

Uçucu Yağ Bileşenleri ile Hibritlenen Gümüş Nanoparçacıkların Antilayşmanyal İlaçlarla Kombinasyonunun Araştırılması

Investigation of the Combination of Silver Nanoparticles Hybridized with Essential Oil Components with Antileishmanial Drugs

Yener ÖZEL¹(ID), İbrahim ÇAVUŞ²(ID), Umut YILMAZ¹(ID), Ayşegül DALMIZRAK³(ID), Feyzullah TOKAY⁴(ID), Sema BAĞDAT⁴(ID), Gülhan VARDAR ÜNLÜ¹(ID), Mehmet ÜNLÜ¹(ID), Ahmet ÖZBİLGİN²(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.

³Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.

³Balıkesir University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Balıkesir, Türkiye.

⁴Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir.

⁴Balıkesir University Science and Letters Faculty, Department of Analytical Chemistry, Balıkesir, Türkiye.

*Bu çalışma, Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2022/035 numaralı BAP projesi ile desteklenmiştir.

**Bu çalışma, 23. Ulusal Parazitoloji Kongresi (30 Ekim - 3 Kasım 2023, Antalya)'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Makale Atfı: Özel Y, Çavuş İ, Yılmaz U, Dalmazrak A, Tokay F, Bağdat S ve ark. Uçucu yağ bileşenleri ile hibritlenen gümüş nanoparçacıkların antilayşmanyal ilaçlarla kombinasyonunun araştırılması. Mikrobiyol Bul 2025;59(2):228-241.

ÖZ

Layşmanyaz; hijyen, altyapı ve vektör kontrolü gibi önleyici tedbirlerin yetersiz olduğu ülkelerde, yaklaşık 12-15 milyon insanı etkileyen önemli bir tropikal hastalıktır. Yoğun araştırmalara rağmen layşmanyaz için tam anlamıyla etkili bir önlem ve tedavi yöntemi hala bulunmamaktadır. Antiparaziter ilaçların yan etkileri ve ciddi sorunlara yol açabilmeleri nedeniyle, uygun tedavi yöntemlerinin keşfi ve geliştirilmesi veya güçlü antilayşmanyal bileşiklerin bulunmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada, gümüş nanoparçacık (NP)'lar ile birlikte sentezlenen sinamaldehit (Sin), karvakrol (Kar) ve timol (Tim) gibi uçucu yağ bileşenlerinden oluşan hibrit NP'lerin sitotoksik aktivitesinin, antilayşmanyal etkinliğinin ve antilayşmanyal ilaçlarla kombinasyonunun araştırılması amaçlanmıştır. Gümüş (Ag)'ün, NP olarak sentezlenmesi sırasında indirgeyici olarak amiloz tercih edilmiştir. Sentez sonucunda merkezinde okside amiloz bulunan Sin Ag (OA-SinAgNP), Kar Ag (OA-KarAgNP) ve Tim Ag (OA-TimAgNP) olmak üzere üç farklı hibrit NP sentezlenmiştir. Sentezlenen NP'ler, FT-IR spektrometresi ve buna ek olarak geçirimli elektron mikroskobu [transmission electron microscope (TEM)] ve taramalı elektron mikroskobu [scanning electron microscope (SEM)] analizleriyle karakterize edilmiştir. NP'lerin sitotoksitesi L929 fibroblastlara, antilayşmanyal aktivitesi ise *Leishmania tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) suşuna karşı sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle

belirlenmiştir. NP komplekslerinin antilayşmanyal ilaçlar olan pentostam ve miltefosin ile etkileşimleri ise dama tahtası yöntemiyle belirlenmiştir. Karakterizasyon analizleri, amiloz yüzeyinin Ag, Sin, Kar ve Tim ile kaplandığını ve oluşan hibrit komplekslerin başarılı bir şekilde sentezlenebildiğini göstermiştir. Hibrit NP komplekslerinin SEM analizlerinde, yapının merkezini oluşturan okside amilozun yüzeylerinde Ag iyonları ile uçucu yağ bileşenlerinin yerleştiği ve NP kompleksinin başarıyla sentezlendiği görülmüştür. Alınan görüntülerde NP'lerin morfolojik şekillerinin yuvarlak görünümünden düzensiz kenarlı görümlere kadar değiştiği saptanmıştır. TEM analizinde ise NP boyutlarının değişken olup OA-SinAgNP için 9.34-14.45 nm aralığında, OA-KarAgNP için 9.88-32.3 nm aralığında ve OA-TimAgNP için 12.01-20.01 nm aralığında olduğu saptanmıştır. OA-SinAgNP, OA-KarAgNP ve OA-TimAgNP hibrit NP komplekslerinin fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik etkinliklerinin 24, 48 ve 72. saatlerde, sırasıyla, 209.6-169.5 µg/mL, 190.4-172.3 µg/mL ve 286.4-259.8 µg/mL aralığında; antilayşmanyal aktivitelerinin ise sırasıyla, 66.04-53.87 µg/mL, 54.44-47.01 µg/mL ve 78.14-58.33 µg/mL arasında olduğu gözlenmiştir. NP'lerin antilayşmanyal etkinliğinin yüksek olduğu ve seçicilik indeksinin > 3 olduğu saptanmıştır. Başarıyla sentezlenen tüm hibrit NP komplekslerinin pentostam ve miltefosinle kombinasyonlarında sinerjik etkileşim tespit edilmiştir. Layşmanyazın tedavisinde geleneksel ilaçlara kıyasla toksisitesi düşük yeni biyoaktif bileşiklerin araştırılması giderek önem kazanmaktadır. Bu açıdan farmakolojik potansiyele sahip doğal ürünlerin nanoteknoloji uygulamalarıyla geliştirilmesi tedaviye önemli katkılar sunabilir. Antilayşmanyal etkinlikleri gösterilmiş olan Sin, Kar ve Tim gibi etkili uçucu yağ bileşenlerinin Ag NP'ler ile hibridize edilmesi ve bu yeni nesil moleküllerin güçlü antilayşmanyal etkinlikleri yanında mevcut antilayşmanyal ilaçlar ile sinerjik etkileşim göstermesi; yeni nesil ilaç kombinasyonlarının tasarlanması, yan etkilerin azaltılması ve direnç gelişiminin önlenmesi adına literatürdeki önemli boşlukları doldurma ve gelecek çalışmalara yön verme potansiyeline sahiptir.

Anahtar kelimeler: *Sinnamaldehyt; Karvakrol; Timol; Okside amiloz; Gümüş nanoparçacık.*

ABSTRACT

Leishmaniasis is an important tropical disease affecting approximately 12-15 million people in countries where preventive measures such as hygiene, infrastructure and vector control are insufficient. Despite intensive research, a fully effective prevention and treatment strategy for leishmaniasis has yet to be established. Due to the side effects of antiparasitic drugs and their potential to cause severe complications, there is a need to discover and develop appropriate treatment methods or identify potent antileishmanial compounds. This study aimed to evaluate the cytotoxic activity, antileishmanial efficacy and synergistic potential of hybrid nanoparticles (NPs) synthesized using volatile oil components namely cinnamaldehyde (Cin), carvacrol (Car) and thymol (Tim) combined with silver nanoparticles, in conjunction with standard antileishmanial drugs. Amylose was preferred as the reducing agent during the synthesis of silver (Ag) as a NP. As a result of the synthesis, three different hybrid nanoparticles were synthesized, namely Cin Ag (OA-CinAgNP), Car Ag (OA-CarAgNP) and Tim Ag (OA-TimAgNP), which have oxidized amylose at the core. The synthesized NPs were characterized using FT-IR spectroscopy, as well as transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) analyses. The cytotoxicity of the NPs was determined on L929 fibroblasts and their antileishmanial activity was assessed against the *Leishmania tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) strain using the broth microdilution method. The interactions of NP complexes with the antileishmanial drugs pentostam and miltefosine were determined using the checkerboard method. Characterization analyses show that the amylose surface was successfully coated with Ag, Cin, Car and Tim and the resulting hybrid complexes were successfully synthesized. SEM analyses of the hybrid NP complexes revealed that the Ag ions and essential oil components were deposited on the surfaces of oxidized amylose at the core of the structure, confirming the successful synthesis of the NP complexes. The obtained images showed that the morphological shapes of the NPs varied from round to irregularly edged structures. TEM analysis indicated that the NP sizes were varied from 9.34 to 14.45 nm for OA-CinAgNP, 9.88 to 32.3 nm for OA-CarAgNP and 12.01 to 20.01 nm for OA-TimAgNP. The cytotoxic activities of OA-CinAgNP, OA-CarAgNP and OA-TimAgNP hybrid NP complexes against fibroblast cells at 24, 48 and 72 hours were observed to be in the ranges of 209.6-169.5 µg/mL, 190.4-172.3 µg/mL, and 286.4-259.8 µg/mL, respectively. Antileishmanial activities of NPs were observed to be in the ranges of 66.04-53.87 µg/mL, 54.44-47.01 µg/mL, and 78.14-58.33 µg/mL, respectively.

It was found that the NPs exhibited high antileishmanial activity with a selectivity index of > 3 . Synergistic interactions were observed in all successfully synthesized hybrid NP complexes when combined with pentostam and miltefosine. Investigation of new bioactive compounds with lower toxicity compared to traditional drugs has become essential in the treatment of leishmaniasis. In this context, the development of natural products with pharmacological potential through nanotechnology applications could provide significant contributions to treatment strategies. The hybridization of effective essential oil components, such as Cin, Car and Tim, with Ag NPs and the demonstration of their strong antileishmanial activities, along with their synergistic interactions with existing antileishmanial drugs, may fill important gaps in the literature. This approach could guide future studies for designing new drug combinations, reducing side effects and preventing the development of resistance.

Keywords: *Cinnamaldehyde; Carvacrol; Thymol; Oxidized amylose; Silver nanoparticle.*

GİRİŞ

Layşmanyaz, hijyen, altyapı ve vektör kontrolü gibi önleyici tedbirlerin yetersiz olduğu ülkelerde yaklaşık 12-15 milyon insanı etkileyen, önemli bir tropikal hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre, 98 ülkede tahminen 350 milyon kişi hastalık riski altındadır¹. Layşmanyaz, *Leishmania* cinsine ait hücre içi parazitlerin neden olduğu ve kutanöz layşmanyaz (KL), mukokutanöz layşmanyaz (MKL) ve viseral layşmanyaz (VL) olmak üzere en az üç farklı klinik tabloyla ilişkilendirilen bir hastalıktır. KL'nin çeşitli klinik formlarından kaynaklanan komplikasyonlar, kendiliğinden sınırlanan cilt lezyonlarından yaygın (ciddi) iç organ tutulumuna kadar değişebilmektedir².

Layşmanyaz için etkili bir önlem ve tedavi yöntemi hala bulunmamaktadır. Layşmanyaz tedavisinde ilk tercih olarak kullanılan geleneksel ilaçlar; toksisite, finansal yük, uzun süreli tedavi, ilaç direnci ve ağırlı uygulama yöntemleri gibi birçok dezavantajı beraberinde getirmektedir³. Antiparaziter ilaçların istenmeyen yan etkileri nedeniyle, uygun tedavi yöntemlerinin veya alternatif antilayşmanyal bileşiklerin araştırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Nanoteknoloji, parçacıkların nanometre ölçeğinde çeşitli amaçlar için sentezlenmesi ve kullanılması esasına dayanan bilim dalıdır. Nanoparçacık (NP)'lerin fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerine bağlı olarak, kullanım amaçları farklılık göstermektedir. NP'lerin fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri, morfolojik ve yapısal özelliklerine, parçacık boyutlarına ve yüzey alanlarına bağlı olarak değişmektedir⁴. NP'ler, biyomedikal alanda antimikrobiyal, antitümör, anti-enflamatuvar ajanlar ve ilaç taşıyıcıları gibi çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Ayrıca NP'ler, bazı bakteriyel ve paraziter hastalıkların görüntülenmesi, tanısı ve tedavisinde de önem kazanmaya başlamıştır⁵. Layşmanyaza özgü kanıta dayalı çalışmalar, NP'lerin hem in vitro hem de in vivo olarak reaktif oksijen türleri üretimi yoluyla oksidatif stresi indükleyerek antilayşmanyal özelliklere sahip olduğunu göstermiştir^{4,6}.

Birçok çalışma, aromatik bitkilerin uçucu yağlarından elde edilen ana bileşenlerin güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Ancak bu bileşenlerin güçlü antimikrobiyal etkinliklerinin yanında toksik etkilerinin de belirlenmesi gerekmektedir. Bu tür bileşenlerin sitotoksitesi ve genotoksitesi üzerine çalışmalar olmasına rağmen güvenli kullanımları için yeterli veri bulunmamaktadır^{7,8}. Bu nedenle uçucu yağ bileşenlerinin toksisitelerinin azaltılmasını temel alan yöntemler önem kazanmaya başlamıştır.

Bu çalışmada, daha önceki çalışmamızda gözlemlediğimiz hibrit kurkumin gümüş (Ag) NP'lerinin sitotoksitesiteyi düşürmesi bulgusundan yola çıkılarak, saf formlarının toksik olduğu bilinen sinnalaldehit (Sin), karvakrol (Kar) ve timol (Tim) gibi uçucu yağ bileşenlerinden oluşan hibrit NP'lerin sitotoksik aktivitesinin, antilayşmanyal etkinliğinin ve antilayşmanyal ilaçlarla kombinasyonunun araştırılması amaçlanmıştır⁹.

GEREÇ ve YÖNTEM

Etik Kurul Onayı

Bu çalışmada insan veya hayvan materyalleri kullanılmamış olup çalışmada deneyler sıvı azotta korunan parazit suşları ile gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle etik kurul onayı gerekmemektedir.

Leishmania Suşu ve Hücre Hattı

Bu çalışmada, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasından alınan *Leishmania tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) referans suşu ve L929 fare fibroblast hücre hattı (American Type Culture Collection, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı. Çalışmada kullanılan parazit suşunun moleküler genotiplendirilmesi, ITS1 ve hsp70 gen lokasyonlarına özgül primerler kullanılarak yapıldı.

Antilayşmanyal İlaçlar ve Uçucu Yağ Bileşenleri

Antilayşmanyal ilaç etken maddeleri olan pentostam (16037-91-5) ve miltefosin (B2693-072166) BOCScience (ABD) firmasından; uçucu yağ bileşenleri olan Sinnalaldehit (C80687), Karvakrol (232197) ve Timol (T0501) ise Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edildi.

NP Komplekslerinin Sentezi

Okside amiloz sentezi

Karışımda 15 ml %30 H₂O₂, 2 ml %0.05 CuSO₄ ve 60 g amiloz birleştirilerek 40 °C'de 15 dakika süreyle karıştırıldı. Süre sonunda karışıma 400 ml kaynama sıcaklığına getirilmiş su eklenerek 75 °C'de 15 dakika daha karıştırıldı. Süre dolduğunda, karışıma 400 ml daha kaynama sıcaklığına getirilmiş su eklenerek 100 °C'de 30 dakika karıştırıldı. Çözelti oda sıcaklığına kadar soğutulup, 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant dört eşit hacme ayrıldı. Süpernatantlardan bakır iyonlarını uzaklaştırmak amacıyla diyaliz işlemi yapıldı. Diyaliz torbası, ışık görmeyecek şekilde oda sıcaklığında iki gün boyunca distile suya karşı diyalize edildi¹⁰.

Okside amiloz ile Sin/Kar/Tim-Ag NP hibrit kompleksinin sentezi

Diyalize edilen ve dört eşit hacme bölünen okside amiloz süpernatantlarının her birine, 100 ml kaynama sıcaklığına getirilmiş su ve 75 ml %0.02 mol/L AgNO₃ eklenerek karanlık ortamda 100 °C'de 120 dakika bekletildi. Her bir süpernatant karışımına, uçucu yağ bileşeninden 1 g eklendi ve sürekli karıştırılarak oda sıcaklığına getirildi. Karışımlar 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek fazla uçucu yağ bileşenlerinden arındırıldı.

Benzer şekilde karışımında bulunan AgNO_3 'ün fazlası ise diyaliz işlemiyle uzaklaştırıldı^{11,12}. Sentezlenen tüm hibrit NP kompleksleri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan Christ Alpha 1-2 LD Plus liyofilizasyon cihazı kullanılarak liyofilize edildi.

Hibrit NP Komplekslerinin FT-IR, SEM ve TEM Karakterizasyonu

Hibrit NP komplekslerinin FT-IR spektrumları, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Analitik Kimya Bölümünde bulunan ve dalga sayısı aralığı 4000 cm^{-1} ile 400 cm^{-1} olan Perkin Elmer Spectrum 65 model cihazla kaydedildi. Taramalı elektron mikroskobu [scanning electron microscope (SEM)] görüntüleri, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan JEOL JSM-7100F model cihaz, geçirimli elektron mikroskobu [transmission electron microscope (TEM)] görüntüleri ise aynı merkezde bulunan JEOL JEM-1400 Plus model cihaz kullanılarak alındı.

Hibrit NP Kompleksleri, Antilayşmanyal İlaçlar ve Uçucu Yağ Bileşenlerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Hibrit NP stok çözeltileri 10 mg/mL , pentostam ve miltefosin stok çözeltileri, sırasıyla 6250 ve 1024 µg/mL olacak şekilde steril distile suyla; Sin, Kar ve Tim stok çözeltileri ise 256 mg/mL olacak şekilde dimetil sülfoksitle hazırlandı⁹.

Hibrit NP Komplekslerinin ve Uçucu Yağ Bileşenlerinin Sitotoksik Aktivitesinin Belirlenmesi

Sıvı azotta muhafaza edilen fibroblastlar, RPMI-1640 ile muamele edilerek, %10 FBS (fetal sığır serumu) içeren RPMI-1640 besiyerine ekilerek 37 °C 'de %5 CO_2 altında 48 saat inkübe edildi. Çoğalan hücrelerin sayısı ve canlılığı, tripan mavisıyla boyanarak thoma lamında belirlendi. $10^5/\text{mL}$ hücre içeren 100 µL hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu mikropatlara dağıtıldı. Sin süspansiyonunun son konsantrasyonu $62.5-0.5 \text{ µg/mL}$ aralığında, Kar ve Tim'in $1000-7.8 \text{ µg/mL}$ aralığında, hibrit NP süspansiyonlarının ise $5000-39 \text{ µg/mL}$ aralığında olacak şekilde seri dilüsyonları farklı bir mikropatlarda yapıldı ve hücrelerin ekildiği mikropatlara aktarıldı. Mikropatlarda, 37 °C 'de %5 CO_2 altında 48 saat inkübe edildi. Hücre canlılığı, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) yöntemiyle belirlendi ve elde edilen absorbans değerleri, Thermo marka Varioskan model (ABD) spektrofotometreyle 570 nm 'de ölçüldü¹³. Sitotoksik aktiviteyi gösteren IC_{50} değerleri, Graphpad Prism 8.4.2 programıyla belirlendi. Sitotoksik aktivite testleri, farklı günlerde üç kez tekrarlandı⁹.

Hibrit NP Kompleksleri, Antilayşmanyal İlaçlar ve Uçucu Yağ Bileşenlerinin Antilayşmanyal Aktivitesinin Belirlenmesi

L.tropica (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) suşu, %10 FBS içeren RPMI-1640 besiyerinde logaritmik faza getirildi. Antilayşmanyal aktivitenin belirlenmesi için, steril, düz tabanlı, 96 kuyucuklu mikropatlarda her bir kuyucuğuna 100 µL RPMI-1640 besiyeri dağıtıldı. Hibrit NP komplekslerinin seri dilüsyonları $2500-19.5 \text{ µg/mL}$ aralığında, pentostamın seri dilüsyonu $1562-12 \text{ µg/mL}$ aralığında ve miltefosinin seri dilüsyonu ise $128-1 \text{ µg/mL}$

aralığında gerçekleştirildi. 1×10^5 /mL konsantrasyondaki promastigot süspansiyonundan 100 µL, negatif kontrol hariç tüm kuyucuklara dağıtıldı ve 26 ± 1 °C'de 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edildi¹⁴. İvert mikroskop altında tüm kuyucuklardaki promastigotların morfolojik yapısı ve hareket durumları gözlenerek parazitlerin tamamının hareketsiz olduğu ve morfolojilerinin bozulduğu en küçük etken madde konsantrasyonu minimum parazitisit konsantrasyon (MPK) olarak belirlendi. Promastigot canlılığı, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) yöntemiyle belirlendi¹³. Absorbanslar, Thermo marka Varioskan model (ABD) spektrofotometreyle 570 nm'de ölçüldü. Antilayşmanyol aktiviteyi gösteren IC₅₀ değerleri, Graphpad Prism 8.4.2 programıyla belirlendi. Etkinlik testleri, farklı günlerde üç kez tekrarlandı⁹.

Hibrit NP Kompleksleri ve Uçucu Yağ Bileşenlerinin Seçicilik İndeksi Değerinin Belirlenmesi

Seçicilik indeksi (SI) değeri, aşağıdaki denklem kullanılarak fibroblast hücre (L929) hattına karşı elde edilen IC₅₀ değerinin *Leishmania* promastigotlarına karşı elde edilen IC₅₀ değerine bölünmesi ile hesaplandı:

$$SI = \text{Fibroblastların IC}_{50} \text{ değeri} / \text{Leishmania promastigotlarının IC}_{50} \text{ değeri}$$

SI değerlerinin 1.00'den yüksek olması, test edilen maddenin promastigotlara karşı fibroblastlardan daha yüksek seçicilik sergilediğini göstermektedir¹⁵.

Hibrit NP Kompleksleri ve Antilayşmanyol Etkileşimlerinin Belirlenmesi

Hibrit NP kompleksleri ile antilayşmanyol ilaçlar arasındaki ilişki, dama tahtası yöntemi kullanılarak belirlendi. Her bir kombinasyon için iki adet, 96 kuyucuklu mikroplak kullanıldı. İlk mikroplağın tüm kuyucuklarına 100 µL RPMI-1640 besiyeri dağıtıldı. Antilayşmanyol ilaçların seri dilüsyonları, IC₅₀ değerinin üç dilüsyon yukarısından başlayarak beş dilüsyon aşağısına kadar dikey olarak gerçekleştirildi. İkinci mikroplağın tüm kuyucuklarına, sekizinci sütuna kadar 110 µL RPMI-1640 besiyeri dağıtıldı. Antilayşmanyol ilaç çözeltilerinden 110 µL, sekizinci sütundaki kuyucuklara eklendi ve sağdan sola doğru yatay olarak seri dilüsyon yapıldı. İkinci mikroplaktaki dilüsyonlar, ilk mikroplaktaki ilgili kuyucuklara 100 µL olarak aktarıldı¹⁶. Birinci mikroplağın tüm kuyucuklarına, besiyeri ve sterilite kontrol kuyucukları hariç olmak üzere, 10^7 promastigot/mL konsantrasyonunda parazit süspansiyonundan 100 µL eklendi. Her bir kontrol için dört kuyucuk kullanıldı: üreme kontrolü (RPMI 1640+promastigot), besiyeri kontrolü (RPMI 1640) ve sterilite kontrolü (RPMI 1640+ antilayşmanyol ilaç/hibrit NP kompleksi). Mikroplaklar, 26 °C'de 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edildi. İvert mikroskop altında tüm kuyucuklardaki promastigotların morfolojik yapısı ve hareket durumları gözlenerek parazitlerin tamamının hareketsiz olduğu ve morfolojilerinin bozulduğu en küçük etken madde konsantrasyonu MPK olarak belirlendi⁹.

Hibrit NP kompleksleri (H-NP) ile antilayşmanyol ilaçlar (AL) arasındaki etkileşim, fraksiyonel inhibitör konsantrasyon (FİK) indeksi hesaplanarak belirlendi. Bu hesaplama için aşağıdaki formülde MPK değerleri kullanıldı:

$$\text{FİK indeksi} = \text{FİK}_{\text{H-NP}} + \text{FİK}_{\text{AL}}$$

$$\text{FİK indeksi} = (\text{MPK}_{\text{H-NP kombinasyondaki}} / \text{MPK}_{\text{H-NP}}) + (\text{MPK}_{\text{AL kombinasyondaki}} / \text{MPK}_{\text{AL}})$$

Hesaplanan FİK indeksi değerleri aşağıdaki eşik değerlerine göre yorumlandı. Etkileşimler şu şekilde değerlendirildi: FİK indeksi ≤ 0.5 : sinerji, FİK indeksi = 0.50-0.75: kısmi sinerji, FİK indeksi = 0.75-1: additif, FİK indeksi = 1.00-4.00: farksız (indiferan), FİK indeksi ≥ 4.00 : antagonizma¹⁷.

İstatistiksel Analiz

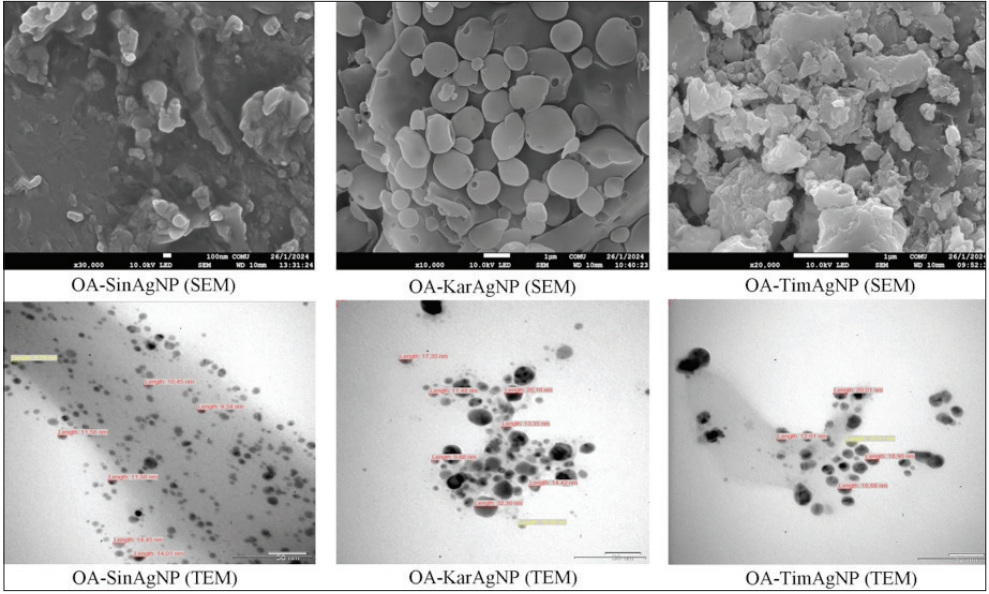
Elde edilen veriler, IBM SPSS 25.0 istatistik yazılımı (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak analiz edildi. Gruplar arasındaki anlamlı farklar, tek yönlü ANOVA ile analiz edildikten sonra, çoklu karşılaştırmalar Tukey testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ olduğunda gruplar arasındaki farklar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

BULGULAR

Okside amiloz (OA) ve uçucu yağ bileşenleri ile oluşturulan hibrit NP komplekslerinin FT-IR spektrumları değerlendirildiğinde, pik yoğunluklarında azalmalar, pik merkezlerinde kaymalar, spektrumlarda genişlemeler ve bölünmeler olduğu tespit edilmiştir. Hibrit NP komplekslerinde saptanan bu değişiklikler kullanılan aktif gruplardan (Sin, Kar ve Tim) kaynaklanmıştır. FT-IR spektrumlarının analizinden elde edilen gözlemler, okside amilozun Sin, Kar, Tim ve Ag⁺ iyonları kullanılarak başarıyla modifiye edildiğini göstermiştir.

Hibrit NP komplekslerinin SEM analizlerinde, yapının merkezini oluşturan okside amilozun yüzeylerinde Ag iyonları ile uçucu yağ bileşenlerinin yerleştiği ve NP kompleksinin başarıyla sentezlendiği görülmüştür. Alınan görüntülerde NP'lerin morfolojik şekillerinin yuvarlak görünümünden düzensiz kenarlı görümlere kadar değiştiği saptanmıştır. TEM analizinde ise NP boyutlarının değişken olup OA-SinAgNP için 9.34-14.45 nm aralığında, OA-KarAgNP için 9.88-32.3 nm aralığında ve OA-TimAgNP için 12.01-20.01 nm aralığında olduğu saptanmıştır (Şekil 1).

Hibrit NP kompleksleri, uçucu yağ bileşenleri ve antilayşmanyal ilaçların IC₅₀ değerlerinde zamana bağlı olarak düşme eğilimi, buna bağlı olarak da antilayşmanyal etkinlikte artış gözlenmiştir (Tablo I, Şekil 2). Parazitlerin tamamının öldüğü MPK değerleri hibrit NP kompleksleri için tüm inkübasyon sürelerinde sabit kalırken uçucu yağ bileşenleri ve antilayşmanyal ilaçlarda MPK değerinin inkübasyon süresi uzadıkça düştüğü saptanmıştır. OA-SinAgNP, OA-KarAgNP ve OA-TimAgNP'lerin IC₅₀ ve MPK değerlerinin birbirine yakın olduğu ($p > 0.05$) ve güçlü antilayşmanyal etkinlik gösterdikleri tespit edilmiştir. Uçucu yağ bileşenleri içinde en güçlü etkinlik Sin için saptanırken Kar ve Tim'in birbirine yakın ($p > 0.05$) ve yine güçlü antilayşmanyal etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Antilayşmanyal ilaçlardan pentostam ile hibrit NP'lerin antilayşmanyal etkinlikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken ($p > 0.05$), miltefosin ile hibrit NP'ler arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Miltefosin sadece Sin ile yakın değerlere sahip olup ($p > 0.05$) aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, miltefosin ile hem



Şekil 1. Hibrit NP'lerin SEM ve TEM görüntüleri.

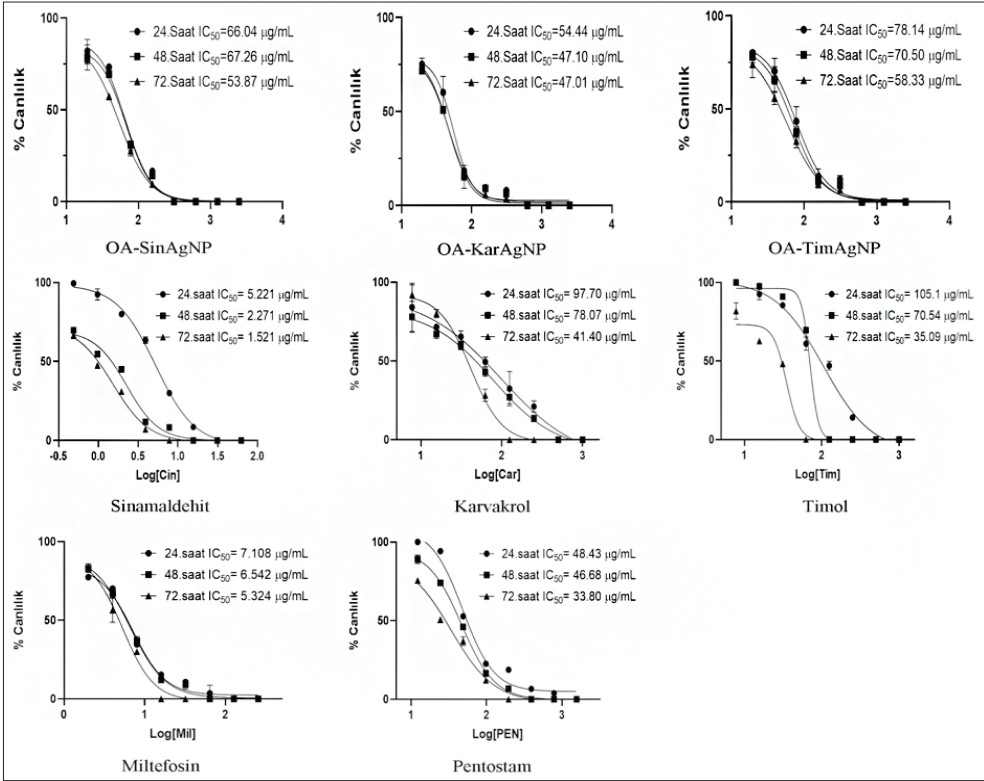
Tablo 1. Hibrit NP Kompleksleri, Uçucu Yağ Bileşenleri ve Antilayşmanyal İlaçların *L.tropica* Suşuna Karşı IC_{50} ve MPK Değerleri ($\mu\text{g/mL}$)

Etken Maddeler	24. Saat		48. Saat		72. Saat	
	IC_{50}	MPK	IC_{50}	MPK	IC_{50}	MPK
OA-SinAgNP	66.04	312.5	67.26	312.5	53.87	312.5
OA-KarAgNP	54.44	625	47.1	625	47.01	625
OA-TimAgNP	78.14	625	70.5	625	58.33	625
Sin	5.22	15.6	2.27	15.6	1.52	7.8
Kar	97.7	250	78.08	250	41.40	62.5
Tim	105.1	250	70.54	125	35.09	62.5
Pentostam	48.43	195	46.68	195	33.80	195
Miltefosin	7.10	32	6.54	16	5.32	16

Sin: Sinalaldehit, Kar: Karvakrol, Tim: Timol, NP: Nanoparçacık, IC_{50} : %50 inhibitör konsantrasyonu, MPK: Minimum parazitisit konsantrasyonu.

hibrit NP'ler hem de diğer uçucu yağ bileşenleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür ($p < 0.05$). Test edilen tüm etken maddelerin güçlü antilayşmanyal etkinliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Tablo 1, Şekil 2).

OA-SinAgNP, OA-KarAgNP ve OA-TimAgNP hibrit NP komplekslerinin fibroblast hücrelerine karşı sitotoksik etkinliklerinin 24, 48 ve 72. saatlerde, sırasıyla, 209.6-169.5 $\mu\text{g/mL}$, 190.4-172.3 $\mu\text{g/mL}$ ve 286.4-259.8 $\mu\text{g/mL}$ aralığında olduğu saptanmıştır. Uçucu yağ bileşenlerinden Sin, Kar ve Tim'in sitotoksik aktivite değerleri ise aynı



Şekil 2. Hibrit NP ve uçucu yağ bileşenlerinin IC₅₀ değerlerini gösteren grafikler.

inkübasyon sürelerinde sırasıyla, 4.09-1.94 µg/mL, 47.44-24.32 µg/mL ve 45.12-33.84 µg/mL aralığında saptanmıştır. SI değerleri hesaplandığında hibrit NP komplekslerinin yüksek seçicilik (SI > 3) gösterdiği, buna karşılık uçucu yağ bileşenlerinin güçlü antilayşmanyal etkinlik göstermesine rağmen seçiciliğinin düşük olduğu saptanmıştır (SI < 1) (Tablo II).

Etken Maddeler	24. Saat (IC ₅₀)			48. Saat (IC ₅₀)			72. Saat (IC ₅₀)		
	<i>L.tropica</i>	L929	SI	<i>L.tropica</i>	L929	SI	<i>L.tropica</i>	L929	SI
OA-SinAgNP	66.04	209.6	3.15	67.26	176.3	2.62	53.87	169.5	3.14
OA-KarAgNP	54.44	190.4	3.49	47.1	174.7	3.70	47.01	172.3	3.66
OA-TimAgNP	78.14	286.4	3.66	70.5	278.1	3.94	58.33	259.8	4.45
Sin	5.22	4.09	0.78	2.27	2.31	1.01	1.52	1.52	1.27
Kar	97.7	47.4	0.48	78.08	35.47	0.45	41.40	24.32	0.58
Tim	105.1	45.12	0.43	70.54	39.74	0.56	35.09	33.84	0.96

Sin: Sinamaldehyt, Kar: Karvakrol, Tim: Timol, NP: Nanoparçacık, IC₅₀: %50 inhibitör konsantrasyonu, L929: Fibroblast hücre hattı, SI: Seçicilik indeksi.

Tablo III. Hibrit NP'ler ile Pentostam/Miltefosin Kombinasyonlarının *L.tropica*'ya Karşı Etkileşimi

Kombinasyonlar	24. Saat		48. Saat		72. Saat	
	FİK indeksi	Etkileşim	FİK indeksi	Etkileşim	FİK indeksi	Etkileşim
OA-SinAgNP+Pen	0.49	Sinerji	0.49	Sinerji	0.49	Sinerji
OA-KarAgNP+Pen	0.49	Sinerji	0.49	Sinerji	0.49	Sinerji
OA-TimAgNP+Pen	0.49	Sinerji	0.37	Sinerji	0.306	Sinerji
OA-SinAgNP+Mil	0.75	Kısmi sinerji	0.625	Kısmi sinerji	0.5	Sinerji
OA-KarAgNP+Mil	0.75	Kısmi sinerji	0.625	Kısmi sinerji	0.5	Sinerji
OA-TimAgNP+Mil	0.5	Sinerji	0.5	Sinerji	0.5	Sinerji

Sin: Sinnamealdehit, Kar: Karvakrol, Tim: Timol, Ag: Gümüş, NP: Nanoparçacık, Pen: Pentostam, Mil: Miltefosin, FİK: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon.

Hibrit NP kompleksleri ile antilayşmanyal ilaçlardan pentostam ve miltefosin kombinasyonları için tüm inkübasyon sürelerinde sinerjik etkileşimler gözlenmiştir (Tablo III).

TARTIŞMA

Sin, Kar ve onun izomerik bileşiği olan Tim'in, antimalaryal, antitrikomonal, anti-kanser, antifungal ve antibakteriyel özellikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bununla birlikte bu bileşenlerin, biyoyararlanımlarının ve suda çözünürlüklerinin düşük olması ve yüksek toksisite gibi dezavantajlarından dolayı kullanımları sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle, söz konusu bileşenlerin terapötik etkinliklerini artırmak, biyoyararlanımlarını iyileştirmek ve toksisitelerini azaltmak için önerilen çeşitli yöntemlerin başında NP hibridizasyonu gelmektedir¹⁸⁻²². Nanoteknoloji alanı son yirmi yılda büyümüş ve uygulamalı teknolojilere geçiş yapmıştır. Nano ölçekli parçacıklar veya NP'ler, ilaç taşıyıcı sistemler, tanı, kozmetik ve diğer birçok biyolojik alanda geniş uygulamaları olan umut verici araçlar olarak ortaya çıkmıştır²³. Bununla birlikte, NP'lerin topografiler, pürüzlülük, termodinamik ve toksisite gibi çeşitli faktörlerden etkilenebileceği ve bu özelliklerin terapötik bir yaklaşım düşünülmeden önce dikkatle değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır⁶.

Literatürde, Ag⁺ iyonunun kompleks yapıların FT-IR spektrumları üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı belirtilmektedir. Bununla birlikte, sentezlenen Ag NP'leri içeren hibrit komplekslerin FT-IR spektrumlarında gözlemlenen pik değişiklikleri; Ag⁺ iyonları ile Sin, Kar ve Tim bileşenlerinin toplam etkisine atfedilebilir. FT-IR spektrumlarının analizinden elde edilen gözlemler, okside amilozun Sin, Kar, Tim ve Ag⁺ iyonları kullanılarak başarıyla modifiye edildiğini göstermektedir.

Uçucu yağ bileşenlerinin olası antimikrobiyal etki mekanizmalarının; hücre membranında hasar oluşturma, dışa atım pompalarını inhibe etme, membran bağımlı ATPaz'ı inhibe etme ve membran geçirgenliğini azaltma şeklinde gerçekleştiği kabul edilmektedir²⁴. Ancak söz konusu mekanizmalar ile etkili olduğu belirtilen uçucu yağ bileşenlerinin toksik özellikleri göz önüne alındığında, NP'ler ile hibritleştirilen uçucu yağ bileşenlerinin antilayşmanyal etkinliğinin ve toksisitesinin nasıl değiştiği merak uyandırmaktadır.

Bu çalışmada, uçucu yağ bileşenleri ile Ag NP'lerin birlikte sentezlenerek hibrit komplekslerinin oluşturulması, toksisitelerinin düşürülmesi, antilayşmanyal etkinliklerinin belirlenmesi, pentostam ve miltefosin gibi antilayşmanyal ilaçlar ile kombinasyonunun araştırılması hedeflenmiştir. Daha önceki çalışmada kurkumin ve AgNP hibrit kompleksinin (OA-CurAg-NP) güçlü antilayşmanyal etkinliğinin yanında fibroblastlar üzerinde düşük toksisitesinin olduğu gösterilmiştir⁹. Ancak yine de NP'lerin kendi toksik etkilerinin de göz önüne alınması gerektiği düşünülmektedir²⁵. Hibrit NP kompleksleri ile antilayşmanyal ilaç kombinasyonlarının sinerjik etkileşim göstermesi, etkin ilaç dozlarının çok daha düşük seviyelerde etkili olmasına ve yan etki profilinin azalmasına katkı sağlayabilir. Çalışmada, OA-SinAgNP, OA-KarAgNP ve OA-TimAgNP hibrit NP komplekslerinin *L.tropica* suşuna karşı güçlü antilayşmanyal etkinlikleri gösterilmiştir. Hibrit NP komplekslerinin fibroblastlara karşı daha düşük sitotoksosite verileri göz önüne alındığında SI değerinin kabul edilebilir (SI > 3) olduğu saptanmıştır (Tablo I). Bu bağlamda, söz konusu hibrit NP'lerin deneysel fare modelinde oluşturulan KL araştırmaları için uygun olduğu görülmektedir.

Brustolin ve arkadaşları²⁶, *Leishmania amazonensis* suşuna karşı Sin'in güçlü etkinlik gösterdiğini ancak yüksek toksisitesi nedeniyle düşük bir SI değeri elde ettiklerini bildirmiştir. Benzer bir çalışmada, Youssefi ve arkadaşları²⁷, *Leishmania infantum* suşuna karşı Kar ve Tim'in IC₅₀ değerlerini sırasıyla, 9.8 ve 7.2 µg/mL olarak saptamış ve deneysel hamster modelinde 100 mg/kg dozda etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Sin, Kar ve Tim'in antilayşmanyal etkinliğine yönelik çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen bu bileşenler ile birlikte sentezlenen hibrit gümüş NP'lerin antilayşmanyal etkinliğine yönelik bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Literatürdeki uçucu yağ bileşenleri ile yapılan çalışmalar, bu çalışmadaki verileri desteklemekle birlikte elde edilen veriler hibrit NP'ler açısından ilk olma niteliği taşımaktadır.

Layşmanyaz için en yaygın olarak uygulanan kemoterapötik seçenekler arasında lipozomal amfoterisin B (L-Amb), miltefosin, paromomisin, pentamidin ve çeşitli pentavalan antimon bileşikleri yer almaktadır. Günümüzde birinci basamak tedavi yöntemi olarak, meglumin antimoniat (glukantim) veya sodyum stiboglukonat (pentostam) gibi antimon bileşikleri kullanılmaktadır²⁸. Miltefosin, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration) tarafından onaylı ilk ve tek oral kullanılabilen antilayşmanyal ilaç olmakla birlikte; KL, VL ve kala-azar sonrası gelişen dermal layşmanyaz (PKDL) tedavisinde kullanılmaktadır^{29,30}.

Son zamanlarda, layşmanyaz için klinik ilaç geliştirme çabaları; güvenlik ve etkinliği artırmanın yanı sıra tedavi süresini azaltmak ve ilaç direncinin ortaya çıkma riskini sınırlamak için kombinasyon rejimlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. İlaç kombinasyonları şu anda yeni antilayşmanyal formülasyonlar geliştirmek için en umut verici yaklaşımlardan birini oluşturmaktadır. Bu nedenle; azaltılmış toksisite, daha kısa tedavi rejimleri ve daha az direnç gelişimi kombinasyon tedavilerinin başlıca avantajlarıdır³¹. Farklı kimyasal yapılara ve etki mekanizmalarına sahip ilaçların kullanıldığı kombinasyon tedavileri, layşmanyaza karşı tedavi uygulamalarını iyileştirmek için umut verici bir yöntem olarak belirlenmiştir³². Bu çalışmada, sentezlenen hibrit Ag NP kompleksleri ile antilayşmanyal

ilaçlardan miltefosin ve pentostam arasında sinerjik etkileşim gözlenmiştir (Tablo II). Literatürde, OA-SinAgNP, OA-KarAgNP ve OA-TimAgNP hibrit NP'lerin miltefosin ve pentostam ile kombinasyonuna yönelik bir çalışmaya rastlanmamış olup bu çalışmanın verileri ilk olma özelliğindedir.

Bu çalışmanın en önemli kısıtlılığı, SI değeri kabul edilebilir değerlerde saptanan üç hibrit NP kompleksinin, hem kendi antilayşmanyal etkinliği hem de miltefosin ve pentostam ile etkileşimlerinin deneysel hayvan modellerinde çalışılmamış olmasıdır. Ancak devam eden çalışmalarımızda hibrit NP'lerin in vivo şartlardaki etkinliğinin araştırılması planlanmaktadır.

Layşmanyaz tedavisinde geleneksel ilaçlara kıyasla toksisitesi düşük yeni biyoaktif bileşiklerin araştırılması ve farmakolojik potansiyele sahip doğal ürünlerin nanoteknoloji uygulamaları ile geliştirilmesi, tedavi etkinliği açısından literatüre önemli katkılar sunabilir. Antilayşmanyal etkinlikleri gösterilmiş olan Sin, Kar ve Tim gibi etkili uçucu yağ bileşenlerinin Ag NP'ler ile hibridize edilmesi ve bu yeni nesil moleküllerin güçlü antilayşmanyal etkinlikleri yanında mevcut antilayşmanyal ilaçlar 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.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada, hibrit NP'lerin sentezlenmesi sırasındaki desteklerinden dolayı Biyolog Mehmet Erkan ÇELEBİ'ye teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma için etik kurul onayı gerekmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Erişim adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (Erişim tarihi: 16.05.2024).
2. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Voty'pka J, Marty P, Delaunay P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. PLoS Neglected Tropical Diseases 2016; 10(3): e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
3. Shmueli M, Ben-Shimol S. Review of Leishmaniasis treatment: Can we see the forest through the trees? Pharmacy 2024; 12(1): 30. <https://doi.org/10.3390/pharmacy12010030>
4. Khan I, Saeed K, Khan I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arab J Chem 2019; 12: 908-31. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
5. Guerra RO, do Carmo Neto JR, da Silva PEF, Franco PIR, Barbosa RM, de Albuquerque Martins T, et al. Metallic nanoparticles and treatment of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. J Trace Elem Med Biol 2024; 83: 127404. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2024.127404>

6. Natarajan P, Tomich JM. Understanding the influence of experimental factors on bio-interactions of nanoparticles: Towards improving correlation between in vitro and in vivo studies. Arch Biochem Biophys 2020; 694: 108592. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108592>
7. Puškárová A, Bučková M, Kraková L, Pangallo D, Kozics K. The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. Sci Rep 2017; 7: 8211. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08673-9>
8. Llana-Ruiz-Cabello M, Pichardo S, Maisanaba S, Puerto M, Prieto A, Gutierrez-Praena D, et al. In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. Food Chem Toxicol 2015; 81: 9-27. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.030>
9. 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>
10. Lyu Y, Ren H, Yu M, Li X, Li D, Mu C. Using oxidized amylose as carrier of linalool for the development of antibacterial wound dressing. Carbohydr Polym 2017; 174: 1095-105. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.033>
11. Kharat M, Du Z, Zhang G. Physical and chemical stability of curcumin in aqueous solutions and emulsions: Impact of pH, temperature, and molecular environment. J Agric Food Chem 2017; 65: 1525-32. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04815>
12. Lyu Y, Yu M, Liu Q, Zhang Q, Liu Z, Tian Y, et al. Synthesis of silver nanoparticles using oxidized amylose and combination with curcumin for enhanced antibacterial activity. Carbohydr Polym 2019; 115573. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115573>
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 6: 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
14. 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>
15. Tronina T, Bartmańska A, Popłoński 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>
16. Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos GM. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, ed. Antibiotics in laboratory medicine. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2005; 365-439.
17. 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>
18. Özel Y, Yılmaz U, Ünlü M. 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. Özel Y, Çavuş İ, Ünlü M, Özbilgin A. Investigation of the efficacy of cinnamaldehyde, cannabidiol and eravacycline in a malaria model. Mikrobiyol Bul 2023; 57(4): 608-24. <https://doi.org/10.5578/mb.20239949>
20. Weng X, Ho CT, Lu M. Biological fate, functional properties, and design strategies for oral delivery systems for cinnamaldehyde. Food Funct 2024; 15(12): 6217-31. <https://doi.org/10.1039/D4FO00614C>
21. Özel Y, Çavuş İ, Ünlü G, Ünlü M, Özbilgin A. Investigation of the antitrichomonal activity of cinnamaldehyde, carvacrol and thymol and synergy with metronidazole. Türkiye Parazit Derg 2024; 48(2): 72-6. <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2024.91855>
22. Yılmaz U, Coşkun AG, Özel Y, Ünlü M, Vardar Ünlü G. Synergistic interactions of essential oil components with antibiotics against multidrug-resistant *Corynebacterium striatum*. J Appl Microbiol 2024; 135(4): lxae090. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxae090>
23. Najahi Missaoui W, Arnold RD, Cummings BS. Safe nanoparticles: Are we there yet? Int J Mol Sci 2020; 22(1): 385. <https://doi.org/10.3390/ijms22010385>
24. 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>

25. Liao C, Li Y, Tjong SC. Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Int J Mol Sci* 2019; 20(2): 449. <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>
26. Ávila Brustolin A, Fernandes Herculano Ramos-Milaré AC, Perles de Mello TF, Alessi Aristides SM, Campana Lonardon MV, Verzignassi Silveira TG. In vitro activity of cinnamaldehyde on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Exp Parasitol* 2022; 236-237: 108244. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108244>
27. Youssefi MR, Moghaddas E, Tabari MA, Moghadamnia AA, Hosseini SM, Hosseini Farash BR, et al. In Vitro and In Vivo Effectiveness of Carvacrol, Thymol and Linalool against *Leishmania infantum*. *Molecules* 2019; 24(11): 2072. <https://doi.org/10.3390/molecules24112072>
28. Pradhan S, Schwartz RA, Patil A, Grabbe S, Goldust M. Treatment options for leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol* 2022; 47(3): 516-21. <https://doi.org/10.1111/ced.14919>
29. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet* 2018; 392(10151): 951-70. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
30. Mbui J, Olobo J, Omollo R, Solomos A, Kip AE, Kirigi G, et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of an allometric miltefosine regimen for the treatment of visceral leishmaniasis in eastern African children: An open-label, phase II clinical trial. *Clin Infect Dis* 2019; 68(9): 1530-8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy747>
31. Roseboom IC, Rosing H, Beijnen JH, Dorlo TPC. Bioanalytical methods for pharmacokinetic studies of antileishmanial drugs. *Biomed Chromatogr* 2023; 37(7): e5519. <https://doi.org/10.1002/bmc.5519>
32. Branquinho MH, Araújo PSS, Oliveira SSC, Sengenito LS, Gonçalves DS, Seabra SH, et al. Antileishmanial Efficacy of the Calpain Inhibitor MDL28170 in Combination with Amphotericin B. *Trop Med Infect Dis* 2022; 7(2): 29. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7020029>



Bu eser CC BY-NC Atıf-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.