

# KEKİK (*Thymus vulgaris*), KİMYON (*CUMINUM CYMINUM*) VE MERSİN (*MYRTUS COMMUNIS*) BİTKİLERİNDEN ELDE EDİLEN YAĞLARIN *İN VİTRO* ANTİLEİSHMANIAL ETKİLERİ

## *In vitro* Antileishmanial Activity of Essential Oils Obtained from Thyme (*Thymus vulgaris*), Cummin (*Cuminum cyminum*) and Mersin (*Myrtus communis*) Plants

Erdoğan MALATYALI<sup>1</sup>, Semra ÖZÇELİK<sup>1</sup>, Nevcihan GÜRİSOY<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Cumhuriyet Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Parazitoloji BD,  
SİVAS  
<sup>2</sup>Cumhuriyet Üniversitesi  
Mühendislik Fakültesi  
Gıda Mühendisliği.

Geliş Tarihi: 09.10.2008  
Kabul Tarihi: 15.04.2009

İletişim:  
Erdoğan MALATYALI  
Cumhuriyet Üniversitesi  
Tıp Fak. Parazitoloji BD.  
58140 SİVAS  
e-posta :  
emalatyalı@cumhuriyet.edu.tr

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada yurdumuzda çeşitli hastalıkların geleneksel tedavisinde kullanılan kekik (*Thymus vulgaris*), kimyon (*Cuminum cyminum*) ve mersin (*Myrtus communis*) bitkilerinden elde edilen yağların *Leishmania* promastigotlarının canlılığı üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Bitkilerden elde edilen yağlar 2/10 ile 1/100 arasında değişen oranlarda seyreltilerek çalışmaya alınmıştır.  $2 \cdot 10^7$  promastigot/ml *Leishmania* solüsyonundan alınan 100' er µl mikrotitrasyon plaklarına dağıtılmış ve üzerlerine farklı oranlarda RPMI ile seyreltilen bitkisel yağlardan 100' er µl konularak 20 dakika beklenmiştir. Işık mikroskobu altında Thoma lamında hareketli ve hareketsiz promastigotlar sayılarak canlılık yüzdeleri hesaplanmıştır.

**Bulgular:** Araştırılan bitkisel yağlardan kekik yağı en yüksek antileishmanial etkiyi gösterirken ( $LD_{50} = 1/1200$  ml/ml),  $LD_{50}$  değeri mersin yağı için 1/1800 ml/ml ve kimyon yağı için 1/3000 ml/ml olarak tespit edilmiştir.

**Sonuç:** Leishmaniasis ülkemizde görülen önemli paraziter hastalıklardan biridir. Leishmaniasisin tedavisinde yaşanan zorluklar nedeniyle alternatif ilaç arayışları gündemdedir. İleri çalışmalara gereksinim duyulmakla birlikte, bu çalışmada denenen bitkisel yağlardan özellikle kekik yağının leishmaniasis tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** *Leishmania* spp., leishmaniasis tedavisi, kekik (*Thymus vulgaris*), kimyon (*Cuminum cyminum*), mersin (*Myrtus communi*)

### ABSTRACT

**Objective:** In this study, it is aimed to determine the *in vitro* antileishmanial activity of essential oils obtained from three different plants such as Thyme (*Thymus vulgaris*), Cummin (*Cuminum cyminum*) and Mersin (*Myrtus communis*) that widely used in traditional medicine in our country.

**Method:** Essential oils from these plants were diluted ranging from 2/10 to 1/100. 100 µl of *Leishmania* promastigote solution ( $2 \cdot 10^7$  promastigot/ml) dispensed in microtitration plate wells and 100µl plant essential oil (diluted in RPMI with different ratios) was added onto, afterwards waited for 20 minutes. The motile and non-motile promastigotes were counted on Thoma slide under light microscope and percentage of cell viability was assessed.

**Results:** The highest *in vitro* antileishmanial activity against promastigote forms of the parasite was obtained with Thyme oil ( $LD_{50} = 1/1200$  ml/ml).  $LD_{50}$  doses of Cumin oil and Mersin oil were  $1/1800$  ml/ml and  $1/3000$  ml/ml, respectively.

**Conclusion:** Because of the difficulties of the treatment of leishmaniasis which is one of the most important parasitic diseases in Turkey, new drug researches are concerned, recently. In this study, we observed that particularly Thyme oil can be used for the treatment of Leishmaniasis, after further researches are performed.

**Key Words:** Leishmania spp., therapy of leishmaniasis, thyme (*Thymus vulgaris*), cummin (*Cuminum cyminum*), mersin (*Myrtus communis*)

## GİRİŞ

*Leishmania* türleri; kutanöz, visseral ve mukokütanöz leishmaniasis olmak üzere üç grup hastalığın etkenidir. *Leishmania* cinsine ait türlere, *Phlebotomus* ve *Lutzomyia* cinslerine ait sinekler vektörlük ederler. Parazit omurgalı vücudunda mononükleer fagositlerin içinde amastigot formunda vektörde ise promastigot formdadır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre leishmaniasis en önemli altı tropikal hastalıktan birisidir ve 88 farklı ülkeden 12 milyon insanı etkilemektedir (1). *Leishmania* türlerinden yurdumuzda görülenler kutanöz leishmaniasis etkeni *Leishmania tropica* ve *Leishmania major*, kala azar etkeni *Leishmania donovani* ve *Leishmania infantum*' dur. Bu türlerden *L. tropica*'nın neden olduğu kronik parazitoz deride; nodül, papül ve yara oluşumuyla karakterizedir (2). Yara genellikle yüzde oluşur ve bir yıl sonra kendiliğinden iyileşebilir. Akdeniz ülkelerinde, Orta Asya'da ve Uzak Doğu'da görülür. *L. major* ise 3-6 ay süren akut bir hastalığa neden olmaktadır. Oluşan yara "yaş tip" olarak adlandırılır ve genelde kol ve bacaklarda görülür. Güneydoğu Anadolu Bölgesi hastalığın endemik olduğu ülkelere coğrafi olarak benzerlik gösterdiğinden, bu bölgede önlemler alınmakla birlikte şark çıbanı olgularına sık rastlanmaktadır (3).

Beş değerli antimon bileşikleri (sodyum stibogluconat müstahzarı Pentostam ve Meglumin antimonat müstahzarı Glukantim) yaklaşık elli yıldır leishmaniasis tedavisinde en sık tercih edilen ilaçlar olmasına karşın halen etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (4). Ayrıca son zamanlarda sodyum antimon stibogluconat (SAG)'a karşı direnç gelişimi artmış; Hindistan'ın bazı bölgelerinde SAG'a karşı direncin epidemik hale gelmesi nedeniyle yeni ilaç arayışlarına başlanmıştır (5). Netto ve ark. glukantim ile tedavi ettikleri hastaları dört yıl boyunca takip etmişler ve kutanöz leishmaniasis hastalarında %10, mukokütanöz leishmaniasis hastalarında %3 nüks tespit etmişlerdir (6). Leishmaniasis tedavisinde göz önüne alınması gereken bir diğer konu da koinfeksiyondur, parazitin HIV virüsüyle birlikte bulunduğu hastalarda etkili bir tedavi henüz yoktur (7).

Klasik tedaviye rağmen yara iyileşmez ise amfoterisin-B gibi antifungal ilaçlar da kullanılabilir (2). Leishmaniasis tedavisinde kullanılan 5-değerli antimon bileşiklerinin yan etkileri olmakla birlikte uzun süre kullanılmaları gerekir. Geçen 80 yıllık süreçte 200.000 hastanın 5-değerli antimon bileşikleriyle tedavi edildiği tahmin edilmektedir. Bununla birlikte sadece iki hastada ilaç kullanımı sonrasında ölüm gerçekleşmiştir. Bu ölümlerin ilacın yan etkilerinden mi yoksa hastalığının seyrinden mi meydana geldiği bilinmemektedir (8). En sık görülen yan etkiler mide bulantısı, kusma, abdominal ağrı, diyare, öksürük, pnömöni, deri reaksiyonları (eritem, ürtiker vb), albuminuri, konvulsiyon, bradikardi, miyozit ve kas ağrısıdır (9). Yüksek dozda glukantim verilerek tedavi edilen visseral leishmaniasisli hastalarda yan etkilerin sık görüldüğü unutulmamalıdır. Bu ilaçlar ağız yoluyla alındıklarında aktif hale gelmemektedir ve paranteral uzun süreli tedavi gerekmektedir (10). İlaçlar ve hastaların immün sistemi arasındaki sinerji ilaç kombinasyonları ve immün sistem uyarıcıları kullanılarak araştırılmaktadır (11).

Aromatik ve eterli yağlar olarak da bilinen esansiyel yağlar konsantre hidrofobik sıvılardır ve bitkilerin uçucu aromatik bileşenlerini içerirler. Kozmetik, gıda ve temizlik gibi bir çok sektörde esansiyel yağların kullanımı yaygındır. Ayrıca, diğer bitki özütleri gibi doğal tedavi ürünleri olarak da asırlardır kullanılmaktadırlar. Birçok biyolojik aktif madde içeren bu yağlar ekstraksiyon yöntemleriyle bitkinin yapraklarından, kökünden, gövdesinden vb. elde edilirler. Bitkisel yağ eldesinde en kullanılabilir yöntem su buharı distilasyon yöntemidir ayrıca vakumlu distilasyon da uygulanmaktadır. Bitkisel yağlar monoterpen olan siklik hidrokarbonlar ve bunların alkol, aldehit ve ester türevlerini içerir. Antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiprotozoal ve antioksidan özellikleri içermeleri terpen ve terpen türevlerinden kaynaklanmaktadır (12). Esansiyel yağların kimyasal biyositlere alternatif olabileceği düşünülmektedir. Örneğin, *Cinnamomum osmophloeum*'dan elde edilen esansiyel yağ *Escheric-*

*hia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* (methisilin-dirençli *S. aureus*), *Salmonella sp.* ve *Vibrio parahemolyticus*'a karşı antibakteriyel özellik göstermiştir (13). Keklik otu olarak bilinen oregano yağı ve nane yağı *E. coli*'ye karşı etkili bulunmuştur (14). Esansiyel yağlar, oral bakterilere karşı da oldukça etkilidir ve antiseptik ağız temizleyicilerinde kullanılmaktadır (15).

Bu çalışmada yurdumuzda çeşitli hastalıkların geleneksel tedavisinde kullanılan kekik (*Thymus vulgaris*), kimyon (*Cuminum cyminum*) ve mersin (*Myrtus communis*) bitkilerinden elde edilen yağların promastigot canlılığı üzerine etkileri ve dolayısıyla tedavi amaçlı kullanılabilirliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Bitkisel yağların hazırlanması

Kekik, kimyon ve mersin bitkilerinden elde edilen 100 gr. öğütülmüş bitki yaprağı 250 ml aseton ile homojenize edilmiş, filtre edilen çözelti, kolondan geçirilerek süzütüden 5 ml alınmış ve türevlendirilmiştir. Bitkisel materyalden elde edilen yağ miktarı tayini Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) cihazı ile yapılmıştır. HPLC cihazına 10 µl örnek enjekte edilmiş doğru orantı ile 100 gr yapraktan elde edilen bitkisel yağ miktarı hesaplanmıştır.

Bitkisel yağlar, çözümlerindeki zorluk nedeniyle ilk olarak dimetilsülfoksit (DMSO) içinde 1/10 oranında çözülmüştür ve daha sonraki seyreltmeler ise RPMI besiyeri ile yapılmıştır.

### Parazit kültürü

Çalışmada kutanöz leishmaniasis hastasından izole edilen *L.tropica* promastigotları kullanılmıştır. Parazit, laboratuvarımızda tavşan kanından hazırlanan NNN ve RPMI 1640 (Sigma) besiyerlerinde 26 °C de çoğaltılmaktadır. Yeni besiyerine alındıktan sonraki beşinci günde parazitler santrifüj edilerek final konsantrasyonu 2.10<sup>7</sup> promastigot/ml'ye ayarlanmıştır. Buradan alınan 100'er µl parazit mikrotitrasyon plaklarının kuyucuklarına konulmuştur.

### Antipromastigot aktivite

Final konsantrasyonu 2.10<sup>7</sup> promastigot/ml'ye ayarlanan çözümlerden alınan 100 µl parazit, mikrotitrasyon plaklarının kuyucuklarına konulmuş ve üzerlerine RPMI'da seyreltmeleri yapılan bitkisel yağ çözeltilerinin (2/10-1/100) arasındaki seyreltilerinden 100 µl eklenmiş; 20 dakika sonra parazitlerin canlılık yüzdesi hemositometre lamında canlı ve hareketli formlar sayılarak belirlenmiştir. Çalışmada kontrol grubuna ise 100 µl RPMI'da seyreltilmiş %10'luk DMSO çözeltisi eklenmiştir. Promastigotların tamamının hareketsiz olmasına neden olan en düşük yağ konsantrasyonu, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC), parazitlerin yarısına yakın kısmının hareketsiz olduğu konsantrasyonlar LD<sub>50</sub> dozu olarak belirlenmiştir.

MIC konsantrasyonlarının belirlendiği kuyucuklardan alınan örnekler NNN besiyerine ekilerek iki-üç gün sonra promastigot varlığı araştırılmıştır. Bu sayede yağların geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak promastigotlar üzerine gösterdiği etki de test edilmiştir.

**Tablo 1.** Kekik, kimyon ve mersin bitkilerinden elde edilen yağların seyreltme oranlarına göre canlı promastigot sayıları ve canlılık yüzdeleri.

Seyreltme oranı	Kekik		Mersin		Kimyon	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
1/3000	22	49	50	100	58	100
1/2000	18	43	44	98	52	100
1/1800	26	40	33	89	47	84
1/1500	20	34	23	68	33	75
1/1200	7	18	19	50	25	64
1/900	-	0	10	24	20	59
1/450	-	0	8	12	31	49
1/300	-	0	-	0	11	23
1/150	-	0	-	0	8	18
1/100	-	0	-	0	-	0

## BULGULAR

Çalışmada üç farklı bitkiden elde edilen yağların *L. tropica* promastigotları üzerine 20 dakikalık sürede öldürücü etkisi test edilmiştir. Kekikten elde edilen yağ 1/1500 seyreltmede parazitlerin tamamını öldürürken (MIC), 1/3000 seyreltmede %50 ye yakın bir kısmını öldürmüştür (LD<sub>50</sub>). Ayrıca çalışmamızda mersin bitkisinden elde edilen yağın minimum inhibisyon konsantrasyonu 1/900, LD<sub>50</sub>= 1/1800 ve kimyon bitkisinden elde edilen yağın MIC= 1/450, LD<sub>50</sub>= 1/1200 olarak belirlenmiştir (Tablo 1, Şekil 1). Diğer yağların aksine, kekik yağının düşük dozlarda promastigotların hücrel yapılarını bozarak parçalanmasına neden olduğu belirlenmiştir.

MIC konsantrasyonlarının tespit edildiği kuyucuklardan örnek alıp NNN besiyerine ekimi yapılmış ve sonraki günlerde incelendiğinde hiç birinde hareketli promastigot gözlenmemiştir. Bitkisel yağlar geri dönüşümsüz olarak etki göstermektedir.

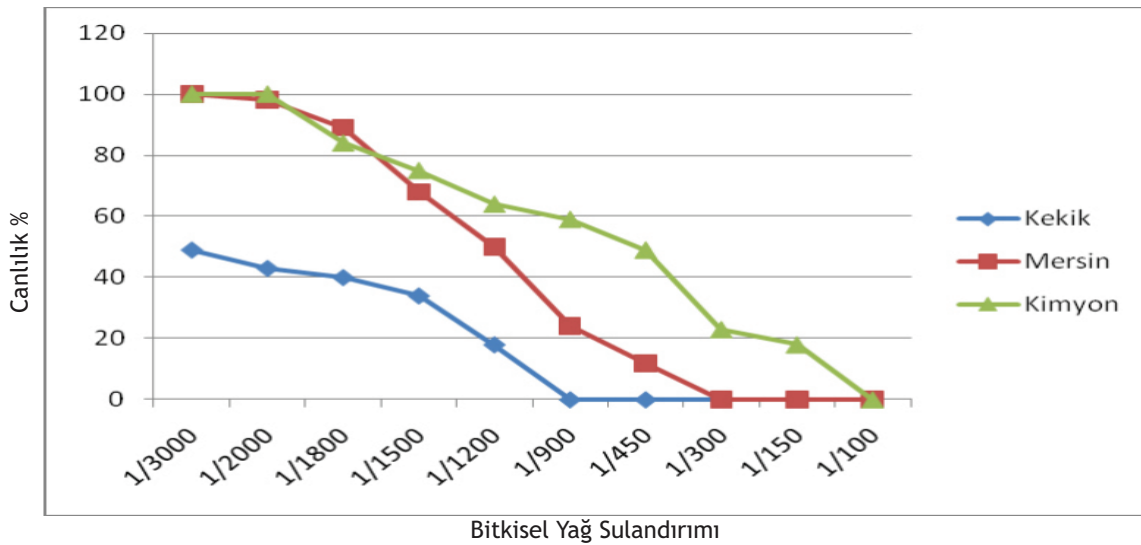
Tüm testlerde, yağları çözmekte kullanılan maksimum %10 konsantrasyondaki dimetil sulfoksit (DMSO) kontrol grubu olarak kullanılmış ve bu maddenin promastigotlar üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.

## TARTIŞMA

Ülkemizde leishmaniasisin visseral ve kutanöz olmak üzere iki tipine rastlanılmaktadır. Leishmaniasis tedavisinde kullanılan ilaçların yetersizliği, yan

etkileri ve parazite gelişen direnç yeni ilaçlara olan gereksinimi artırmıştır (16,17). Bu gereksinimler doğrultusunda alternatif ilaç geliştirme çalışmaları önem kazanmıştır (18). Birçok antibiyotik ve farmasötik ajan *Leishmania* türleri üzerine denenmektedir ancak toksik olmamaları ve kolay elde edilebilir olmaları nedeniyle bitkisel materyallere olan ilgi artmıştır (11,19). Ayrıca geleneksel tedavide kullanılan bitkiler, sitotoksik etkileri az olduğu için araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Brezilya’da bu bitkilerle yapılan çalışmada 19 bitkinin *L. amazonensis* ve *T. cruzi* nin çoğalmasını %99’a varan oranlarda inhibe ettiği bildirilmiştir (20).

Beş değerli antimonlar olarak adlandırılan sodyum stiboglukonat ve meglumin antimonyat (Glukantim) leishmaniasis tedavisinde yaklaşık 80 yıldır kullanılmaktadır. Bu bileşikler fosfofruktokinaz (PFK) aktivitesini baskılar ve bu yolla ATP üretimini engelleyerek aktivite gösterir. Üç-değerli antimon bileşiklerinin kullanımı renal ve kardiyak yan etkileri olduğu için 1920’li yıllarda yerini 5-değerli antimonlara bırakmıştır. Buna ek olarak 5-değerli antimonlar, serumda daha erken maksimum seviyeye ulaşır ve idrarla atılırlar (%95 5-değerli antimon ve %5 3-değerli antimon olarak). Bu ajanlar ilk olarak shistosomiasis tedavisinde kullanılmakla birlikte günümüzde intralezyonel ve kas içi enjeksiyon şeklindeki uygulamalarla leishmaniasis tedavisinde birinci tercih olmuşlardır (21, 22).



Şekil 1: Üç bitkisel yağın değişik sulandırım oranlarında *Leishmania* promastigotlarının canlılığı üzerine etkileri.

Bitki özütleri antiparaziter ilaç geliştirilmesi açısından önemli bir kaynaktır. Özçelik ve ark. sarımsak özütünün skolesidal özelliğini, Polat ve ark., aynı bitkinin amibisidal özelliğini araştırmışlardır (23,24). Bitki ekstraktlarının antibiyotik etkileri çoğunlukla içerdikleri uçucu yağlardan kaynaklanmaktadır (25). Bu nedenle bitkilerden izole edilen özütler arasında uçucu yağların antileishmanial etki gösterecekleri öngörülmüştür. Çalışmamızda araştırılan üç bitkisel yağ belirli konsantrasyonların üzerinde *Leishmania* promastigotlarını etkilemektedir. Zaman isteyen bir süreç olmasına karşın, *Leishmania* promastigotlarının maddelere duyarlılığının araştırılmasında mikroskopik sayım altın standarttır ve rutin olarak antileishmanial etkilerin araştırılmasında verimli bir şekilde kullanılabilir (19,26). Ancak ortam sıcaklığı promastigotların hareketliliğini etkilemektedir. Çalışılan bitkisel yağlar arasında promastigot formuna karşı en düşük dozda etki gösteren ve dolayısıyla en etkin olan kekik yağıdır. Kekik yağı uzun yıllardır birçok hastalığın tedavisinde kullanılmakta ve temel bileşenleri olan kalvakrol ve timolün antibakteriyel ve antifungal özellik gösterdiği bilinmektedir (27,28). Leishmaniasis tedavisinde antifungal amfoterisin B de kullanılabilir (2). Bu nedenle antifungal özellik gösteren kekik yağının antipromastigot etki göstereceği de öngörülebilir. Timol, kekik yağı içeriğinin %80,4'ünü oluşturmaktadır. Ayrıca kekik yağının bir diğer bileşeni olan p-simen (p-cymene) antileishmanial etki göstermektedir (29). Fakat kekik yağının 86 bileşik içerdiği ve antibiyotik etkisini diğer maddelerin yardımıyla gerçekleştirdiği göz önüne alınmalıdır (30). Kekik yağının antifungal özelliği kimyon yağından daha yüksektir (31). Çalışmamızda da bu sonuca benzer şekilde kekik yağının kimyon yağına göre promastigotlara karşı daha etkili olduğu bulunmuştur. Kimyon yağının temel bileşeni olan eugenolün antiseptik özelliği de vardır. Kimyona benzer bir bitkiden izole edilen eugenolün antileishmanial ve antihelmintik özelliği bulunmaktadır (16, 32). Mersin yağı diğer iki bitkiden farklı olarak linalol içerir. Linalolce zengin bir bitkiden elde edilen özütün

antileishmanial etki göstermesi mersin bitkisinin antileishmanial özelliğinin linalolden kaynaklanabileceği fikrini uyandırmaktadır (33).

Leishmaniasis tedavisinde deneysel amaçlı birçok bitkisel materyal kullanılmıştır. Brezilya'dan bir grup araştırmacı geleneksel olarak bölgelerinde tedavi amaçlı kullanılan propolisin LD<sub>50</sub> dozunu promastigotlar için 18.13 µg/mL olarak belirlemiştir (11). Ataş ve ark., Sivas yöresine endemik bitkilere ait özütlerin de kullanıldığı çalışmada 30 farklı bitki özütünü Glukantim ile karşılaştırarak test etmişler ve *Allium*, *Tanacetum*, *Pimpinella*, *Origanum*'un *Leishmania* promastigotlarına karşı en etkin cinsler olduğunu ortaya koymuşlardır (34). Karamenderes ve ark., papatyagiller familyasından bitkilerden elde ettikleri bitkisel özütlerin antibakteriyel etkilerinin yanısıra *Plasmodium falciparum* ve *L. donovani*'ye karşı etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca, kloroform ekstraktlarının klorokine dirençli *P. falciparum* kolonilerine karşı yüksek antiprotozoal aktivite göstermiştir (35). Bitkisel yağlar parazitin amastigot formuna karşı, promastigot formuna göre daha etkilidir. *Ocimum gratissimum*'dan izole edilen esansiyel yağın LD<sub>50</sub> değeri promastigotlar için 135 µg/ml, amastigotlar için 100 µg/ml olarak belirlenmiştir (16). Benzer şekilde gerçekleştirdiğimiz çalışmada belirtilen dozlardan daha düşük dozlar konaktaki amastigot formuna karşı etkili olabilir. Sudan'da yapılan bir çalışmada 72 kütanöz leishmaniasisli (KL) hasta konvansiyonel ilaçlar ve bitki etanol ekstraktları kullanılarak tedavi edilmiş ve bütün ajanlarla %90.3'e yakın olumlu sonuç alınmıştır. Bu çalışmada ayrıca *Allium sativa* (sarımsak), *Azadirachta indica* (neem)'nin tedavide pentastom kadar etkili olduğu bulunmuştur (34).

Yurdumuz coğrafi konumu nedeniyle birçok farklı bitki türünü barındırmaktadır. Bu bitki potansiyeli doğal açıdan daha iyi değerlendirilebilir. Kekik yağının etken maddesi kalvakrol ve timolün ileri çalışmalarla leishmaniasis tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Bailey MS, Lockwood DN. Cutaneous leishmaniasis. Clin Dermatol 2007; 25:203-11.
2. Saygı G. *Temel Tıbbi Parazitoloji*. 2. Baskı. Sivas: Esnaf Ofset Matbaası, 2002.
3. Ok ÜZ, Balcıoğlu İC, Taylan Özkan A, Özensoy S, Özbel Y. Leishmaniasis in Turkey. Acta Tropica 2002; 84:43-8.
4. Denton H, Mcgregor JC, Coombs GH. Reduction of antileishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. Biochem J 2004; 381(2): 405-12.
5. Sundar S, More DK, Singh MK. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the centre of the Indian epidemic. Clin Infect Dis 2000; 31: 1104-7.



6. Netto EM, Merdsen PD, Lianos-Cuentas EA, Costa JM, Cuba CC, Barreto AC, Badaro R, Johnson WD, Jones TC. Long-term follow up of patients with *Leishmania braziliensis* infection and treated with Glucantime. *Trans R Soc Med Hyg* 1990; 84(3): 367-70.
7. Hamarton TC, Mottram JC, Doerig C. The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Prog Cell Cycle Res* 2003; 5: 91-101.
8. Pegg AE, McCann PP. Polyamine metabolism and function in mammalian cells and protozoans. *Atlas of Science: Biochemistry* 1988. 1: 11-8.
9. Beheshti M, Ghotbi S, Amirzade S. Therapeutic and adverse effects of glucantime used for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Shiraz E-Medical Journal* 2007; 8(4).
10. Adinolfi LE, Bonventre PF, Pas MV, Eppstein DA. Synergistic effect of glucantime and a liposome-encapsulated muramyl dipeptide analog in therapy of experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 1985; 48(2): 409-16.
11. Pontin K, Ademar A, Filho DS, Santos FF, Silva MLA, Cunha WR, Nanayakkara NPD, Bastos JK, Albuquerque S. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitol Res* 2008; 103:487-92.
12. Wallace RJ. Symposium on 'Plants as animal foods: a case of catch 22?' Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society* 2004; 63: 621-9.
13. Chang ST, Chen PF, Chang SC. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 77: 123-7.
14. Elgayyar M, Draughon FA, Golden DA, Mount JR. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection* 2001; 64:1019-24.
15. Shapiro S, Meier A, Guggenheim B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology* 1994; 9: 202-8.
16. Nakamura TU, Mendonço-Filho RR, Morgado-Diaz JA. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitol Int* 2006; 55: 99-105.
17. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003; 19: 502-8.
18. Brenzan MA, Nakamura CV, Dias-Filho BP. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res* 2007; 101(3): 715-22.
19. Çeliksöz A, Saygı G, Özçelik S, Öztöp AY, Şanlıdağ T. Trimethoprim-sulphametaxole ve oflaksasin'in *Leishmania promastigotlarına in vitro* etkilerinin araştırılması. *T Parazitol Derg* 1998; 22(4):343-7.
20. Luize PS, Tiunan TS, Morello LG, Maza PK, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Cortez, DAG, Mello JCP de, Nakamura CV. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2005; 41(1): 85-94.
21. Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis, New approaches to disease control. *BMJ* 2003; 326: 377-82.
22. Weigle K, Saravia NG. Natural history, clinical evolution and the host-parasite interaction in new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 1996; 14: 433-50.
23. Özçelik S, Sümer Z, Değerli S, Ozan F, Sökmen A. Sarımsak (*Allium sativum*) özütü skolosidal ajan olarak kullanılabilir mi?. *T Parazitol Derg* 2007; 31(4):318-21.
24. Polat, Z.A., Vural A, Ozan F, Ozcelik S, In vitro evaluation of the amoebicidal activity of garlic (*Allium sativum*) extract on *Acanthamoeba castellanii* and its cytotoxic potential on corneal cells. *J Ocul Pharmacol Ther* 2008; 24(1): 8-14.
25. Tripathi SC, Singh SP, Dube S. Studies on antifungal properties of essential oil of *Trachyspermum ammi* (L.) sprague. *Journal of Phytopathology* 1985; 116:113-120.
26. Habtemariam. *In vitro* antileishmanial effects of antibacterial diterpenes from two Ethiopian *Premna* species: *P. schimperii* and *P. oligotricha*. *BMC Pharmacology* 2003; 3(6).
27. Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian thymus* essential oils. *App Microbiol* 1999; 29: 130-5.
28. Lacoste E, Chaumont JP, Mandin D, Plumel MM, Matos FJ. Antiseptic properties of essential oil of *Lippia sidoides cham.* application to the cutaneous microflora. *Ann Pharm Fr* 1996; 54(5): 228-30.
29. Robledo S, Osorio E, Munoz D, et al. *In vitro* antileishmanial activities of thymol and hemisynthetic derivatives. *Antimic Ag Chem* 2005; 49(4): 1652-5.
30. Asslani U, Vilma T. Chemical composition of Albanian thyme oil (*Thymus vulgaris* L.). *J Ess Oil Res* 2003; 15(3): 165-7.

31. Boyraz N, Koçak R. Bazı bitki ekstraktlarının *in-vitro* antifungal etkileri. SÜ Ziraat Fakültesi Dergisi 2006; 20(38): 82-7.
32. Asha MK, Prashanth B, Murali B. Antihelmintic activity of essential oil of *Ocimum sanctum* and eugenol. Fitoterapia 2001; 72(6): 669-70.
33. Rosa MSS, Mendonça-Filho RR, Bizzo HR. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. Antimic Ag Chem 2003; 47(6): 1895-901.
34. Ataş AD, Özçelik S, Sökmen A. Deri leishmaniasisi etkenleri üzerine, Sivas yöresinde endemik ve endemik olmayan bitkilerin (özütlerinin) antileishmanial etkilerinin araştırılması. T Parazitol Derg 2003; 27(3):170-5.
35. Khalid FA, Abdalla NM, Mohomed HEO, Toum AM, Magzoub MMA, Ali MS. Treatment of cutaneous leishmaniasis with some local Sudanese plants (Neem, Garad & Garlic). T Parazitol Derg 2004; 28(3):129-32.
36. Karamenderes C, Khan S, Tekwani BL, Jacob MR, Khan IA. Antiprotozoal and antimicrobial activities of *Centaurea* species growing in Turkey. Pharmaceutical Biology 2006; 44(7): 534-539.