

ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTI VE FLUKONAZOLÜN BAZI DERMATOFİTLERE KARŞI SİNERJİK ETKİSİ

SYNERGISTIC EFFECT OF OLIVE LEAF EXTRACTS AND FLUCONAZOLE TOWARDS DERMATOPHYTES

Nisa SİPAHI¹ Pınar GÖÇ RASGELE^{1,2} Ayşe Ilgın KEKEÇ³
Ertuğrul KAYA^{1,4} İsmail YILMAZ⁵

¹Düzce Üniversitesi, Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi, Düzce

²Düzce Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyosistem Mühendisliği Bölümü, Düzce

³İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

⁴Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Düzce

⁵İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, İzmir

Anahtar Sözcükler: Antifungal, dermatofit, flukonazol, Olea europaea, sinerjik etki

Keywords: Antifungal, dermatophyte, fluconazole, Olea europaea, synergistic effect

Yazının alınma tarihi: 14.10.2022

Yazının kabul tarihi: 29.12.2022

Online basım: 28.02.2023

ÖZ

Amaç: Çalışmada, farklı çözücülerle ekstrakte edilmiş zeytin yaprağı ekstrelerinin ve flukonazolün hem ayrı ayrı, hem de kombinasyonlarının *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis* ve *Microsporium nanum* dermatofitleri üzerine olan antifungal etkileşimlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada kullanılan zeytin yaprağının en önemli bileşeni olan oleuropein miktarı RP-HPLC yöntemiyle ölçülmüştür. Ekstrelerin ve flukonazol (FLU)'un, minimal inhibisyon konsantrasyonlarını (MİK) belirlemek için Mikrodilüsyon Testi; ekstrelerin flukonazol ile kombinasyonu sonucunda meydana gelen etkileşimi belirlemek için ise Dama Tahtası Yöntemi kullanılmıştır.

Bulgular: En yüksek oleuropein miktarı 19,72 µg/mL ile %5'lik metanol ekstresinde belirlenmiştir. Zeytin yaprağı ekstrelerinin tek başına uygulandıklarında, mantar türleri üzerinde inhibe edici özelliği olduğu ve mantarların en çok metanol ve etanol ekstraktına karşı hassasiyet gösterdiği saptanmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktları ve FLU'un kombine etkinliği araştırıldığında, Flukonazol ve ZY4 (%1'lik Dimetilsülfoksit) arasında bir etkileşim olmadığı diğer ekstraktlarda çoğunlukla sinerjik etkileşim olduğu gözlenmiştir.

Sonuç: Çalışmamızla zeytin yaprağı ekstrelerinin FLU ile olan sinerjistik etkileşimi ilk kez ortaya konmuş olup, doza bağımlı antifungal etki potansiyelinin oleuropein etken maddesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Sonuçlar daha ileri *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ışık açarken bulguların başka çalışmalarda da desteklenmesi gerekmektedir.

SUMMARY

Introduction: The study aimed to investigate the antifungal interactions of olive leaf extracts and fluconazole extracted with different solvents, separately and in their combinations, on the dermatophytes *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis*, and *Microsporium nanum*.

Material and Method: The amount of oleuropein, the essential component of the olive leaf used in the study, as measured by the RP-HPLC method. Microdilution Test to determine minimal inhibition concentrations (MIC) of extracts and fluconazole (FLU); The Checkerboard Method was used to determine the interaction that occurred as a result of the combination of extracts with fluconazole.

Results: The highest amount of oleuropein was determined in 5% methanol extract with 19.72 µg/mL. It has been found that olive leaf extracts, when applied alone, have inhibitory properties on fungal species and that fungi are most sensitive to methanol and ethanol extract. When the combined efficacy of olive leaf extracts and FLU was investigated, it was observed that there was no interaction between Fluconazole and ZY4 (1% Dimethylsulfoxide) but mostly synergistic interaction in other extracts.

Conclusion: Our study demonstrated the synergistic interaction of olive leaf extracts with FLU for the first time and suggested that the potential for dose-dependent antifungal effects could be due to the active ingredient oleuropein. While the results shed light on further in vitro and in vivo studies, other studies should support the findings.

GİRİŞ

Dermatofitoz, dermatofit adı verilen bir grup mantarın insanların ve hayvanların keratinize dokularını enfekte etmesiyle ortaya çıkan önemli ve sıkça görülen bir cilt hastalığıdır. Neden olan mantar türleri oldukça geniş yayılım gösterir. *Trichophyton* spp ve *Microsporum* spp türleri, sıklıkla rapor edilen dermatofitoz etkeni olan türlerdendir. Bunlar çoğunlukla zoonoz özellik göstermekte yani hem insanlarda hem hayvanlarda hastalık oluşturabilmektedirler. Bu durum evcil hayvanlarla kolaylıkla taşınabilmelerine neden olur (1).

Mantar enfeksiyonları, enfeksiyonun ileri boyutlara varması ve sistemik enfeksiyona dönmesiyle sağlığı ciddi ölçüde tehdit eden bir unsur olabilirken genellikle yaşam kalitesini hem hayvanlarda hem insanlarda düşüren, semptomatik bir enfeksiyon çeşididir. Tedavisinde sıklıkla azol grubu antifungal ajanlar kullanılır ve flukonazol bu grubun önemli üyelerinden biridir. Ancak son yıllarda yaşanan küresel antimikrobiyal ajan direnci burada da karşımıza çıkmaktadır. Tedavide yaşanan antimikrobiyal ajan direnci sorunu bir yana, tedavi sürecinin uzaması ilaç etkinliğini düşüren bir diğer sebeptir. Çünkü dermatofitozlar sıklıkla yinelenebilir karakterde enfeksiyonlardır. Özellikle de uzun süreli kronik enfeksiyonlarda flukonazol etkisiz kalabilmekte ve beraberinde başka zorluklar yaşanabilmektedir. Çünkü flukonazol doz bağımlı bir fungisidal ajandır (2).

Tek bir ilaç uygulanarak yapılan enfeksiyon tedavilerinde bazen terapötik etki sınırlı olabilir. Böyle durumlarda çoklu ilaç tedavileri kullanılarak maksimum terapötik etkinlik hedeflenir. Ancak kombinasyonu yapılacak ilaç-ilaç veya ilaç-doğal ürünlerin nasıl bir etkileşim göstereceklerinin

bilimsel çalışmalarla ortaya konması bu tedavilerdeki önemli noktadır. Günümüzde invaziv ve sistemik mantar enfeksiyonlarına karşı terapötik etkinliği artırmak için verilen iki veya daha fazla antifungal ilaç kombinasyonlarının araştırıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur (2,3). Ancak kombinasyon tedavileri sonrasında oluşabilecek ilaç advers etkileri insanlarda ve hayvanlarda ciddi sıkıntılara neden olabilir. Bu durum günümüzde doğal ürünlere yönelimi giderek artırmakta ve bunların tedavide etkili olabilme potansiyellerinin araştırma konusu olmasına kapı açmaktadır (4). Antifungal ilaç ve doğal ürün kombinasyonları ile yapılan çalışmalar, sahip olduğu çeşitlilik ve etkileşim sonuçları ile son yıllarda dikkat çekmektedir (5,6). Önemli antifungallerden olan flukonazolün çeşitli bitkilerin uçucu yağ ve ekstratleri (7,8), protokatesik asit türevleri ve (9), nar kabuğundan ekstratleri (10) ile yapılmış deneysel çalışmaları özellikle dirençli mikroorganizmalara sinerjik etki gösterme potansiyelleri açısından değerlendirildiğinde umut vaat edicidir.

Zeytin yaprağı ekstratları da özellikle halk arasında bu amaçla yaygın şekilde kullanılan doğal ürünlerdendir. Literatürde zeytin yaprağının antibakteriyel ve antifungal etkilerini bildiren çalışmalar mevcuttur. Zeytin yaprağı ekstratları mikrobiyal hastalıklara karşı oleuropein, hidroksitriazol ve türevleri gibi polifenoller içerirler ve bunların tedavide etkili olma potansiyelleri bildirilmiştir (11). Bu ekstratlarının *Candida* cinsi funguslara karşı olan antifungal etkilerinin araştırıldığı çalışmalar var olup (12,13), literatürde flukonazol ile kombine etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu nedenle çalışmamızda, farklı çözücülerle ekstrakte edilmiş zeytin yaprağı ekstratlarının ve

flukonazol kombinasyonlarının dermatofitler üzerine olan antifungal etkileşimlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bitki Ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılan *Olea europaea* L. bitkisine ait yapraklar Düzce Üniversitesi Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezinden satın alınmıştır. Yaprakların distile su, etanol, metanol ve dimetilsülfoksit (DMSO) olmak üzere dört farklı ekstresi hazırlanmış olup, ekstraksiyonda kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich kimya şirketinden (St. Louis, MO, ABD) temin edilmiştir. Yapraklar öğütücü yardımıyla parçalandıktan sonra 5'er g olacak şekilde tartılarak 50'er mL distile su (ZY1), %5'lik etanol (ZY2), %5'lik metanol (ZY3) ve %1'lik DMSO (ZY4) içerisine konulmuştur. Hazırlanan dört farklı şişe karanlık bir ortamda 50°C'de 6 saat çalkalanmış ve ardından 12 saat oda ısısında bekletilmiştir. Ertesi gün 5 dk'da 3500 rpm'de çöktürülmüş ve süpernatant 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek çalışmalarda kullanılmıştır (14). İlaç olarak kullanılan flukonazol (FLU) VEM İlaç San. (İstanbul)'den temin edilerek çalışmada 2 mg/L konsantrasyonunda, serum fizyolojik ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

Test Suşları

Kullanılan klinik izolatlar İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kliniğine gelen hastalara ait kültür koleksiyonundan sağlanmıştır. Buna göre çalışmada kedi orjinli *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* ve *M. nanum* dermatofitleri kullanılmıştır. Her türden bir izolat seçilmiştir. Suşların kültüre edilmesinde ve proliferasyonunda Merck (Almanya) firmasından temin edilen Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) kullanılmıştır.

HPLC Analizi

Ekstrakt içindeki oleuropein miktarı RP-HPLC yöntemiyle ölçülmüştür. Bu amaçla UV-DAD dedektör içeren HPLC cihazı kullanılmıştır (Shimadzu LC-20AT HPLC-DAD, Japonya). Analizlerde 5 µm çapında partikül içeren, 4,6x250 mm ölçülerinde C18 kolon kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı tüm analiz boyunca 40°C olarak

ayarlanmıştır. Mobil faz olarak ultra saf su (A) ve asetonitril (B); 0,9 mL/dakika akış hızında ve 30:70 (A:B) oranında izokratik olarak kullanılmıştır. Analiz süresi 33 dakikada tamamlanmıştır. Ekstraktlar yukarıda tanımlanan şekilde gerçekleştirildikten sonra cihaza 20 µL olacak şekilde enjeksiyon yapılmıştır.

Oleuropein analitik standardı (Sigma-Aldrich, ABD) HPLC grade metanol içinde 500 ppm konsantrasyonda hazırlandı. Cihaza 20 µL enjeksiyondan sonra DAD detektörden elde edilen en yüksek pik alanına 230 nm dalga boyunda ulaşılmış olup, analizlere 220 nm dalga boyunda devam edilmiştir.

Oleuropein kantitatif miktar analizi için kalibrasyon grafiği hazırlanmıştır. Bu amaçla 1; 3; 10; 20; 50 µg/mL konsantrasyonlarda oleuropein standart solüsyonları metanol içinde hazırlanarak, her bir konsantrasyon için üçer defa olmak üzere yukarıda belirtilen yöntemle analizler yapılmıştır. Bu analizlerden elde edilen sonuçlarla kalibrasyon eğrisi çizilmiş, eğri denkleminde yerine koyma yöntemi uygulanarak analiz sonuçları hesaplanmıştır.

Toplam Katı Madde Miktarı Ölçümü

Elde edilen ekstraktlardaki toplam katı madde miktarı dijital refraktometre (Milwaukee MA871, ABD) ile ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak öncelikle cihazın okuma haznesine 10 µL distile su damlatılmıştır. Elde edilen değerlerin sıfır olduğu görülerek kontrol edilmiştir. Pozitif kontrol olarak %0,9 NaCl solüsyonu cihazın okuma haznesine 10 µL damlatılarak %0,9 sonucu teyit edilmiştir. Negatif ve pozitif kontrol işlemleri beşer kez tekrarlanmıştır. Deneyde kullanılan ekstraktların her biri cihazın okuma haznesine 10 µL damlatılarak elde edilen sonuçlar kaydedilmiştir. Tüm ölçümler beşer kez tekrarlanmış olup, her seferinde aynı sonuç alınmıştır.

Minimal İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) Belirlenmesi

Elde edilen dört ekstraktın ve flukonazolün 3 farklı dermatofitte karşı MİK değerleri belirlenmiştir. Test, CLSI-M38 direktiflerine göre gerçekleştirilmiştir. MOPS ile tamponlanmış RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, ABD) besiyeri kullanılarak mikrodilüsyon testi yapılmıştır. FLU için 2 mg/mL'den

0,002mg/mL'ye kadar, zeytin yaprağı ekstraktları için 100 mg/mL'den 0,02 mg/mL'ye kadar seri dilüsyonlar hazırlanmıştır. İçerisine son konsantrasyon $2,5-5 \times 10^3$ cfu/mL olacak şekilde mantar konidyumları (%0,9 NaCl içeren steril distile su içerisine hazırlanmış) süspansiyonu eklenmiştir. 35°C'de 5 gün inkübe edilmiş ve üremenin olmadığı en düşük konsantrasyonu içeren kuyu MİK değeri olarak belirlenmiştir (15).

Sinerji Testi

Farklı çözücülerle hazırlanan dört farklı zeytin yaprağı ekstraktının ayrı ayrı flukonazol ile arasındaki sinerjik etki dama tahtası (checkboard assay) yöntemiyle araştırılmıştır. 96 kuyucuklu mikropakada yatay bir şekilde 25 µL 4 x MİK konsantrasyonundan MİK/32'ye kadar FLU, 25 µL 4 x MİK değerinden MİK/128 konsantrasyonuna kadar zeytin yaprağı ekstraktı dikey bir şekilde eklenmiştir. Deney, her bir ekstrakt ve her mantar suşu için iki tekrarlı olarak tasarlanmıştır. Her kuyucuğa 150 µl son konsantrasyon $2,5-5 \times 10^3$ cfu/mL olacak mantar konidyumları içeren RPMI eklenmiştir. 35°C'de 5 gün inkübe edilmiş ve üremenin olmadığı kuyucuk konsantrasyonları kaydedilmiştir. FIC (Fractional Inhibitory Concentration) indeksi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

FIC indeksi (FICI) = FICA + FICB (A: Bitki ekstraktları, B: Flukonazol)

$$FICA: \frac{\text{MİK (A) kombine}}{\text{MİK (A) ekstrakt}}$$

$$FICB: \frac{\text{MİK (A) kombine}}{\text{MİK (B) antifungal}}$$

FIC indeksi $\leq 0,5$ sinerjik etki; $0,5 < FICI < 1$ aditif etki; $1 < FICI < 4$ etkileşim yok/kayıtsız; $FICI > 4$ antagonistik etki olarak değerlendirilmiştir (9, 16,17). Kontrol olarak bitki materyali içermeyen solventler aynı konsantrasyonda flukonazol ile ayrıca çalışmaya dahil edilmiştir. Bunun dışında hiçbir tedavi ürünü içermeyen sadece konidum ihtiva eden besiyeri de negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

BULGULAR

Ekstraksiyon

Ekstraksiyon işlemi sonrası, zeytin yaprağının su ekstraktı ZY1, %5 etanol içeren etanol ekstraktı ZY2, %5 metanol içeren metanol ekstraktı ZY3, %1 DMSO içeren DMSO ekstraktı ZY4 olmak üzere 4 farklı ekstrakt elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktlardaki dijital refraktometre ile ölçülen ve ekstraksiyon verimini temsil eden toplam katı madde miktarları Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Ekstraktlardaki toplam katı madde miktarları

Ekstrakt	Toplam Katı Madde Miktarı
Sulu ekstrakt (ZY1)	% 2,2
%5 Etanol ekstraktı (ZY2)	% 3,1
%5 Metanol ekstraktı (ZY3)	% 3,0
%1 DMSO ekstraktı (ZY4)	% 5,2

ZY1: Distile su, ZY2: %5 Etanol, ZY3: %5 Metanol, ZY4: %1 DMSO (Dimetil sülfoksit)

HPLC Bulguları

Zeytin yaprağının en önemli bileşeni oleuropein miktarı RP-HPLC yöntemiyle ölçülmüştür. Oleuropein için UV spektrumunda en yüksek absorbans 230 nm dalga boyunda elde edilmiştir (Şekil 1). Aynı yöntemle yapılan analizler sonucu elde edilen kromatogramlar üst üste çakıştırılarak aynı tutulma zamanında gelen pikler birbiriyle kıyaslanmıştır. DAD detektördeki analizlere 220 dalga boyunda devam edilmiş ve kalibrasyon grafiğinin doğrusallığını ifade eden r^2 değeri 0,986 olarak bulunmuştur. Numune ön hazırlığı yapılmadan direkt olarak sisteme enjeksiyon yapıldığı için kromatogramda birçok pik görülmektedir ancak uygulanan yöntemle yakındaki piklerden rahatlıkla ayrılarak tek bir pik halinde görülmüştür. Oleuropeinin RP-HPLC analizinde tutulma zamanı 19,2 dakikadır. Ekstraktlara göre oleuropein miktarları Tablo 2'de ve HPLC kromatogramları ise Şekil 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Ekstraktların oleuropein miktarı

Ekstrakt	Oleuropein Miktar (µg/mL)
ZY1	4,61
ZY2	16,28
ZY3	19,72
ZY4	4,70

ZY1: Distile su, ZY2: %5 Etanol, ZY3: %5 Metanol, ZY4: %1 DMSO (Dimetil sülfoksit)

Antifungal ve Sinerji Testi Bulguları

Mikrodilüsyon testine göre dermatofitler için MİK değerleri Tablo 3'de verilmiştir. CLSI kriterlerine (Dirençli>64 µg/mL) göre izolatların FLU antifungaline duyarlı olduğu görülmüştür. FLU'un MİK değerleri *T. rubrum* için 0,016 mg/mL; *M. canis* ve *M. nanum* için 0,032 mg/mL olarak tespit edilmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktlarının tek başına uygulandıklarında, mantar türleri üzerinde inhibe edici özelliği olduğu görülmüştür. Buna göre mantarların en çok metanol ve etanol ekstraktına karşı hassasiyet gösterdiği; en az ise su ekstraktına karşı duyarlılık gösterdiği görülmektedir. Kontrol grubu olarak kullanılan ekstrakt içermeyen %5'lik etanol ve %5'lik metanol ile %1'lik DMSO'nun herhangi bir inhibisyon etkisi olmamıştır.

Zeytin yaprağı ekstraktları ve FLU'un kombine etkinliği araştırıldığında, flukonazol ve ZY4 arasında bir etkileşim olmadığı diğer ekstraktlarda ise çoğunlukla bir etkileşim olduğu ve bunun sinerjik ya da aditif etki yönünde olduğu görülmüştür (Tablo 4). Sinerjik etkinin görüldüğü kuyularda flukozanol için MİK değeri 0,008 ve 0,004 mg/mL arasında değişiklik göstermiştir. Ekstraktların ise sinerji testinde gösterdiği en düşük konsantrasyonlar MİK testinden farklı olarak 1,56 mg/mL; 0,78 mg/mL ve 0,39 mg/mL'ye kadar düşmüştür (Tablo 5). Kontrol olarak bitki materyali içermeyen aynı konsantrasyondaki etanol, metanol ve DMSO'nun flukonazol ile aynı konsantrasyonda herhangi bir etki gösterip göstermediği denenmiş ve mantar hücrelerinin büyümeye devam ettiği görülmüştür.

Tablo 3. Zeytin yaprağı ekstraktları ve flukanazolun MİK değerleri

Tür adı	MİK (mg/mL)				
	ZY1	ZY2	ZY3	ZY4	Flukonazol
<i>T. rubrum</i>	50	6,25	6,25	12,5	0,016
<i>M. canis</i>	50	12,5	12,5	25	0,032
<i>M. nanum</i>	50	6,25	6,25	12,5	0,032

ZY1: Distile su, ZY2: %5 Etanol, ZY3: %5 Metanol, ZY4: %1 DMSO (Dimetil sülfoksit)

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon. Kontrol grubu olarak ekstrakt içermeyen %5'lik etanol, %5'lik metanol ve %1'lik DMSO kontrol olarak kullanılmış olup herhangi bir inhibisyon görülmediğinden Tablo'da ayrıca yer verilmemiştir.

Tablo 4. Dermatofitlere karşı flukanazol ve zeytin yaprağı ekstrakt kombinasyonlarının FIC indeks ve etkileşim sonuçları

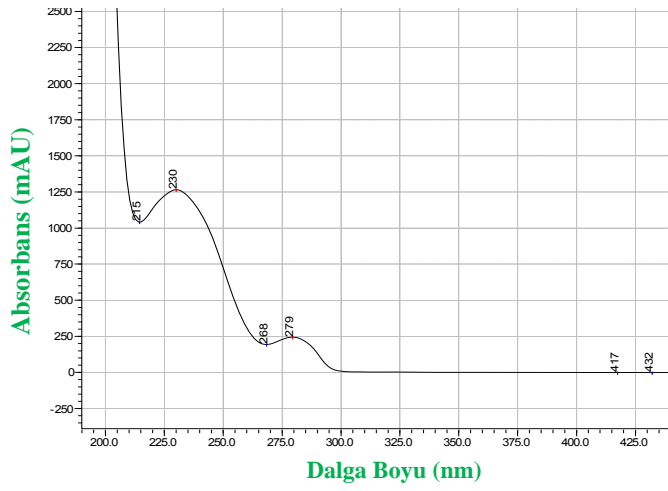
Tür Adı	FIC indeks (FICI)							
	ZY1 +FLU		ZY2 +FLU		ZY3+FLU		ZY4 +FLU	
	FICI	Etkileşim	FICI	Etkileşim	FICI	Etkileşim	FICI	Etkileşim
<i>T. rubrum</i>	0,75	Aditif etki	0,74	Aditif etki	0,37	0,004	1,5	Kayıtsız
<i>M. canis</i>	1,5	Kayıtsız	0,24	Sinerjik	0,28	Sinerjik	1	Kayıtsız
<i>M. nanum</i>	0,75	Aditif etki	0,49	Sinerjik	0,24	Sinerjik	1	Kayıtsız

ZY1: Distile su, ZY2: %5 Etanol, ZY3: %5 Metanol, ZY4: %1 DMSO (Dimetil sülfoksit), FLU: Flukanazol, FIC: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyon, FICI: FIC indeks

Tablo 5. Flukonazol ve eskraktların kombine MİK değerleri

Tür Adı	MİK Kombinasyon (mg/mL)							
	ZY1	FLU	ZY2	FLU	ZY3	FLU	ZY4	FLU
<i>T. rubrum</i>	12,5	0,008	1,56	0,008	0,78	0,004	6,25	0,016
<i>M. canis</i>	25	0,016	1,56	0,004	0,39	0,008	12,5	0,016
<i>M. nanum</i>	25	0,008	1,56	0,008	0,78	0,008	6,25	0,016

ZY1: Distile su, ZY2: %5 Etanol, ZY3: %5 Metanol, ZY4: %1 DMSO (Dimetil sülfoksit), FLU: Flukanazol, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon



Şekil 1. Oleuropein analitik standardının UV (Ultraviyole) spektrumu



Şekil 2. HPLC Kromatogramları: Siyah: ZY1, Kırmızı: ZY2, Mavi: ZY3, Yeşil: ZY4 ve oleuropein standardının (500 ppm) karşılaştırılması. Şekildeki ok piklerden rahatlıkla ayrılarak tek bir pik halinde görülmüştür. ZY1: Distile su, ZY2: %5 Etanol, ZY3: %5 Metanol, ZY4: %1 DMSO (Dimetil sülfoksit)

TARTIŞMA

Tüm ciddi mantar enfeksiyonlarının tedavisi için uygun antifungal tedaviye ihtiyaç vardır. Ancak zaman zaman bu amaç için kullanılacak antifungal ilaç sayısı sınırlı olabilmektedir. Global düzeyde görülen tekli ya da çoklu ilaç direnci yeni terapötik ajan arayışlarını artırmaktadır. Bu amaçla son yıllarda bilim dünyasında doğal biyoaktif bileşikler ve bunların kombinasyonlarına dair çalışmalar dikkat çekmektedir (18).

Olea europaea, antimikrobiyal çalışmalarda sıkça tercih edilen bir bitki türüdür ve içerdiği birçok fenolik bileşen içerisinden ana etkinin oleuropein kaynaklı olduğu bildirilmektedir (19). Bitki içerisindeki oleuropein için alkol ekstraksiyonu oldukça etkili bir yöntemdir (14,20). Alkol oranı arttıkça çözünen madde miktarı da artmaktadır ancak bu çalışmamızda solvent içerikleri toksisite veya inhibisyon oluşturmaması için düşük tutulmuştur. Oleuropein esas olarak Oleaceae familyasında bulunan, kemotaksonomik bir belirteç olarak kabul edilen önemli bir bileşiktir ve antifungal etkileri bildirilmiştir (21). Çalışmamızda kullanılan zeytin yaprağının en önemli bileşeni olan oleuropein miktarı RP-HPLC yöntemiyle ölçülmüş, en yüksek miktar 19,72 µg/mL ile metanol ekstraktında tespit edilmiştir. Benzer şekilde etanol, metanol, asetonitril ve su çözücülerini kullanarak yapılan bir çalışmada en yüksek verim %80 metanol çözeltisi ile elde edilmiş, en yüksek oleuropein miktarı 13,35 mg/g kuru yaprak olarak saptanmıştır (22). Kalaycioğlu ve ark. (23), oleuropein miktarını 11,7-106 mg/g kuru yaprak olarak belirlemişlerdir. Farklı çözücülerin kullanıldığı başka bir çalışmada, saf çözücülerin (%100 su, %100 metanol ve %100 etanol) oleuropein ekstraksiyonu için iyi çözücüler olmadığı, %80 etanolün en yüksek oleuropein içeriğini verdiği belirtilmektedir (24). Gerçekleştirilen bu çalışmada en düşük oleuropein miktarı (4,61 µg/mL) %100 su ile yapılan ekstraktta görülmüştür. Dolayısıyla bitki ekstraktlarındaki madde miktarının ekstrakt yöntemine ve seçilen çözücüye göre değişim gösterdiği görülmektedir (14).

Yapılan çalışmalarda oleuropein gibi farklı birçok etken maddenin ya da bitkisel ekstraktın antimikrobiyal etkileri olduğu ve bu etkinin ekstrakt içindeki madde konsantrasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir (25,26). Yakın zaman önceki bir çalışmada çeşitli solventlerle hazırlanan zeytin yaprağı ekstraktlarının MİK değerlerinin bakteriler

için 31,2-250 µg/mL arasında değiştiği bildirilmiştir (27). Zoric ve ark. (13) çalışmalarında *Candida albicans* için MİK değerini 12,5 mg/mL olarak tespit etmiştir. Ma'as (28) çalışmasında %70'lik *Olea europaea* yaprak ekstraktının *T. rubrum* için iyi bir antifungal olduğunu bildirmektedir. Çalışmamızda zeytin yaprağı ekstraktının %100 su, %5 etanol, %5 metanol ve %1 DMSO ile yapılan ekstraktlarının MİK değerleri sırasıyla *T. rubrum* ve *M. nanum* için 50/6,25/6,25/12,5 mg/mL, *M. canis* için 50/12,5/12,5/25 mg/mL bulunmuştur. Bununla birlikte çalışmamız dört farklı çözücüde ekstraksiyonu yapılan zeytin yaprağının, antifungal bir ilaç olan FLU ile etkileşiminin araştırıldığı ilk çalışma niteliğindedir. Ayrıca, zeytin yaprağı ekstraktlarının tek başına uygulandıklarında en çok metanol ve etanol ekstraktlarının mantar türleri üzerinde inhibe edici özelliği olduğu belirlenmiş, FLU ile birlikte uygulanması sonucunda da metanol ekstraktı ile olan kombinasyonun diğerlerinden daha etkili bir sinerjik etkiye sahip olduğu ilk kez ortaya konmuştur. Temiz ve Temur'un (14) yaptıkları çalışmada metanolün zeytin yaprağı içindeki oleuropeini daha iyi ekstrakte etmesi ve toplam fenolik madde miktarının metanolde en yüksek düzeyde bulunmuş olması da çalışmamız sonuçlarını destekler niteliktedir. Çünkü sinerjik etki için belli bir düzeyde madde miktarı gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar bitkisel etken madde konsantrasyonuna bağlı olarak antimikrobiyal etkinin de değiştiğini göstermektedir (26,29). Kombine etki çalışmalarından birinde zeytin yaprağı ekstraktı ve gümüş nitratlardan elde edilen nanopartiküllerin iyi bir antibakteriyel ve antifungal ajan olduğunu bildirilmiştir (30). Soares ve ark. (9) ise çalışmalarında bitkisel metabolit olan protokatekuik asit türevlerinin iyi bir antifungal olduğunu ve *T. rubrum* için flukonazol ile sinerjik etki oluşturduğunu (FICI: 0,49) tespit etmiştir. Çalışmamız sonuçlarından farklı olarak; zeytin yaprağı ekstraktının antibakteriyel bir ilaç olan kolistin ile kombinasyonunun araştırıldığı bir çalışmada; *Olea europaea* L.'nin etanolik özütünün sadece kinolon dirençli *Acinetobacter baumannii*'ye karşı güçlü aktiviteye sahip olduğunu, ancak kolistin ile birleştirildiğinde ilginç şekilde antagonistik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (11). Çalışmalar arasındaki farklı sonuçların mikroorganizmaların ve antifungal/antibakteriyel ilaç mekanizmaları arasındaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Genel olarak zeytin yaprağı ekstraktının antifungal etkisinde, mikrobiyal membran lipidleri arasındaki etkileşimi ana etken maddesi oleuropeinin ortodifenol yapısı ve diğer fenolik bileşikler sayesinde bozmasının rolünün olduğu düşünülmektedir. Mekanizma tam olarak açıklanamasa da buna yönelik çok sayıda araştırma mevcuttur (26). Zeytin ekstraktlarının içinde bulunan bazı alifatik aldehitlerin *T. mentagrophytes*, *M. canis* ve *Candida* spp. üzerine olan antifungal etkisi *in vitro* olarak gösterilmiştir. Bu maddelerin deri kolonizasyonunda dermatofitler için gerekli bir virülans faktörü olan elastazı inhibe etme yeteneği ile ilgili olabileceği ortaya konmuştur (31). Diğer bir çalışmada *Candida* spp. için önemli bir virülans faktörü olan SAP (Secretory aspartyl proteinase) enziminin oleuropein tarafından inhibe edildiği belirtilirken (13), başka bir çalışmada metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* için Daphne

genkwa L. ekstraktının oksasilin ile birlikte penisilin bağlayıcı proteinleri inhibe ettiği ve bu sinerjik etkinin bitkinin temel etken maddesi tiliroziden kaynaklandığını iddia etmişlerdir (32).

SONUÇ

Sonuç olarak çalışmamızla dört farklı çözücüde ekstraksiyonu yapılan zeytin yaprağının, antifungal bir ilaç olan FLU ile olan sinerjistik etkileşimi ilk kez ortaya konmuş ve zeytin yaprağı ekstraktlarının doz bağımlı olarak dermatofitoz tedavisinde etkili olma potansiyellerinin bulunduğu gösterilmiştir. Özellikle metanol ekstraktının tüm izolatlar için FLU ile oluşturduğu sinerjik etki kombine kullanımda yeni terapötikler açısından da umut vericidir. Sonuçlar benzer *in vitro* ve *in vivo* çalışmalara ışık açarken bulguların başka çalışmalarla da desteklenmesi uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. de Oliveira Lima MI, de Medeiros AA, Silva KS, Cardoso GN, de Oliveira Lima E, de Oliveira Pereira, F. Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. *J Mycol Med* 2017; 27(2): 195-202.
2. Aneke C I, Rhimi W, Otranto D, Cafarchia C. Synergistic effects of efflux pump modulators on the azole antifungal susceptibility of *Microsporum canis*. *Mycopathologia* 2020; 185(2): 279-88.
3. Nyilasi I, Kocsuóé S, Krizsán K, Galgóczy L, Papp T, Pesti M et al. Susceptibility of clinically important dermatophytes against statins and different statin-antifungal combinations. *Med Mycol* 2014; 52(2): 140-8.
4. Sakkas H, Economou V, Gousia P, Bozidis P, Sakkas VA, Petsios S et al. Antibacterial efficacy of commercially available essential oils tested against drug-resistant gram-positive pathogens. *App Sci* 2018; 8(11): 2201.
5. Ramata-Stunda A, Petrişu Z, Valkovska V, Boroduşkiş M, Gibnere L, Gurkovska E et al. Synergistic effect of polyphenol-rich complex of plant and green propolis extracts with antibiotics against respiratory infections causing bacteria. *Antibiotics (Basel)* 2022; 11(2): 160.
6. El Atki Y, Aouam I, El Kamari F, Taroq A, Nayme K, Timinouni M et al. Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *J Adv Pharm Technol Res* 2019; 10(2): 63-7.
7. Khan MSA, Ahmad I. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 90(3): 1083-94.
8. Ghandour A, Abdel-Rahim M, Bayoumi SAL, Sayed HM, El-Badawy O. Evaluation of antimicrobial and synergistic effects of some medicinal plant extracts on antimicrobial resistant organisms. *Microbes Infect Dis* 2021; 2(4): 807-18.
9. Soares LA, Gullo FP, Sardi Jde C, Pitangui Nde S, Costa-Orlandi CB, Sangalli-Leite F et al. Anti-trichophyton activity of protocatechuates and their synergism with fluconazole. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; 2014: 957860.
10. Endo EH, Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res Microbiol* 2010; 161(7): 534-40.
11. Ghaffaripour R, Samsamipour M, Eslamifar Z, Madmoli M. Inhibitory effect of hydroalcoholic extract of olive leaf (*Olea europaea*) on growth of *Candida albicans*. *Journal of Pharmaceutical Research International* 2019; 28(5): 1-8.
12. Nasrollahi Z, Abolhasannezhad M. Evaluation of the antifungal activity of Olive leaf aqueous extracts against *Candida albicans* PTCC-5027. *Curr Med Mycol* 2015; 1(4): 37-9.
13. Zorić N, Kosalec I. The antimicrobial activities of oleuropein and hydroxytyrosol. In: Rai M, Kosalec I, editors. *Promising antimicrobials from natural products*. 1st ed. Springer; 2022: p.75-89.
14. Temiz MA, Temur A. Effect of solvent variation on polyphenolic profile and total phenolic content of olive leaf extract. *YYÜ Tar Bil Derg* 2017; 27(1): 43-50.
15. CLSI, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, Approved Standard. 3rd edition. Wayne, PA, USA; Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. https://clsi.org/media/1894/m38ed3_sample.pdf.

16. White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(8): 1914-8.
17. Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex HJ. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(3): 693-715.
18. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis* 2017; 17(12): e383-92.
19. Mitsagga C, Petrotos K, Giavasis I. Antimicrobial properties of lyophilized extracts of olive fruit, pomegranate and orange peel extracts against foodborne pathogenic and spoilage bacteria and fungi in vitro and in food matrices. *Molecules* 2021; 26(22): 7038.
20. Koby O, Çağlak E, Kara B. Balıkesir-Ayvalık ve Trabzon-Çarşıbaşı'ndan toplanan zeytin yapraklarının (*Olea europaea* L.) Farklı yöntemlerle kurutulması ile elde edilen ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin karşılaştırılması. *J Anatol Environ Animal Sci* 2019; 4(2): 257-62.
21. Topuz S, Bayram M. Oleuropein extraction from leaves of three olive varieties (*Olea europaea* L.): Antioxidant and antimicrobial properties of purified oleuropein and oleuropein extracts. *J Food Process Preserv* 2022; 46(6): e15697.
22. Gümüşbulut G. Extraction of oleuropein from olive leaves (a thesis submitted to the graduate school Izmir Institute of Technology in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science in Chemical Engineering), 2020. <https://openaccess.iyte.edu.tr/bitstream/11147/11043/1/10375397.pdf>.
23. Kalaycıoğlu Z, Koparand M, Bedia E. Oleuropein levels of Anatolian olive leaves and correlated antioxidant, antidiabetic, and anti-inflammatory activities. *J Chem Metrol* 2020; 14(2): 133-41.
24. Yateem H, Afaneh I, Al-Rimawi F. Optimum conditions for oleuropein extraction from olive leaves, *Int J Appl Sci Technol* 2014; 4(5): 153-7.
25. Zehra A, Naqvi SBS, Ali SQ. In vitro evaluation of antimicrobial effect of extracts of medicinal plant's leaves. *J Med Microbiol Diag* 2016; 5(3): 236.
26. Bayram M, Topuz S, Kaya C. Antioxidant, antimicrobial activity of olive leaf extract and oleuropein, their possibilities usage in foods. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology* 2020; 8(2): 337-47.
27. Adem SR, Ayangbenro S, Gopane RE. Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Olea europaea* subsp. *Africana* against pathogenic microorganisms. *Sci African* 2020; 10: e00548.
28. Ma'as MFN. Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol 70% Daun Zaitun (*Olea europaea* L.) Terhadap *Candida albicans*, *Aspergillus niger* dan *Trichophyton rubrum*. UIN Syarif Hidayatullah University Jakarta, Bachelor's thesis; 2019. <https://repository.uinjkt.ac.id/dspace/bitstream/123456789/49578/1/Muhammad%20Farhan%20Naufal%20Ma%27as-FIKES.pdf>.
29. Kaltaloğlu K, Karaköse M, Şahin H, Bektaş E, Bektaş Kİ. Gümüşhane ilinde yayılış gösteren bazı tıbbi bitkilerin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin ve RP-HPLC-DAD ile fenolik bileşenlerinin belirlenmesi. *Gümüşhane Üniv Fen Bil Derg* 2019; 9(2): 362-72.
30. Essghaier B, Ben Khedher G, Hannachi H, Dridi R, Zid MF, Chaffei C. Green synthesis of silver nanoparticles using mixed leaves aqueous extract of wild olive and pistachio: Characterization, Antioxidant, Antimicrobial and effect on virulence factors of *Candida*. *Arch Microbiol* 2022; 204(4): 1-13.
31. Battinelli L, Daniele C, Cristiani M, Bisignano G, Saija A, Mazzanti G. In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. fruit. *Phytomedicine* 2006; 13(8): 558-63.
32. Kuok CF, Hoi SO, Hoi CF, Chan CH, Fong IH, Ngok CK et al. Synergistic antibacterial effects of herbal extracts and antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A computational and experimental study. *Exp Biol Med* 2017, 242(7): 731-43.

Sorumlu yazar

İsmail YILMAZ (Doç. Dr.)
İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, İzmir
35360, Karabağlar, İZMİR
Tel: +90232 243 43 43/1798
Fax: 0232 243 15 30
E-posta: driyilmaz@yahoo.com
ORCID: 0000-0002-4474-9617

Nisa SİPAHİ (Öğr. Gör. Dr.) ORCID: 0000-0001-8915-3545
Pınar Göç RASGELE (Doç. Dr.) ORCID: 0000-0002-7558-3138
Ayşe Iğın KEKEÇ (Araş. Gör.) ORCID: 0000-0002-0821-8376
Ertuğrul KAYA (Prof. Dr.) ORCID: 0000-0003-0081-682X