

## Momordica Charantina Ekstraktının Amfotericin B ve Miltefosin İlaç Kombinasyonları ile Leishmania Parazitleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi

**Kübra KELLEÇİ<sup>1,2</sup>** ORCID 0000-0002-9409-2254

**Murat IHLAMUR<sup>1,3</sup>** ORCID 0000-0002-0458-5638

**Melisa ÖZKAN<sup>1</sup>** ORCID 0000-0002-5899-6037

**Emrah Şefik ABAMOR<sup>1</sup>** ORCID 0000-0002-9174-4528

<sup>1</sup>Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya- Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İstanbul

<sup>2</sup>Beykoz Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikleri Bölümü, İstanbul

<sup>3</sup>Biruni Üniversitesi, Meslek Yüksekokulu, Elektronik ve Otomasyon Bölümü, İstanbul

Geliş tarihi: 07.08.2023

Kabul tarihi: 28.03.2024

Atıf şekli/ How to cite: KELLEÇİ, K., IHLAMUR, M., ÖZKAN, M., ABAMOR, E.Ş., (2024). Momordica Charantina Ekstraktının Amfotericin B ve Miltefosin İlaç Kombinasyonları ile Leishmania Parazitleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi. Çukurova Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Dergisi, 39(1), 1-7.

### Öz

Leishmaniasis, Leishmania parazitlerinin neden olduğu tropikal bir hastalıktır. Halk arasında “kala-azar” olarak bilinen, hastalığın en ölümcül formu olan viserial leishmaniasise (VL) *L. infantum*’un neden olduğu bilinmektedir. Piyasada hali hazırda antileishmanial ajanlar mevcuttur, ancak bu kemoterapötik ajanların toksisitelerinin ve yan etkilerinin olduğu bilinmektedir. Şifalı bitkiler ve onların ekstraktlarına olan ilgi, yan etkilerinin yok denecek kadar az olmasıyla her geçen gün artmaktadır. Bu çalışmada leishmaniasise yönelik etkin bir ilaç formülasyonu geliştirmek için, zengin kimyasal içeriğe sahip, anti-leishmanial özellik sergileyen kudret narı (*Momordica charantina*) özütleri kullanılmıştır. Çalışmada kudret narı ekstraktları tek başına ve farklı antileishmanial ilaçlarla (Amfotericin B ve miltefosin) kombine edilerek RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Ayrıca elde edilen ekstrakt-ilaç formülasyonlarının *L. infantum* parazit hücreleri üzerindeki öldürücü etkinliği de MTT analiz yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen verilere göre ekstraktın tek başına toksik etkisinin olmadığı, ilaçla kombine edildiği zaman doğal immün sistem hücreleri üzerinde ilacın toksik etkisini azalttığı, leishmania parazitleri üzerinde ise sitotoksik etkisini arttırdığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların VL karşı tedavi yaklaşımının geliştirilmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Leishmania infantum, Momordica charantina, Sitotoksisite, Antileishmanial

---

\*Sorumlu yazar (Corresponding Author): Kübra KELLEÇİ, [kubragkelleci@gmail.com](mailto:kubragkelleci@gmail.com)

## **Investigation of the Cytotoxic Effects of Momordica Charantina Extract on Leishmania Parasites with Amphotericin B and Miltefosine Drug Combinations**

### **Abstract**

Leishmaniasis is a tropical disease caused by Leishmania parasites. It is known that *L. infantum* causes visceral leishmaniasis (VL), which is the deadliest form of the disease, popularly known as "kala-azar". Antileishmanial agents are already available in the market, but these chemotherapeutic agents are known to have toxicities and side effects. Interest in medicinal plants and their extracts is increasing day by day, with almost no side effects. In this study, bitter melon (*Momordica charantina*) extracts with rich chemical content and exhibiting anti-leishmanial properties were used to develop an effective drug formulation for leishmaniasis. In the study, the cytotoxic effect of bitter melon extracts alone or in combination with different antileishmanial drugs (Amphotericin B and miltefosine) was investigated in RAW 264.7 macrophage cells. In addition, the lethal activity of the obtained extract-drug formulations on *L. infantum* parasite cells was also investigated by MTT analysis method. According to the data obtained from the study, it was determined that the extract did not have a toxic effect alone, when combined with the drug, it reduced the toxic effect of the drug on the cells of the innate immune system, and increased the cytotoxic effect on the leishmania parasites. It is thought that the results obtained will help to develop a treatment approach against VL.

**Keywords:** Leishmania infantum, Momordica charantina, Cytotoxicity, Antileishmanial

### **1. GİRİŞ**

Bitkiler binlerce yıldır farklı medeniyetler tarafından, halk arasında geleneksel tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkilerin hemen hemen bütün kısımlarında farklı düzeylerde bulunan fenolik bileşikler sayesinde antialerjen, antimitojen, antikarsinojen, antihipertansif, antikolesterol, antiinflamatuvar, antitrombotik, vasodilatör ve sakinleştirici özelliklere sahip oldukları bildirilmektedir [1].

Cucurbitaceae familyasına ait bir tür olan kudret narı (*Momordica charantina*) bugün sadece geleneksel tıpta kullanımı nedeniyle halkın değil aynı zamanda tıbbi ve gıda endüstrisinde kullanımı ile de araştırmacıların ilgisini çekmektedir. İçeriğinde bulunan fenolik bileşikler sayesinde antidiyabetik, antiviral, anti-inflamatuvar, antiparazitik özelliğe sahip olduğu kanıtlanmıştır [2].

Yapılan çalışmalar bitkinin sahip olduğu kimyasal bileşen düzeyinin, bitkinin olgunluk seviyesine, bitkinin kısımlarına ve ekstraksiyonda kullanılan çözücüye bağlı olduğunu göstermiştir [3]. Kudret

narı günümüzde birçok hastalığın tedavisinde kullanılmakla birlikte son yıllarda ülkemizde artan leishmaniasis hastalığının tedavisine yönelik çalışmalarda da kullanılmaya başlanmıştır [4].

Leishmaniasis, Phlebotomus cinsi sineklerden bulaşan paraziter bir hastalıktır. Hastalığın en ölümcül formu olan viseral leishmaniasis (VL)'e *L. infantum*, *L. tropica* ve *L. donovani* türlerinin neden olduğu bilinmektedir [5]. VL'nin tedavisinde genellikle kemoterapi ilaçları ile sağlanmaktadır. Deoksikolat veya lipozomal formülasyonlarda hazırlanan amfoterisin B, paromomisin ve miltefosin dahil olmak üzere yeni ilaçlar geliştirilmiş olsa da bu ilaçlar ciddi toksik ve yan etkilere neden olmakta, ilaç direncini arttırmaktadır [6]. Bu nedenle antileishmanial ilaçların geliştirilmesine acilen ihtiyaç vardır [7].

Yapılan literatür çalışmaları tedavide kimyasal ilaçlara ek olarak bitkisel kaynaklı ekstrakt kullanılması ilacın etkinliğini artırabileceğini belirtmiştir. Bu nedenle birçok bitki ekstraktının leishmaniasis tedavisinde kullanımı araştırılmıştır [8]. Yapılan çalışmalarda kudret narının içeriğinde bulunan Momordicatin adlı bileşiğin *L. donovani*

üzerinde etkili bir ajan olduğu kanıtlanmıştır [9]. Bitkideki Momordicatin adlı bu bileşiğin leishmaniasis tedavisinde kullanılan ilaçlarla kombinasyonunun olumlu bir etki oluşturacağı düşünülmektedir. Kombinasyon tedavisi son zamanlarda anti-leishmanial ilaçların dezavantajlarını minimize etmek için en çok araştırılan alanlardan biri olmuştur [6]. Bu çalışmada kudret narı ekstraktı tek başına ve leishmaniasis tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçlar ile kombine edilerek leishmania parazitlerindeki toksisitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Kudret narı ekstraktının anti-leishmanial aktivitesi tespit edilmeden önce toksik olmayan konsantrasyonları RAW 264.7 makrofaj hücre hattı kullanılarak belirlenmiştir.

## 2. YÖNTEM

RPMI-1640, Fetal bovin serum (FBS), Dimetilsulfoxid (DMSO), gentamisin, filtre kâğıdı (Hoffmann) ve 0.22 µm filtrelerin tümü Sigma-Aldrich'ten satın alındı. Tüm sulu çözeltiler milli-Q su ile hazırlandı. Morfolojik değişiklikleri gözlemek amacıyla ters mikroskop (Olympus CKX 41) kullanıldı.

### 2.1. Kudret Narı Ekstraktının Hazırlanması

*M. charantia* yerel pazardan temin edilmiştir. Olgun kudret narı uygun şekilde distile su ile yıkandı, meyvelerin içinde yer alan tohumlar temizlendikten sonra meyveler küçük parçalara ayrıldı. Mikroalgada kurutularak toz haline getirilen kudret narından 8 gr tartılıp, üzerine 50 ml metanol eklendi. 6 gün karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra elde edilen özüt, Whatman No.1 filtre kâğıdı kullanılarak süzüldü ve metanol hava akımı ve sıcaklık yoluyla buharlaştırıldı. Kudret narı ekstraktının miktarı hesaplandı [10].

### 2.2. Parazit ve Hücre Kültürü

Bu çalışmada laboratuvarımızdaki kriyobankta bulunan RAW.264.7 makrofaj hücresi ve VL etmeni olan *L.infantum* paraziti kullanıldı.

Hücrelerin ve parazitlerin proliferasyonu için RPMI-1640 besiyeri içerisine %1 gentamisin, %1 L-glutamin ve %10 FBS ilave edilerek, 37°C, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> inkübe edildi.

Makrofaj hücreleri %80-90 konfluente ulaştıktan sonra fiziksel yol ile toplanarak 1000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüj edildi [11]. Laboratuvar kriyobankında mevcut olan *L.infantum*, RPMI-1640 besiyerinde 27°C, karbondioksitsiz etüvde inkübe edildi. 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslara 3x10<sup>5</sup> parazit/ml olacak şekilde kültürden parazit ekimi yapıldı. 25 cm<sup>2</sup>'lik flaskta 10<sup>7</sup> parazit/ml sayısına ulaştığında *L.infantum* promastigotları 75 cm<sup>2</sup>'lik flaska aktararak 48 saat boyunca inkübe edildi. Parazitler gerekli konfluente ulaşan parazitler 96 kuyulu plaklara 2x10<sup>6</sup> parazit/ml olacak şekilde ekilerek 27°C de karbondioksitsiz ortamda 24 saat boyunca tutuldu [12].

### 2.3 Sitotoksosite Analizleri

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrakt, ilaç (10 -100 µg/ml), ve ekstrakt+ilaç (40 µg/ml ekstrakt ve 10 -100 µg/ml ilaç) formülasyonlarının sitotoksitesini belirlemek için MTT yöntemi kullanıldı. Parazitlerin canlılığı, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazilyum bromür ile değerlendirildi. Plakalara fenol-red içermeyen besiyerinde ekilen parazitlere (2x10<sup>6</sup> parazit/ml) ekstrakt, ilaç ve ekstrakt+ilaç formülasyonları eklenerek CO<sub>2</sub> içermeyen 27°C'lik inkübatörde 48 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu ilave edilerek CO<sub>2</sub>'siz etüvde 27°C'de 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklara 100 µl DMSO ilave edilerek plakalar 30 dakika karanlıkta tutuldu [13].

Parazitlerin canlılık analizi 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Her deney grubu üç kez tekrarlandı ve ortalaması alındı. Hücre canlılığı Denklem 1 kullanılarak, 48 saat sonunda elde edildi.

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \left( \frac{\text{Örnek absorbanansı}}{\text{Kontrol absorbanansı}} \right) * 100 \quad (1)$$

## 2.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen veriler IBM SPSS 25.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, ABD) paket programında analiz edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi Tek Yönlü ANOVA testi ile yapılmıştır. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verildi ve istatistiksel anlamlılık  $p < 0,05$  olarak kabul edildi.

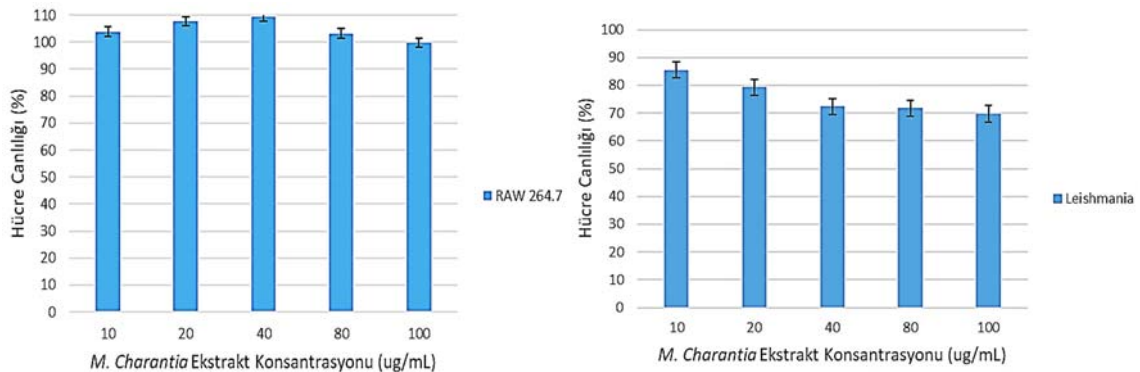
## 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bitkilerdeki ikincil metabolitler, fenolik asitler, flavonoidler, tanenler, kinonlar, antosiyaninler gibi birçok aktif bileşiğin anti-leishmanial etkinliği olduğu bilinmektedir [14]. Bu çalışmada maserasyon yöntemi ile hazırlanan kudret narı ekstraktının anti-leishmanial aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla hazırlanan ekstrakt ve anti-leishmanial ilaçlar ile yapılan kombinasyonların RAW 264.7 makrofaj hücrelerinde ve *L. infantum* parazitlerinde toksisiteyi tespit edilmiştir. *In vivo* çalışmalarda denenmek üzere leishmaniasis tedavisinde uygulama potansiyeli en yüksek olan ekstrakt-ilaç kombinasyonu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada ekstraktın en yüksek öldürme etkinliğinin 100 µg/ml konsantrasyonda elde edildiği görülmektedir. Fakat bu konsantrasyon Şekil 1’de gösterildiği gibi RAW 264.7 hücrelerine uygulandığında yüksek sitotoksosite gösterdiği için değerlendirilmemiştir.

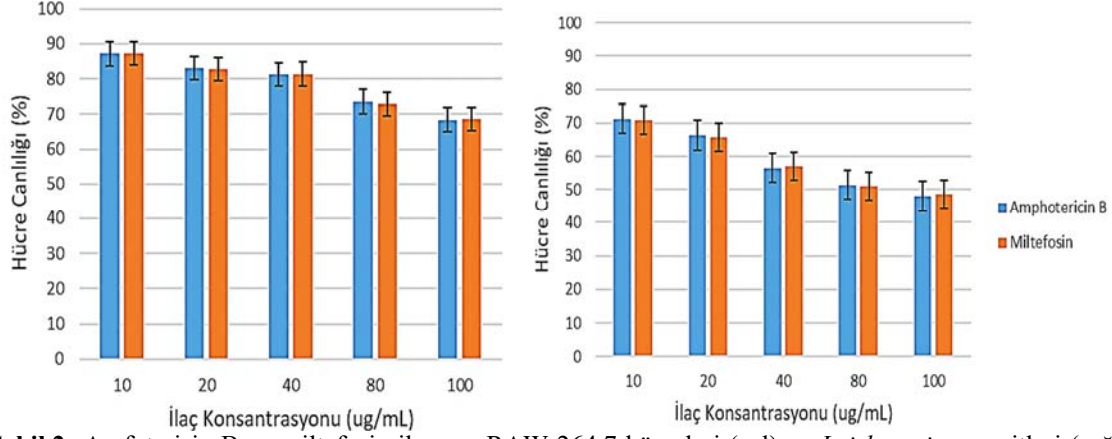
40 µg/ml konsantrasyondaki ekstraktın sitotoksosite analizi incelendiğinde RAW 264.7 hücrelerinde %

109,44 canlılık tespit edilirken, Leishmania parazitlerinde %72,36 canlılık tespit edilmiştir. Ekstraktın artan konsantrasyonla birlikte Leishmania parazitlerini öldürme kabiliyetinin arttığı görülmektedir. Kudret narı ekstraktının sitotoksik etkinliği en yüksek 40 µg/ml konsantrasyonda olduğu için ilaç kombinasyonları bu konsantrasyon ile uygulanmıştır. Kudret narı ekstraktının Amfoterisin B ve miltefosin ilacı ile kombinasyonun RAW 264.7 hücrelerinde ve Leishmania parazitlerindeki sitotoksik etkinliği Şekil 2’de gösterilmiştir. RAW 264.7 hücrelerinde 40 µg/ml Amfoterisin B uygulandığında %81,27 canlılık, 40 µg/ml miltefosin ilacı uygulandığında ise %81,29 canlılık tespit edilmiştir. Aynı konsantrasyonda Leishmania parazitlerine Amfoterisin B uygulandığında %56,47 canlılık, miltefosin uygulandığında ise %57,03 canlılık tespit edilmiştir.

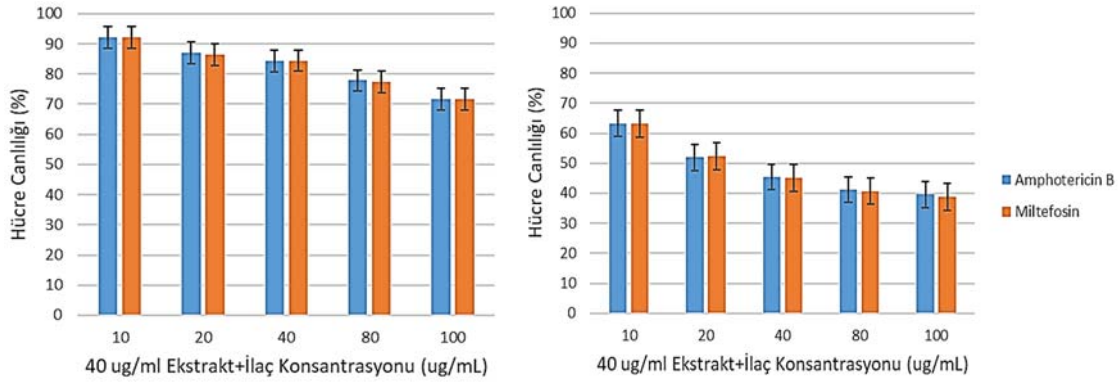
Kudret narı ekstraktının Amfoterisin B ve miltefosin ilacı ile ayrı ayrı kombinasyonunda, RAW 264.7 hücrelerinde 40 µg/ml ekstrakt+40 µg/ml Amfoterisin B ilacının %84,26 canlılığa, 40 µg/ml ekstrakt+40 µg/ml miltefosin ilacının ise %84,45 canlılığa neden olduğu bulunmuştur (Şekil 3). Aynı şekilde ekstrakt+ilaç kombinasyonlarının Leishmania parazitleri üzerine sitotoksik etkileri de yer almaktadır. Sonuçlara göre 40 µg/ml ekstrakt+40 µg/ml Amfoterisin B ilacı uygulandığında %45,36 canlılık, 40 µg/ml ekstrakt+40 µg/ml miltefosin ilacı uygulandığında ise %45,13 canlılık tespit edilmiştir.



Şekil 1. Ekstraktın RAW 264.7 hücre hattı ve Leishmania parazitindeki sitotoksitesisi



Şekil 2. Amfoterisin B ve miltefosin ilacının RAW 264.7 hücreleri (sol) ve *Leishmania* parazitleri (sağ) üzerindeki sitotoksitesisi



Şekil 3. Amfoterisin B ve miltefosin ilacının kudret narı kombinasyonlarıyla RAW 264.7 hücreleri (sol) ve *Leishmania* parazitindeki (sağ) sitotoksik etkileri

Leishmaniasis tedavisinde kullanılan ilaçlar *Leishmania* parazitlerinin öldürülmesini sağlamaktadır. Fakat mevcut ilaçların tek başına kullanımlarının sitotoksik etki oluşturmaları ve istenilen etkinlik düzeyinde olmamaları gibi dezavantajları vardır. Son yıllarda yapılan çalışmalarla leishmaniasis tedavisinde kullanılan ilaçların bitkisel ekstraktlarla kombine olarak kullanımının, ilaçların toksisitelerini azalttığı ve anti-leishmanial etkilerini artırdığı görülmektedir. Yapılan bu çalışmada elde edilen sonuçlar literatürü desteklemektedir [15]. Yapılan bir çalışmada *P. granatum* ekstraktının anti-leishmanial aktivitesi incelenmiştir. *L. infantum* ve *L. major* parazitlerinde *P. granatum* ekstraktının IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 0,84 ve 1,67 µM olarak bulunduğu bildirilmiştir

[16]. Sonuçlar referans ilaç miltefosin değerleriyle karşılaştırıldığında, *P. granatum* ekstraktının *L. infantum* parazitlerinde miltefosine göre yaklaşık 25 kat daha seçici olduğu rapor edilmiştir.

#### 4. SONUÇLAR

Beş değerlikli antimoniyaller, ölümcül olduğu bilinen VL tedavisi için ilk ilaç grubu olarak kabul edilmektedir [17]. Bazı parazitik suşlar bu klasik beş değerlikli antimonlara karşı direnç geliştirmiştir [18]. Piyasada sıklıkla kullanılan Miltefosin, Amfoterisin B ilaçları VL tedavisi için etkili olduğu bilinmektedir. Fakat ne yazık ki kesin çözüm değildir. Bu ilaçların kullanımı ile hastalarda kutanöz leishmaniasis ya da yeniden VL tekrarlama

durumu söz konusudur. Ayrıca ilaçların sahip olduğu yan etkiler ve toksisite gibi zararları da ilaçların kullanımını sınırlamaktadır. Dolayısıyla VL tedavisi için yeni ilaçların geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır [19].

Paraziter hastalıkların tedavisinde şifalı bitkilerin ve bitki ekstraktlarının kullanımı geçmiş zamanlardan beri sıklıkla çalışmalara araştırma konusu olmuştur [16]. Bugüne kadar, halk arasında kudret narı olarak da bilinen *M. charantia* bitkisi ve bitki özütü ile yapılan pek çok *in vivo* ve *in vitro* çalışma vardır. *M. charantia* bitkisinin antidiyabetik, antiparaziter, antimikrobiyal pek çok faydalı etkisi olduğu literatürde yapılan çalışmalarda görülmektedir [2].

Bu çalışma kapsamında kudret narı ekstraktının RAW 264.7 makrofaj hücre hattında sitotoksik etkinliği araştırılmıştır. Aynı zamanda *L. infantum* parazitleri üzerindeki öldürücü etkisi de incelenmiştir. Çalışmada bitki ekstraktı tek başına kullanıldığında doğal immün sistem hücreleri üzerinde toksik etkisinin olmadığı fakat *Leishmania* parazitleri için toksik etki yarattığı belirlenmiştir. *Leishmania* parazitleri üzerindeki etkiyi artırmak ve mevcut anti-leishmanial ilaçların toksik etkisini minimize etmek için, ilaç+ekstrakt kombinasyonu uygulanmıştır. Elde edilen veriler ışığında kudret narı ekstraktlarının ilaçların doğal immün sistem hücreleri üzerinde toksik etkisini azalttığı, *Leishmania* parazitleri üzerinde ise toksik etkisini arttırdığı belirlenmiştir. Bu çalışma ile kudret narının leishmaniasis tedavilerinde kullanılma potansiyeli olan antileishmanial özelliklerinin olduğu belirlenmiştir.

Bu bulgular ışığında leishmaniasis tedavisinde kudret narının etkili sonuçlar verse de tek başına yeterli olmayacağı ve antileishmanial ilaçlarla kullanıldığı zaman ilaçların toksik etkilerini azaltarak antileishmanial etkilerini arttırdığı belirlenmiştir. Kudret narı ile Amfotericin B ve Miltefosin gibi antileishmanial ilaçların kombinasyonlarının leishmania tedavisinde kullanım potansiyellerinin olduğunu ve *in vivo* çalışmalarla bitkisel ekstrakt+ilaç formülasyonlarının leishmaniasis tedavilerinde etkili sonuçlar vereceğini düşünmekteyiz.

## 5. KAYNAKLAR

1. Bortolotti, M., Mercatelli, D., Polito, L., 2019. *Momordica charantia*, a Nutraceutical Approach for Inflammatory Related Diseases. *Front Pharmacol*, 10, 486.
2. Wang, S., Li, Z., Yang, G., Ho, C. T., Li, S., 2017. *Momordica charantia*: A Popular Health-Promoting Vegetable With Multifunctionality. *Food Funct*, 8(5), 1749-1762.
3. Jia, S., Shen, M., Zhang, F., Xie, J., 2017. Recent Advances in *Momordica charantia*: Functional Components and Biological Activities. *Int J Mol Sci*, 18(12), 2555.
4. Gupta, S., Raychaudhuri, B., Banerjee, S., Das, B., Mukhopadhyaya, S., Datta, S.C., 2010. *Momordicatin Purified From Fruits of Momordica charantia* is Effective to Act as a Potent Antileishmania Agent. *Parasitol Int*, 59(2), 192-197.
5. Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M.R., Ruiz-Esmenjaud, J., Arenas, R., 2017. *Leishmaniasis: A Review*. *F1000Res*, 6, 750.
6. Kelleci, K., Allahverdiyev, A., Bağırova, M., İhlamur, M., Abamor, E.Ş., 2023. Particulate and Non-Particle Adjuvants in *Leishmaniasis* Vaccine Designs: A Review. *Journal of Vector Borne Diseases*, 60(2), 125-141.
7. Kelleci, K., 2022. Determination of Immunostimulatory Efficacy of Benzimidazole Derivatives Against *Leishmania infantum*. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 13(12), 11.
8. Monzote, L., Piñón, A., Setzer, W.N., 2014. Antileishmanial Potential of Tropical Rainforest Plant Extracts. *Medicines*, 1(1), 32-55.
9. Saeed, F., Afzaal, M., Niaz, B., Arshad, M., Tufail, T., Hussain, M., Javed, A., 2018. Bitter Melon (*Momordica charantia*): A Natural Healthy Vegetable. *International Journal of Food Properties*, 21.
10. Horax, R., Hettiarachchy, N., Chen, P., 2010. Extraction, Quantification, and Antioxidant Activities of Phenolics from Pericarp and Seeds of Bitter Melons (*Momordica charantia*) Harvested at Three Maturity Stages (Immature, Mature, and Ripe). *J Agric Food Chem*, 58(7), 4428-4433.

11. Philippeos, C., Hughes, R.D., Dhawan, A., Mitry, R.R., 2012. Introduction to Cell Culture. *Methods Mol Biol*, 806, 1-13.
12. Castelli, G., Galante, A., Lo Verde, V., Migliazzo, A., Reale, S., Lupo, T., Bruno, F., 2014. Evaluation of Two Modified Culture Media for *Leishmania infantum* Cultivation Versus Different Culture Media. *J Parasitol*, 100(2), 228-230.
13. Guevara, I., Iwanejko, J., Dembińska-Kieć, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., Szczudlik, A., 1998. Determination of Nitrite/Nitrate in Human Biological Material by The Simple Griess Reaction. *Clin Chim Acta*, 274(2), 177-188.
14. Poddar, S., Sarkar, T., Choudhury, S., Chatterjee, S., Ghosh, P., 2020. Indian Traditional Medicinal Plants: A Concise Review. *International Journal of Botany Studies*, 5(5), 174-190.
15. Oryan, A., 2015. Plant-Derived Compounds in Treatment of Leishmaniasis. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 16(1), 1.
16. Kelleci, K., 2023. In Vitro Anticarcinogenic, Antiparasitic and Antimicrobial Effects of *P. granatum* Extract. *Biology Bulletin Reviews*, 13(Suppl 3), 264-269.
17. Haldar, A.K., Sen, P., Roy, S., 2011. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. *Mol Biol Int*, 2011, 1-23.
18. Jeddi, F., Piarroux, R., Mary, C., 2011. Antimony Resistance in *Leishmania*, Focusing on Experimental Research. *J Trop Med*, 2011, 1-15.
19. Kelleci, K., Gölebatmaz, E., 2023. In Vitro Determination of Antileishmanial Activities of Benzimidazolium Derivatives on *L. major* Promastigotes and Amastigotes. *Acta Parasitologica*, 68(1), 51-55.

