



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAZI BİTKİ EKSTRATLARININ THEİLERİA ANNULATA'YA KARŞI IN VITRO  
ETKİSİ**

**Oya GİRİŞGİN**

**(DOKTORA TEZİ)**

**BURSA - 2008**



**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PARAZİTOLOJİ ANABİLİM DALI**

**BAZI BİTKİ EKSTRATLARININ THEİLERİA ANNULATA'YA KARŞI IN VITRO  
ETKİSİ**

**Oya GİRİŞGİN**

**(DOKTORA TEZİ)**

**Danışman : Prof. Dr. Şevki Ziya COŞKUN**

**BURSA - 2008**

Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu tez, jürimiz tarafından DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Adı ve Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Şevki Z. COŞKUN	
Üye	Prof. Dr. Levent BÜYÜKUYSAL	
Üye	Prof. Dr. Semra OKURSOY	
Üye	Prof. Dr. Levent AYDIN	
Üye	Doç. Dr. Aynur GÜLANBER	

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun **16.10.2008** tarih, **2008/33** sayılı toplantısında alınan **1** numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Gürsel SÖNMEZ

Enstitü Müdürü

## İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET .....	IV
İNGİLİZCE ÖZET .....	VI
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	3
1. <i>Theileria annulata</i> .....	3
1.1. Tropikal Theileriosis'in Tarihçesi .....	3
1.2. <i>Theileria annulata</i> 'nın Sınıflandırılması .....	4
1.3. <i>Theileria annulata</i> Enfeksiyonlarında Tedavi ve Kontrol .....	5
2. <i>Arnebia densiflora</i> (Nordm.) Ledeb. Bitkisi (Eyilik Otu) .....	9
2.1. Botanik Özellikleri ve Yayılışı .....	9
2.2. <i>Arnebia</i> Türlerinin Naftakinonları .....	10
2.3. Biyoaktivite Bilgileri .....	11
3. <i>Artemisia annua</i> Lamarck Bitkisi (Acı Pelin) .....	12
3.1. Botanik Özellikleri ve Yayılışı .....	12
3.2. Etnofarmakolojik Bilgiler .....	13
3.3. Biyoaktivite Bilgileri .....	13
GEREÇ VE YÖNTEM .....	15
1. Bitkilerin Toplanması, Kurutulması ve Çözücülerle Ekstraksiyonu .....	15
1.1. <i>Arnebia densiflora</i> Bitkisinin Toplanması, Kurutulması ve n-hekzan ile Ekstraksiyonu .....	15
1.1.1. <i>Arnebia densiflora</i> Ekstresinin Analizi .....	17
1.2. <i>Artemisia annua</i> Bitkisinin Toplanması, Kurutulması, Petrol Eteri ve Metanol ile Ekstraksiyonu .....	17
1.2.1. <i>Artemisia annua</i> Bitkisinden Elde Edilen Ekstrelerin Gaz Kromatografik Analizi .....	19
2. Çalışma Planı .....	20
3. Bitki Ekstrelerinin In vitro Ortamda Sağlıklı Peripheral Blood Mononuclear (PBM) Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemeleri .....	21
3.1. Sağlıklı PBM Hücreleri'nin Kandan İzolasyonu ve Kültivasyonu .....	21

3.1.1. PBM Hücrelerinin Mikroskopik Sayımı .....	21
3.1.1.1. 1 ml Hücre Süspansiyonundaki Toplam Hücre Sayısı .....	22
3.1.1.2. 1 ml Hücre Süspansiyonundaki Canlı ve Ölü Hücre Sayıları ile Oranları .....	22
3.1.1.3. Sağlıklı PBM Hücreleri'nin Deneme Kuyucuklarına Aktarılması .....	23
4. Sağlıklı PBM Hücrelerine DMSO'in Etkinlik Denemeleri .....	23
5. Bitki Ekstrelerinin Çözdürülmesi, Sulandırılması ve İçinde Sağlıklı PBM Hücreleri Bulunan Deneme Kuyucuklarına Aktarılması .....	23
5.1. Deneme Sonrası Hücrelerin Deneme Kuyucuklarından Alınması ve Sayılması .....	24
6. Bitki Ekstrelerinin In vitro Ortamda <i>Theileria annulata</i> Schizontu ile Enfekte PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemeleri .....	24
6.1. <i>Theileria annulata</i> Schizontu ile Enfekte PBM Hücrelerinin Sıvı Azot Tankından Alınıp Çözdürülmesi ve Kültivasyonu .....	24
6.2. Kültürü Yapılan <i>Theileria annulata</i> Schizontu ile Enfekte PBM Hücrelerinin Mikroskopik Sayımının Yapılması ve Deneme Kuyucuklarına Aktarılması .....	25
6.2.1. 1 ml Hücre Süspansiyonundaki Toplam Enfekte Hücre Sayısı .....	25
6.2.2. 1 ml Hücre Süspansiyonundaki Canlı ve Ölü Hücre Sayıları ile Oranları .....	25
6.2.3. Enfekte PBM Hücreleri'nin Deneme Kuyucuklarına Aktarılması .....	26
7. DMSO'in In vitro Ortamda <i>Theileria annulata</i> Şizontu ile Enfekte PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemeleri .....	26
8. Bitki Ekstrelerinin Çözdürülmesi, Sulandırılması ve İçinde Enfekte PBM Hücreleri Bulunan Deneme Kuyucuklarına Aktarılması .....	26
8.1. Deneme Sonrası Hücrelerin Deneme Kuyucuklarından Alınması ve Sayılması .....	27
9. İstatistiksel Değerlendirme .....	27
<b>BULGULAR .....</b>	<b>28</b>
1. Bitkilerin Çözücülerle Ekstraksiyonundan Elde Edilen Bulgular .....	28
1.1. <i>Arnebia densiflora</i> Bitkisinin n-hekzan ile Ekstraksiyonu Sonucu Elde Edilen Bulgular .....	28
1.2. <i>Artemisia annua</i> Bitkisinin Petrol Eteri ile Ekstraksiyonu	

Sonucu Elde Edilen Bulgular .....	28
1.3. <i>Artemisia annua</i> Bitkisinin Metanol ile Ekstraksiyonu	
Sonucu Elde Edilen Bulgular .....	28
1.4. <i>Artemisia annua</i> Bitkisinden Elde Edilen Ekstrelerin	
Gaz Kromatografik Analizine Ait Bulgular .....	28
2. Bitki Ekstrelerinin In vitro Ortamda Sağlıklı PBM Hücrelerine	
Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular .....	29
2.1. <i>Arnebia densiflora</i> Bitkisinden Elde Edilen n-hekzan Ekstresinin Sağlıklı	
PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular .....	29
2.2. <i>Artemisia annua</i> Bitkisinden Elde Edilen Petrol Eteri Ekstresinin Sağlıklı	
PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular .....	30
2.3. <i>Artemisia annua</i> Bitkisinden Elde Edilen Metanol Ekstresinin Sağlıklı	
PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular .....	31
3. DMSO'ın In Vitro Ortamda Sağlıklı ve Enfekte PBM Hücrelerine Etkinlik	
Denemesi Bulguları .....	32
4. Bitki Ekstrelerinin In vitro Ortamda <i>Theileria annulata</i> Schizontu ile Enfekte	
PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular .....	32
4.1. <i>Arnebia densiflora</i> Bitkisinden Elde Edilen n-hekzan Ekstresinin Enfekte	
PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular .....	32
4.2. <i>Artemisia annua</i> Bitkisinden Elde Edilen Petrol Eteri Ekstresinin Enfekte	
PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular .....	34
4.3. <i>Artemisia annua</i> Bitkisinden Elde Edilen Methanol Ekstresinin Enfekte	
PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular .....	35
TARTIŞMA VE SONUÇ .....	36
KAYNAKLAR .....	39
TEŞEKKÜR .....	45
ÖZGEÇMİŞ .....	46

## ÖZET

Bitki ekstratları paraziter enfeksiyonların tedavisi açısından önemli potansiyele sahiptirler. Naftakinonlar ve artemisinin veteriner ve tıp hekimliğinde kan parazitlerine karşı kullanılan bitkisel orijinli moleküllerdir. Ülkemizin birçok bölgesinde doğal olarak yetişen *Arnebia densiflora* (*A.densiflora*) içerdiği naftakinonlar nedeni ile, ve *Artemisia annua* (*A.annua*) içerdiği artemisinin nedeni ile tıbbi öneme haiz bitkilerdir. Bu çalışmada söz konusu bitkilerden elde edilen ekstratların *Theileria annulata* (*T.annulata*) schizontları ile enfekte Peripheral Blood Mononuclear (PBM) hücrelere karşı etkinlikleri araştırılmıştır. Bu amaçla, Eskişehir yöresinden toplanan *A.densiflora* bitkisinin kökleri, Bursa yöresinden toplanan *A.annua* bitkisinin topraküstü kısımları açık havada ve gölgede kurutulmuş, mekanik olarak parçalanmıştır. *A.densiflora*'nın n-hekzan ekstresi, *A.annua*'nın petrol eteri ve metanol ekstreleri çıkarılmıştır. *A.annua* ekstrelerinin içerdikleri Artemisinin miktarını belirlemek amacı ile Gas Chromatographic analizleri yapılmıştır. Ekstrelerin çözdürülmesinde 8 µl/0.5 ml medium konsantrasyonunda Dimethylsulfoksit (DMSO) kullanılmıştır. Sağlıklı ve enfekte PBM hücrelerinin kültürasyonu RPMI 1640 besi yeri ile sağlanmıştır. Hücreler denemelerin yapılacağı kuyucuklara 0.5 ml medium içinde  $2 \times 10^6$  adet bulunacak şekilde dağıtılmışlardır. *A.densiflora* 125, 62.5, 15.625, 7.8125, 3.9062 µg/ml konsantrasyonlarda, *A.annua* 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.9062, 1.9531 µg/ml konsantrasyonlarda PBM hücreleri üzerinde denenmiştir. Kontrol grubu olarak ayrılan kuyucuklara sadece medium ilave edilmiştir. Canlı ve ölü hücrelerin ayrımı denemenin 24 ve 48. saatlerinde örnek hücreleri Trypan blue ile boyayarak yapılmıştır. Deneme grupları ile kontroller arasındaki farkların istatistikî analizleri için Mann Whitney U Test uygulanmış,  $p < 0.05$  ve üstü değerler anlamlı kabul edilmiştir.

*A.densiflora* bitkisinde 90.5 g drogdan 4.12 g ekstre, *A.annua* bitkisinde 100 g drogdan petrol eteri ile 2.28 g, metanol ile 5.56 g ekstre elde edilmiştir. *A.annua* metanol ekstresinde  $1.14 \pm 0.07$  mg/ 100 g, petrol eteri ekstresinde  $4.54 \pm 0.10$  mg/100g düzeylerinde Artemisinin varlığı tespit edilmiştir.

*A.densiflora* ekstresinin denenen tüm konsantrasyonlarda hem sağlıklı hem enfekte hücreleri kontrol gruplarındakilere kıyasla anlamlı düzeylerde ( $p < 0.05$ ) öldürdüğü gözlenmiştir.

*A.annua* metanol ekstresinin sağlıklı hücreler üzerinde hiçbir olumsuz etkisi olmamış, enfekte hücreler üzerindeki etkisi ise yetersiz düzeyde olmasına rağmen sadece 125 µg/ml konsantrasyonda gözlenmiştir.

*A. annua* petrol eteri ekstresi sağlıklı hücresler üzerinde olumsuz etki göstermemiş, enfekte hücreleri ise denemenin 24. saati itibarı ile 15.625 µg/ml ve üstü konsantrasyonlarda anlamlı düzeylerde ( $p < 0.05$ ) öldürmüştür. Denemenin 48. saatinde 62.5 µg/ml konsantrasyonda tüm enfekte hücreler ölmüştür.

Sonuç olarak *A. annua* petrol eteri ekstresinin 15.625-62.5 µg/ml konsantrasyonlarda sağlıklı hücelere zarar vermeden *T. annulata* schizontu ile enfekte PBM hücrelerini in vitro ortamda etkili şekilde yok ettiği ortaya konmuş, ekstrenin hastalar üzerinde denenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Theileria annulata*, *Arnebia densiflora*, *Artemisia annua*, naftakinonlar, artemisinin



## SUMMARY

### **In Vitro Efficacy of Some Plant Extracts Against *Theileria annulata***

Plant extracts have significant potentials for the treatment of parasitic infections. Napthaquinones and artemisinin are plant based molecules used against blood parasites in veterinary and human medicine. *Arnebia densiflora* (*A.densiflora*) and *Artemisia annua* (*A.annua*) grow in most parts of our country and have medical value due to their napthaquinone and artemisinin contents, respectively. In this study, effects of the extracts of these plants on peripheral blood mononuclear (PBM) cells infected with *Theileria annulata* schizonts were investigated. For this aim, roots of *A. densiflora* collected in Eskişehir province and over-soil parts of *A.annua* collected in Bursa province were shade-dried and grinded mechanically. *A. densiflora*'s n-hexane extract, and *A. annua*'s petroleum ether and methanol extract were prepared. Gas chromatography was performed to measure the artemisinin quantity in *A.annua* extracts. Dimethylsulfoxide (DMSO, 8 µl/0.5 ml medium) was used for dissolving the extracts. Cultivation of healthy and infected PBM cells was carried out with RPMI 1640 medium. Cells were put into trial wells as  $2 \times 10^6$  cells in 0.5 ml medium per well. *A. densiflora* was added at concentrations of 125, 62.5, 15.625, 7.8125, 3.9062 µg/ml and *A. annua* was added at concentrations of 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.9062, 1.9531 µg/ml on PBM cells. In control wells medium was added only. Distinction of dead and alive cells was made by trypan blue staining of sampled cells at 24th and 48th hours of the trial. Mann Whitney U test was applied for the statistical analysis of trial and control groups; a p value of <0.05 and over was accepted significant.

4.12 g of extract was achieved from 90.5 g drog prepared from *A.densiflora*, while 5.56 g and 2.28 g of extract was achieved via methanol and petroleum ether extractions, respectively, from 100 g drog prepared from *A.annua*.  $1.14 \pm 0.07$  mg/ 100 g and  $4.54 \pm 0.10$  mg/100g of artemisinin was yielded after methanol and petroleum ether extraction of *A.annua*.

*A.densiflora* extract killed both healthy and infected cells at all concentrations when compared with the control group ( $p < 0.05$ ).

*A.annua* methanol extract did not have any negative effect on healthy cells. A mild affect was seen on infected cells at concentration of 125 µg/ml.

*A. annua* petroleum ether extract had no negative effect on healthy cells, but killed infected cells at concentration of 15.625 µg/ml and over at 24th hour of trial ( $p < 0.05$ ). All infected cells died at concentration of 62.5 µg/ml at 48th hour.

Consequently, it was proven that PBM cells infected with *T. annulata* schizonts are effectively destroyed *in vitro* by *A. annua* petroleum ether extract at concentrations of 15.625–62.5 µg/ml without damaging healthy cells. Trial of this extract on patients is suggested.

**Key words:** *Theileria annulata*, *Arnebia densiflora*, *Artemisia annua*, naphtaquinones, artemisinin

## GİRİŞ

Türkiye’de yüksek verimli sığır ırklarının sayısının artırılması amacıyla, kültür ırkı sığır ithali ve bu ırk hayvanların düşük verimli yerli ırklarla melezlenmesi çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda elde edilen yüksek verimli ırklar, yerli ırklara göre viral, bakteriyel ve bazı paraziter hastalıklara daha duyarlıdırlar.

Tropikal theileriosis, Türkiye’de özellikle ithal edilen yüksek verimli sığırlarda ve melezlerinde yüksek oranda ölümlere ve verim düşüklüklerine sebep olan ve bu nedenle ülke ekonomisine büyük zararlar veren bir protozoon enfeksiyonudur.

Tropikal theileriosisin kontrolü; vektör kene mücadelesinde akarisit uygulanması, hastalık etkenine karşı ilaç kullanımı ve hastalığa karşı korunmada *attenüe macroschizontla* enfekte hücre kültürü aşısı uygulanması ile yapılmaktadır. Akarisid uygulamasının, pahalı olması, sığırların et ve sütlerinde ilaç atık maddelerinin kalması, ilaçların çevreyi kirletmeleri ve kenede akarisitlere karşı direnç gelişmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Hastalığa karşı korunmada kullanılan aşı ise, üretilen doz miktarının yetersiz olması, taşıma ve uygulamadaki bazı güçlükler nedeniyle hastalığın kontrol altına alınmasında yetersiz kalmaktadır.

Ülkemizde theileriosisin tedavisinde Buparvaquone etken maddeli bir ilaç olan Butalex kullanılmaktadır. Ancak ilaçla tedavi çok pahalı olmakta ve tedaviye erken dönemde başlanılmadığında istenilen sonuç elde edilememektedir.

Dozu ve stabilitesi kolay ayarlanabilen sentetik ilaçların varlığına rağmen pek çok hastalığın tedavisinde alternatif bir yöntem olarak bitki kullanımı, gelişmiş ve gelişmekte olan toplumlarda yaygınlaşmıştır.

İçermiş oldukları etken maddelerin yapılarının aydınlatılmasıyla, aynı etkiyi gösterebilecek birçok sentetik ilaç için model olarak kullanılabilen bitkisel materyaller modern tıbbın vazgeçilmez unsurlarındandır. Ayrıca, iyi değerlendirildiklerinde ülkeler için büyük bir ekonomik potansiyel oluştururlar (1).

Türkiye bitkisel flora açısından çok zengin bir yapı arz etmektedir. Doğal olarak yetişen dokuz binden fazla bitki türü göz önüne alındığında ülkemiz sayısal olarak bile büyük bir potansiyele sahiptir. Ülkemizin coğrafi konumu, iklim özellikleri ve değişik ekolojik şartlarının yarattığı bu zenginlikler ile ekonomik kalkınmaya aktarılacak çok çeşitli imkanların sağlandığı görülmektedir. Bitkilerin tedavi amacıyla kullanılması çok eski devirlere kadar gitmektedir. Yüzyıllar boyunca geleneksel olarak kullanılmış olan bitkisel

kaynaklı ilaçların bu yöndeki etkilerinin ve varsa toksik özelliklerinin olup olmadığının belirlenmesi araştırmalar arasında yer almaktadır (2).

Bu alışmada; Türkiye’de Eskişehir yöresinde yaygın olarak bulunan *A. densiflora* bitkisinin kök ekstresinin ve Bursa yöresinde bulunan *A. annua* bitkisinin toprak üstü kısmının farklı ekstrelerinin içerdikleri Artemisinin düzeylerini belirleyerek bu ekstrelerin *T. annulata* schizontlarına karşı in vitro etkinliklerini araştırmak, in vivo denemeler için ümit verici olup olmadıklarını belirlemek amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### 1. THEİLERİA ANNULATA

#### 1.1. Tropikal Theileriosis'in Tarihçesi

Tropikal theileriosis, Akdeniz Sahil Humması veya Mısır Humması etkeni olan *Theileria annulata*, Kuzey Afrika, Güney Avrupa, Orta Doğu, Hindistan, Çin, Asya'nın bir bölümü ile Nil Vadisi'nden Sudan'a kadar uzanan geniş bir coğrafyada sığır, manda ve zebularda görülen, Hyalomma cinsine bağlı keneler tarafından transtadial olarak nakledilen önemli bir protozoondur (3-7).

Mimioğlu (8)'na göre ilk kez 1904 yılında Dschunkowsky ve Luhs tarafından Kafkasya sığırlarında tespit edilen *T. annulata*, Doğu Sahil Humması etkeni *Theileria parva* ile çubuk şeklindeki eritrositik formundan dolayı benzerlik göstermişse de, eritrosit içindeki halka formları çoğunlukta olduğu için *Piroplasma annulatum* olarak adlandırılmıştır. Mimioğlu (8)'na göre Bettencourt ve arkadaşları 1907 yılında *P. annulatum* ile *P. bigeminum*'un iç organlardaki gelişimlerini karşılaştırmalı olarak incelemiş, *P. annulatum*'un schizontlarına iç organlarda rastladıkları halde *P. bigeminum*'un schizontları bulunmadığından bu paraziti *Piroplasma* cinsinden çıkarıp *Theileria* cinsine almışlardır.

Levine (3)'a göre 1924 yılında Kuzey Afrika'da Sergent ve arkadaşları yaptıkları incelemelerden sonra orada hüküm süren hastalık etkeninin ayrı olduğunu tespit ederek parazite *Theileria dispar* adını vermişlerdir. Bundan sonra uzun yıllar *T. annulata* ve *T. dispar*'ın ayrı türler oldukları kabul edilmiştir. Aynı yıllarda Türkistan'da bulunan türün de başka bir parazit olduğu tahmin edilerek *Theileria turkestanica* olarak isimlendirilmiştir.

Mimioğlu (8)'nin bildirdiğine göre 1948'de Dschunkowsky ve 1949'da Delpy bu parazitlere ayrı ayrı isim vermek yerine (*T. dispar*, *T. turkestanica*) *T. annulata* adının kullanılmasını önermişlerdir.

## 1.2. *Theileria annulata*'nın Sınıflandırılması

*Theileria* türlerinin sınıflandırılmasında, uzun süre schizont ve piroplazmaların morfolojik yapıları, vektör kene spesifikliğı, patojenite, biyolojik karakterler ve serolojik tanımlamalar esas alınmıştır. Ancak piroplazmaların morfolojisi, enfeksiyonun seyri sırasında değışebileceğı için türlerin ayırımında kullanılabilecek iyi bir kriter olmadığı belirtilmiştir (9).

Günümüzde *Theileria* türlerinin ayırımında, parazitteki moleküler ve genetik farklılıkları ortaya koyan filogenetik analizlerin dikkate alınması gerektiğı ifade edilmektedir (10).

Levine'a göre (3) *T.annulata*'nın taksonomideki yeri aşağıdaki gibidir:

Alem: Animalia

Alt alem: Protozoa

Şube: Apicomplexa

Sınıf: Sporozoasida

Alt sınıf: Coccidiasina

Takım: Eucoccidiorida

Alt Takım: Piroplasmorina

Aile: Theileriidae

Cins: *Theileria*

Tür: *Theileria annulata*

*Theileria* türleri Apicomplexa şubesinde yer almalarına rağmen, parazitlerin apikal kompleksi azalmıştır. Sadece rhoptriye sahip olup, polar ring, konoid, mikronem ve subpelliküler mikrotubullerden yoksundurlar (11). Ancak hareketli olan kinetler mikroneme, intraeritrositik formlar ise mikropora sahiptir (12).

### 1.3. *Theileria annulata* Enfeksiyonlarında Tedavi ve Kontrol

Birçok ülkede kene ve kenelerle bulaşan hastalıklar çiftlik hayvanları endüstrisinin gelişimini önemli ölçüde engellemektedir. Tropikal theileriosis sığırlarda et ve süt üretiminde azalma ve hastalığın kontrolü amacıyla yapılan harcamalar sonucunda büyük ekonomik kayıplara yol açmaktadır (13).

Türkiye’de sığırlarda görülen önemli hastalıklardan biri olan tropikal theileriosis dünyada 250 milyon sığırı tehdit etmektedir (14).

Tropikal theileriosis’in kontrolünde vektör kene ile mücadele, ilaçla tedavi ve hastalığa duyarlı hayvanlarda aşılama metodları kullanılmaktadır (15).

Vektör kene ile mücadele hayvanların ve hayvan barınaklarının Avermektinler, Formamidinler, Piretiroidler, Organofosfatlar, Makrosiklik laktonlar gibi akarisitlerle kenelerden arındırılması esasına dayanmaktadır (15, 16). Başarılı bir uygulama için mücadele programının çok iyi planlanmış olması gerekmektedir (15). Birçok durumda akarisitler 21-30 günde bir tekrarlanmaktadır (16). Uzun süre akarisit kullanımı kenelerde akarisitlere karşı direnç gelişmesine neden olabilmektedir. Akarisitlerin devamlı kullanılması, yerli ırklarda var olan endemik stabilitenin gelişmesini engelleyebilmekte ve böyle bir sığır ırkında akarisit kullanımının aksadığı dönemlerde hastalığa yakalanma riski artmaktadır. Bunların dışında akarisit mücadelesinin pahalı olması, sığırların et ve sütlerinde ilaç atık maddelerinin kalması ayrıca ilaçların çevreyi kirletmeleri gibi dezavantajları da bulunmaktadır (15, 16).

Tropikal theileriosise karşı macroschizont ile enfekte hücre kültürü (canlı-attenüe) ile aşılama korumada önemli yer tutmaktadır (15). Theileriosise karşı aşılama ilk olarak 1924 yılında Cezayir’de theileriosis tespit edilen bir sığırdan alınan kanın, mekanik olarak sağlam sığırlara inokule edilmesi ile sağlanmıştır (17).

*T. annulata*’nın schizont formlarının in vitro kültürünün yapıldığı 1945 ile 1965 yılları arasında aşılama daha çarpıcı bir ilerleme kaydetmiştir (17). Karatepe (18)’nin bildirdiğine göre *T. annulata* ilk olarak 1945 yılında doku kültüründe üretilmiş ve Tsur tarafından *T. annulata* schizontlarının in vitro kültivasyonunun yapılması ile tropikal theileriosis’e karşı bir kültür aşısı geliştirilmiştir.

Yapılan kültürlerde iki karakteristik özellik gözlenmiştir; biri hücre içi schizontların içinde bulunduğu lenfosit hücresi ile eş zamanlı olarak bölünmesi, diğeri ise uzun süren kültivasyon sonucunda schizontların virülenslerini kaybetmeleridir (19).

Macroschizont ile enfekte hücre kültürlerinin attenüe olma süreleri her suş için değişkenlik göstermektedir, farklı izolatlar farklı pasaj sayılarında tam attenüasyona ulaşmaktadır. Tam attenüasyon macroschizontların merozoit ve böylece de piroplasm üretme yeteneklerinin kaybolması ile ilişkilidir (15).

*Theileria annulata* schizont aşısı, bugün Türkiye'nin de aralarında bulunduğu birçok ülkede kullanılmaktadır (6, 20-27).

Ülkemizde tropikal theileriosis'e karşı aşı olarak kullanılan suş Ankara yöresinden izole edilmiştir. Bu aşı Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Pendik Hayvan Hastalıkları Merkez Araştırma Enstitüsü'nde 1982 yılından beri üretilmektedir. Tam attenüasyon 250'nci pasaj civarında elde edilmiştir. Tam attenüe olmuş schizontların ileri pasajlarda virulans kazanmadığı da saptanmıştır. Attenüe schizontlarla enfekte  $1.2 \times 10^5$  lenfoid hücre, koruyucu immüniteyi oluşturmak için yeterlidir. Ancak aşının dondurularak muhafazası, sahaya nakli, çözündürülmesi ve hayvanlara tatbiki esnasındaki bütün riskleri hesaba katarak bir dozu  $10^7$  hücre olacak şekilde hazırlanmaktadır (18).

Nalbantoğlu (17), tropikal theileriosis *T. annulata* schizont aşısı uyguladığı 58 sığırdan 45 (% 77.5)'inin *T. annulata* piroplasm ve schizont antijenine karşı 4-12 ay süreyle antikor taşıdığını ve 6 (% 10.3) sığırın da piroplasm taşıyıcısı olduğunu saptamıştır. Yaman (28),  $10^7$  hücre dozunda *T. annulata* schizont aşısı ile aşıladığı 54 sığırdan 43 (% 79.62)'ünün *T. annulata* piroplasm ve schizont antijenine karşı 3-7 ay süreyle antikor taşıdığını ve 2 sığırın da (% 3.7) piroplasm taşıyıcısı olduğunu tespit etmiştir. Öz (19), aşı uygulaması sonrası % 100 oranında *T. annulata*'nın schizont ve piroplasm antijenleri ile ölçülebilen antikor yanıtı, % 75.4 oranında ise *T. annulata*'nın piroplasmik formlarını tespit etmiştir. Karatepe (18), tropikal theileriosis'e karşı attenüe  $10^7$  hücrelik bir dozda *T.annulata* schizont aşısı uygulanan değişik yaş gruplarına ait 46 sığırdan 37 (% 80.4)'sinde seropozitiflik tespit etmiş olup, 2 (% 4.3)'sinde de piroplasm taşıyıcılığı saptamıştır. Araştırmacı (18) aşılanan hayvanların 6-12 ay süreyle antikor taşıdığını tespit etmiştir.

Her ne kadar attenüe canlı aşılar başarı ile birçok ülkede kullanılmakta ise de, canlı aşılarda uygulanmasında dezavantajlar da söz konusudur. Aşının hazırlanması zor, zaman alıcı ve her aşının serisinin kontrolü pahalı olmaktadır. Ayrıca aşılarda uygulandığı alana soğuk zincir ile taşınması gerekmektedir. Aşının koruyuculuk ömrü kısa olduğu ve endemik stabilitenin olmadığı durumlarda aşılanmanın tekrarı gerekmektedir. Aşının tekrarlanması graft reaksiyonlarına neden olarak immun cevabın oluşumunu engelleyebilmektedir (15).

Tedavi amacıyla tropikal theileriosis'e karşı 1980'li yılların ortalarına kadar akrinin grubu bileşikler, üre-xuinoleine deriveleri, pentamidin, 4 ve 8-aminoquinoleine deriveleri,



biguanid derivelere, diguanil-diazo-aminobenzol derivesi, sülfonamidler, antibiyotikler ve immun serum, immun kan, immun gamma globulin gibi biyolojik maddeler kullanılmıştır (29). 1990'lı yılların ortalarına kadar sığır theileriosisi'nin tedavisinde, menoctone, parvaquone ve buparvaquone gibi hydroxynaphtaquinone'lar ve halofuginone gibi quinazolinone'lar kullanılmıştır (4, 30). Günümüzde de söz konusu ilaçlara ilave olacak güçlü bir alternatif mevcut değildir. Buparvaquone'un yapılan in vitro ve in vivo denemeler sonucunda sığırlarda en etkili anti-theilerial ilaç olduğu bildirilmiştir. Klinik theileriosis'in tedavisinde 2.5 mg/kg dozda kullanımı önerilmektedir. Bazı gerekli durumlarda ikinci defa aynı dozun uygulanabileceği belirtilmiştir. Ayrıca alternatif olarak 5 mg/kg tek doz uygulamasının daha etkili olduğu vurgulanmıştır (31).

Gül ve arkadaşları (30) Elazığ ve çevresinde *T. annulata* ile enfekte sığırların buparvaquone ile tedavisi üzerine yaptıkları araştırmada, toplam 96 hasta sığıra 2.5 mg/kg dozda intramusküler olarak tek doz buparvaquone (Butalex) uygulamışlardır. Ateşi düşmeyen 4 sığıra ise tedaviden 48 saat sonra aynı doz 2. defa yapılmıştır. Tedavi edilen hastalarda piroplazm formda dejenerasyon oluşmasına rağmen, en yaşlı ineğin (14 yaşında) anemi, 3 buzağının ise diare ile komplikasyon sonucu öldükleri belirlenmiştir. Sonuç olarak buparvaquone sığırlarda *T. annulata* enfeksiyonlarının tedavisinde çok etkili bulunmuş, uygulama sonrası ilaca bağlı hiçbir komplikasyon görülmemiştir.

Kenya'da yapılan bir çalışmada (32) *T. parva* enfeksiyonlarının tedavisinde parvaquone ve buparvaquone karşılaştırmalı olarak denenmiş, her ikisinin de benzer etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.

Tanzanya'da yapılan bir çalışmada (33), *T. parva* ile enfekte 60 sığırın tedavi amacıyla 30'una parvaquone, diğer 30 tanesine de parvaquone-frusemid verilmiştir. Parvaquone – frusemide uygulanan grupta 28 (% 93.3) sığır tedavi edilirken parvaquone uygulanan grupta 24 (% 80) sığır tedaviye cevap vermiştir. Bu çalışma (33), parvaquone-frusemide'in *T. parva* enfeksiyonlarının tedavisinde daha kullanışlı olduğunu ortaya koymuştur.

Mbwambo ve arkadaşları (34) Tanzanya'da *T. parva* ile enfekte 63 sığıra tedavi amacıyla 2.5 mg/kg dozda intramusküler olarak tek doz buparvaquone uygulamışlar ve deneme sonunda 38 (% 60.3) sığırın hastalığın erken döneminde, 25 (% 39.7) sığırın ise hastalığın ileri döneminde tedavi edildiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak buparvaquone'un *T. parva* enfeksiyonlarının tedavisinde güvenle kullanılabilirliği belirtilmiştir.

Günümüzde theileriosisin tedavisinde kullanılan Buparvaquone ve Parvaquone etken maddeli ilaçlara alternatif olabilecek bir ilaç bulunmamaktadır. Theileriosisin bitkilerden elde edilen etken maddeler ile tedavi edilmesi üzerine az sayıda çalışma yapılmıştır.

Mirzaei (35) İnan'da *T. annulata* ile enfekte 50 sığıra 5 mg/kg dozda 5 gün boyunca *Peganum harmala* ekstresini intramuskuler olarak uygulamış ve 39 (% 78) sığırın tedavi edildiğini, 11 (% 22) sığırın ise tedaviye cevap vermediğini ve öldüğünü bildirmiştir.

## 2. *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. Bitkisi (Eyilik Otu)

### 2.1. Botanik Özellikleri ve Yayılışı

*Arnebia* cinsi Boraginaceae familyasına dahildir. Bu familyanın üyeleri otsu bitkiler ve çalılardan oluşmaktadır. Ülkemizde 30 kadar cinsi ve 150 kadar türü bilinmektedir. *Arnebia* cinsinin dört türünden birisi olan *A. densiflora* (Nordm.) Ledeb. çok yıllık, kalın odunsu bir bitkidir. Gövdesi basit, 25-40 cm. uzunluğunda kadife tüylü ve dikenlidir. Yaprakları yatık-kıllı ve kadife tüylüdür. Çiçek durumu yoğun 6-12 cm. büyüklüğündedir. Mayıs-Ağustos ayları arasında çiçek açarlar. Kökleri erguvan rengi boya taşıyan bu bitki sarp kayalık, kayalık çıkıntılar, kireçli kayalıklar ve volkanik yüzeylerde yaklaşık 750-2600 m. yükseklikte bulunur (36).

*A. densiflora* bitkisinin Türkiye florasında yedi adet sinonimi verilmiştir (2):

- *Lithospermum densiflorum*
- *Arnebia cephalotes*
- *Munbya cephalotes*
- *Munbya densiflora*
- *Munbya conglobata*
- *Macrotomia cephalotes*
- *Arnebia macrothyrsa*

*A. densiflora*'nın Türkiye'de yetiştiği bölgeler şu şekildedir: Bursa Uludağ; Manisa Kırkağaç; Eskişehir Kepen; Kayseri Bakır Dağı; Adana Saimbeyli, Bozoğlan Dağı; Erzincan Keşiş Dağı; Konya Hamitseydi, Ermenek, Boğaz-Beşkuyu; Niğde Aladağ, Ulupınar yaylası; Kahramanmaraş Berit Dağı; Sivas Ulaş, Kangal ve Gürün'dür. Türkiye dışında Yunanistan'da da yetişmektedir (2).

## 2.2. Arnebia Türlerinin Naftakinonları

Boraginaceae familyası naftakinonlarca çok zengindir. En fazla naftakinon ihtiva eden türler, bu familyanın Lithospermum, Echium, Onosma, Alkana, Cynoglossum ve Arnebia cinslerine aittir (37, 38). Bunların içinde naftakinon yönünden en zengin olan Lithospermum cinsidir. Naftakinonlar *Alkana tinctoria*'nın köklerinden izole edilen ilk naftakinon olan alkanninden dolayı alkanninler adı ile de bilinmektedirler (38).

*A. densiflora*'dan izole edilen naftakinonlar ise şunlardır (39).

- Alkannin
- Arnebin-7
- Asetilalkannin
- İzovalerilalkannin
- $\alpha$ -metil-n-butilalkannin
- $\beta$ ,  $\beta$ -dimetilakrilalkannin
- Anjelikalkannin

Naftakinonların biyolojik aktivitelerinde kayıplar özellikle ışık, hava ve ısının etkisiyle meydana gelen polimerizasyonlarda görülmüştür. Bu nedenle izolasyon esnasında farmakolojik aktiviteleri göz önünde bulundurularak polimerizasyonu en az düzeye indiren izolasyon yöntemi seçilmelidir (40). Bozan (41) 5<sup>0</sup>C'de saklanması halinde terakrilalkannin'in pH 3.05'te yarılanma ömrünü 478 gün (16 ay), pH 2.2'de 332 gün (11 ay) olarak tespit etmiştir.

Bozan (42) naftakinonların izolasyonu için Sivas Kangal'dan toplanan *A. densiflora* bitkisinin köklerinden elde edilen ekstreyi kullanmıştır. *A. densiflora* bitkisinin köklerinin n-hekzanlı ekstresinden, ince tabaka kromatografisi kullanılarak izole edilen naftakinonlar aşağıda belirtilmiştir.

- Terakrilalkannin
- $\beta$ ,  $\beta$ -dimetilakrilalkannin
- $\alpha$ -metil-n-butilalkannin
- İzovalerilalkannin

Bozan ve arkadaşları (39) tarafından Eskişehir-Sivrihisar'dan toplanan materyalden Thin Layer Chromatography (TLC) - densitometri kullanarak *A. densiflora* köklerindeki naftakinon içeriğinin kantitatif olarak belirlendiği çalışmada Bozan (1) ile benzer sonuçlar

elde etmişlerdir. Aynı çalışmada (39) araştırıcılar TLC ile elde ettikleri bu bulguları High Performance Liquid Chromatography (HPLC) kullanılarak bulunan verilerle karşılaştırmışlar ve belirlenen naftakinon içerikleri arasında önemli bir fark tespit edememişlerdir.

*A. densiflora* köklerinin maksimum ekstraksiyon verimi üzücü olarak n-hekzan kullanılarak Soxhlet cihazı ile yapılan ekstraksiyonda % 5.65 olarak bulunmuştur. Soxhlet cihazında ilk yarım saat içinde naftakinonların yaklaşık % 80'i, ilk iki saatte ise % 86-90'ı ekstre edilebilmektedir. Köklerin parçacık boyutu ekstraksiyon verimi üzerine yaklaşık % 3 etki etmektedir (41).

### 2.3. Biyoaktivite Bilgileri

Bütün naftakinonlar biyolojik olarak son derece aktif bileşiklerdir. Bu tür maddelerin antibakteriyel (40), antitümör (2, 40), herbisidal (43) ve yara iyileştirici (2) aktiviteleri belirgindir. Bu grubun bütün üyelerinin sahip olduğu yara iyileştirici etkileri, belki de en fazla klinik öneme sahip özelliğidir.

Boraginaceae köklerinden elde edilen ürünler birçok ülkede halk arasında eczema, keratoderma, dermatophytosis, corns callus, acne vulgaris, yanıklar ve tüm hemorroidlerde kullanılmaktadır. Bu etkileri açıklayacak bilimsel çalışmalar 1980'li yıllarda gelişmeye ve destek görmeye başlamıştır (38).

Naftakinonlar, parazitolojide bazı protozoon enfeksiyonlarının tedavisinde de kullanılmaktadır. *Trypanozoma cruzi*'de bulunan trypanothione reductase enziminin naftakinon türevi ile inhibe edildiği bildirilmiştir (44). Dobbelaere ve ark (45) tarafından naftakinon türevlerinin *Theileria parva*'nın mitokondrial elektron transportunu engelleyerek parazitin ölümüne neden olduğu gözlenmiştir. Bunlara ilave olarak naftakinonların sıtma, toxoplasmosis ve *Pneumocystis pneumonia*'nın tedavisi amacıyla kullanıldığı belirtilmiştir (46).

Boraginaceae familyasının tüm üyelerinde tipik olarak bulunan pyrolizidine alkaloidlerin memelilerde hepatotoksik etkisi olduğu bilinmektedir (47).

Boraginaceae familyası üyelerinin sahip olduğu bu özellikler nedeniyle üyelerinin farmakolojik özellikleri araştırılarak tedavi alanına sunulması çalışmaları halen devam etmektedir (40).

### 3. *Artemisia annua* Lamarck Bitkisi (Acı Pelin)

#### 3.1. Botanik Özellikleri ve Yayılışı

Asteraceae familyasından olan bu bitki, tek yıllık ve dik gövdelidir. Gövde genellikle kırmızımsı ve puberulos tüylüdür. Yapraklar 2-pinnatisect parçalı olup her biri düzenli ve derin dişlidir. Çiçek durumu genişçe yaygın paniculadır. Kapitulum yuvarlak, çok çiçekli ve 2–4 mm genişliğindedir. Dıştaki fillariler uzunca otsu; içtekiler ise uzunca yumurta şekilli ve dıştakilerden daha uzun olup çoğunlukla ince zarımsıdır. Dıştaki çiçekler ipliksi, dişi; içtekiler ise hermafrodit, fertil, korolla sarımsı ve tüsüzdür. Bitkinin çiçeklenme dönemi Haziran ve Kasım ayları arasındadır. Düşük rakımlarda, dere kenarı, çayır gibi alanlarda yayılış gösterir (36).

*A. annua* L. dünyada Türkiye, İspanya, Fransa, Balkan ülkeleri, Rusya, İran ve Çin’de yetişir (48).

*Artemisia* cinsinin sistematik durumu aşağıda belirtilmiştir (49);

Bölüm (Divisio) : Spermatophyta  
Alt Bölüm (Subdivisio): Angiospermae  
Sınıf (Classis) : Dicotyledone  
Alt Sınıf (Subclassis) : Asteridae  
(Ordo) : Asterales  
Aile (Familia) : Asteraceae  
(Tribus) : Anthemideae  
Cins (Genus) : *Artemisia* L.  
Tür : *Artemisia annua* L.

### 3.2. Etnofarmakolojik Bilgiler

Artemisia L. türleri eski Mısırlılar döneminden beri tedavide kullanılmaktadır(49).

Bu bitki türleri doğada yaygın olarak bulunmaktadır ve birçoğu karakteristik tat ve kokuya sahiptir. Birçok yerde, geleneksel tedavide tonik, antihelmintik, antiplasmodial, romatizmal ağrılarda, hepatit ve kanserde, mantar, bakteri ve virüslerin sebep olduğu enfeksiyonlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (49).

Ülkemizde halk dilinde acı pelin olarak, yurt dışında sweet wormwood veya sweet annie olarak bilinen *A. annua* yiyeceklere hoş koku vermek amacıyla kullanılır. Bu bitki dünyada, kozmetik sanayinde, uçucu yağından dolayı koku vermek amacıyla parfümeride, biyolojik aktivitesinden dolayı da ilaç sanayinde kullanılmaktadır (48).

Antalya ve Kütahya yörelerinde yetişen bazı Artemisia türlerinin çiçekli dallarının sıtmaya karşı toz halinde (acı lezzetini saklamak için sigara kağıdına sarılarak), dahilen dizanteri ve vereme karşı, haricen çıbanları iyileştirici olarak da kullanıldığı bildirilmektedir (49).

### 3.3. Biyoaktivite Bilgileri

Günümüzde Artemisia türlerinin önem kazanması 1971 yılında Çinli araştırmacıların *A. annua*'dan "Artemisinin (Qing Hao Sui)" adını verdikleri hidrofobik, biyolojik membranları kolaylıkla geçebilen, seskiterpen lakton yapılı, antiplasmodial etkili bir maddeyi izole etmesiyle başlamıştır (50, 51).

*A. annua*'nın hoş kokulu toprak üstü kısımlarının, uçucu yağı elde edilmiş ve kromatografik yöntemlerle yapısı aydınlatılmıştır. Yapıda ylang, delta-cadinen, beta-selinen, beta-farnasen, capilen, mentol, borneol, terpinen-4-ol, pinokarveol, pinokarvon, 3-metil-pinokarvon olduğu saptanmıştır (48).

*A. annua*'dan artemisinin izolasyonu için en çok kullanılan çözücüler toluene, n-hekzan, chloroform ve petrol eteridir. Yapılan bir çalışmada (52) n-hekzan, toluene ve petrol eteri çözücü olarak kullanılmış ve artemisinin türevlerinden artemisinik asit ve arteannuin B ekstraksiyonu yönünden karşılaştırılmıştır. Ekstraksiyon ürünleri yönünden bu çözücüler arasında fark olmadığı bildirilmiştir.

Bitkinin toprak üstü kısımları kurutulmuş, toz haline getirilmiş, alınan hekzan ekstresi HPLC, HPLC/DAD (Diode Array Detector) ve HPLC/MS (Mass Spectrometry) spektrumundaki analizler sonucu incelenmiş ve elde edilen maddenin artemisinin adlı bir seskiterpen lakton olduğu saptanmıştır (53).

Woerdenbag ve arkadaşları (54) *A.annua*'dan elde edilen seskiterpen lakton yapısında olan artemisinin maddesi ve türevlerinin antiplasmodial ilaç olabileceğini bildirmiştir. Aynı araştırmacı (55) artemisinin, dihydroartemisinin ve yarı sentetik türevlerinin sitotoksik etkilerini araştırmış ve bu maddelerin kanserli hücreler üzerinde etkili olabileceğini bildirmiştir.

Woodrow ve arkadaşları (50) artemisinin ve türevlerinin in vitro ortamda parazit öldürücü özelliği olduğunu, nanomolar dozlarda dahi parazitleri diğer antiplasmodial ilaçlardan daha hızlı öldürdüğünü bildirmiştir.

*A. annua*'nın hekzan ekstresinin incelenmesi sonucu elde edilen artemisinik asidin de antiplasmodial etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (56).

*A. annua*'dan izole edilen artemisinin türevlerinden dihydroartemisinin, artesunat, artemeter ve arteeter'in günümüzde plasmodiumun tedavisinde artemisinin ile birlikte kullanıldığı bildirilmiştir (57).

Mishina ve arkadaşları (51) artemisinin bileşiklerinin *Leishmania major*, *L.infantum*, *L.donovani*, *Trypanosoma cruzi* ve *T.brucei rhodesiense*'ye karşı etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Kim ve arkadaşları (58)'nin bildirdiğine göre artemisinin, *Eimeria tenella*, *Neospora caninum*, *Cryptosporidium parvum*, *Naegleria fowleri*, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma japonicum*, *S.mansoni* ve *Clonorchis sinensis*'e karşı etkili bulunmuştur.

*A. annua* bitkisinden elde edilen antiplasmodial etkili artemisinin maddesinin yanı sıra elde edilen artemisinik asit, arteannuin B, arteeter ve bunların sentetik türevlerinin monokotil ve dikotil tohumlu bitkiler üzerinde yaşayan parazitlere karşı insektisit etkili oldukları saptanmıştır (48).

1996 yılında bu bitkinin kökleri ile yapılan bir çalışmada artemisinin maddesi tesbit edilmiş ve bitkinin sadece toprak üstü kısımlarının değil köklerinin de antiplasmodial olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir (59).



## GEREÇ VE YÖNTEM

### 1. Bitkilerin Toplanması, Kurutulması ve Çözücülerle Ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılan bitkilerin toplama ve kurutma işlemlerini takiben tüm ekstraksiyon, bitki içeriklerinin ve/veya miktarlarının belirlenmesi işlemleri Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalınca gerçekleştirilmiştir.

#### 1.1. *Arnebia densiflora* Bitkisinin Toplanması, Kurutulması ve n-hekzan ile Ekstraksiyonu

Bu çalışmada, *A. densiflora* bitkisinin kökleri kullanılmıştır. *A. densiflora* bitkisi (Şekil 1), 12.07.2005 tarihinde Eskişehir-Sivrihisar karayolunda Alpu'ya 10 km uzaklıkta kireçli tepelerden toplanmıştır.



Şekil-1. *Arnebia densiflora* bitkisinin görünümü

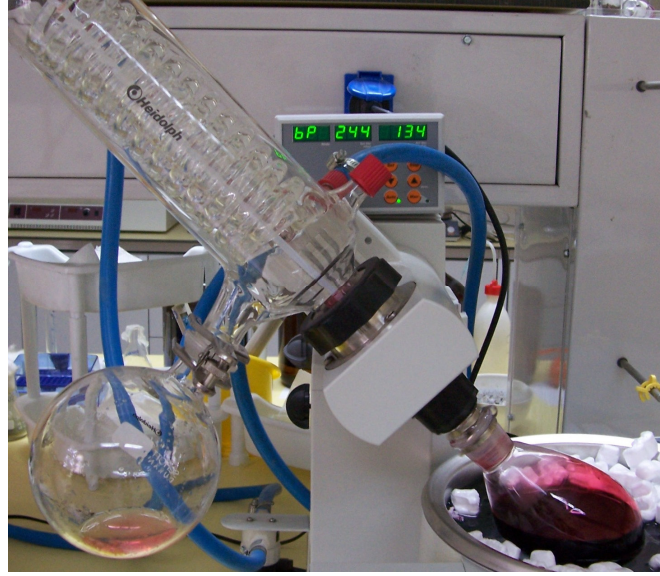
Toplanan bitkilerin kökleri çıkarılmış, açık havada ve gölgede kurutulmuş, mekanik olarak kaba toz haline getirilmiş (drog) ve Soxhlet apareyinde (Şekil 2) oda şartlarında n-hekzan ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur (1).



Şekil-2. Soxhlet apareyi

Soxhlet apareyindeki balon jojeye çözücü olarak n-hekzan çıkış borusu seviyesine kadar doldurulmuş ve ısıtıcıya yerleştirilmiştir. 90.5 g drog, kurutma kağıdına sarılarak ekstraktöre koyulmuştur. Kaynama başladığı zaman geniş çaplı olan çözücü çıkış borusundan çözücü buharları yükselmiş, soğutucuda yoğunlaşarak drog üzerinde birikmeye başlamıştır. Ekstraktördeki çözücü seviyesi ince çaplı olan sifon borusu seviyesine geldiği zaman sifon gerçekleşmiş ve renkli ekstre balona dönmüştür. Ekstraksiyona, çözeltiye renkli madde geçmeyinceye kadar devam edilmiştir.

Ekstraksiyon sonunda çözücü madde olarak kullanılan n-hekzan, rotary evaporator (Şekil 3) aracılığı ile alçak basınç altında ve  $40^{\circ}\text{C}$ 'yi geçmeyen ısıda ortamdan uzaklaştırılmış ve ekstre yoğunlaştırılmıştır.



Şekil-3. Rotary evaporator

### 1.1.1. *Arnebia densiflora* Ekstresinin Analizi

Bu çalışma öncesinde Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognози Anabilim Dalınca TLC yöntemi ile *A. densiflora* köklerinden elde edilen ekstrelerin analizleri yapılmış, izole edilen naftakinonlar ve miktarları belirlenmiştir (1). Aynı sonuçların elde edileceği düşünülerek TLC çalışmaları burada tekrarlanmamış, ancak elde edilen ekstre kullanılmıştır.

### 1.2. *Artemisia annua* Bitkisinin Toplanması, Kurutulması, Petrol Eteri ve Metanol ile Ekstraksiyonu

Bu çalışmada 12.11.2005 tarihinde Bursa-Acemler'de açık araziden toplanan *A. annua* bitkisinin (Şekil 4) toprak üstü kısımları kullanılmıştır. Açık havada ve gölgede kurutulan, mekanik olarak kaba toz haline getirilen çiçek ve yapraklardan, ultrasonik su banyosunda petrol eteri ve metanol maserasyonu ile ekstreler elde edilmiştir(52).



Şekil-4. *Artemisia annua* bitkisinin görünümü

100 g drog 1lt'lik erlenmayere koyulmuş ve üzerine 900 ml petrol eteri ilave edilmiştir. Erlenmayerin ağzı kapak ile kapatılmış, etrafı alüminyum folyo ile sarılarak karanlık ortam oluşturulmuştur. Erlenmayer oda ısısında, içinde distile su bulunan ultrasonik su banyosunda 15 dakika bekletilmiştir (Şekil 5). Erlenmayer içinde bulunan drog cam huni içine koyulan pamuktan boş bir behere süzölmüştür. Drog üzerine aynı miktarda çözücü ilave edilerek bu işlemler toplam 3 defa tekrarlanmıştır. Ekstraksiyon sonunda çözücü maddeler rotary evaporator aracılığı ile alçak basınç altında ve 40<sup>0</sup> C'yi geçmeyen ısıda ortamdan uzaklaştırılmış ve petrol eteri ekstresi yoğunlaştırılmıştır.

*A. annua*'dan metanol ekstresi de aynı yöntemle elde edilmiştir.



Şekil 5. Ultrasonik su banyosu

*A. densiflora* ve *A. annua* bitkilerinden elde edilen ekstratlar denemelerde kullanılmak üzere koyu renkli cam şişelerde ağızları kapalı olarak - 20<sup>0</sup> C'de muhafaza edilmiştir.

### 1.2.1. *Artemisia annua* Bitkisinden Elde Edilen Ekstrelerin Gaz Kromatografik Analizi

*A. annua* bitkisinin petrol eteri ve metanol ekstreleri içinde bulunan artemisinin, chrompack kapiller kolonda tutunma süresine göre ayrılmış ve relatif yüzdesine göre değerlendirilmiştir (60).

#### Gaz Kromatografisi Analiz Koşulları

Kolon	: CP-Sil 5 CB (25 m x 0.25 mm)
Dedektör	: FID
Taşıyıcı gaz	: Helyum
Split akış hızı	: 0.8 ml / dak
Split oranı	: 25:1
Dedektör sıcaklığı	: 300 <sup>0</sup> C
Enjektör sıcaklığı	: 250 <sup>0</sup> C
Program	: 195 <sup>0</sup> C 15 dak 5 <sup>0</sup> C / dak 230 <sup>0</sup> C 20 dak

## 2.Çalışma Planı

Çalışmada sağlıklı ve *T. annulata* schizontu ile enfekte Peripheral Blood Mononuclear (PBM) hücreleri kullanılmıştır. Her iki hücre grubunda da kontrol amacı ile ayrılan hücrelere hiçbir işlem yapılmamıştır. Ekstrelerin çözdürülmesinde kullanılan Dimetilsülfoksit (DMSO) ve denemeye alınan tüm ekstreler Tablo 1’de belirtilen konsantrasyonlarda her iki hücre grubu üzerinde denenmiştir. *A. densiflora* n-hekzan ekstresi ile yapılan denemelerde her konsantrasyon 6 kez, *A. annua* petrol eteri ve metanol ekstreleri ile yapılan denemelerde her konsantrasyon 9 kez, ekstrelerin çözdürülmesinde kullanılan DMSO ile yapılan denemeler 9 kez tekrar edilmiştir.

Tablo-1. Çalışma planı

Sağlıklı PBM Hücreler			Theileria annulata Schizontu ile Enfekte PBM Hücreler		
Kontrol Grubu	DMSO Denemesi	Deneme Grubu	Kontrol Grubu	DMSO Denemesi	Deneme Grubu
		8 µl DMSO’da çözdürülen ekstrelerin 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.9062, 1.9531µg/ml konsantrasyonları denendi			8 µl DMSO’da çözdürülen ekstrelerin 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125, 3.9062, 1.9531µg/ml konsantrasyonları denendi
Taze medium ilave edildi	En yüksek deneme konsantrasyonu olan 8 µl denendi		Taze medium ilave edildi	En yüksek deneme konsantrasyonu olan 8 µl denendi	

### **3. Bitki Ekstrelerinin In vitro Ortamda Sağlıklı Peripheral Blood Mononuclear (PBM) Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemeleri**

#### **3.1. Sağlıklı PBM Hücreleri'nin Kandan İzolasyonu ve Kültivasyonu**

Peripheral Blood Mononuclear hücreler, bir buzağının perifer kanından Ficoll Paque (Biochrom AG) ile izole edilmiştir (61). Ficoll Paque, kan hücrelerinin yoğunluk farkıyla birbirinden ayrılmasını sağlayan bir solüsyondur. Buzağı kanından lenfosit izolasyonu için kullanılan Ficoll-Paque'in yoğunluğu 1077 g/lt dir.

Buzağının vena jugularisinden steril, lithium-heparinli tüpe alınan 10 ml kan, 10 ml steril, pH 7.3 olan phosphate buffered saline (PBS) ile karıştırılmıştır. Kan-PBS karışımı, 8 ml Ficoll Paque üzerine tabaka oluşturacak şekilde aktarılmış ve 2800 rpm, 15<sup>0</sup> C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda üstte plazma, onun altında PBM hücreler, hücrelerin altında Ficoll-Paque ve en altta eritrositler ve granüositler yer almaktadır (61).

Peripheral Blood Mononuclear (PBM) hücreler, iç yüzeyden toplanarak 20 ml PBS ile 1500 rpm, 15<sup>0</sup> C'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır. Tüpün dibinde toplanan hücre peletinin üstündeki trombositleri içeren katman uzaklaştırılarak, pelet 20 ml PBS ile 1500 rpm, 15<sup>0</sup> C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Peletin üst katmanı atılarak pelet 14 ml medium ile süspanse edilmiştir (61).

Medium; Besi yeri (RPMI 1640), ısı ile inaktive edilmiş % 10 neonatal calf serum (NCS), 2 mM L-glutamine, 100 µg/ ml streptomycin ve 100 U/ ml penicillin içermektedir.

Daha sonra hücre süspanسیونundan 200 µl alınarak PBM hücreler hemositometri (geliştirilmiş Neubauer tipi) ile sayılmıştır.

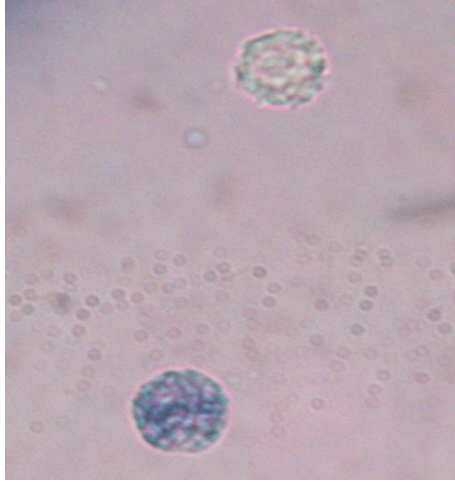
##### **3.1.1. PBM Hücrelerinin Mikroskopik Sayımı**

Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla Neubauer lamının ortasına lamel yerleştirilmiştir. Hücre süspanسیونundan 20 µl alınarak lamın üst yarımına yerleştirilmiştir. Bu bölgede 1 mm<sup>2</sup>deki toplam hücre sayılmıştır (62).

Canlı ve ölü hücreleri saymak amacıyla, 50 µl hücre süspanسیونu 50 µl % 0.4 trypan blue ile süspanse edilmiştir. Bu karışımdan 20 µl, Neubauer lamının alt yarımına lam ile lamel arasına verilmiş, lam ışık mikroskobuna yerleştirilerek 10x objektifte 1 mm<sup>2</sup>deki canlı



ve ölü hücre sayıları belirlenmiştir. Trypan blue ile mavi renge boyanan hücreler ölü, boya almayan hücreler canlı kabul edilmiştir (Şekil 6) (62).



Şekil 6. Canlı ve Ölü PBM hücreleri

### 3.1.1.1. 1 ml Hücre Süspansiyonundaki Toplam Hücre Sayısı

Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla Neubauer lamının üst yarımında boyanmayan süspansiyon sayılmıştır. Neubauer lamında  $1 \text{ mm}^2$  'lik 4 farklı alan bulunmaktadır. Her  $1 \text{ mm}^2$  'deki hücreler sayılmış, toplanmış ve 4'e bölünerek ortalaması alınmıştır. Çıkan sonuç, ortalama hücre sayısı /  $1 \text{ mm}^2$  'dir (62).

$(\text{Ortalama hücre sayısı} / 1 \text{ mm}^2) \times 10000 = \text{Hücre sayısı} / 1 \text{ ml Hücre süspansiyonu}$  formülüne göre hücre süspansiyonunun ml sindeki hücre sayısı bulunmuştur (62) .

### 3.1.1.2. 1 ml Hücre Süspansiyonundaki Canlı ve Ölü Hücre Sayıları ile Oranları

Hücre süspansiyonundaki canlı ve ölü hücre sayılarını belirlemek amacıyla Neubauer lamının alt yarımında % 0.4 trypan blue ile boyanmış hücre süspansiyonu sayılmıştır. Hemositometrinin  $1 \text{ mm}^2$  'lik 4 farklı alanındaki canlı hücreler ve ölü hücreler ayrı ayrı sayılmış, ortalamaları alınarak canlı ve ölü hücre oranları hesaplanmıştır (62).



### 3.1.1.3. Sağlıklı PBM Hücreleri'nin Deneme Kuyucuklarına Aktarılması

Ekstrelerin sağlıklı PBM hücelere etkisini belirlemek amacıyla 24 deneme kuyucuklu pleyt kullanılmıştır. Elde ettiğimiz sağlıklı PBM hücre süspansiyonundan plaktaki her çukura  $2 \times 10^6$  hücre olacak şekilde 0,5 ml koyulmuştur (31).

### 4. Sağlıklı PBM Hücrelerine DMSO'in Etkinlik Denemeleri

Ekstrelerin çözündürülmesinde kullanılan DMSO'in sağlıklı hücelere etkisini belirlemek amacıyla 0.5 ml mediumda 8 µl DMSO olacak şekilde hücre süspansiyonu bulunan deneme kuyucuklarına DMSO ilave edilmiştir. Denemenin 24 ve 48. saatlerinde ölü hücre oranları belirlenerek kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Denemeler 9 kez tekrarlanmıştır.

### 5. Bitki Ekstrelerinin Çözündürülmesi, Sulandırılması ve İçinde Sağlıklı PBM Hücreleri Bulunan Deneme Kuyucuklarına Aktarılması

Ekstreler DMSO'de çözündürülmüştür. *A. densiflora*'nın n-hekzan ekstresi 125 µg / ml, 62.5 µg / ml, 15.625 µg / ml, 7.8125 µg / ml, 3.9062 µg / ml konsantrasyonlarda, *A. annua*'nın petrol eteri ve metanol ekstreleri 125 µg / ml, 62.5 µg / ml, 31.25 µg / ml, 15.625 µg / ml, 7.8125 µg / ml, 3.9062 µg / ml, 1.9531 µg / ml konsantrasyonlarda denenmiştir. Bu amaçla, 256 µl DMSO'de 4 mg *A. densiflora*'nın n-hekzan ekstresi vorteks yardımıyla çözündürülmüş ve % 10 NCS içeren 8 ml mediumla süspanse edilmiştir. Süspansiyon 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve steril tüpe aktarılarak içinde 4 ml medium bulunan tüplerde sulandırmaları yapılmıştır. Denemeler 6 kez tekrarlanmıştır.

*A. annua*'nın petrol eteri ve metanol ekstresi denemeleri için, 256 µl DMSO'de 4 mg ekstre vorteks yardımıyla çözündürülmüş ve % 10 NCS içeren 8 ml mediumla süspanse edilmiştir. Süspansiyon 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve steril tüpe aktarılarak içinde 4 ml medium bulunan tüplerde sulandırmaları yapılmıştır.

Sağlıklı PBM hücre süspansiyonundan 0.5 ml koyulan deneme kuyucuklarına 0.5'er ml ekstrelerin sulandırmalarından ilave edilmiştir. Böylece her deneme kuyucuğunda 0.5 ml

hücre süspansiyonu ve 0.5 ml ekstre süspansiyonu olmak üzere toplam 1 ml süspansiyon elde edilmiştir.

Her iki ekstre için denemeler 9 ar kez tekrar edilmiştir.

### **5.1. Deneme Sonrası Hücrelerin Deneme Kuyucuklarından Alınması ve Sayılması**

Ekstrelerin sağlıklı PBM hücrelerine uygulanmasından sonra, pleyt 37<sup>0</sup> C, % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilmiştir. Deneme sonrası 24. ve 48. saatlerde inverted mikroskop altında hücre üremeleri kontrol edilmiştir. Her dilüsyon için kullanılan deneme çukurlarından 150'şer µl hücre süspansiyonu alınarak hemositometri ile toplam hücre sayıları, canlı ve ölü hücre oranları belirlenmiştir (62).

## **6. Bitki Ekstrelerinin In vitro Ortamda *Theileria annulata* Schizontu ile Enfekte PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemeleri**

### **6.1. *Theileria annulata* Schizontu ile Enfekte PBM Hücrelerinin Sıvı Azot Tankından Alınıp Çözdürülmesi ve Kültivasyonu**

Denemelerimizde *T. annulata* Osmanbükü-İbrahim Özkan izolatının 2 ve 3 no'lu pasajları kullanılmıştır. Daha önce kültivasyonu yapılan ve -196<sup>0</sup> C'de sıvı azot tankında bulunan *T.annulata* schizontuyla enfekte PBM hücrelerinin bulunduğu cryotüp çıkarılarak 37<sup>0</sup> C'deki su dolu beherin içinde 3-4 dakikada çözdürülmüştür. Cryotüp sudan çıkarılarak, kapağı açılmış ve içindeki süspansiyon pipetle 1 kere alt-üst edilerek içinde 8 ml medium bulunan steril tüpe aktararak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Buradaki amaç, hücrelerin dondurulması amacıyla kullanılan DMSO'in ortamdan uzaklaştırılmasıdır. Santrifüj sonrası peletin üstündeki süpernatant atılarak pelet 10 ml % 20 NCS içeren medium ile süspanse edilmiştir. Süspansiyonun tamamı 25 cm<sup>2</sup> 'lik flaska aktarılmıştır. Flask 37<sup>0</sup> C, % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Hücre sayısı her 48-72 saatte logaritmik artış gösterdiğinden iki gün sonra hücre üremeleri inverted mikroskopta kontrol edilmiştir (61).

Flasktaki hücre süspansiyonundan 200 µl alınarak 1 ml'deki canlı hücre sayısı hemositometri ile belirlenmiştir. Flaskta hücre yoğunluğu 1-2 x10<sup>5</sup> / ml olacak şekilde hücre

süspansiyonundan belli miktarda bırakılarak üzerine % 10 NCS içeren taze medium ilave edilmiştir. Flask 37<sup>0</sup> C, % 5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır (61).

## **6.2. Kültürü Yapılan *Theileria annulata* Schizontu ile Enfekte PBM Hücrelerinin Mikroskopik Sayımının Yapılması ve Deneme Kuyucuklarına Aktarılması**

Flasktaki hücre süspansiyonu hücre üremelerinin değerlendirilmesi için iki gün sonra inverted mikroskopta incelenmiştir. Hemositometri ile toplam hücre, ölü ve canlı hücre sayıları belirlenmiştir. Flaskta 1-2 x10<sup>5</sup>/ml hücre bırakılmış ve geriye kalan hücre süspansiyonu steril bir tüpe aktarılmıştır (61). Steril tüpe aktarılan hücre süspansiyonundan 200 µl alınarak enfekte hücreler hemositometri ile sayılmıştır.

Flaskta kalan hücrelere ise taze medium ilave edilerek % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde, 37<sup>0</sup> C'de inkübasyona bırakılmıştır (61).

### **6.2.1. 1 ml Hücre Süspansiyonundaki Toplam Enfekte Hücre Sayısı**

Toplam hücre sayısını belirlemek amacıyla Neubauer lamının üst yarımında boyanmayan süspansiyon sayılmıştır. Neubauer lamında 1 mm<sup>2</sup>'lik 4 farklı alan bulunmaktadır. Her 1 mm<sup>2</sup>'deki hücreler sayılmış, toplanmış ve 4'e bölünerek ortalaması alınmıştır. Çıkan sonuç, ortalama hücre sayısı / 1 mm<sup>2</sup>'dir (62).

(Ortalama hücre sayısı / 1 mm<sup>2</sup>) x 10000 = Hücre sayısı / 1 ml. Hücre süspansiyonu formülüne göre hücre süspansiyonunun ml sindeki hücre sayısı bulunmuştur (62).

### **6.2.2. 1 ml Hücre Süspansiyonundaki Canlı ve Ölü Hücre Sayıları ile Oranları**

Hücre süspansiyonundaki canlı ve ölü hücre sayılarını belirlemek amacıyla Neubauer lamının alt yarımında % 0.4 trypan blue ile boyanmış hücre süspansiyonu sayılmıştır. Hemositometrinin 1 mm<sup>2</sup>'lik 4 farklı alanındaki canlı hücreler ve ölü hücreler ayrı ayrı sayılmış, ortalamaları alınarak canlı ve ölü hücre yüzdeleri hesaplanmıştır (62).

### 6.2.3. Enfekte PBM Hücreleri'nin Deneme Kuyucuklarına Aktarılması

Ekstrelerin enfekte PBM hücelere etkisini belirlemek amacıyla 24 deneme kuyucuklu pleyt kullanılmıştır. Elde ettiğimiz enfekte PBM hücre süspansiyonundan plaktaki her çukura  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde 0,5 ml koyulmuştur (31).

### 7. DMSO'in In vitro Ortamda *Theileria annulata* Schizontu ile Enfekte PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemeleri

Ekstrelerin çözündürülmesinde kullanılan DMSO'in enfekte PBM hücelere etkisini belirlemek amacıyla 0.5 ml mediumda 8 µl DMSO olacak şekilde, hücre süspansiyonu bulunan deneme kuyucuklarına ilave edilmiştir. Denemenin 24 ve 48. saatlerinde ölü hücre oranları belirlenerek kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Denemeler 9 kez tekrarlanmıştır.

### 8. Bitki Ekstrelerinin Çözündürülmesi, Sulandırılması ve İçinde Enfekte PBM Hücelere Bulunan Deneme Kuyucuklarına Aktarılması

Ekstreler DMSO'de çözündürülmüştür. *A. densiflora*'nın n-hekzan ekstresi 125 µg / ml, 62.5 µg / ml, 15.625 µg / ml, 7.8125 µg / ml, 3.9062 µg / ml konsantrasyonlarda, *A. annua*'nın petrol eteri ve metanol ekstreleri 125 µg / ml, 62.5 µg / ml, 31.25 µg / ml, 15.625 µg / ml, 7.8125 µg / ml, 3.9062 µg / ml, 1.9531 µg / ml konsantrasyonlarda denenmiştir. Bu amaçla, 256 µl DMSO'de 4 mg *A. densiflora*'nın n-hekzan ekstresi vorteks yardımıyla çözündürülmüş ve % 10 NCS içeren 8 ml mediumla süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve steril tüpe aktarılarak içinde 4 ml medium bulunan tüplerde sulandırmaları yapılmıştır. Denemeler 6 kez tekrarlanmıştır.

*A. annua*'nın petrol eteri ve metanol ekstresi denemeleri için, 256 µl DMSO'de 4 mg ekstre vorteks yardımıyla çözündürülmüş ve % 10 NCS içeren 8 ml mediumla süspansiyon edilmiştir. Süspansiyon 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve steril tüpe aktarılarak içinde 4 ml medium bulunan tüplerde sulandırmaları yapılmıştır.

Enfekte PBM hücre süspansiyonundan 0.5 ml koyulan deneme kuyucuklarına 0.5'er ml ekstrenin sulandırmalarından ilave edilmiştir. Böylece her deneme kuyucuğunda 0.5 ml hücre süspansiyonu ve 0.5 ml ekstre süspansiyonu olmak üzere toplam 1 ml süspansiyon elde edilmiştir.

Her iki ekstre için denemeler 9 ar kez tekrarlanmıştır.

### **8.1. Deneme Sonrası Hücrelerin Deneme Kuyucuklarından Alınması ve Sayılması**

Ekstrelerin enfekte PBM hücrelerine uygulanmasından sonra, pleyt 37<sup>0</sup> C, % 5 CO<sub>2</sub> 'li etüvde inkübe edilmiştir. Deneme sonrası 24. ve 48. saatlerde inverted mikroskop altında hücre üremeleri kontrol edilmiştir. Her dilüsyon için kullanılan deneme çukurlarından 150'şer µl hücre süspansiyonu alınarak hemositometri ile toplam hücre sayıları, canlı ve ölü hücre oranları belirlenmiştir (62).

## **9. İstatistiksel Değerlendirme**

Bulguların istatistiki analizleri SPSS 11.5 programı kullanılarak yapılmıştır. Kontrol ve deneme gruplarına ait ölü PBM hücre yüzde oranlarının aritmetik ortalamaları ve standart hataları çalışmanın 24 ve 48. saatleri için hesaplanmıştır. Kontrol ve deneme gruplarına ait veriler arasındaki farklılıkların önem analizleri Mann Whitney U testi ile çalışılmıştır. P<0.05 ve üstü değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## BULGULAR

### 5. Bitkilerin Ekstraksiyonundan Elde Edilen Bulgular

#### 1.1. *Arnebia densiflora* Bitkisinin n-hekzan ile Ekstraksiyonu Sonucu Elde Edilen Bulgular

Bitkinin kurutulması ve parçalanması ile hazırlanmış 90.5 g drogdan 4.12 g koyu-mor renkli ekstre elde edilmiştir.

#### 1.2. *Artemisia annua* Bitkisinin Petrol Eteri ile Ekstraksiyonu Sonucu Elde Edilen Bulgular

Bitkinin kurutulması ve parçalanması ile hazırlanmış 100 g drogdan 2.28 g yeşil renkli ekstre elde edilmiştir.

#### 1.3. *Artemisia annua* Bitkisinin Metanol ile Ekstraksiyonu Sonucu Elde Edilen Bulgular

Bitkinin kurutulması ve parçalanması ile hazırlanmış 100 g drogdan 5.56 g koyu-yeşil renkli ekstre elde edilmiştir.

#### 1.4. *Artemisia annua* Bitkisinden Elde Edilen Ekstrelerin Gaz Kromatografik Analizine Ait Bulgular

*A. annua* bitkisinin petrol eteri ve metanol ekstreleri içinde bulunan etken madde miktarı, yapılan gaz kromatografik analiz sonucunda Tablo 2’de belirtildiği gibi bulunmuştur.

Tablo-2. *Artemisia annua* Bitkisinden Elde Edilen Ekstrelerin Gaz Kromatografik Analizi

<b>Ekstre</b>	<b>Artemisinin Miktarı (mg/100g ekstre)</b>
Petrol Eteri	4.54 ± 0.10
Metanol	1.14 ± 0.07

## 2. Bitki Ekstrelerinin In vitro Ortamda Sağlıklı PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular

### 2.1. *Arnebia densiflora* Bitkisinden Elde Edilen n-hekzan Ekstresinin Sağlıklı PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular

Deneme sonuçları Tablo 3’de sunulmuştur.

Tablo-3. *Arnebia densiflora* n-hekzan ekstresinin sağlıklı PBM hücrelerine karşı etkinlik denemelerinden elde edilen ölü hücre oranları (n=6)

<b>Ekstrenin Konsantrasyonu (µg/ml)</b>	<b>24.saat</b>	<b>48.saat</b>
	<b>Ortalama (%) ± Standart Hata</b>	<b>Ortalama (%) ± Standart Hata</b>
125	50.17±3.094**	57.85±2.121**
62.5	46.85±2.211**	56.07±1.860**
15.625	45.85±2.118**	58.30±3.244**
7.8125	45.60±3.875**	56.07±2.774**
3.9062	31.25±1.474*	48.87±1.618**
Kontrol	25.93±1.602	39.90±1.188

\* : Kontrol grubu ile arasındaki fark p<0.05 düzeyinde önemlidir

\*\* : Kontrol grubu ile arasındaki fark p<0.01 düzeyinde önemlidir

Tablo 3’de görüldüğü gibi *A. densiflora* ekstresinin sağlıklı PBM hücreleri üzerine denenen tüm konsantrasyonlarda olumsuz etkisi olmuştur. Bu bulgular *A. densiflora* ekstresinin in vivo kullanım için ümit verici olmadığı görüşünü doğrulamıştır.

## 2.2. *Artemisia annua* Bitkisinden Elde Edilen Petrol Eteri Ekstresinin Sağlıklı PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular

Deneme konsantrasyonlarından elde edilen 24. ve 48. saat bulguları Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo-4. *Artemisia annua* petrol eteri ekstresinin sağlıklı PBM hücrelerine karşı etkinlik denemelerinden elde edilen ölü hücre oranları (n=9)

Ekstrenin Konsantrasyonu (µg/ml)	24.saat	48.saat
	Ortalama (%) ± Standart Hata	Ortalama (%) ± Standart Hata
125	33.08±2.324	53.33±4.950*
62.5	29.89±0.956	39.46±2.196
31.25	30.22±1.770	41.94±1.782
15.625	25.53±1.695	38.25±1.810
7.8125	25.37±1.863	38.01±1.609
3.9062	27.15±1.497	40.26±1.980
1,9531	25.47±1.661	34.88±2.526
Kontrol	28.08±2.460	36.84±1.501

\* : Kontrol grubu ile arasındaki fark  $p<0.05$  düzeyinde önemlidir

Tablo 4’de görüldüğü gibi 24. saat sonunda gözlenen ölü hücre oranları açısından kontrol grubu ile deneme grupları arasında istatistiki açıdan önemli olabilecek bir sonuç bulunmamıştır. Denemenin 48. saatinde ise yalnızca 125 µg/ml konsantrasyonla elde edilen sonuçlar istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Bu bulgu, *A. annua* petrol eteri ekstresinin 125 µg/ml’den daha düşük konsantrasyonlarda denenmesi gerektiğini, daha yüksek konsantrasyonlarının sağlıklı hücrelere zarar verebileceğini ortaya koymuştur.



### 2.3. *Artemisia annua* Bitkisinden Elde Edilen Metanol Ekstresinin Sağlıklı PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular

Deneme konsantrasyonlarından elde edilen bulgular Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo-5. *Artemisia annua* metanol ekstresinin sağlıklı PBM hücrelerine karşı etkinlik denemelerinden elde edilen ölü hücre oranları (n=9)

Ekstrenin Konsantrasyonu ( $\mu\text{g/ml}$ )	24.saat	48.saat
	Ortalama (%) $\pm$ Standart Hata	Ortalama (%) $\pm$ Standart Hata
125	26.85 $\pm$ 1.722	39.920 $\pm$ 3.2270
62.5	26.53 $\pm$ 1.929	35.940 $\pm$ 1.6812
31.25	27.37 $\pm$ 1.500	36.040 $\pm$ 1.7583
15.625	22.42 $\pm$ 2.366	34.420 $\pm$ 1.9369
7.8125	24.13 $\pm$ 0.701	35.800 $\pm$ 2.3380
3.9062	23.55 $\pm$ 2.162	34.640 $\pm$ 1.7195
1,9531	22.27 $\pm$ 0.992	33.900 $\pm$ 2.5063
Kontrol	26.43 $\pm$ 0.599	35.560 $\pm$ 1.8405

Tablo 5’de görüldüğü gibi denemenin 24 ve 48. saatlerinde gözlenen ölüm oranları açısından kontrol grupları ile ekstreye maruz bırakılan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı farkın bulunmadığı gözlenmiştir. Bu bulgu, *A. annua* metanol ekstresinin denenen konsantrasyonlarda sağlıklı PBM hücrelerine karşı olumsuz bir etkisinin olmadığını ortaya koymuştur.

## 2.DMSO'in In Vitro Ortamda Sağlıklı ve Enfekte PBM Hücrelerine Etkinlik Denemesi Bulguları

Deneme sonuçları Tablo 6'de gösterilmiştir.

Tablo-6. DMSO'in sağlıklı ve enfekte PBM hücrelerine karşı etkinlik denemelerinden elde edilen ölü hücre oranları (n=9)

DMSO Miktarı	Sağlıklı PBM Hücreleri		Theileria annulata Schizontu ile Enfekte PBM Hücreleri	
	24.saat	48.saat	24.saat	48.saat
	Ortalama (%) ± Standart Hata	Ortalama (%) ± Standart Hata	Ortalama (%) ± Standart Hata	Ortalama (%) ± Standart Hata
8 µl	26.578 ± 1.3365	32.633 ± 1.2204	14.544 ± 2.2044	6.911 ± 2.2378
Kontrol	26.933 ± 0.6726	31.683 ± 1.4425	11.889 ± 1.7220	5.189 ± 1.3958

Tablo 6'de görüldüğü gibi denemede bitki ekstralarının çözündürülmesinde kullanılan DMSO'in kullanıldığı miktarda sağlıklı ve enfekte PBM hücrelerine karşı istatistiki olarak anlamlı hiçbir olumsuz etkisi belirlenmemiştir.

## 4. Bitki Ekstrelerinin In vitro Ortamda *Theileria annulata* Schizontu ile Enfekte PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular

### 4.1. *Arnebia densiflora* Bitkisinden Elde Edilen n-hekzan Ekstresinin Enfekte PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular

*T. annulata* schizontu ile enfekte PBM hücrelerinden elde edilen sonuçlar Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo-7. *Arnebia densiflora* n-hekzan ekstresinin enfekte PBM hücrelerine karşı etkinlik denemelerinden elde edilen ölü hücre oranları (n=6)

Ekstrenin Konsantrasyonu (µg/ml)	24.saat	48.saat
	Ortalama (%) ± Standart Hata	Ortalama (%) ± Standart Hata
125	100 ± 0.0**	-
62.5	100 ± 0.0**	-
15.625	95.13±3.125**	100 ± 0.0**
7.8125	70.60±3.464*	91.48 ± 4.615**
3.9062	29.62±3.312*	74.57 ± 3.565*
Kontrol	6.85±1.422	12.92±2.145

\* : Kontrol grubu ile arasındaki fark p<0.05 düzeyinde önemlidir

\*\* : Kontrol grubu ile arasındaki fark p<0.001 düzeyinde önemlidir

Tablo 7’de görüldüğü gibi *A. densiflora* ekstresinin enfekte PBM hücreler üzerine denenen tüm konsantrasyonlarından 24 ve 48. saatlerde elde edilen sonuçlar kontrol grubundakilere kıyasla istatistiki olarak farklı bulunmuştur. Bu bulgu, *A. densiflora* ekstresinin denenen en küçük konsantrasyonda dahi enfekte PBM hücrelerine karşı etkili olduğunu ortaya koymuştur. 62.5 µg/ml ve üstü konsantrasyonlarda 24. saat sonunda tüm enfekte hücrelerin öldüğü, buna karşın kontrol grubundaki ölüm oranının çok düşük düzeylerde olduğu gözlenmiştir.

#### 4.2. *Artemisia annua* Bitkisinden Elde Edilen Petrol Eteri Ekstresinin Enfekte PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular

Deneme sonuçları Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo-8. *Artemisia annua* petrol eteri ekstresinin enfekte PBM hücrelerine karşı etkinlik denemelerinden elde edilen ölü hücre oranları (n=9)

Ekstrenin Konsantrasyonu (µg/ml)	24.saat Ortalama (%) ± Standart Hata	48.saat Ortalama (%) ± Standart Hata
125	100 ± 0.0**	-
62.5	91.59±4.581**	100 ± 0.0**
31.25	68.80±5.097**	74.25 ± 4.991**
15.625	30.31±4.703*	14.91±3.373
7.8125	14.68±2.010	10.06±2.047
3.9062	9.33±3.391	5.74±0.655
1.9531	9.92±1.643	8.17±1.586
Kontrol	9.16±2.702	9.04±1.969

\*: Kontrol grubu ile arasındaki fark p<0.01 düzeyinde önemlidir

\*\* : Kontrol grubu ile arasındaki fark p<0.001 düzeyinde önemlidir

Tablo 8’de görüldüğü gibi *A. annua* petrol eteri ekstresinin 24. saatte 125 µg/ml, 62.5 µg/ml, 31.25 µg/ml ve 15.625 µg/ml konsantrasyonları ile 48. saatte 62.5 µg/ml ve 31.25 µg/ml konsantrasyonlarından elde edilen sonuçlar kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak anlamlı düzeyde farklı bulunmuştur. Denemenin 24 ve 48. saatlerinde diğer konsantrasyonlar ile kontrol grubu arasında istatistiki açıdan anlamlı fark bulunmadığı gözlenmiştir. Bu bulgu, *A. annua* petrol eteri ekstresinin 62.5 µg/ml ve üstü konsantrasyonlarda 48. saat itibarı ile tüm enfekte PBM hücrelerini öldürdüğünü, buna karşın kontrol grubundaki ölüm oranının düşük düzeylerde olduğunu göstermiştir.

### 4.3. *Artemisia annua* Bitkisinden Elde Edilen Metanol Ekstresinin Enfekte PBM Hücrelerine Karşı Etkinlik Denemelerinden Elde Edilen Bulgular

*T. annulata* schizontu ile enfekte PBM hücrelerinden elde edilen sonuçlar Tablo 9’da gösterilmiştir.

Tablo-9. *Artemisia annua* metanol ekstresinin enfekte PBM hücrelerine karşı etkinlik denemelerinden elde edilen ölü hücre oranları (n=9)

Ekstrenin Konsantrasyonu (µg/ml)	24.saat	48.saat
	Ortalama (%) ± Standart Hata	Ortalama (%) ± Standart Hata
125	30.73 ± 3.375**	23.171 ± 5.1385*
62.5	20.79 ± 1.596*	13.143 ± 2.5523
31.25	17.26 ± 1.596	8.286 ± 1.4410
15.625	12.50 ± 1.177	5.843 ± 2.3380
7.8125	15.53 ± 0.992	5.100 ± 1.3645
3.9062	12.26 ± 0.817	7.014 ± 1.1831
1.9531	15.59 ± 1.607	6.943 ± 1.3282
Kontrol	12.26 ± 2.558	6.371 ± 2.6892

\* : Kontrol grubu ile arasındaki fark  $p < 0.05$  düzeyinde önemlidir

\*\* : Kontrol grubu ile arasındaki fark  $p < 0.001$  düzeyinde önemlidir

Tablo 9’da görüldüğü gibi denemenin 24. saatinde 125 µg/ml ve 62.5 µg/ml konsantrasyonlarda, 48. saatinde yalnızca 125 µg/ml konsantrasyonda elde edilen sonuçlar istatistiki olarak kontrol grubundan farklı bulunmuştur. Denemenin 24 ve 48. saatleri sonunda diğer deneme grupları ile kontrol grubu arasında istatistiki açıdan önemli olabilecek bir sonuç bulunmamıştır. Bu bulgu, *A. annua* metanol ekstresinin 62.5 µg/ml ‘den daha düşük konsantrasyonlarda enfekte PBM hücrelerine karşı etkisiz olduğunu ortaya koymuştur.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Fitoterapi beşeri ve veteriner hekimlikte geniş bir kullanım alanına sahiptir. Günümüzde bitkilerden hazırlanan çeşitli ekstratlarla yapılan tedavi denemelerine karşı yoğun ilgi mevcuttur. Hemen hergün bir bitkiden elde edilen bir molekülün bir soruna karşı etkili olduğuna dair bilgiler yayınlanmaktadır. Naftakinonlar ve artemisinin veteriner ve beşeri hekimlikte kan parazitlerine karşı kullanılmakta olan moleküllerdir. Ancak bu moleküllerin orijinal yeri olan bitki ekstratları ile bir bütün olarak etkinlikleri konusunda bilgiler sınırlıdır. *A. densiflora* naftakinonlar açısından zengindir. Bu bitki ekstratının theileriosis üzerine etkinliği hususunda dünyada yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Aynı şekilde, artemisinin beşeri hekimlikte Plasmodium enfeksiyonlarına karşı kullanılan bir moleküldür. *A. annua*, artemisinin içeriği açısından zengin bir bitkidir. Bu bitki ekstratının theileriosis üzerine etkinliği hususunda dünyada yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Söz konusu alanda dünyada yapılmış ilk çalışma olması nedeni ile bu araştırma bulguları önemlidir.

Çalışmanın in vitro şartlarda yapılması in vivo çalışmaların nasıl yönlendirileceği ve planlanacağı hususlarına yardımcı olması açısından da ayrıca önemlidir. Çalışma bulgularının benzer başka çalışmalar olmaması nedeni ile kıyaslayarak tartışılması mümkün olmamıştır. Bu nedenle, çalışmanın kendi içerisinde incelenerek sonuçlarının savunulması ya da sonuçların ümit verici olmadığı yolunda kararlar alınması yoluna gidilmiştir.

Eskişehir yöresinden toplanan *A. densiflora* bitkisinin köklerinden hazırlanan n-hekzan ekstresi naftakinonlar açısından zengin olması (1) nedeni ile tercih edilmiştir. Çalışma sonucunda ekstrenin hem sağlıklı hem de enfekte hücreler üzerinde olumsuz etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgu denenen konsantrasyonlarda ekstrenin in vivo denemeler için uygun olmadığına işaret etmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda deneme yapılmayışının sebebi olarak, en düşük konsantrasyondaki etki düzeyinin istatistiki olarak farklı olmasına rağmen kontrol gruplarındaki ortalama ölüm oranlarına yakın olması gösterilebilir. Daha düşük konsantrasyonların enfekte hücreler üzerindeki olası etkinliği devam etse bile sağlıklı hücreler üzerindeki olumsuz etkisinin devam edebileceği (Tablo 3) düşünülmüştür.

*A. annua*'nın metanol ekstresinden alınan sonuçlar sağlıklı hücreler açısından zararsızdır. Bu ekstrenin enfekte hücreler üzerindeki etkinliği düşük düzeylerde olsa bile 125 µg/ml konsantrasyonda gözlenebilmiştir. Güçlü bir etkinlikten söz edebilmek için daha yüksek konsantrasyonların denenmesi gereği açıktır. Bu denemelerin sağlıklı PBM

hücreleri üzerinde de yapılması zorunludur. Bu bulgular gerçekte ekstrenin içerdiği artemisinin oranı ile uyumludur. Bitkiden hazırlanan 100 g drogdan 5.56 g ekstre elde edilmiş ve ekstredeki artemisinin oranı  $1.14 \pm 0.07$  mg/100 g olarak bulunmuştur. Sonuç olarak denenen konsantrasyonlarda artemisinin oranı çok düşük düzeylerde kalmış, yeterli düzeyde etkiyi gösterememiştir. Bu hususun aydınlatılabilmesi açısından bu ekstrenin daha yoğun konsantrasyonlarda denenmesi gerektiği düşünülmüştür.

*A. annua*'nın petrol eteri ekstresinden alınan sonuçlar yüz güldürücü niteliktedir. Bitkiden hazırlanan 100 g drogdan 2.28 g ekstre elde edilmiştir. Bu ekstrenin denenen konsantrasyonlarda sağlıklı PBM hücreleri üzerine önemli sayılabilecek düzeyde olumsuz bir etkisi olmamıştır. Denemenin 24. saatinde sağlıklı hücrelerde hiçbir olumsuz etki gözlenmemiş, buna karşın enfekte hücrelerin 15.625 µg/ml konsantrasyondan itibaren kontrollere kıyasla önemli düzeyde öldükleri belirlenmiştir ( $p < 0.01$ ). 125 µg/ml konsantrasyonda sağlıklı hücreler üzerinde hiçbir olumsuz etki yok iken, enfekte hücrelerin tamamının öldüğü tesbit edilmiştir. Bu bulgu arzulanan en iyi sonuçtur. Çalışmanın 48. saatinde, 62.5 µg/ml konsantrasyona maruz bırakılan enfekte hücrelerin yine tamamının öldüğü, sağlıklı hücrelerin ise önemli düzeyde zarar görmedikleri saptanmıştır ( $p < 0.001$ ). 125 µg/ml konsantrasyonda ise 48. saat itibarı ile sağlıklı hücrelerde de kısmi bir kaybın olduğu belirlenmiştir. Bu bulgulara dayanarak in vivo denemelerin 15.625-62.5 µg/ml konsantrasyonlarda yapılması gerektiği kanısına varılmıştır. Ancak, bu düz mantığın in vivo denemelerin birçok aşamasında değişikliğe uğrayabileceği gerçeği açıktır. Varılan sonuç sadece denemelerin başlangıç noktasına işaret etmesi açısından önemlidir.

Çalışma sırasında ekstrelerin çözdürülmesinde kullanılan DMSO'nun kullanıldığı konsantrasyonda (8 µl/0.5 ml medium) sağlıklı ya da enfekte PBM hücreleri üzerine olumsuz etkisi olmadığı belirlenmiştir. Çalışmanın iş yükünü ve maliyetini azaltmak açısından denemeler sırasında kontrol grubu hücrelerinin kültürü yapılmış ve tüm sonuçlar bu hücrelerden elde edilen bulgular ile karşılaştırılmıştır.

Sonuç olarak *A. densiflora* köklerinden hazırlanan 100 g drogdan 4.12 g ekstre elde edildiği, bu ekstrenin 3.9062 µg/ml ve üstü konsantrasyonlarda hem sağlıklı hem de *T. annulata* schizontu ile enfekte PBM hücrelerini kontrollere kıyasla istatistiki açıdan ( $p < 0.05$ ) önemli düzeylerde öldürdüğü gözlenmiştir. *A. annua* bitkisinin 100 g drogdan 5.56 g metanol ekstresi elde edilmiş, bu ekstrenin Gas Chromatographic analizinde 1.14 mg/100 g artemisinin içerdiği belirlenmiştir. Denenen konsantrasyonlarda sağlıklı veya enfekte PBM hücreleri üzerinde önemsenecek düzeyde etkinlik saptanmamıştır. *A. annua* bitkisinin 100 g drogdan 2.28 g petrol eteri ekstresi elde edilmiş, bu ekstrede 4.54

mg/100 g artemisinin bulunduğu tesbit edilmiştir. *A. annua* petrol eteri ekstresinin 15.625-62.5 µg/ml konsantrasyonlarda sağlıklı hücresler üzerinde 48 saat süresince hiçbir olumsuz etkisinin bulunmadığı, *T. annulata* schizontu ile enfekte PBM hücrelerini ise % 100'e varan oranda elimine ettiği belirlenmiştir. Bu ekstrenin in vivo şartlar için ümit verici nitelikte olduğu kanısına varılmıştır.



## KAYNAKLAR

1. BOZAN B. *Arnebia densiflora* (Nordm.)Ledeb. bitkisinden elde edilen naftakinonların gıda, kozmetik ve ilaç endüstrisinde kullanılabilirliğinin araştırılması. Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 1994.
2. KÖŞGER HH. *Arnebia densiflora* (Nordm.)Ledeb. bitkisinden elde edilen ekstrenin yara iyileşmesi üzerine etkisinin deneysel olarak incelenmesi. Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2002.
3. LEVINE ND. Veterinary Protozoology. Iowa state University press, Ames, page 313, 1985.
4. MEHLHORN H. Parasitology in Focus: Facts and Trends. Springer-Verlag, page 41, 567, 1988.
5. WILLIAMSON S, TAIT A, BROWN D, WALKER A, BECK P, SHIELS B, FLETCHER J, HALL R. *Theileria annulata* sporozoite surface antigen expressed in *Escherichia coli* elicits neutralizing antibody. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 86: 4639-4643, 1989.
6. SINGH S, KHATRI N, MANUJA A, SHARMA RD, MALHOTRA DV, NICHANI AK. Impact of field vaccination with a *Theileria annulata* schizont cell culture vaccine on the epidemiology of tropical theileriosis. Veterinary Parasitology, 101:91-100, 2001.
7. VATANSEVER Z, NALBANTOĞLU S. Sahada *Theileria annulata* ile Enfekte Sığırların Nested PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), IFA (İndirekt Floresan Antikor) Testi ve Kan Frotisi Bakışı ile Saptanması. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 26:1465-1469, 2002.
8. MİMİOĞLU M. Theileriosis'in tarihçesi. Editör: SAYIN F. Theileriosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, sayfa 1-4, 1985.
9. ALTAY K, AKTAŞ M. Sığır Theileriosisi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 18 (2): 79-86, 2004.
10. GUBBELS MJ, HONG Y, WEİDE M, QI B, NIJMAN I, GUANGYUAN L, JONGEJAN F. Molecular characterisation of the *Theileria buffeli/orientalis* group. International Journal for Parasitology, 30: 943-952, 2000.
11. SHAW MK. The same but different: the biology of *Theileria* sporozoite entry into bovine cells. International Journal for Parasitology, 27: 457-474, 1997.
12. SHAW MK. Cell invasion by *Theileria* sporozoites. Trends in Parasitology, 19 (1): 2-6, 2003.

13. İNCİ A, ÇAKMAK A, ÇAM Y, KARAER Z, ATASEVER A, İÇA A. Kayseri yöresinde tropikal theileriosise bağlı ekonomik kayıplar. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 26: 156-160, 2002.
14. D'OLIVEIRA C, FEENSTRA A, VOS H, OSTERHAUS ADME, SHIELS BR, CORNELISSEN AWCA, JONGEJAN F. Induction of protective immunity to *Theileria annulata* using two major merozoite surface antigens presented by different delivery systems. Vaccine, 15 (16): 1796-1804, 1997.
15. KARAGENÇ T, EREN H. Tropikal theileriosise aşılama. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 26 (3): 266-270, 2002.
16. GHOSH S, AZHAHIANAMBI P, FUENTE J. Control of ticks of ruminants, with special emphasis on livestock farming systems in India: present and future possibilities for integrated control. Experimental Applied Acarology, 40: 49-66, 2006.
17. NALBANTOĞLU S. Çukurova yöresinde Tropikal Theileriosise karşı aşılanan sığırlar üzerinde saha çalışmaları. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 1996.
18. KARATEPE B. Niğde yöresinde Tropikal Theileriosis'in aşılama sonrası epidemiyolojisi. Türkiye Parazitoloji Dergisi, 25 (3): 265-272, 2001.
19. ÖZ İ. Adana yöresinde Tropikal Theileriosise karşı aşılanan sığırlar üzerinde saha çalışmaları. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 1999.
20. VISERAS J, GARCIA-FERNANDEZ P, ADROHER FJ. Field trial of immunization with an experimental vaccine against Mediterranean theileriosis in Spain. Veterinary Research, 28: 397-403, 1997.
21. SHIRONG S. Application and effect of the schizont vaccine against *Theileria annulata* in China. Tropical Animal Health Production, 29: 101-103, 1997.
22. ZHANG ZH. *Theileria annulata* and its control in China. Proceedingd of the second EEC workshop of orientation and coordination of research on tropical tehileriosis. National Dairy Development Board, Anand, India, page 11-14, 1991.
23. ZABLOTSKY VT. Specific prevention of bovine theileriosis in Soviet Union. Proceedingd of the second EEC workshop of orientation and coordination of research on tropical tehileriosis. National Dairy Development Board, Anand, India, page 9-10, 1991.
24. HASHEMI-FESHARKI R. Chemotherapeutic value of parvaquone and buparvaquone against *Theileria annulata* infection of cattle. Research Veterinary Sciences, 50 (2): 204-207, 1991.

25. ONAR E. Türkiye’de tropikal theileriosis’e (*Theileria annulata*) karşı aşı hazırlama ve uygulama çalışmaları. Uluslararası Mycoplasmosis ve Theileriosis Sempozyumu, Pendik, yayın no: 10, sayfa 47-52, 1989.
26. ÖZKOÇ Ü, PIPANO E. Trials with cell culture vaccine against theileriosis in Turkey. In “Advances in the control of Theileriosis”. Editörler: IRVIN, A, CUNNINGHAM MP, YOUNG AS. Netherlands, page 256, 1981.
27. GHARBI M, SASSI L, DORCHIES P, DARGOUTH MA. Infection of calves with *Theileria annulata* in Tunisia: Economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination. *Veterinary Parasitology*, 137 (3-4): 231-241, 2006.
28. YAMAN N. Ankara Çubuk yöresinde Tropikal Theileriosise karşı aşılanan sığırlarda aşılama sonrası seroepidemiolojik çalışmalar. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 1998.
29. GÜLER S. Theileriosisde tedavi. Editör: SAYIN F. Theileriosis. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayınları, sayfa 165-171, 1985.
30. GÜL Y, AKSOY G, ÖZDEMİR H. Elazığ ve çevresinde *Theileria annulata* ile enfekte sığırların buparvaquone (Butalex)'la tedavisi üzerine araştırmalar, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2 (1-2): 97-116, 1991.
31. WILKIE GM, BROWN CGD, KIRVAR E, THOMAS M, WILLIAMSON SM, BELL-SAKYI LJ, SPARAGANO O. Chemoprophylaxis of *Theileria annulata* and *Theileria parva* infections of calves with buparvaquone. *Veterinary Parasitology*, 78: 1- 12, 1998.
32. MURAGURI GR, KIARA HK, MCHARDY N. Treatment of East Coast fever: a comparison of parvaquone and buparvaquone. *Veterinary Parasitology*, 87: 25–37, 1999.
33. MBWAMBO HA, SUDI FF, MKONYI PA, MFINANGA JM, MELLA ES, NGOVI CJ. Comparative studies of the efficacy of parvaquone and parvaquone-plus-frusemide in the treatment of *Theileria parva* infection (East Coast fever) in cattle. *Veterinary Parasitology* 108: 195–205, 2002.
34. MBWAMBO HA, MAGWISHA HB, MFINANGA JM. Evaluation of buparvaquone (BUTA-KeITM KELA, Belgium) as a treatment of East Coast fever in cattle, in the peri-urban of Dar Es Salaam city, Tanzania. *Veterinary Parasitology* 139: 67–73, 2006.
35. MIRZAEI M. Treatment of natural tropical theileriosis with the extract of the plant *Peganum harmala*. *Korean Journal of Parasitology*, 45 (4): 267-271, 2007.
36. DAVIS PH. Flora of Turkey and the East Aegean Islans. Volume 5, Edinburgh University Press, 1975.

37. BAYTOP A. Farmasötik botanik. İstanbul Üniversitesi Yayınları, No: 3637, İstanbul, 1991.
38. PAPAGEORGIU VP, MELLIDIS AS, SAGREDOS AN. Study on the antibiotic fraction of *Alkanna tinctoria* Tausch. *Chimica Cronica*, 9: 57-63, 1980.
39. BOZAN B. *Arnebia densiflora*'dan naftakinonların izolasyonu ve yapı tayini. Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 1990.
40. GÜN H. *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. ekstresinin kromozom, lökosit, idrar kompozisyonu ve bazı serum enzimlerine etkisi. Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 1994.
41. BOZAN B, BASER KHC, KARA S. Quantitative determination of naphthoquinones of *Arnebia densiflora* by TLC- densitometry. *Fitoterapia*, 70 (4): 402-406, 1999.
42. BOZAN B, BASER KHC, KARA S. Quantitative determination of naphthoquinones of *Arnebia densiflora* (Nordm.) Ledeb. an improved high performance liquid chromatographic method. *Journal Chromatography A*, 782 (1): 133-136, 1997.
43. HAGIMOTO H. The herbicidal activity of 2-amino-3-chloro-1,4-naphthoquinone III. penetration and translocation. *Weed Research*, 10 (1): 11-17, 1970.
44. JOCKERS-SCHERUBL MC, SCHIRMER RH, KRAUTH-SIEGEL RL. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*: Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. *European Journal of Biochemistry*, 180: 267-272, 1989.
45. DOBBELEARE DAE, FERNANDEZ PC, HEUSSLER VT. *Theileria parva*: taking control of host cell proliferation and survival mechanisms. *Cellular Microbiology*, 2 (2): 91-99, 2000.
46. SRIVASTAVA IK, MORRISEY JM, DARROUZET E, DALDAL F, VAIDYA AB. Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome b in malaria parasites. *Molecular Microbiology*, 33 (4): 704-711, 1999.
47. WASSEL G, EL-MENSHAWI B, SAEED A, MAHRAN G. Toxic pyrrolizidine alkaloids of certain boraginaceous plants. *Acta Pharmaceutica Suecica*, 24: 199-204, 1987.
48. KARAOĞLAN V. Hatay yöresinde yetişen aromatik ve şifalı bitkilerin terapötik ve kozmetik amaçlı hazırlanacak formülasyonlarda kullanılması. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2003.
49. BAYKAN Ş. Batı Anadolu'da yayılış gösteren doğal *Artemisia* L. Taksonlarının uçucu yağları ve biyoaktivite potansiyelleri. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2005.

50. WOODROW CJ, HAYNES RK, KRISHNA S. Artemisinins. *Postgraduate Medical Journal*, 81: 71-78, 2005.
51. MISHINA YV, KRISHNA S, HAYNES RK, MEADE JC. Artemisinins Inhibit *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* In Vitro Growth. *Antimicrobial Agents and Chemoteraphy*, 51 (5): 1852–1854, 2007.
52. CHRISTEN P, VEUTHEY L. New trends in extraction, identification and quantification of artemisinin and its derivatives. *Current Medicinal Chemistry*, 8: 1827-1839, 2001.
53. BARALDI R, ISACCHI B, PREDIERI S, MARCONI G, VINCIERI FF, BILIA AR. Distribution of artemisinin and bioactive flavonoids from *Artemisia annua* L. during plant growth. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 340-348, 2008.
54. WOERDENBAG HJ, PRAS N, BOS R, VISSER JF, HENDRIKS H, MALLINGRE TM. Analysis of artemisinin and related sesquiterpenoids from *Artemisia annua* L. by combined gas chromatography/mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 2: 215-219, 1991.
55. WOERDENBAG HJ, MOSKAL TA, PRAS N, MALLINGRE TM. Cytotoxicity of artemisinin related endoperoxides to Erlich ascites tumor cells. *Journal of Natural Products*, 56: 849-856, 1993.
56. MISRA LN, AHMAD A, THAKUR RS, LOTTER H, WAGNER H. Crystal structure of artemisinic acid: a possible biogenetic precursor of antimalarial artemisinin from *Artemisia annua*. *Journal of Natural Products*, 56 (2): 215-219, 1993.
57. HAYNES RK, FUGMANN B, STETTER J, RIECKMANN K, HEILMANN HD, CHAN HW, et al. Artemisine a highly active antimalarial drug of the artemisinin class. *Angewandte Chemie International Edition*, 45: 2082–2088, 2006.
58. KIM JT, PARK JY, SEO HS, OH HG, NOH JW, KIM JH et al. In vitro antiprotozoal effects of artemisinin on *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 103: 53-63, 2002.
59. TEOH KH, WEATHERS PJ, CHEETHAM RD, WALCERZ DB. Cryopreservation of transformed (hairy) roots of *Artemisia annua*. *Cryobiology*, 33 (1): 106-117, 1996.
60. PENG CA, FERREIRA JFS, WOOD AJ. Direct analysis of artemisinin from *Artemisia annua* L. using high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector, and gas chromatography with flame ionization detector. *Journal of Chromatography A*, 1133: 254-258, 2006.
61. BROWN CGD. Theileriidae. In: *In vitro methods of parasite cultivation*. Editörler: TAYLOR ER, BAKER JR. Academic Pres, London, page: 230-251, 1987.

62. BARKER K. At the bench a laboratory navigator. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, page 225-228, 2004.

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarımın çeşitli aşamalarında bana destek olan, aşağıda isimleri yazılı kişilere teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez konusu üzerinde çalışmamı bana öneren, çalışmalarım süresince beni destekleyen danışmanım Prof. Dr. Şevki Ziya COŞKUN'a,

Laboratuvar imkanlarından yararlanmama izin veren Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanı ve Parazitoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hasan EREN'e, hücre kültürü denemelerimde yardım, öneri, destek ve materyal sağlayan Doç. Dr. Tülin KARAGENÇ'e, laboratuvar çalışmalarım sırasında bana çok yardımcı olan aynı fakülte'deki araştırma görevlileri Serkan BAKIRCI ve Hakkı ÜNLÜ'ye, doktora öğrencileri Hüseyin Bilgin BİLGİÇ, Murat HOŞGÖR, Gülcan KIRLI ve Miray TONK'a,

Çalışmadaki bitkilerin toplanması ve ekstraların elde edilmesi aşamalarında bana yardımcı olan Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. K.Hüsnü Can BAŞER, Prof. Dr. Neş'e KIRIMER ve Doç. Dr. Müberra KOŞAR'a, Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hulusi MALYER'e,

Çalışma arkadaşlarıma, çalışmalarım süresince bana her zaman için destek olan eşim Arş. Gör. Dr. Ahmet Onur GİRİŞGİN'e ve ailelerime çok teşekkür ederim.

## ÖZGEÇMİŞ

10 Nisan 1978'de Bursa'da doğmuşum. İlkokulu Uşak'ın Banaz ilçesi ve Trabzon'un Akçaabat ilçesinde, ortaokulu Kütahya'nın Tavşanlı ilçesinde, liseyi Bursa'da okudum. 1995 yılında üniversite sınavında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazanarak öğrenimime başladım. Bu fakültede lisans eğitimimi 2001 yılında tamamlayarak, 2002 yılında Parazitoloji Anabilim Dalında doktora eğitimime başladım.

Evliyim ve İngilizce bilmekteyim.