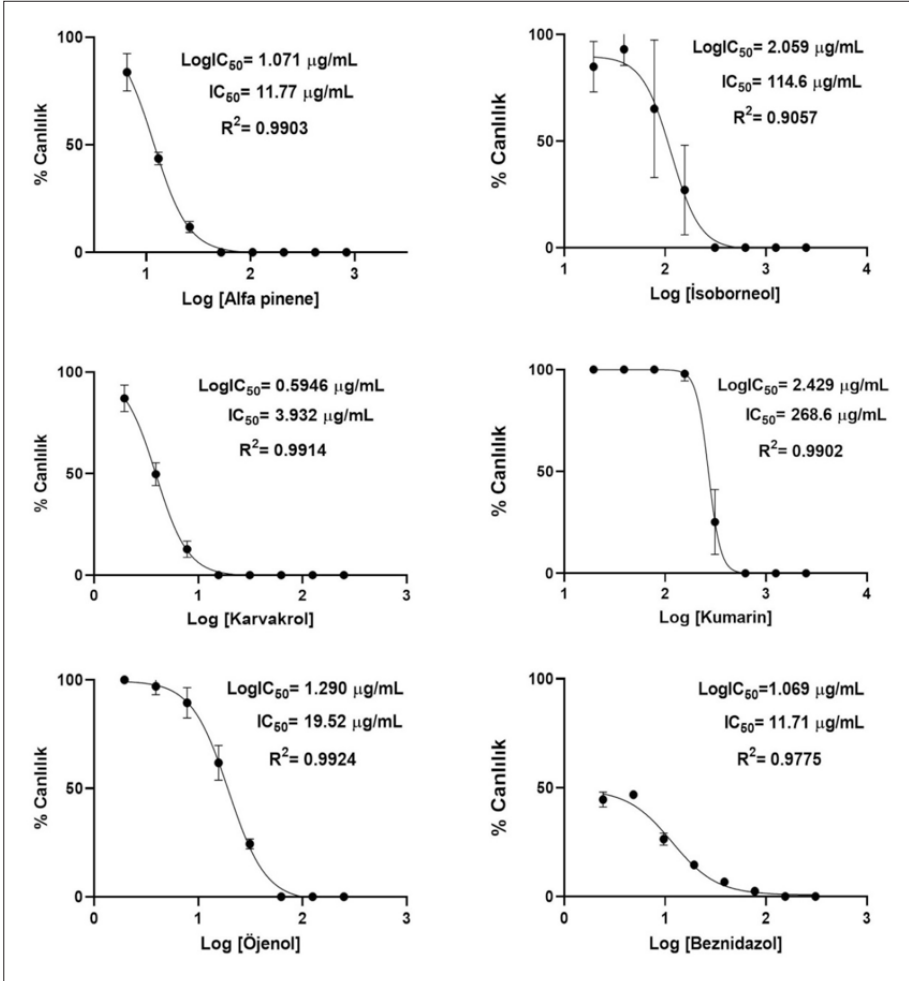
Uçucu Yağ Bileşenleri	IC_{50}	MPK
Alfa-pinen	11.8	52.4
İsoborneol	114.6	312.5
Karvakrol	3.9	15.6
Kumarin	268.6	625
Öjenol	19.5	62.5
Benznidazol	11.7	77.5

IC_{50} : %50 inhibisyon konsantrasyonu, MPK: Minimum parazitsidal konsantrasyon.

UYB ile BENZ etkileşimleri dama tahtası (checkerboard) yöntemiyle araştırılmıştır. Denenen UYB'ler ile BENZ arasında tüm inkübasyon sürelerinde sinerjik etkileşimler gözlenmiştir (Tablo V).

TARTIŞMA

Chagas hastalığı, etkili ve iyi tolere edilen alternatif tedavilerden yoksun ciddi bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Klinik tedavi için kullanılmakta olan sınırlı ilaçlar da yan etkilere sahiptir ve özellikle hastalığın kronik evresinde düşük etkinlik



Şekil 2. Etken maddelerin *T.cruzi* suşuna karşı IC₅₀ değerlerini gösteren grafikler.

Tablo III. Uçucu Yağ Bileşenleri ve Benznidazolün L929 Fibroblastlara Karşı IC₅₀ Değerleri (µg/mL)

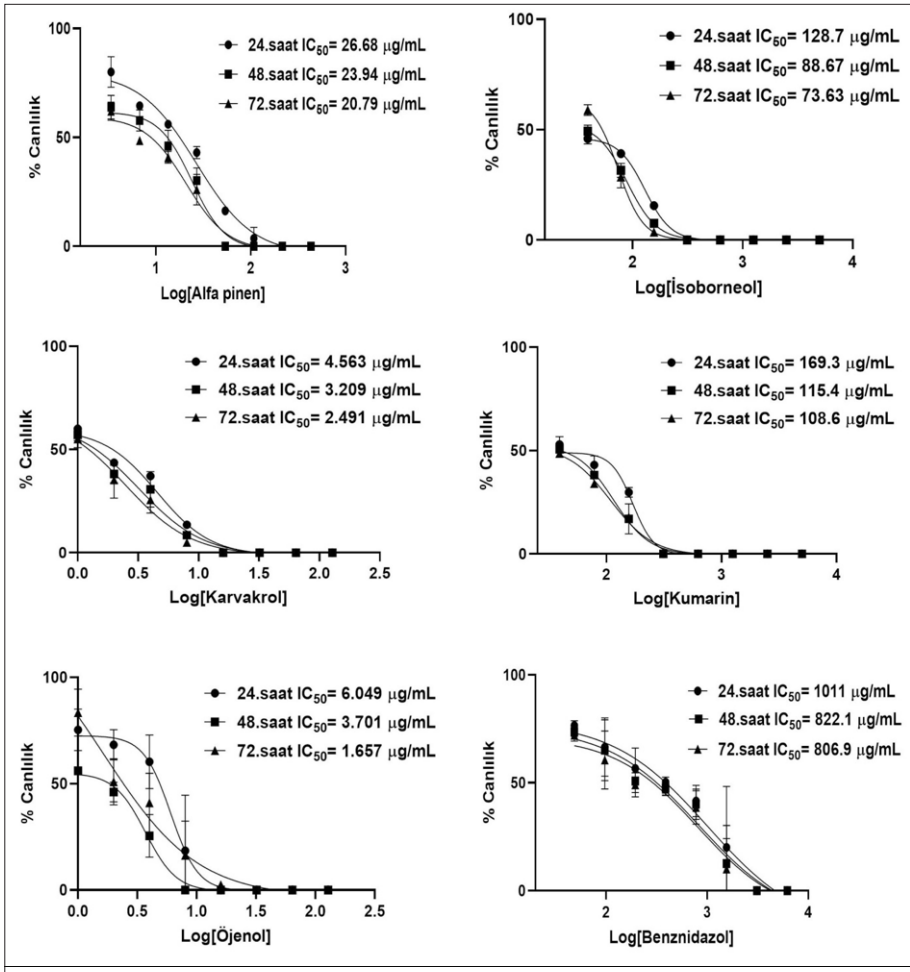
Uçucu Yağ Bileşenleri	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Alfa-pinen	26.68	23.94	20.79
İsoborneol	128.7	88.67	73.63
Karvakrol	4.56	3.2	2.49
Kumarin	169.3	115.4	108.6
Öjenol	6.04	3.7	1.65
Benznidazol	1011	822.1	806.9

IC₅₀: %50 inhibitör konsantrasyonu, L929: Fibroblast hücre hattı.

Tablo IV. Uçucu Yağ Bileşenleri ve Benznidazolün Sitotoksisite ve SI Değerleri

Etken Maddeler	48. Saat (IC_{50})		
	<i>T.cruzi</i>	L929	SI
Alfa-pinen	26.68	23.94	20.79
İsoborneol	128.7	88.67	73.63
Karvakrol	4.56	3.2	2.49
Kumarin	169.3	115.4	108.6
Öjenol	6.04	3.7	1.65
Benznidazol	1011	822.1	806.9

IC_{50} : %50 inhibitör konsantrasyon, SI: Seçicilik indeksi



Şekil 3. Etken maddelerin L929 fibroblastlara karşı IC_{50} değerlerini gösteren grafikler.

Tablo V. Uçucu Yağ Bileşenleri ve Benznidazolün Kombinasyonlarının T.cruzi Suşuna Karşı Etkileşim Sonuçları

Kombinasyon	24. Saat		48. Saat		72. Saat	
	FİK İndeksi	Etkileşim	FİK İndeksi	Etkileşim	FİK İndeksi	Etkileşim
APN - BENZ	0.372	Sinerji	0.372	Sinerji	0.372	Sinerji
ISO - BENZ	0.374	Sinerji	0.497	Sinerji	0.372	Sinerji
KAR - BENZ	0.623	Kısmi sinerji	0.562	Kısmi sinerji	0.374	Sinerji
KUM - BENZ	0.247	Sinerji	0.373	Sinerji	0.373	Sinerji
ÖJE - BENZ	0.75	Kısmi sinerji	0.498	Sinerji	0.373	Sinerji

APN: Alfa-pinen, ISO: İsoborneol, KAR: Karvakrol, KUM: Kumarin, ÖJE: Öjenol, BENZ: Benznidazol, FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu.

göstermektedir. Uzun süreli tedavi protokolleri ve ilaca dirençli *T.cruzi* suşlarının ortaya çıkması hastalığın tedavisini sınırlandırmaktadır²⁰. *T.cruzi*'de görülen ilaç direncinin mekanizması hala anlaşılmış değildir. Çoklu biyolojik etkilere sahip doğal bileşikler, yeni ilaç formülasyonları ve yeni kombinasyonlar, ilaç direncinin üstesinden gelme çabalarına destek olabilir²¹. Bu stratejiler içinde çeşitli mikroorganizmalara karşı biyolojik aktiviteleri gösterilmiş olan UYB'ler iyi birer alternatif oluşturabilir¹⁰.

Alfa-pinen, monotermen sınıfının bir üyesi olup kozalaklı ağaçlar, *Juniper* spp. ve *Cannabis* spp. gibi bitkilerde yüksek oranda bulunmaktadır. Alfa-pinen, yüzyıllardır solunum yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılmaktadır. In vitro deneyler, bu bileşiğin antimikrobiyal etkilerine yönelik güçlü kanıtlar sunmaktadır²². Brito ve arkadaşları²³, içeriğinde yüksek oranda alfa-pinen bulunan *Saururus cernuus* L. bitkisinin uçucu yağının 17.3 µg/mL EC₅₀ değeri ile *T.cruzi*'ye karşı etkili olduğunu ve yüksek seçicilik gösterdiğini (SI > 1) bildirmiştir. Pereira ve arkadaşları tarafından yapılan benzer bir çalışmada²⁴, majör bileşeni alfa-pinen olan *Cordia verbenacea* uçucu yağının *T.cruzi*'ye karşı LC₅₀ değeri 92.01 µg/mL, fibroblastlara karşı LC₅₀ değeri ise 138.1 µg/mL olarak saptanmış ve uçucu yağın güçlü antitripanozomal etkinlik ve yüksek seçicilik gösterdiği ifade edilmiştir. Yine majör bileşeni alfa-pinen olan *Piper tuberculatum* Jacq uçucu yağının *T.cruzi*'ye karşı LC₅₀ değeri 140.31 µg/mL, fibroblastlara karşı LC₅₀ değeri ise 204.71 µg/mL olarak saptanmış ve güçlü etkinlik ve yüksek seçicilik (SI > 1) gösterdiği bildirilmiştir²⁵. Literatürde içeriğinde alfa-pinen bulunan uçucu yağların *T.cruzi*'ye karşı etkinliğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır ancak total yağ içeriğinde bulunan diğer bileşenlerin de biyolojik etkiden sorumlu olabileceği unutulmamalıdır. Total yağ içeriğinde bulunan majör bileşenlerin saf olarak araştırılması daha sağlıklı verilerin elde edilmesinde önem arz etmektedir. Çalışmamızda da olduğu gibi alfa-pinenin saf olarak antitripanozomal etkinliğinin gösterildiği sınırlı çalışma bulunmaktadır. Amaral ve arkadaşları tarafından yapılan kapsamlı bir çalışmada²⁶, in vitro şartlarda alfa-pinen ve beta-karyofilenin güçlü antitripanozomal etkinliğe sahip olduğu, in vivo şartlarda ise 1 mL/kg dozlarda farelerin yaşam sürelerini uzattığı ve %83.33'lük bir tedavi başarısı

sağladığı gösterilmiştir. Çalışmamızda, alfa-pinenin *T.cruzi*'ye karşı IC_{50} değeri 11.8 µg/mL, L929 fibroblast hücrelerine karşı IC_{50} değeri ise 23.94 µg/mL olarak belirlenmiş olup parazite yönelik güçlü aktivite ve yüksek seçicilik gösterdiği (SI > 1) saptanmıştır. Ayrıca BENZ ile kombinasyonunda sinerjik etkileşim gözlenmesi bu kombinasyonun in vivo şartlarda deneysel tedaviye olumlu katkılar sunacağını düşündürmektedir.

Borneolün bir izomeri olan izoborneol, çok sayıda bitkinin uçucu yağlarında bulunan monoterpenoid bir alkoldür. Çin'de kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan birçok ilaç borneol veya izoborneol içermektedir. Yapılan çalışmalar izoborneolün antienflamatuvar etkiye sahip olduğunu ve kardiyovasküler sistemi koruyabildiğini göstermiştir. Ayrıca, izoborneolün kan-beyin bariyerini geçebildiği veya diğer ilaçların geçmesine yardımcı olduğu kanıtlanmıştır²⁷. İzoborneolün antitripanozomal etkinliğine yönelik bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır ancak *T.cruzi* ile yakın ilişkili bir tür olan *Leishmania* türüne karşı sınırlı çalışma bulunmaktadır. Machodo ve arkadaşları²⁸, *Leishmania infantum*, *Leishmania tropica* ve *Leishmania major* promastigotlarına karşı izoborneolü değerlendirilmiş ve 400 µg/mL konsantrasyonda bile antilayşmanyal aktivite görülmediğini bildirmişlerdir. Buna karşılık Silva ve arkadaşları, *Leishmania amazonensis* türüne karşı izoborneolün 190.2 µg/mL IC_{50} değeriyle güçlü antilayşmanyal aktivite ve L929 fibroblastlara karşı düşük sitotoksikite gösterdiğini bildirmiştir. Elde edilen farklı sonuçlar izolat ve etken madde farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Çalışmamız bilindiği kadarıyla izoborneolün *T.cruzi*'ye karşı etkinliğinin ve BENZ ile kombinasyonun araştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmamızda, izoborneolün IC_{50} değeri *T.cruzi*'ye karşı 114.6 µg/mL, L929 fibroblastlara karşı ise 88.67 µg/mL olarak saptanmış olup güçlü antitripanozomal etkinlik ancak düşük seçicilik (SI < 1) gösterdiği saptanmıştır. Buna karşılık izoborneol ile BENZ arasında sinerjik etkileşim gözlenmesi çok daha düşük dozlarda aynı etkiyi göstereceği için tedaviye olumlu katkı sunabilir.

Karvakrol monoterpenoid fenol ailesinden izomerik bileşiklerdir. Bu uçucu yağlar *Lamiaceae* familyası, *Thymus*, *Satureja*, *Origanum*, *Thymbra*, *Lippia pepperwort*, *Corydorthymus* ve Wild bergamot gibi çeşitli aromatik bitki gruplarından elde edilir. Karvakrolün antifungal, antikanser, antioksidan, anti-Parkinson, anti-anksiyete ve antibakteriyel aktivitelere sahip olduğuna yönelik çok sayıda kanıt bulunmaktadır²⁹. Monzote ve arkadaşları³⁰, *Plectranthus amboinicus* bitkisinin uçucu yağında majör bileşen olarak bulunan karvakrolün etkinliğini bakteri, mantar ve protozoon parazitlere karşı araştırmış; *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Trypanosoma brucei*, *T.cruzi* ve *L.infantum* türlerine karşı IC_{50} değerini > 64 µg/mL, *Staphylococcus aureus* için 20.2 µg/mL, *Plasmodium falciparum* için 6.3 µg/mL ve *L.amazonensis* için ise 28.8 µg/mL olarak bildirmişlerdir. Ayrıca yazarlar, üç farklı kanser hücre hattına karşı karvakrolün sitotoksik etkiler gösterirken kanser karakterinde olmayan hücre hatlarına karşı toksik olmadığını ifade etmişlerdir. Literatürde uçucu yağların ve başta karvakrol gibi çeşitli bileşenlerin *Trypanosoma* ve *Leishmania* türlerine karşı etkinliğini gösteren çok sayıda veri bulunmaktadır³¹. Ancak doğal aktif bileşiğin antimikrobiyal etkinliğini çalışırken paralel sitotoksikite testlerinin yapılması ve çalışma sonuçlarının bu faktörler ışığında

yorumlanması önem arz etmektedir. Çok etkili görünen bir bileşiğin seçicilik indeksinin yüksek olması beklenir. Çalışmamızda karvakrolün *T.cruzi*'ye karşı IC_{50} değeri 3.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, L929 fibroblastlara karşı IC_{50} değeri ise 3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak bulunmuştur. Karvakrol *T.cruzi* izolatına karşı çok etkili olmakla birlikte düşük seçiciliğe ($SI < 1$) sahiptir. Böyle durumlarda kombinasyon stratejileri ile daha düşük dozlarda etkinliğin sağlanması ya da nanopartikül hibridizasyonu gibi yeni nesil yöntemlerle mevcut bileşiklerin sitotoksitesisi düşürülebilir. Önceki çalışmamızda tek başına *Leishmania* suşuna karşı etkili ancak toksisitesi yüksek olan karvakrol, gümüş nanopartiküller ile birlikte hibrit olarak sentezlenmiş ve toksisitesinin düşürülmesi sağlanmıştır (kabul edilmiş ancak henüz yayımlanmamış veri). Çalışmamızda karvakrol ile BENZ kombinasyonu *T.cruzi*'ye karşı çalışılmış ve sinerjik etkileşimler elde edilmiştir. Literatürde *T.cruzi*'ye karşı karvakrol ile BENZ kombinasyonuna yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Birleşik benzen ve alfa-piron halkalarından oluşan kumarin (2H-1-benzopiran-2-bir), ilk olarak 1820 yılında *Fabaceae* familyasından Tonka fasulyesinden (*Dipteryx odorata*) izole edilmiştir. Kumarinler çok çeşitli bitki türlerinde bulunan ikincil metabolitlerdir ve en çok *Apiaceae*, *Rutaceae*, *Asteraceae* ve *Fabaceae* familyalarında yaygındır. Kumarinler çeşitli biyolojik aktiviteler ve farmakolojik özelliklerle ilişkilidir. Gerek çeşitli bitkilerden elde edilen doğal kumarin gerekse sentetik modifikasyonlarla sentezlenen türevleri güçlü biyolojik özellikler göstermektedir. Etki mekanizmaları genel olarak hücre zarlarında hasar, enzim aktivitesinin inhibisyonu, nükleik asit sentezinin ve çeşitli metabolik yolların engellenmesi şeklinde tanımlanmaktadır³². Capelini ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada³³, 17 farklı kumarin türevi *T.cruzi* paraziti ve L929 fibroblastına karşı in vitro olarak çalışılmış, bunlardan iki tanesinin BENZ'e eş değer IC_{50} değerleri ve yüksek SI (> 50) değerleriyle etkili antitripanozomal bileşikler olduğu bildirilmiştir. *Calophyllum brasiliense* bitkisinden izole edilen kumarinin *T.cruzi*'ye karşı etki mekanizmasının araştırıldığı bir çalışmada, bileşiğin otofaji ve apoptoz benzeri olaylarla *T.cruzi*'nin epimastigot ve tripomastigot formları için (LC_{50} değerleri sırasıyla, 85.8 ve 36.9 μM) hücre ölümünü indüklediği ve tedavide yeni ilaçların geliştirilmesi için umut verici bir molekül olabileceği ifade edilmiştir³⁴. Gelişen teknolojilerle yeni nesil etken madde tasarımlarının uygulanması oldukça popüler hale gelmiştir. Antiparaziter etkili olup suda çözünürlüğü zayıf ya da toksisitesi yüksek olan bileşiklerin yeni nesil çözümlerle tedavilere katkı sağlama potansiyelinin artırılması önemli bir adımdır. Bu bağlamda, Rostan ve arkadaşları³⁵, yapısında kumarin içeren yeni bir palladyum kompleksinin *T.cruzi*'ye karşı etkinliğini değerlendirmiş ve 25 μM konsantrasyonda BENZ'e eş değer bir etkinlik gösterdiğini ve in vivo modellerde parazitemi sayısında kayda değer bir azalma olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, test edilen kumarin bileşiğinin *T.cruzi*'ye ve L929 fibroblastlara karşı etkinliği sırasıyla 268.6 ve 115.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak bulunmuş olup BENZ'e kıyasla etkinliğinin ve seçiciliğinin zayıf ($SI < 1$) olduğu gözlenmiştir. Literatüre bakıldığında genellikle kimyasal modifikasyon ile sentezlenen kumarin türevlerinin *T.cruzi*'ye karşı çok daha etkili olduğu görülmektedir. Bu yönteme ek olarak zayıf etkili bileşiklerin kombinasyon stratejileri ile etkinliğinin artırılması ve toksisitesinin düşürülmesi mümkündür. Çalışmamızda zayıf et-

kili olan kumarin ile BENZ arasında sinerjik etkileşim gözlenmiştir. Kumarinler ile BENZ arasında kombinasyon çalışmalarının araştırıldığı az sayıda çalışma olup bu çalışmalarda da sinerjik etkileşimler saptandığı bildirilmiştir^{36,37}.

Öjenol; *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae* ve *Myristicaceae* gibi çeşitli bitki familyalarının uçucu yağlarında bulunan bir fenilpropanoiddir. Gıdalarda ve kozmetik ürünlerde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, öjenolün antienflamatuvar, analjezik ve antioksidan özelliklere sahip olduğunu ve kanser, enflamatuvar bağırsak hastalıkları, böbrek ve akciğer yaralanmaları ve osteoartrit tedavisinde potansiyel kullanımı olduğunu göstermiştir. Öjenolün anti-enflamatuvar ve antioksidan etkileriyle ilişkili mekanizmalar, transkripsiyon faktörleri ve proenflamatuvar sitokinlerin yanı sıra antioksidan savunma sistemini oluşturan endojen moleküllerin düzenlenmesi üzerinde birleşmektedir³⁸. Teles ve arkadaşları, majör bileşeni öjenol (%52.23) olan *Syzygium aromaticum* bitkisinin uçucu yağını ve öjenolün saf formunu *T.cruzi*'ye karşı araştırmış ve IC₅₀ değerlerini epimastigot formlara karşı sırasıyla, 28.68 ve 31.97 µg/mL, amastigot formlarına karşı ise sırasıyla, 64.51 ve 45.73 µg/mL olarak bildirilmiş, hem uçucu yağın hem de öjenolün parazite karşı yüksek seçicilik gösterdiğini ifade etmiştir³⁹. Clemente ve arkadaşları⁴⁰ öjenolün; antiplazmodiyal, antitripanozomal ve antilayşmanyal aktivitelerini çalışmış ve öjenolün *L.braziliensis* ve *P.falciparum*'a karşı güçlü, *T.cruzi*'ye karşı orta düzeyde etkili olduğunu bildirmiştir. Doğal öjenolün antitripanozomal etkinliğine yönelik çalışmalara ek olarak farklı sentetik türevlerinin de araştırıldığı yeni çalışmalar önem kazanmaya başlamıştır. Sear ve arkadaşları⁴¹, doğal bir ürün olan neolignan dehidrodiojenol B'nin türevlerini sentezleyerek bu analogların IC₅₀ değerlerini *T.cruzi*'nin amastigot formlarına karşı 4-63 µM aralığında, fibroblastlara karşı ise > 200 µM olarak saptamış ve güçlü etkinlik, yüksek seçicilik gösterdiğini ifade etmiştir. Çalışmamızda öjenolün *T.cruzi*'ye ve L929 fibroblastlara karşı IC₅₀ değerleri sırasıyla 19.5 ve 3.7 µg/mL olarak bulunmuştur. Öjenol için BENZ'e eş değer şekilde yüksek etkinlik ancak düşük seçicilik (SI< 1) saptanmıştır. Buna karşılık öjenol ve BENZ kombinasyonunda sinerjik etkileşimler gözlenmiştir. Bir kombinasyonda sinerjik etkileşimin gözlenmesi en az dört kat daha düşük dozlarda aynı etkinliğin saptanması anlamına gelmektedir. Bu bağlamda antimikrobiyal etkinliği yüksek ancak seçiciliği düşük olan alternatif moleküller, kombinasyon stratejileriyle tedaviye olumlu katkı sunabilir. Kombinasyon stratejilerine ek olarak güncel bir çalışmada, BENZ'in nitroimidazol halkası ile nitratlı veya nitratsız formlardaki öjenol veya analoglarının çekirdeği arasında biyoizosterik bir yer değiştirme gerçekleştirerek öjenol ve BENZ arasında moleküler hibritler tasarlanmıştır. Sentezlenen hibrit bileşikler *T.cruzi*'nin epimastigot ve amastigot formlarına karşı denenmiştir. Bu bileşiklerden birinin (öjenol nitro türev 8 IC₅₀ = 24.7 µM) BENZ (IC₅₀ = 29.9 µM) ile eş değer etkinliğe ve düşük sitotoksitesi ile yüksek seçiciliğe sahip olduğu bildirilmiştir⁴². Yine majör bileşeni öjenol olan *S.aromaticum* ve *Zingiber officinale* uçucu yağlarının antitripanozomal etkinliğinin in vivo kemirgen modelinde araştırıldığı bir çalışmada, uçucu yağların hem tek başlarına hem de BENZ ile kombinasyon halinde uygulandıklarında kontrol grubuna kıyasla farelerdeki parazitemi oranını azaltıp yaşam süresini artırdığı bildirilmiştir⁴³.

Bu çalışmanın en önemli kısıtlılığı, UYB'lerin sadece in vitro epimastigot formlarına karşı test edilmesi, hücresel amastigotlar üzerinde test edilmemiş olmasıdır. Şu anki verilerimize göre alfa-pinen dışında düşük seçicilik gösteren bu bileşenlerin hücresel amastigotlar üzerinde farklı seçicilik indekslerine sahip olabileceği olasıdır. Diğer çalışmalar verilerimizi desteklemekle birlikte çalışmamızdaki UYB'ler ile BENZ kombinasyonuna yönelik literatürde benzer çalışmalara rastlanmamış olup çalışmamız bu anlamda ilk verileri literatüre kazandırmaktadır.

Doğal ürünler, bitki fizyolojisinde önemli bir rol oynayan ikincil metabolitler açısından zengin bir kimyasal bileşime sahiptir. Antioksidan, antienflamatuvar, antikanser, antibakteriyel ve antifungal aktiviteler gibi çeşitli potansiyel biyolojik faydalara ve buna ek olarak, şu anda bitkilerden izole edilen aktif bileşiklere dayanan yüzlerce ilaç bulunmaktadır. Gelecekte doğal ürün araştırmaları, geçmişten önemli ölçüde farklı olacak şekilde, fitokimyası yenilikçi teknolojik kaynaklarla birleştiren multidisipliner bir süreç olmalıdır. UYB'lerin güçlü antitripanozomal etkinlikleri yanında BENZ ile sinerjik etkileşim göstermesi, yeni nesil ilaç kombinasyonlarının tasarlanması, yan etkilerin azaltılması ve direnç gelişiminin önlenmesi adına literatürdeki önemli boşlukları doldurabilir ve gelecek çalışmalara yön verebilir.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma kapsamında herhangi bir insan veya hayvan materyali kullanılmamıştır. Tüm deneyler yalnızca sıvı azotta muhafaza edilen ve daha önce izole edilmiş *T.cruzi* suşları ile in vitro olarak gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle çalışmada etik kurul onayı gerekmemektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından 2023/207 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO). Chagas disease. Erişim adresi: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (Erişim tarihi: 15.12.2024).
2. Hochberg NS, Montgomery SP. Chagas disease. *Ann Intern Med* 2023; 176(2): 17-32. <https://doi.org/10.7326/AITC202302210>
3. Nguyen T, Waseem M. Chagas disease. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
4. Jackson Y, Wyssa B, Chappuis F. Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother* 2020; 75: 690-6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz473>
5. Clark EH, Messenger LA, Whitman JD, Bern C. Chagas disease in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2024; 37(2): e0009923. <https://doi.org/10.1128/cmr.00099-23>

6. Garcia-Huertas P, Cardona-Castro N. Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets. *Biomed Pharmacother* 2021; 142: 112020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112020>
7. Santoro GF, Cardoso MG, Guimarães LGL. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L., *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. *Exp Parasitol* 2007; 116: 283-90. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.01.018>
8. Zanusso GJ, Massago M, Teston APM, Morey AT, Toledo MJO. Efficacy of some essential oils in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Trop J Pharm Res* 2017; 16: 1307. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i6.14>
9. Lazarin-Bidóia D, Garcia FP, Ueda-Nakamura T, Silva SO, Nakamura CV. Natural compounds based chemotherapeutic against Chagas disease and leishmaniasis: Mitochondrion as a strategic target. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2022; 117: e220396. <https://doi.org/10.1590/0074-02760220396>
10. Morais MC, Souza JV, da Silva Maia Bezerra Filho C, Dolabella SS, Sousa DP. Trypanocidal essential oils: A review. *Molecules* 2020; 25(19): 4568. <https://doi.org/10.3390/molecules25194568>
11. Okoliegbe IN, Hijazi K, Cooper K, Ironside C, Gould IM. Antimicrobial synergy testing: Comparing the tobramycin and ceftazidime gradient diffusion methodology used in assessing synergy in cystic fibrosis-derived multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics (Basel)* 2021; 10(8): 967. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080967>
12. Özbilgin A, Çavuş I, Nuraydin A, Özel Y. The production of *Trypanosoma brucei rhodesiense*, cause of African sleeping sickness, and *Trypanosoma cruzi*, cause of American Chagas disease, on different medias and testing a New Media. *Turkish J Parasitol* 2020; 44(1): 7. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2019.6656>
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
14. Özel Y, Çavuş İ, Yılmaz U, Tokay F, Bağdat S, Özbilgin A, et al. Hibrit gümüş nanoparçacık komplekslerinin sitotoksik ve antilayşmanyal aktivitesinin araştırılması: *Leishmania türlerine karşı potansiyel ilaç adayları*. *Mikrobiyol Bul* 2024; 58(2): 182-95. <https://doi.org/10.5578/mb.202498184>
15. Özbilgin A, Zeyrek FY, Güray MZ, Çulha G, Akyar I, Harman M, et al. Determination of antimony resistance mechanism of *Leishmania tropica* causing cutaneous Leishmaniasis in Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2020; 54(3): 444-62. <https://doi.org/10.5578/mb.69702>
16. Tronina T, Bartmanska A, Popłonski J, Rychlicka M, Sordon S, Filip-Psurska B, et al. Prenylated flavonoids with selective toxicity against human cancers. *Int J Mol Sci* 2023; 24(8): 7408. <https://doi.org/10.3390/ijms24087408>
17. Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations. In: Lorian V (eds). *Antibiotics in laboratory medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2005: 365-439.
18. Özel Y, Yılmaz U, Ünlü M, Vardar Ünlü G. Antibacterial activity and synergistic interaction of various essential oil components and antibiotics. *Mikrobiyol Bul* 2022; 56(1): 95-102. <https://doi.org/10.5578/mb.20229908>
19. Li YJ, Pan CZ, Zhao ZW, Zhao ZX, Chen HL, Lu WB. Effects of a combination of amlodipine and imipenem on 42 clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* obtained from a teaching hospital in Guangzhou, China. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 548. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-548>
20. Sales Junior PA, Molina I, Fonseca Murta SM, Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Corrêa-Oliveira R, et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. *Am J Trop Med Hyg* 2017; 97(5): 1289-303. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>
21. Murta SMF, Lemos Santana PA, Jacques Dit Lapierre TJW, Penteado AB, El Hajje M, Navarro Vinha TC, et al. New drug discovery strategies for the treatment of benzimidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Expert Opin Drug Discov* 2024; 19(6): 741-53. <https://doi.org/10.1080/17460441.2024.2349155>
22. Allenspach M, Steuer C. α -Pinene: A never-ending story. *Phytochemistry* 2021; 190: 112857. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112857>
23. Britoa JR, Costa-Silva TA, Londeroa VS, Baldimc JL, Temponed AG, Ferreirae EA, et al. Molecular dereplication of volatile oils from *Saururus cernuus* L. and evaluation of antitrypanosoma cruzi activity. *Quim Nova* 2022; 4(2): 159-64. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170811>

24. Pereira PS, Oliveira CVB, Maia AJ, Tintino SR, Oliveira-Tintino CDM, Vega-Gomez MC, et al. Cytotoxicity of essential oil cordia verbenaceae against Leishmania brasiliensis and Trypanosoma cruzi. *Molecules* 2021; 26(15): 4485. <https://doi.org/10.3390/molecules26154485>
25. Dos Santos Sales V, Monteiro AB, Delmondes GA, do Nascimento EP, Sobreira Dantas Nóbrega de Figueiredo FR, de Souza Rodrigues CK, et al. Antiparasitic activity and essential oil chemical analysis of the piper tuberculatum Jacq Fruit. *Iran J Pharm Res* 2018; 17(1): 268-75.
26. Amaral RG, Baldissera MD, Grando TH, Couto JCM, Posser CP, Ramos AP, et al. Combination of the essential oil constituents α -pinene and β -caryophyllene as a potentiator of trypanocidal action on Trypanosoma evansi. *J Appl Biomed* 2016; 14(4): 265-72. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2016.04.004>
27. Wang Y, Li Z, Liu B, Wu R, Gong H, Su Z, et al. Isoborneol attenuates low-density lipoprotein accumulation and foam cell formation in macrophages. *Drug Des Devel Ther* 2020; 14: 167-73. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S233013>
28. Machado M, Dinis AM, Santos-Rosa M, Alves V, Salgueiro L, Cavaleiro C, et al. Activity of Thymus capitellatus volatile extract, 1,8-cineole and borneol against Leishmania species. *Vet Parasitol* 2014; 200(1-2): 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.016>
29. Peter S, Sotondoshe N, Aderibigbe BA. Carvacrol and thymol hybrids: Potential anticancer and antibacterial therapeutics. *Molecules* 2024; 29(10): 2277. <https://doi.org/10.3390/molecules29102277>
30. Monzote L, Scherbakov AM, Scull R, Gutiérrez YI, Satyal P, Cos P, et al. Pharmacological assessment of the carvacrol chemotype essential oil from Plectranthus amboinicus growing in Cuba. *Natural Product Communications* 2020; 15(10). <https://doi.org/10.1177/1934578X20962233>
31. Luna EC, Luna IS, Scotti L, Monteiro AFM, Scotti MT, de Moura RO, et al. Active essential oils and their components in use against neglected diseases and arboviruses. *Oxid Med Cell Longev* 2019; 2019: 6587150. <https://doi.org/10.1155/2019/6587150>
32. Yadav AK, Maharjan Shrestha R, Yadav PN. Anticancer mechanism of coumarin-based derivatives. *Eur J Med Chem* 2024; 267: 116179. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.116179>
33. Capelini C, Câmara VRF, Villar JDF, Barbosa JMC, Salomão K, de Castro SL, et al. Synthesis, antitypanosomal and antimycobacterial activities of coumarin N-acylhydrazonic derivatives. *Med Chem* 2021; 17(6): 630-7. <https://doi.org/10.2174/1573406416666200121105215>
34. Rodríguez-Hernández KD, Martínez I, Reyes-Chilpa R, Espinoza B. Mamea type coumarins isolated from Calophyllum brasiliense induced apoptotic cell death of Trypanosoma cruzi through mitochondrial dysfunction, ROS production and cell cycle alterations. *Bioorg Chem* 2020; 100: 103894. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103894>
35. Rostán S, Porto S, Barbosa CLN, Assis D, Alvarez N, Machado FS, et al. A novel palladium complex with a coumarin-thiosemicarbazone hybrid ligand inhibits Trypanosoma cruzi release from host cells and lowers the parasitemia in vivo. *J Biol Inorg Chem* 2023; (8): 711-23. <https://doi.org/10.1007/s00775-023-02020-2>
36. Seguel V, Castro L, Reigada C, Cortes L, Díaz MV, Miranda MR, et al. Pentamidine antagonizes the benznidazole's effect in vitro, and lacks of synergy in vivo: Implications about the polyamine transport as an anti-Trypanosoma cruzi target. *Exp Parasitol* 2016; 171: 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.10.007>
37. Vilas-Boas DF, Oliveira RRG, Gonçalves-Santos E, Silva LS, Diniz LF, Mazzeti AL, et al. 4-nitrobenzoylcoumarin potentiates the antiparasitic, anti-inflammatory and cardioprotective effects of benznidazole in a murine model of acute Trypanosoma cruzi infection. *Acta Tropica* 2022; 228: 106314. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106314>
38. Damasceno ROS, Pinheiro JLS, Rodrigues LHM, Gomes RC, Duarte ABS, Emídio JJ, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of eugenol: An update. *Pharmaceuticals (Basel)* 2024; 17(11): 1505. <https://doi.org/10.3390/ph17111505>
39. Teles AM, Silva-Silva JV, Fernandes JMP, Abreu-Silva AL, Calabrese KDS, Mendes Filho NE, et al. GC-MS characterization of antibacterial, antioxidant, and antitypanosomal activity of Syzygium aromaticum essential oil and eugenol. *Evid Based Complement Alternat Med* 2021; 2021: 6663255. <https://doi.org/10.1155/2021/6663255>

40. Clemente CM, Pineda T, Yepes LM, Upegui Y, Allemandi DA, Robledo SM, et al. Eugenol carbonate activity against *Plasmodium falciparum*, *Leishmania braziliensis*, and *Trypanosoma cruzi*. *Arch Pharm (Weinheim)* 2022; 355(3): e2100432. <https://doi.org/10.1002/ardp.202100432>
41. Sear CE, Pieper P, Amaral M, Romanelli MM, Costa-Silva TA, Haugland MM, et al. Synthesis and structure-activity relationship of dehydrodieugenol B neolignans against *Trypanosoma cruzi*. *ACS Infect Dis* 2020; 6(11): 2872-8. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00523>
42. de Melo İM, Camargo TP, da Silva VA, Dos Santos EG, Caldas IS, Mansur Pontes CL, et al. Discovery of a new eugenol-benznidazole hybrid active against different evolutive stages of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Chem* 2025; 154: 107993. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2024.107993>
43. Sarto MPM, Lucas da Silva HF, de Souza Fernandes N, de Abreu AP, Zanusso Junior G, de Ornelas Toledo MJ. Essential oils from *Syzygium aromaticum* and *Zingiber officinale*, administered alone or in combination with benznidazole, reduce the parasite load in mice orally inoculated with *Trypanosoma cruzi* II. *BMC Complement Med Ther* 2021; 21(1): 77. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03248-8>



Bu eser CC BY-NC Atf-GayriTicari Türev Eser Yaratma 4.0 Uluslararası Lisansı kapsamında lisanslanmıştır.

Veri Paylaşım Beyanı: Bu çalışmanın bulgularını destekleyen veriler, makul talepler doğrultusunda sorumlu yazardan temin edilebilir.

©Telif Hakkı 2025 Mikrobiyoloji Bülteni'ne aittir. Makale metnine www.mikrobiyolbul.org web sayfasından ulaşılabilir.