

## Araştırma Makalesi

Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg 2020; 13(3):371-381

doi:10.26559/mersinsbd.718890

### ***Pelargonium endlicherianum* fenzl. uçucu yağı ve penisilin kombinasyonlarının *streptococcus pneumoniae*'ye karşı sinerjik potansiyeli**

 Berrak Dumlupınar<sup>1</sup>,  Gökçe Şeker Karatoprak<sup>2</sup>

<sup>1</sup> İstanbul Gelişim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü

<sup>2</sup> Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı

#### Öz

**Amaç:** *Pelargonium endlicherianum* uçucu yağının enfeksiyon tedavilerinde sıklıkla kullanılan benzilpenisilin ile kombine edilerek in vitro deney modeli içerisinde *Streptococcus pneumoniae*'ye karşı antimikrobiyal etkisinin ortaya çıkarılması ve insan lökosit hücreleri üzerindeki fonksiyonun tespit edilmesi amaçlandı. **Yöntem:** *P. endlicherianum* uçucu yağının benzilpenisilin ile kombine kullanımının *Streptococcus pneumoniae*'ye karşı antimikrobiyal etkisi agar difüzyon tekniği kullanılarak ve lökosit hücreleri üzerindeki fagositik fonksiyonları in vitro hücre deney modeli içinde insan lökosit hücresi WBC 264-9C ATCC HB-8902 kullanılarak ortaya çıkarılmıştır. *P. endlicherianum* uçucu yağ ve benzilpenisilin bakterisidal etkisi zamana bağlı öldürme yöntemi ile zamana ve antibiyotik yoğunluğuna bağlı olarak dinamik olarak ortaya konuldu. Uçucu yağın tek başına ve antibiyotik ile kombine kullanıldığında bakteriyel dış membrandaki geçirgenliği U.V. spektrofotometre ve morfolojik görüntüsü taramalı elektron mikroskobu ile analiz edildi. **Bulgular:** Tedavi sonrası 24. saatte, ilaç kombinasyonu sadece uçucu yağ tedavisi ile karşılaştırıldığında, yaşayabilir hücre sayısında azalma olduğu gözlemlendi. Uçucu yağ+antibiyotik kombinasyonlarında uçucu yağ ve antibiyotik arasında sinerjizm gözlemlenmiş olup, lökosit hücrelerinin fagositik aktivitesi artarak canlı bakteri sayısında belirgin bir düşüş belirlendi. **Sonuç:** Çalışmanın sonuçlarına göre *S. pneumoniae*'ye karşı kullanılan benzilpenisilin *P. endlicherianum* uçucu yağı ile kombine kullanımı sonucu antibiyotik etkinliğinin arttığı ve böylece bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi engellenerek etkin bir tedavi sağlanabileceği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Pelargonium endlicherianum* Fenzl., uçucu yağ, benzilpenisilin, antimikrobiyal aktivite

---

Yazının geliş tarihi:12.04.2020

Yazının kabul tarihi: 10.10.2020

**Sorumlu Yazar:** Berrak Dumlupınar, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Cihangir, Şehit Jandarma Jandarma Komando Er, J. Kom. Er Hakan Öner Sk. No:1, 34310 Avcılar/İstanbul, Tel(iş):0212 4227000/401, E-posta: baltinsoy@gelisim.edu.tr

## Synergic potential of pelargonium endlicherianum fenzl. essential oil and penicillin combination against streptococcus pneumoniae

### Abstract

**Aim:** The main aim of the study is to combine Pelargonium endlicherianum essential oil with benzylpenicillin used in the treatment of infection, revealing the antimicrobial effect against *S. pneumoniae* in human in vitro experimental model and its functions on human leukocyte cells. **Method:** The antimicrobial effect of the use of *P. endlicherianum* essential oil combined with benzylpenicillin against *Streptococcus pneumoniae* was demonstrated using agar diffusion technique and its phagocytic functions on leukocyte cells in an in vitro cell assay model using the human leukocyte cell WBC 264-9C ATCC HB-8902. Bactericidal effect of essential oil and antibiotic combination was dynamically detected by the method of Time Kill assay, was analyzed by U.V spectrophotometer and morphologic images was analysed by scanning electron microscopy. **Results:** A reduction in the number of viable cells was observed at 24 hours after treatment, when the drug combination was compared only with essential oil treatment. In essential oil + antibiotic combination, synergism was observed between essential oil and antibiotic, and the phagocytic activity of leukocyte cells increased, and a significant decrease in the number of live bacteria was determined. **Conclusion:** According to the results, the use of benzylpenicillin, which are used in infection treatments, together with a phytochemical *P. endlicherianum* essential oil, increases the effectiveness of antibiotic and thus, it has been shown that an effective treatment can be achieved by preventing bacteria from developing resistance to antibiotics.

**Keywords:** Pelargonium endlicherianum Fenzl., essential oil, benzylpenicillin, antimicrobial activity

### Giriş

Günümüzde bakteriyel enfeksiyon tedavilerinde antibiyotik kombinasyonları kullanılmaktadır. Ancak kombine antibiyotik tedavisi sadece maliyetin artmasına neden olmaz, aynı zamanda uygun olmayan antibiyotik kombinasyonları kullanıldığında, beklenen terapötik yarar sağlanamadığı gibi, istenmeyen etkilerin görülmesine de neden olur. Kombine antibiyotik tedavisi sırasında normal flora daha fazla inhibe olur ve dirençli mikroorganizmaların kolonizasyonunda artış gözlenir, çoğul dirençli Gram-negatif çomaklar ortaya çıkabilir.<sup>1-3</sup> Kombinasyon tedavisi sırasında oluşan süper enfeksiyonlar tek ajanla oluşandan çok daha fazladır. Bu nedenle antibiyotik tedavisi mümkün olduğu kadar dar spektrumlu olmalıdır.<sup>1,4</sup> Kombine antibiyotik tedavisi antibakteriyel ajanların toksik yan etki görülme riskini de artırır. Örneğin aminoglikozidlerin, vankomisin, sefalotin veya üçüncü kuşak sefalosporinlerle kombine edilmesi nefrotoksisite riskinin artışına neden olur.<sup>2</sup> Öte yandan, kombine antibiyotik tedavisi

altında bir yan etki ortaya çıktığında bunu belirli bir antibiyotiğe bağlamak zordur; bu nedenle tüm antibiyotiklerin kesilmesi hastanın tedavi süresinin uzamasına ve maliyetin artmasına neden olmaktadır. Bu hem zaman kaybettirir hem pahalıdır hem de hastanın tedavisini geciktirmektedir. Örneğin vankomisin ve aminoglikozit kombinasyonu daha sık enjeksiyon ve serum düzeyi takibi gerektirir. Nefrotoksisitenin yakından takibi ve izleme vb. muayeneler de tedavinin maliyetinde artışa neden olur.<sup>1,2</sup> Antibiyotiklere dirençli bakterilerin artışı ilaç dirençli bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlarda tedavinin başarısızlığına yol açmaktadır. Bu nedenle, bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede alternatif stratejilere ihtiyaç vardır. Bu çalışma ile *P. endlicherianum* türünden elde edilen uçucu yağın bakteriyel menenjit tedavilerinde sıklıkla kullanılan penisilin ile kombine edilmesi, antibiyotik ile uçucu yağın fizikokimyasal etkileşimlerle birlikte hareket ederek *S. pneumoniae*'ye karşı direnç mekanizmalarını inhibe etmesi sağlanarak

antibiyotik kullanımını azaltmak mümkün olabilmektedir.

Literatürde uçucu yağlar ile antibiyotiklerin kombine kullanımının sinerjistik etki göstererek mikroorganizmalar üzerinde antibakteriyel etkisini artırdığı rapor edilmiştir.<sup>5-7</sup> Günümüzde doğal kaynaklı ürünlere ilginin artmasıyla bilimsel alanda bu yöndeki çalışmalar da hız kazanmıştır. Uçucu yağlar, eski çağlardan günümüze kadar kullanılan gelen aromatik karışımlardır. Koku, tat maddesi olarak kullanılmalarının dışında farklı biyolojik aktiviteleri nedeniyle sağlık alanında da kullanımları bulunmaktadır. Bir çok *Pelargonium* türü, hibritleri ve bunlardan elde edilmiş kültürleri uçucu yağ üreten kokulu yapraklara sahiptirler.<sup>8</sup> *Pelargonium* uçucu yağı Geranium oil olarak bilinir ancak yağ eldesinde kullanılan türlerin tamamı *Pelargonium*'dur. Geranium uçucu yağının aromaterapide; premenstrual gerginlik ve menopozal problemlerde, lenfatik sistem ve immün sistem stimülasyonunda, dolaşım problemleri, hemoroit ve flebit, boğaz ağrısı, tonsilit, astım, aşırı mukus salgılanması gibi durumlarda kullanımı mevcuttur.<sup>9</sup> Ülkemizde yetişen *P. endlicherianum* üzerinde toprak üstü kısımlarının kimyasal analizi ve çeşitli biyolojik aktivitesi gösterilmiştir.<sup>10-12</sup>

Literatürde *P. endlicherianum* köklerinden elde edilen metanol ve etanol ekstraktlarının bazı mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal etkisi bildirilmiştir.<sup>13</sup> Fakat bu türden elde edilen uçucu yağların patojen mikroorganizmalar üzerinde inhibe edici etkisine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. *P. endlicherianum* türünden elde edilen toprak üstü kısımlara ait uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesi çalışılmamış olup, türün uçucu yağının penisilin ile kombine kullanımı sonucu *S. pneumoniae*'ye karşı antimikrobiyal etkisi ve bu uçucu yağ ile kombine olarak kullanılan penisilin insan lökosit hücrelerinde fagositozu nasıl etkilediğinin tespiti bu çalışma kapsamında amaçlandı.

## Yöntem

### *Bitkisel Materyal*

Çalışmamızda *P. endlicherianum* 2015 yılının Temmuz ayında Kayseri ilinin Develi ilçesinden toplanmıştır. Bitkinin herbaryum örneği Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Herbaryumu'nda saklanmaktadır (Bitki toplayıcı no: GK-1003).

### *P. endlicherianum* fenzl. uçucu yağ eldesi

*P. endlicherianum* toprak üstü kısımlarından Avrupa Farmakopesine göre Clevenger apareyinde hidrodistilasyon yöntemi ile uçucu yağ elde edildi. Bitkinin toprak üstü kısımları 100 g tartılarak Clevenger apareyinde 2 litrelik balona yerleştirilip üzerine balonun 2/3'üne kadar su ilave edilip 3 saatlik distilasyona tabi tutuldu.

### *Bakteri kültürünün hazırlanması*

Çalışmalarda kullanılan *S. pneumoniae* ATCC 49619, Amerikan tipi kültür koleksiyonundan (ATCC) temin edildi. *S. pneumoniae* Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda Brain Heart Infusion Agar (BHA) besiyerine ekilerek 24 saat %5'lik CO<sub>2</sub> ortam şartlarında üretildikten sonra bulanıklığı McFarland 0.5 olacak şekilde ayarlanmıştır.<sup>14</sup>

### *MİK değerlerinin belirlenmesi*

Uçucu yağın dahil olduğu kuyucukların spektrofotometre değerleri ölçüm yapılan aralıkta standart bir sonuç vermediği için mikrodilüsyon yöntemi ile minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) çalışmalarında antimikrobiyal etki tespit edilemedi ve çalışmanın bu basamaklarına agar difüzyon tekniği kullanılarak devam edildi. Antibiyotik başlangıç konsantrasyonları EUCAST klinik sınır değer tablosuna göre iki üst konsantrasyonlar seçilerek dilüsyonları yapıldı.<sup>14,15</sup>

### *Zamana bağlı öldürme yöntemi*

Zamana bağlı azalma için farklı zamanlarda canlı bakteri sayımı yapıldı.

Kontrol tüpü ve antibiyotik/ uçucu yağ/ antibiyotik+uçucu yağ içeren tüpleri bakteri ile inoküle edildikten sonra 0, 3, 6, 12 ve 24. saatlerde örnekleme yapıldı. Çalışılan saatlerde her konsantrasyon için farklı dilüsyonlarla ekim yapılarak ve koloniler sayıldı.<sup>6</sup> Deney iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

#### *Uçucu yağ+antibiyotik kombinasyonu ile inkübasyon*

Mc Farland 0,5 bulanıklığına gelen bakteri süspansiyonu kombinasyonları oluşturulan uçucu yağ ve antibiyotik tek başlarına ve MİK değerlerine göre her bir kombinasyonla, 37°C'de çalkalayıcı etüvde 2 saat inkübe edildi. Inkübasyonun ardından antibiyotik ve uçucu yağ kombinasyonu uzaklaştırıldı. Daha sonra bakteri sayısı mililitrede koloni oluşturan birim olarak (kob/mL)  $5 \times 10^7$ 'ye ayarlandı.

#### *Lökosit hücrelerinin aktivasyonu*

*In vitro* lökosit hücresi modeli olarak WBC 264-9C ATCC HB-8902 insan lökosit hücreleri kullanıldı. WBC 264-9C hücreleri 37°C sıcaklıkta, %5 karbondioksit içeren steril inkübatörde kültüre edildi.<sup>16</sup>

WBC 264-9C ATCC HB-8902 insan lökosit hücreleri ( $1 \times 10^7$  hücre/ml) süspansiyonun üzerine yaklaşık  $2 \times 10^7$  bakteri içerecek şekilde bakteri süspansiyonu ilave edildi sonra tüpler, 37°C'de su banyosunda inkübe edildi. Lökositlerin antibiyotikle muamele edilmiş ve edilmemiş, deney ve kontrol bakterilerini öldürme miktarını bulmak için, 0., 2., 4., 8. ve 12. saatlerde tüplerden örnek alınıp patlatılıp dilüe edilen lökositler Brain Hearth Infusion Agar (BHA) besiyeri yüzeyine ekildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra koloniler sayılarak, mL'deki bakteri sayıları bulundu.<sup>17,18</sup>

#### *Dış membran geçirgenliğinin belirlenmesi*

Uçucu yağın tek başına ve antibiyotik kombinasyonları ile kullanıldığında bakteriyel dış membrandaki geçirgenliği Hemaiswarya ve Doble ve Marri ve ark. metodlarına göre tespit edildi.<sup>19,20</sup> Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) %0.1 nihai

konsantrasyonda kullanıldı. SDS'in yol açtığı ani hücre ölüm belli aralıklarla (0, 5., 10., 30. ve 60. dakika) UV-vis spektrofotometre ile 625 nm'de tespit edildi.<sup>6</sup>

#### *Taramalı elektron mikroskobu*

Uçucu yağın tek başına ve antibiyotik ile kombine kullanımının bakteriler üzerindeki etkisini tespit etmek amacıyla bakteri hücreleri BHB besiyeri içinde 37°C'de 16 saatlik inkübasyondan sonra taramalı elektron mikroskobunda (SEM) gözlendi.

#### *İstatiksel yöntemler*

Çoklu grupların karşılaştırılması ve sinerjetik etkinin tayini için sırasıyla tek yönlü ANOVA ve post hoc testleri yapılmış n sayısı 5'ten az olduğu için Benferroni düzeltilmesi yapılarak Tukey biweight testi uygulandı. İkili grupların karşılaştırılmasında (Time Kill Yöntemi) için Wilcoxon testi ile analiz edildi. Lökosit tayini için hastalıklara göre gruplar Freidman Testi kullanılarak karşılaştırıldı.

## **Bulgular**

#### *Minimum inhibitör konsantrasyon (mik) zon değerleri*

*S. pneumoniae* penisiline karşı duyarlıdır. MİK sınır değeri 0.5 mg/L olarak tespit edildi. Uçucu yağın *S. pneumoniae*'ye karşı MİK değeri 20 mg/mL, zon değeri  $9 \pm 0$  mm, penisilin MİK değeri 0.5 µg/mL zon değeri  $14 \pm 0$  mm olarak tespit edildi. Penisilin uçucu yağ ile kombine kullanılması ile MİK değeri 0.125 µg/mL, MİK zon çapı  $11 \pm 0$  olarak tespit edildi (Tablo 1).

#### *Zamana bağlı öldürme yöntemi*

Zamana bağlı öldürme çalışmasında uçucu yağ ile penisilin arasındaki sinerjistik etkileşim gözlendiği veriler Şekil 1'de gösterildi. Zamana bağlı canlı bakteri sayısındaki azalmanın tespitine yönelik yapılan bu çalışmada penisilin ve uçucu yağ + penisilin grupları arasında anlamlı fark bulundu ( $p=0.002$ ). Tedavi sonrası 24. saatte, ilaç kombinasyonu sadece uçucu yağ

tedavisi ile karşılaştırıldığında, yaşayabilir hücre sayısında azalma olduğu gözlemlendi. Buna karşılık, tek başına olan ilaç tedavisinin, hücre sayılarını etkili bir şekilde azaltmadığı görüldü.

#### Lökosit hücrelerinin aktivasyonu

*P. endlicherianum* uçucu yağının insan lökosit hücrelerinin fagositik aktivitesi üzerindeki doğrudan etkisini araştırmak için, bu yağın tespit edilen MİK değeri penisilin ile kombine halde verilerek *in vitro* fagositik aktivitesi test edildi. Penisiline önceden maruz kalma ile belirlenen lökosit hücrelerinin bakterisit aktivitesinin güçlendirilmesine ilişkin veriler Tablo 2'de verildi. Antibiyotik ve antibiyotik+uçucu yağ tedavisi insan lökosit hücrelerinin kontrol değerleri ile karşılaştırıldığında fagositik aktivitesini anlamlı bir şekilde artırdığı görüldü ( $p<0.022$ ). *S. pneumoniae*'ya karşı 4. saatten itibaren penisilin+uçucu yağ kombinasyonunda sadece penisilin uygulanan grup ile kıyaslandığında lökosit hücrelerinde fagositik aktiviteyi artırdığı gözlemlendi ( $p<0.001$ ). Test edilen uçucu yağ+penisilin kombinasyonunda uçucu yağ ve penisilin

arasında sinerjizm gözlemlendi, lökosit hücrelerinin fagositik aktivitesi artarak canlı bakteri sayısında belirgin bir düşüş belirlendi ( $p<0.050$ ).

#### Dış membran geçirgenliği

SDS'in yol açtığı ani hücre ölümü tespit etmek amacıyla belli aralıklarla (0, 5., 10., 30. ve 60. dakika) absorbanslar arasındaki farklılıklar Tablo 3'de gösterildi. En az ölüm sadece SDS'in kullanıldığı kontrol gruplarında görüldü ( $p<0.001$ ). Penisilin ile uçucu yağ kombinasyonunun *S. pneumoniae* için daha etkili membran hasarı sağladığı görüldü ( $p<0.001$ ).

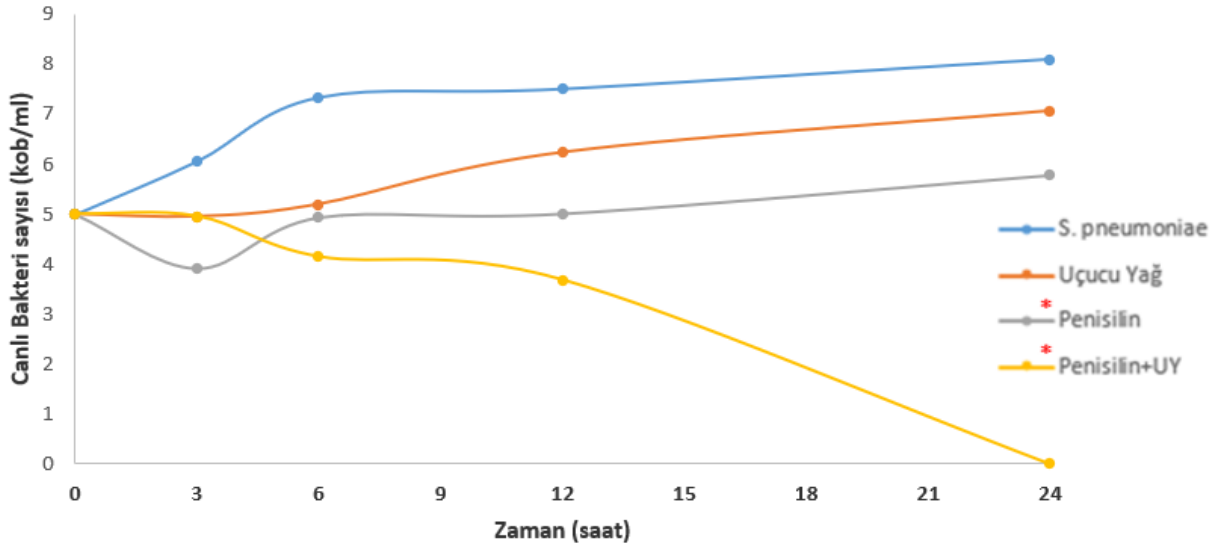
#### Taramalı elektron mikroskobu

Elektron mikroskobu sonuçları, uçucu yağ ve antibiyotik kombinasyonu ile muameleden sonra *S. pneumoniae* üzerinde ayrıntılı hücre hasarını göstermektedir (Şekil 2). Taramalı elektron mikrofisi, uçucu yağ ile muamele edilen genel bakteri hücre yüzeyinin, uçucu yağ ile muamele edilmemiş bakteri hücrelerinden yapısal olarak önemli ölçüde farklılık göstermiştir.

**Tablo 1.** Penisilin ve penisilin+uçucu yağ kombinasyonunun *S. pneumoniae*'ye karşı MİK zon değerleri

Penisilin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Zon çapı (mm)	Uçucu yağ (mg/mL)	Zon çapı (mm)	*Penisilin + uçucu yağ	Zon çapı (mm)
16	21±0	80	16.5±1.5	4	26±0
8	18.5±0.5	40	12.5±0.5	2	22±0
4	15.5±0.5	20	9±0	1	19±0
2	14.5±0.5	10	-	0.5	17±0
1	14±0	5	-	0.25	14±0
0.5	14±0	2.5	-	0.125	11±0
0.25	-	1.25	-	0.06	-
0.125	-	-	-	0.03	-

\*Penisilin+uçucu yağ kombinasyonundaki antibiyotiğin konsantrasyon değeri verilmiştir.  $\mu\text{g/mL}$ : mikrogram/mililitre, mm: milimetre, mg: miligram



**Şekil 1.** Uçucu yağ, penisilin ve her ikisinin kombinasyonunun *S. pneumoniae*'ye karşı Zamana bağlı öldürme analizi

\*Penisilin ve uçucu yağ + penisilin uygulanan gruplar arasında anlamlı fark bulunmuştur (p=0.002).

**Tablo 2.** Lökositlerin penisiline maruz kalan *S. pneumoniae* üzerine fagositik etkisi

Lökositler ile inkübasyon ve zaman (saat)	Kontrol (log kob/mL)	Penisilin (log kob/mL)	*Penisilin + Uçucu yağ (log kob/mL)
0	6.94±0.10	6.88±0.10	6.28±0.94
2	6.88±0.10	6.64±0.10	5.86±0.47
4	6.94±0.10	5.60±0.10	¥2.34±0.26
8	2.89±0.19	2.70±0.30	0.65±0.00
12	2.17±0.00	1.30±0.30	0.00±0.00

log kob/mL:1 mililitrede logaritmik canlı sayısı

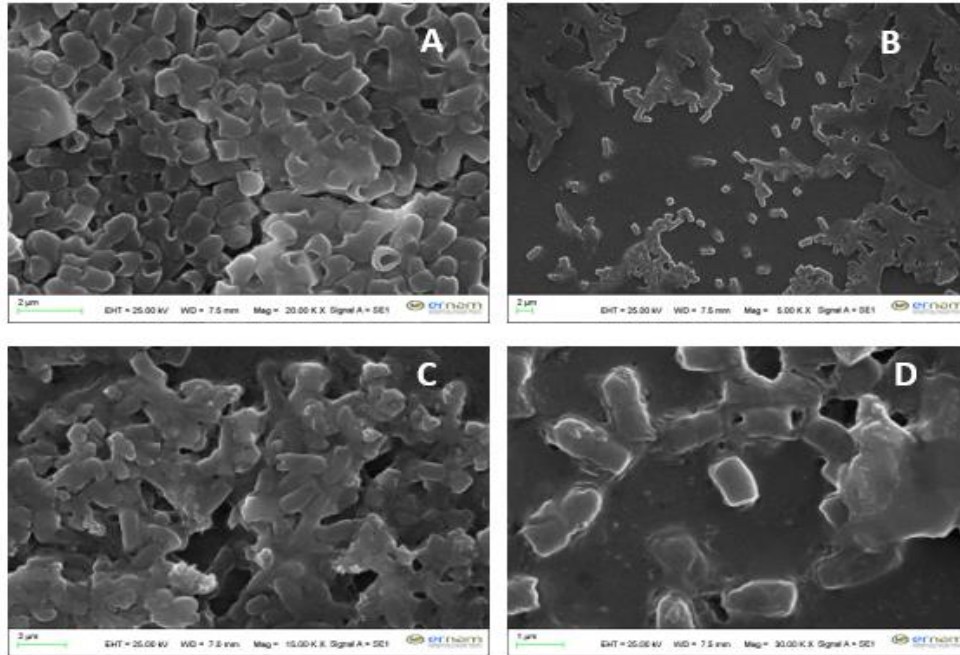
\*p<0.022; Kontrol ile kıyaslandığında, ¥p<0.001; Penisilin ile kıyaslandığında.

**Tablo 3.** Uçucu yağ, penislin ve uçucu yağ+penisilin kombinasyonu tarafından *S. pneumoniae*'nin membran geçirgenliğinin azaltılması

OD <sub>625</sub> = SD (n=3)					
Zaman (dk)	0	5	10	30	60
<i>S. pneumoniae</i> (Kontrol)					
%0.1 SDS ile	0.31±0.010	0.31±0.005	0.31±0.01	0.31±0.012	0.32±0.011
%0.1 SDS ilavesiz	0.30±0.007	0.30±0.006	0.29±0.010	0.31±0.002	0.31±0.008
Uçucu yağ (20mg/L)					
%0.1 SDS ile	0.29±0.008	0.29±0.018	0.28±0.018	0.28±0.025	0.26±0.031
%0.1 SDS ilavesiz	0.29±0.003	0.28±0.010	0.28±0.017	0.27±0.024	0.25±0.033
Penisilin (0.5 mg/L)					
%0.1 SDS ile	0.31±0.006	0.29±0.006	0.26±0.011	0.25±0.002	0.24±0.004
%0.1 SDS ilavesiz	0.30±0.002	0.29±0.006	0.28±0.003	0.27±0.020	0.24±0.008
*Uçucu yağ +Penisilin					
%0.1 SDS ile	0.28±0.003	0.26±0.010	0.26±0.007	0.24±0.005	0.22±0.007
%0.1 SDS ilavesiz	0.28±0.009	0.26±0.003	0.28±0.006	0.24±0.006	0.22±0.003

OD: Optik dansite, Dk: Dakika, mg/L: miligram/Litre

\*p<0.001; Penisilin ile kıyaslandığında.



**Şekil 2.** Taramalı elektron mikroskobu altında *S. pneumoniae* (A) İşlemsiz hücreler (kontrol), (B) *P. endlicherianum* uçucu yağı (%0.012 (v/v)), (C) penisilin (500 µg/mL) ve (D) uçucu yağ (%0.012 (v/v) + penisilin (500 µg/mL)

## Tartışma

*P. endlicherianum* uçucu yağının GK/KS sistemi ile analiz edildiği başka bir çalışmamızda, uçucu yağın ana bileşenleri  $\beta$ -burbonen (%15.5), 2-feniletıl-2-metilbutirat (%10.5), heksahidrofarneşil aseton (%7.7),  $\alpha$ -pinen (%58), germakren D (%5.3) ve  $\beta$ -pinen (%5.1) olarak tespit edilmiştir.<sup>12</sup> Ülkemizde yetişen *P. endlicherianum* üzerinde toprak üstü kısımları ile yapılmış başka bir çalışmada uçucu yağda germakren-D,  $\beta$ -karyofillen, T-kadinol,  $\alpha$ -karyofillen,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen ana bileşenler olarak bulunmuştur.<sup>10</sup> Çalışmamızda, *P. endlicherianum*'dan elde edilen uçucu yağ *S. pneumoniae*'ye karşı önemli bir antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Bu antimikrobiyal aktivite ve kimyasal bileşim arasındaki korelasyon, test edilen uçucu yağ aktivitesinin yüksek konsantrasyonda  $\alpha$ -pinen ve  $\beta$ -pinen gibi monoterpen hidrokarbonların varlığı ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesine katkıda bulunan  $\alpha$ -pinen ve  $\beta$ -pinen hidrokarbonlarının antimikrobiyal ve antifungal aktiviteleri ile  $\beta$ -burbonen ve germakren D gibi seskiterpenlerin ve monoterpenlerin bakteriyostatik aktiviteleri literatürde gösterilmiştir.<sup>21-24</sup> Daha önceki çalışmamızda elde edilen *P. endlicherianum* uçucu yağının bazı antibiyotikler ile kombine kullanımı *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı sinerjistik etki göstererek bakteri üzerinde antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir.<sup>12</sup>

Geri dönüşü olmayan zar hasarının, uçucu yağ bileşenlerinin birikmesinden dolayı hücre zarının asitlenmesi ve protein denatürasyonundan kaynaklandığı ileri sürülmektedir.<sup>25</sup> ve bu hipotez, bu çalışmada dış membran geçirgenliği testinin sonuçları ile desteklenmiştir.

Antibiyotiğin konakçı savunması ile etkileşimi veya ön maruz kalma sırasında bakteriyel hücre yüzeyindeki değişiklikler mikroorganizmaları fagositoza ve hücre içi öldürmeye karşı daha duyarlı hale getirerek lökosit hücrelerinin fagositik aktivitesini destekleyebilir.<sup>26</sup>

Belirli bir antibiyotiğin yaygın kullanımına cevap olarak dirençli bakteriyel suşlar ortaya çıkmaktadır. Başlıca ve spesifik direnç

mekanizmalarının tespiti, bilim insanlarına yeni terapötiklerin geliştirilmesine yönelik stratejiler hakkında bilgi sağlamaktadır. Enfeksiyon etkeni bakterilerde antibiyotiklerin etkinliğini arttırmak için, antibiyotiklerin difüzyonunu artıran ve bakteriyel membran bariyerini atlayan yöntemleri araştırmak ve incelemek gerekir. Bu çalışmada, penisilinin *S. pneumoniae* üzerinde etki mekanizması *P. endlicherianum*'dan elde edilen uçucu yağ ile kombine edildiğinde daha da genişletilmiş ve penisilin etkinliğinin artırılması ile sonuçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, dış membran geçirgenlik testinin sonuçları, dış zar bariyerinin, uçucu yağın varlığı ile bozulduğunu ve antibiyotiklerin, sitoplazmik membranın dış yüzeyinde lokalize olan penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP'ler) bağlanma etkilerini önemli ölçüde arttırdığı ortaya koymuştur.<sup>27</sup>

Penisilinin tek başına yüksek konsantrasyonları, hücrelerde SDS akını olmasına rağmen dış membran geçirgenliğini artırmamıştır ve bu nedenle, beta-laktam antibiyotiklerin hidrofilik doğası nedeniyle, Optik Dansite (OD) okumaları bu deney boyunca önemli ölçüde azalmamıştır ( $p>0.05$ ). Bakteriyel hücre zarlarının ölümcül yaralanması, hücre geçirgenliğini bozabilir ve bu nedenle, zarın, osmoz yeteneğini etkileyebilir.<sup>28</sup> SDS, kimyasal yapısı nedeniyle bakterilerin sitoplazmik membranını kolayca çözer, ancak bu çalışmada kullanılan %0.1 SDS ile muamele, penisilin ve/veya uçucu yağın %0.1 SDS olmadan yapılan kontrolleri ile karşılaştırıldığında herhangi bir önemli litik etkiye neden olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, SDS'ye uzun süre maruz kalmanın bir sonucu olarak olası hücre litik reaksiyonunu önlemek için bu deneyin süresi 60 dakika ile sınırlandırılmıştır. İnhibitör konsantrasyonun da ki uçucu yağ bakteriyi SDS'e karşı hassaslaştırmıştır. Bu bulgular, *P. endlicherianum* uçucu yağında bulunan ana bileşenlerden olan burbonen ve germakren D gibi seskiterpenlerle yapılan çalışmalarda büyük ölçüde uyum içindedir; Seskiterpenoitler, ekzojen antimikrobiyal bileşiklere duyarlılığı ve bakteri membran geçirgenliği arttırarak bakteri hücre zarının bozulmasında rol oynamaktadır.<sup>29</sup> Diğer hücresel yapılar da hücre zarı bozulması



nedeniyle bakteriyel hücre duvarı lizisine neden olur, ardından hücre içi yoğun madde kaybı gerçekleşir.<sup>30</sup>

Uçucu yağların çok çeşitli polifenol ve terpenoitleri içerdiği bilinmektedir. Bu fenoller, yüksek lipofilik özellikleri nedeniyle protein veya glikoproteinler gibi farklı moleküler yapılara güçlü bir bağlanma afinitesine sahiptir. Bu nedenle, hücre membranları için büyük eğilimlere sahiptirler ve hücre duvarlarının içinden nüfuz etme potansiyeli gösterirler, bu da hücre içeriğinin sızmasına neden olur.<sup>31</sup> Genel olarak, uçucu yağlar gram negatif bakterilere kıyasla gram pozitif bakterilere karşı daha etkilidir.<sup>32,33</sup>

Taramalı elektron mikroskopisinde gözlenen letal etki zar yapısının bozulmasından kaynaklanıyor olabilir ve daha önceki çalışmalar bu hipotezi desteklemektedir.<sup>34,35</sup> Uçucu yağ ve penisilin ile kombine edilen hücreler, boyut ve şekil değişiklikleri ile brüt hücre hasarı göstermiştir. Ancak taramalı elektron mikroskopu ancak kalitatif bir gözlem sağlayabilir. Kontrole kıyasla değişikliklerin büyüklüğü hakkında bir ölçüm sağlamaz; bunun yerine, hücrenin fizyolojik durumuna fiziksel olarak zarar verdiğinin kanıtıdır.

Bu çalışmada, *P. endlicherianum* uçucu yağının antibiyotiklerle birlikte kullanılmasında menenjit etkeni bakteriyel enfeksiyonlara karşı yeni tedavi yöntemi olarak kullanılabilirliği tespit edilmiştir. Uçucu yağın önerilen ana etki şekli hem öldürücü hem de ölümcül konsantrasyonlarda bakteri zararının parçalanması ve ardından antibiyotiğin bakteri hücresi içine özgü olmayan hareketliliğinin artırılmasıdır. Çalışmamızın sonuçları uçucu yağın sadece membran geçirgenleştirme aktivitesine değil, aynı zamanda insan lökosit hücrelerinde fagositik aktiviteye de sahip olduğunu göstermiştir. Uçucu yağın heterojen bileşimi göz önüne alındığında, etki tarzının burada gösterilenden daha karmaşık olması muhtemeldir. Bu bakış açısına göre, etki mekanizmaları hakkında edinilen bilgiler sınırlı olmakla birlikte, bu bileşiklerin antibiyotiklere karşı direnç kazanmış mikroorganizmaların elimine edilmesinde kullanılabilirliği üzerine yoğunlaşmak ve söz

konusu mekanizmaları anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Menenjit tedavilerinde kullanılan güncel antibiyotiklerle birlikte terapötik bir seçenek olarak kullanılmak üzere uçucu yağın pratik uygulamalarını doğrulamak için çok önemlidir. Uçucu yağlar ile yapılan *in vitro* çalışmalar sinerjistik etkili olduklarını göstermesi açısından umut verici olmasına rağmen, insan vücudundaki bu doğal ürünlerin ve olası olumsuz bitki-ilaç etkileşimlerinin, stabilite, seçicilik ve biyoyararlanımlarının araştırılması gerekmektedir.

### Teşekkür

Bu çalışmada, 216S666 projesine mali destek sağladığı için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederiz. Çalışmamıza istatistiksel olarak destek sağlayan Eda Merve Kurtuluş'a teşekkür ederiz.

**Yazar katkısı:** Berrak Dumlupınar: Minimum inhibisyon konsantrasyon tespiti, Time Kill, dış membran geçirgenliği, taramalı elektron mikroskop tayini ile lökosit hücrelerinin fagositik aktivitesinin tayininde katkı sağlamıştır. Gökçe Şeker Karatoprak: Çalışmada bitkisel materyalin temin edilmesi ve bitkiden uçucu yağ elde edilmesi ile Lökosit hücrelerinin fagositik aktivitesinin tayininde katkı sağlamıştır.

**Çıkar çatışması:** Makalemiz ile ilgili yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

**Mali destek:** Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından mali desteklenmiştir.

### Kaynaklar

1. Ayaz C. Antibiyotik Kombinasyonları. *Klimik Dergisi*. 2001; 14(3): 140-143.
2. Moellering RC Jr. Principles of antiinfective therapy. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Eds., Principles and Practice of Infectious Diseases, 4th Ed., New York: Churchill Livingstone, 1995: 199-212.

3. Uzun Ö. Birden fazla antibiyotikle tedavi ilkeleri. *Medikal Magazin*. 1993; 91 (1993): 74-76.
4. Çolak H. Ampirik antibiyotik tedavisi: genel ilkeler. In: Tümbay E, Üncü R, Hilmioğlu S, Eds., Antimikrobik Kemoterapi Günleri: Klinik-Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler 3rd. Ed., İstanbul: *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları*. 1997; 31: 26-29.
5. Adrar N, Oukil N, Bedjou F. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Ind Crops Prod*. 88 (2016):112-119. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.007>
6. Yap PSX, Lim SHE, Hu CP, Yiap BC. Combination of essential oils and antibiotics reduce antibiotic resistance in plasmid-conferred multidrug resistant bacteria. *Phytomedicine*. 2013;20(8-9):710-713. doi: 10.1016/j.phymed.2013.02.013
7. Kwiatkowski P, Mnichowska-Polanowska M, Pruss A, Masiuk H. The effect of fennel essential oil in combination with antibiotics on *Staphylococcus aureus* strains isolated from carriers. *Burns*. 2017;43(7):1544-1551. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2017.04.014>
8. Williams CA, Harborne JB. Phytochemistry of the genus *Pelargonium*. In: Lis-Balchin MEd., Geranium and *Pelargonium*, 1st Ed., London: Taylor and Francis; 2002: 5-7.
9. Lis-Balchin M. A Guide for Healthcare Professionals Aromatherapy Science, 1st Ed., London: Pharmaceutical Press; 2006: 196-199.
10. Bozan B, Ozek T, Kürkcüoğlu M, Kırimer N, Başer KHC. The analysis of essential oil and headspace volatiles of the flowers of *Pelargonium endlicherianum* used as an anthelmintic in folk medicine. *Planta Med*. 1999;65(8):781-782. doi: 10.1055/s-2006-960872
11. Şeker Karatoprak G, Göger F, Yerer MB, Koşar M. Chemical composition and biological investigation of *Pelargonium endlicherianum* root extracts. *Pharm Biol*. 2017;55(1):1608-1618. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1314511>
12. Dumlupinar B, Karatoprak G., Celik DD, Gürer ÜS, Demirci B, Gürbüz B, Rayaman P, Kurtulus EM. Synergic potential of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. Essential oil and antibiotic combinations against *Klebsiella pneumoniae*. *S Afr J Bot*. 2020;135:117-126.
13. Kirbağ S, Zengin F, Kursat M. Antimicrobial activities of extracts of some plants. *Pak J Bot*. 2009;41(4):2067-2070.
14. CLSI, M100-S17; Antibiyotik Duyarlılık testleri için Uygulama Standartları; On yedinci Bilgi Eki. Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi;2007.
15. EUCAST Version 8.0. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by <http://www.eucast.org>. 2018.
16. Yin X, Knecht DA, Lynes MA. Metallothionein mediates leukocyte chemotaxis. *BMC Immunol*. 2005; 15:6-21. doi: 10.1186/1471-2172-6-21
17. Novelli A, Fallani S, Cassetta MI, Conti S, Mazzei T. Postantibiotic Leukocyte Enhancement of Meropenem against Gram-Positive and Gram-Negative Strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(11):3174-3176. doi: 10.1128/AAC.44.11.3174-3176.2000
18. Pruul H, McDonald PJ. Enhancement of Leukocyte Activity Against *Escherichia coli* After Brief Exposure to Chloramphenicol. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979;16(6):695-700. doi: 10.1128/aac.16.6.695
19. Davis PH, Hedge IC. *Pelargonium L'Hérit* In: Flora of Turkey and the East Aegean Islands. University Press, Edinburgh. 1967;2:487-489.
20. Pereira V, Dias C, Vasconcelos MC, Rosa E, Saavedra MJ. Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). *Ind Crops Prod*. 2014;52:1-7.

- <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.09.032>
21. Alma MH, Nitz S, Kollmannsberger H, Digrak M, Efe FT, Yilmaz N. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from the Gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera*L.). *J Agric Food Chem.* 2004;52(12): 3911-3914. doi: 10.1021/jf040014e
  22. Brehm-Stecher BF and Johnson EA. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol, and Apritone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(10):3357-3360. doi: 10.1128/AAC.47.10.3357-3360.2003
  23. Pepeljnjak S, Kosalec I, Kaloera Z, Blazevic N. Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). *Acta Pharm.* 2005;55 (4):417-422.
  24. Al Maqtari MAA, Alghalibi SM, Alhamzy EH. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Thymus vulgaris* from Yemen. *Turk Biyokim Derg.* 2011;36 (4):342-349.
  25. Borges A, Ferreira C, Saavedra MJ, Simoes M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microb Drug Resist.* 2013;19(4):256-265. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0244>
  26. Gerber AU, Bruddeger UHP, Feller C, Stritzko T, Stalder B. Antibiotic therapy of infections due to *Pseudomonas aeruginosa* in normal and granulocytopenic mice: comparison of murine and human pharmacokinetics. *International of Infectious Disease.* 1986;153(1):90-97. doi:10.1093/infdis/153.1.90
  27. Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;30(5):673-691. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x>
  28. Gilbert P, Evans DJ, Evans E, Duguid IG, Brown MR. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Appl Bacteriol.* 1991;71:72-77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb04665.x>
  29. Bryan LE, Godfrey AJ.  $\beta$ -Lactam antibiotics: mode of action and bacterial resistance. In *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 3rd edn (Lorian, V. Ed.), 1991; 599-664. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
  30. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(6):1914-1920. doi: 10.1128/AAC.46.6.1914-1920.2002
  31. Hemaiswarya S, Doble M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. *Phytomedicine.* 2009;16(11):997-1005. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.04.006>
  32. Luqman S, Dwivedi GR, Darokar MP, Kalra A, Khanuja SP. Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. *Altern Ther Health Med.* 2007;13(5):54-59.
  33. Su JY, Zhu L, Tian YJ. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil of *Matricaria songarica*. *Int J Agric Biol.* 2012;14(1):107-110.
  34. Sikkema J, de Bont JAM, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.* 1995;59(2):201-222.
  35. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(6):1081-1085. DOI: 10.1093/jac/dkh243