

Fare Kemik İliği Hücrelerinde Siklofosfamid Tarafından İndüklenen Genotoksisiteye Karşı Tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) Yaprak Ekstraktının Olası Koruyucu Etkisinin Mikronükleus Testi ile Belirlenmesi

Hatice ULU*, Pınar AKSU KILIÇLE

¹Kafkas Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 36100, Kars, Türkiye

Araştırma Makalesi Research Article	Biyoloji Biology	Geliş Tarihi/Received 13.10.2020	Kabul Tarihi/Accepted 28.12.2020
--	---------------------	-------------------------------------	-------------------------------------

Öz: Bu çalışma; siklofosfamid (CP) tarafından indüklenen genotoksisiteye karşı, tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) yaprak ekstraktının olası koruyucu etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmada her bir grupta 8 hayvan olacak şekilde toplam 6 grup oluşturuldu. Bu gruplar; I. grup: negatif kontrol grubu, II. grup: pozitif kontrol grubu (50 mg/kg, i.p. CP), III. grup: 75 mg/kg tarhun yaprak ekstraktı grubu, IV. grup: 150 mg/kg tarhun yaprak ekstraktı grubu, V. grup: 75 mg/kg tarhun yaprak ekstraktı + CP (50 mg/kg, i.p.) grubu, VI. grup: 150 mg/kg tarhun yaprak ekstraktı + CP (50 mg/kg, i.p.) grubu şeklindedir. 14 gün boyunca tarhun yaprak ekstraktı oral gavaj yol ile farelere verildi. Fareler disloke edilmeden 24 saat önce (15. gün) intraperitoneal olarak siklofosfamid enjekte edildi. Disloke edilen farelerin kemik iliği hücrelerinde mikronükleus testi yapılarak, mikronükleus oranları tayin edildi. Çalışma sonunda; mikronükleus sayılarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi neticesinde negatif kontrol grubu ile kıyaslama yapıldığında, CP uygulanan grubun MN sayısının negatif kontrol grubuna göre artış gösterdiği belirlenmiş ($p<0.001$), CP ile birlikte 75 mg/kg ve 150 mg/kg dozlarında AD uygulamasına bağlı olarak ise, MN sayılarında CP grubuna göre oldukça önemli düzeyde azalma tespit edilmiştir ($p<0.001$). PCE/NCE oranları açısından değerlendirme yapıldığında ise, yine negatif kontrol grubuna göre CP grubu değerlerinin oldukça düşük olduğu ($p<0.001$), CP ile birlikte 75 mg/kg AD uygulandığında ($p<0.005$) ve 150 mg/kg AD uygulandığında ($p<0.001$) CP grubuna göre PCE/NCE oranlarının azaldığı belirlenmiştir. Sonuç olarak; *Artemisia dracunculus* L. yaprak ekstraktının 75 mg/kg ve 150 mg/kg dozlarının fare kemik iliği hücrelerinde siklofosfamidin neden olduğu mikronükleus artışını azaltarak koruyucu etki gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Artemisia dracunculus* L., *Mus musculus*, Siklofosfamid, Mikronükleus Testi

Determination Of The Possible Protective Effect Of Tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) Leaf Extract In The Mouse Bone Marrow Cells Against Cyclophosphamid By Micronucleus Test

Abstract: This work; had been carried out by aiming the determination of the possible protective effect of the tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) leaf extract against genotoxicity of cyclophosphamide (CP), by micronucleus

test. In the study, 6 test groups were formed and each group was involved 8 animals. These groups were named as: I. group is negative control group, II. group is positive control group which is formed from 50 mg/kg, i.p. CP, III. group denotes 75 mg/kg tarragon leaf extract group, IV. group denoted 150 mg/kg tarragon leaf extract group, V. group is formed from 75 mg/kg tarragon leaf extract + CP (50 mg/kg, i.p.) and VI. group is formed from 150 mg/kg tarragon leaf extract + CP (50 mg/kg, i.p.). The tarragon leaf extract was given to the mice via oral gavage during 14 days. Cyclophosphamide was injected intraperitoneally to the mice before 24 hours of the dislocation (day 15) of them. The micronucleus ratios were determined by the performing of the micronucleus tests to the bone marrow cells of dislocated mice. At the end of the study; when the statistical evaluation of micronucleus numbers were compared with the negative control group, it was determined that the MN numbers increased in the group which was exposed to CP ($p < 0.001$) according to the negative control group. On the other hand, it was determined that the MN numbers of CP group were significantly decreased when the 75 mg/kg and 150 mg/kg doses AD in addition to the CP ($p < 0.001$) were applied to the CP group. When an evaluation was carried out upon the PCE/NCE ratios, it was determined that values of the CP group ($p < 0.001$) were less than values of the control group, on the other hand, when 75 mg/kg AD applied with CP ($p < 0.005$) it was observed that the PCE/NCE ratios were decreased compared to the situation that applied 150 mg/kg AD to the CP group ($p < 0.001$). As a result; it was determined that 75 mg/kg and 150 mg/kg doses of *Artemisia dracunculus* L. leaf extract showed protective effect in mouse bone marrow cells by leading to decrease of the increase in micronucleus which was caused by cyclophosphamide.

Keywords: *Artemisia dracunculus* L., *Mus musculus*, Cyclophosphamide, Micronucleus Test

1. GİRİŞ

Tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) Asteraceae familyasına ait, otsu ve çok yıllık bir bitkidir. Doğrusal olarak büyüyen, demet halinde bulunan ve yukarı kısımları çatallara ayrılan bitki, kuvvetli köklere ve kısa yan köklere sahiptir. Bitkinin gövdesi ise yuvarlak hatlıdır ve 60-120 cm uzunluğa kadar erişebilmektedir. Tarhun yapraklarının alt kısmında bulunan yağ bezeleri sayesinde, bitki aromatik bir özellik kazanmaktadır. Tarhunun ana yurdu Sibirya'dır. Sonrasında Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'ya yayılmıştır. Türkiye'de de özellikle Bayburt, Erzurum, Gaziantep ve Şanlıurfa'da tarhun yetiştirilmektedir. *Artemisia dracunculus* L. Fransız ve Rus tarhunu olmak üzere iki varyeteye sahiptir (Ceylan, 1989; Fernandez-Lizarazo et al., 2011; Froushani et al., 2016; İlisulu, 1992).

Tarhun yüzyıllar boyunca insanlar tarafından; iştah, sindirim, romatizma, kan dolaşımı, uykusuzluk, cilt iltihapları, hayvan ısırıkları, sıtma, ülser, iskorbüt, gece körlüğü, epilepsi, diyabet ve kardiovasküler hastalıklar gibi çok çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılmıştır. Ayrıca Fransız tarhunundan elde edilen uçucu yağ; antioksidan, antifungal, antikanser ve antibakteriyel etkiler göstermektedir (Asımgil, 1997; Azırak, 2007; Gholivand et al., 2014; Güner ve ark., 2000). Hastalıklara karşı tedavinin dışında, tarhun (*Artemisia*

dracunculus L.) mutfak dünyasında da kendine geniş bir kullanım alanı bulmuştur. Aromasından ötürü içeceklerde, yemeklerde, konservelede, likör yapımında, şekerlemelerde ve peynir yapımında kullanılmaktadır. Tarhun aroması mutfak dışında parfüm yapımında da yer almıştır (Chaleshtori et al., 2013; Graven et al., 1990; Kırtunç, 2002).

Bitkilerin ekstrakt haline getirilerek şifa amacı ile kullanılması, Çin'de MÖ 2700 yıllarına kadar dayanmaktadır. Hitit dönemi tıbbi tabletleri üzerinde bulunan reçetelerdeki bitki isimleri ise Anadolu insanının uzun yıllardır yabancı bitkilerden şifa aradığının bir göstergesidir (Toroğlu ve Çenet, 2006; Yiğit ve Benli, 2005). Uzun yıllardır yapılan bilimsel çalışmalarda tarhun bitkisinden elde edilen yağlardaki mevcut bileşenler araştırılmıştır. Bu bileşenler bölgelerin ekolojik durumuna göre değişiklik göstermektedir. Farklı coğrafik bölgelerde yapılan çalışmalarda tarhun bitkisinde en sık rastlanan bileşenler; estragol, elemisin, metil öjenol ve terpinolen olmuştur (Lamian et al., 2017; Tak et al., 2014; Wierdak and Zaviślak, 2014).

Siklofosfamid, azotlu hardal (nitrojen mustard) türü olan alkilleyici özelliğe sahip ilaçlardan biridir. Siklofosfamidin aktif metaboliti FAM (fosforamid mustard)'dır ve siklofosfamid karaciğerde bu yapıya dönüşerek etkili hale gelmektedir. Dönüşüm sonrası aktiflik kazanan siklofosfamid, DNA'ya bağlanıp alkilleşerek, DNA transkripsiyonu ve DNA replikasyonunda hasar meydana getirmektedir (McEvoy, 2004; Karaboğa, 2018). Siklofosfamid uygulaması ile ikincil kanserler arasında bir bağ olduğu ortaya çıkarıldığı için siklofosfamid, insan karsinogeni sınıfına dahil edilmekte ve pro-ilaç olarak adlandırılmaktadır (Doğan, 2008).

Canlılar üzerinde olumsuz etki meydana getiren ve bu etki sonrasında mutasyona neden olan fiziksel ve kimyasal maddelerin belirlenmesi amacı ile birçok test sistemi geliştirilmiştir. Günümüzde oldukça fazla kullanılmakta olan bu test yöntemleri, bileşiklerin genotoksik etkisinin tespitini yapmaktadır. En çok da kimyasallar, çevre kirliliği ve ilaçlar ile oluşan zehirlerde bu test yöntemleri tercih edilmektedir. Fakat yapılan bu testler çoğunlukla yeterli olmadığı için ek olarak akut ve kronik toksisite yöntemleri, antioksidan aktivite ve alerjik testlere de başvurulabilir (Klug and Cummings, 2002).

En yaygın olarak kullanılan standart *in vitro* ve *in vivo* mutajenite testleri; ames testi, comet testi, kromozom anormallikleri testi, kardeş kromatit değişimi testi ve mikronükleus testidir. Mikronükleus testi; *in vivo* ve *in vitro* şeklinde değerlendirilebilen, birtakım kimyasal ve fiziksel maddelerin neden olduğu klastojenik ve anöjenik etkilerin tespitinde kullanılan, genotoksisite test yöntemlerinden biridir. MN test yöntemi 1950'lerde ilk kez bitki

hücrelerinde meydana gelen kromozom anomalilerinin tespitinde kullanılmıştır (Özkara ve Akyıl, 2015; Önen ve ark., 2017).

Bu çalışma ile, hücrel proteinlerin işlevini değiştirip DNA'ya hasar vererek alkilleyici ajan görevi gören siklofosfamidinin, fare kemik iliği hücrelerinde meydana getirdiği genotoksitete karşı *Artemisia dracunculus* L. yaprak ekstraktının koruyucu etkisinin mikronükleus testi ile araştırılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Hayvan Materyali

*Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2019/133 sayılı izin ile çalışma onayı alındı.

Çalışma esnasında mikronükleus analizinin yapılması amacıyla 12 haftalık, ağırlıkları 32-47 gram arasında değişen, 48 adet *Mus musculus* cinsi albino fare kullanıldı. Fareler standart hayvan koşullarına uygun bir şekilde, 121°C'de otoklave edilebilen ve polikarbon malzemelerden üretilmiş olan kafeslerde 8'li gruplar halinde konumlandırıldı. Su ve yem ihtiyaçlarının ad libitum olması sağlanarak, fareler distile su ve normal fare yemi ile beslendi. Fareler 20 ± 2 °C sıcaklığa ve % 50 bağıl neme sahip, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ışık periyodu olan laboratuvar ortam ve koşullarında barındırıldı. Farelerin günlük ağırlıklarına göre çalışmada kullanılacak maddelerin dozları belirlendi. Maddeler distile su ile çözülüp, oral gavaj ve intraperitoneal (i.p.) yöntemler ile farelere verildi.

2.2. *Artemisia dracunculus* L. Yaprak Ekstraktı

Çalışmada kullanılan tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) Bayburt ili Yerlice Köyü'nden haziran ayında toplandı. Bitki mevsiminde ve taze olarak laboratuvar ortamına ulaştırıldı. Kafkas Üniversitesi Botanik Anabilim Dalı uzmanları tarafından teşhis edildi. Bitkinin yaprak kısımları alınarak güneş görmeyen ve hava sirkülasyonuna sahip olan alanda kurutuldu. Tamamen kurutulmuş bitki yaprakları öğütücü yardımı ile öğütüldü. Ekstraksiyon çözücüsü ile yıkanan soxhlet cihazı kartuşunun içerisine 40 gram öğütülmüş yaprak örneklerinden alınarak konuldu. Tarhun yaprak örneğini içeren kartuş 500 ml'lik soxhlet ekstraktörü içerisine yerleştirildi. Kaynama balonuna ekstraksiyon çözücüsü olarak 650 ml etanol konuldu. Yaklaşık olarak 8 saat süre ile çözücü berrak hale gelinceye kadar 7-10 kez sifon edildikten sonra sıvı ekstrakt elde edildi. Sıvı ekstrakt içerisinde bulunan partiküller, mavi band süzgeç kağıdı kullanılarak uzaklaştırıldı. Partiküllerinden aranan ekstrakt örneğindeki çözücüler, 35-45 °C'de rotary evaporatör ile uçuruldu. Balon içerisinde geriye

kalan tarhun yaprak ekstraktı, desikatörde 12 saat süre ile bekletildi. Çözücüsünden tamamen ayrılmış olan tarhun yaprak ekstraktı numune ekstrakt kutusuna konularak, yapılacak olan çalışma için +4 °C’de muhafaza edildi (Wang and Weller, 2006).

2.3. Deney Grupları

Fareler her grupta 8 adet olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Bunlar;

1. Grup: (n:8) Negatif kontrol. Diğer gruptaki fareler ile aynı stresi yaşamaları için, bu gruptaki farelere 14 gün boyunca distile su oral gavaj yol ile verildi. 15. gün eter anestezisi altında servikal dislokasyon yapıldı.

2. Grup: (n:8) 50 mg/kg siklofosfamid (CP). Bu gruptaki farelere 14 gün boyunca distile su oral gavaj yol ile verildi. Farelere 50 mg/kg siklofosfamid 14. gün intraperitoneal yol ile verildi. 15. gün eter anestezisi altında servikal dislokasyon yapıldı (CP’nin 24 saatlik etkisine bakıldı).

3. Grup: (n:8) 75 mg/kg tarhun yaprak ekstraktı. Bu gruptaki farelere 75 mg/kg tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) yaprak ekstraktı 14 gün boyunca oral gavaj yol ile verildi. 15. gün eter anestezisi altında servikal dislokasyon yapıldı.

4. Grup: (n:8) 150 mg/kg tarhun yaprak ekstraktı. Bu gruptaki farelere 150 mg/kg tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) yaprak ekstraktı 14 gün boyunca oral gavaj yol ile verildi. 15. gün eter anestezisi altında servikal dislokasyon yapıldı.

5. Grup: (n:8) 75 mg/kg tarhun yaprak ekstraktı + CP. Bu gruptaki farelere 75 mg/kg tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) yaprak ekstraktı 14 gün boyunca oral gavaj yol ile verildi. 14. günün sonunda 50 mg/kg dozda CP intraperitoneal yol ile verildi. 15. gün eter anestezisi altında servikal dislokasyon yapıldı.

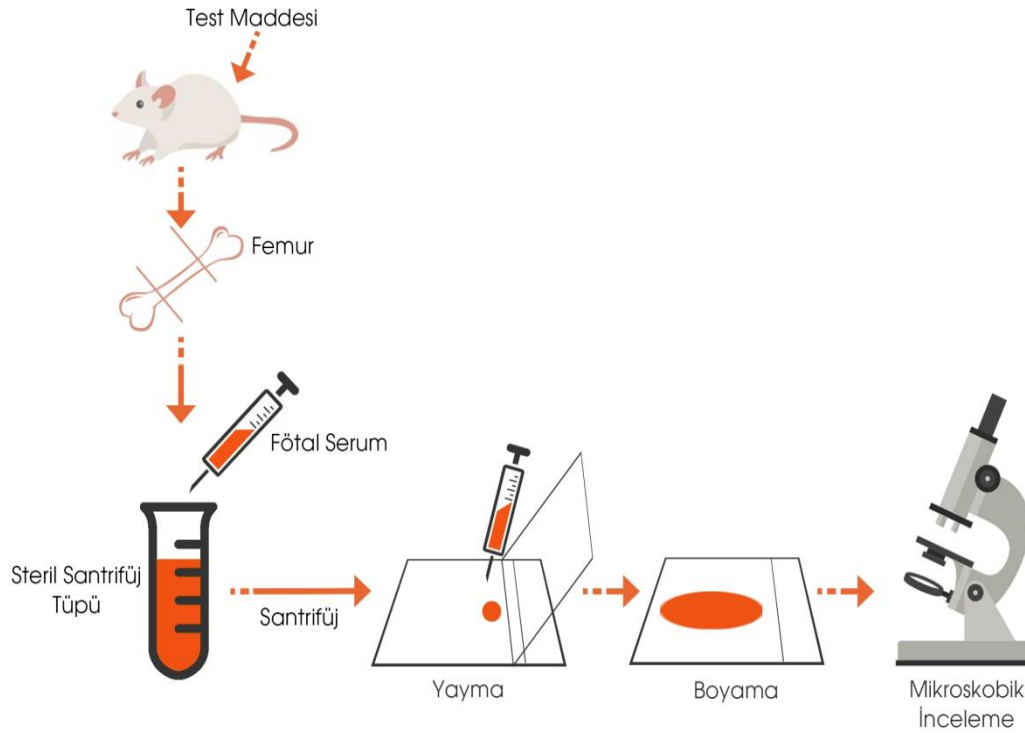
6. Grup: (n:8) 150 mg/kg tarhun yaprak ekstraktı + CP. Bu gruptaki farelere 150 mg/kg tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) yaprak ekstraktı oral gavaj yol ile 14 gün verildi. 14. günün sonunda 50 mg/kg dozda CP intraperitoneal yol ile verildi. 15. gün eter anestezisi altında servikal dislokasyon yapıldı.

2.4. Mikronükleus testi

Yapılan çalışmada mikronükleus testi için fare kemik iliği kullanıldı. İncelemede kullanılmak üzere hazırlanan preparatlar, ilk kez Schmid tarafından 1975 yılında geliştirilen kemik iliği preparat yöntemi ışığında yapıldı (Şekil 1).

Öncelikle ilik için farelerden çıkarılan femur kemiği kaslarından tamamen temizlendi ve iki ucundan bistüri yardımı ile kesildi. Enjektör ile kemik içerisindeki ilik, 3 ml fetal dana

serumu içeren santrifüj tüpüne aktarıldı. Tüpler 5 dakika boyunca 2000 rpm’de santrifüj edildi ve sonrasında süpernatantları pasteur pipetle alınarak atıldı. Sonrasında tüp içerisine bir damla fetal dana serumu eklendi ve hücreler süspansiyon edildi. Tüplerden birer damlalık örnekler alındı ve temiz lamlara yayıldı. Yayma işleminden sonra havada kurutulan preparatlar, 10 dakika boyunca metil alkolde fikse edildi. Preparatlar fikse edildikten sonra, ilk olarak % 0.25’lik May Grunwald boyası ile 5 dakika boyunca boyandı ve saf su ile yıkandı. Sonrasında preparatlar % 0.125’lik May Grunwald boyası ile tekrar 5 dakika boyunca boyanıp, saf su ile yıkandı. Son olarak % 20’lik Giemsa boyası ile 30 dakika boyunca boyanan preparatlar, saf su ile yıkanıp oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. İmmersiyon objektifinde (1000’lik büyütme) her deney grubundan gelişigüzel 2000 adet polikromatik eritrosit (PCE) hücre sayıldı. Mikronükleuslu polikromatik eritrosit (MNPCE) içeren hücreler sayılarak, MNPCE oranları belirlendi. Bunlara ek olarak 1000 adet normokromatik eritrosit (NCE) ve PCE sayılarak, PCE/NCE yüzdeleri tespit edildi (Schmid, 1975; Doğan, 2019; Aksu ve ark., 2013).



Şekil 1. *In vivo* Mikronükleus Test Protokolü

2.5. Tarhun Bitkisinin Uçucu Yağ Analizi

Tarhun yaprak ekstraktının uçucu yağ bileşenlerinin ve bu bileşenlerin bağlı yüzdelerinin tayin edilmesi için, kurutulmuş 40 gr tarhun bitkisi Anadolu Üniversitesi Bitki,

İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne gönderildi. Merkezde Gaz Kromatografisi (GC) yöntemi ile yağ analizi yapıldı. Yapılan analiz sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Yöntem

Örnek maddenin uçucu yağının bileşenlerinin tanımlanması için Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi, bağlı yüzdelerin belirlenmesi için ise Gaz Kromatografisi yöntemi kullanılmıştır.

Numune Hazırlama

Hekzan ile hazırlanan (% 10 h/h) örnek 40:1 split oranı ile 1 µL olarak sisteme enjekte edilmiştir.

Gaz Kromatografisi (GC) Şartları

Sistem: Agilent 7890B GC System

Kolon: Agilent HP-Innowax (60 m × 0.25 mm iç çap × 0.25 µm film kalınlığı)

Dedektör: Alev İyonlaşma Dedektörü (FID)

Enjeksiyon Sıcaklığı: 250°C

Dedektör Sıcaklığı: 250°C

Sıcaklık Programı: 60°C (10 dk), 4°C/dk. 220°C (10 dk) 1°C/dk 240°C Toplam 80 dk

Taşıyıcı Gaz: Helyum (0.7 mL/dk)

Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) Şartları

Sistem: Agilent 7890B GC 5977B Mass Selective Dedector System

Kolon: Agilent HP-Innowax (60 m, 0.25 mm iç çap, 0.25 µm film kalınlığı)

Enjeksiyon Sıcaklığı: 250°C

İyon Kaynağı Sıcaklığı: 230°C

İyonizasyon Modu: EI

Elektron Enerjisi: 70 ev

Kütle Aralığı: 35- 450 m/z

Sıcaklık Programı: 60°C (10 dk), 4°C/dk. 220°C (10 dk) 1°C/dk 240°C, Toplam 80 dk

Taşıyıcı gaz: Helyum (0.7 mL/dk)

Tanımlamalar: Wiley 9-Nist 11 Mass Spectral Database (Özek, 2020)

Tablo 1: *Artemisia dracunculus* Uçucu Yağının Bileşimi

No	Bileşik*	Bağlı yüzde (%)
1	Estragol	67,7
2	(Z)- β -Osimen	5,5
3	(E)- β -Osimen	5,1
4	Spatulenol	4,5
5	Limonen	3,9
6	Metil öjenol	2,0
7	α -Pinen	1,4
(* \geq % 1)Toplam		90.1

2.6. İstatistik Analizi

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için SPSS 22 paket programı kullanıldı. Kontrol ve deney grupları arasındaki farklılığın belirlenmesi için, tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) yapıldı ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Fare Kemik İliği Hücrelerinde Kontrol ve Deney Gruplarının Mikronükleus Frekansları

Mikronükleus testi için gruplardaki her bir fare için 3 adet kemik iliği preparatı hazırlandı. Mikronükleus frekansının belirlenmesi adına her bir hayvandan 2000 adet PCE (Polikromatik Eritrosit) sayımı yapıldı (Tablo 2).

Tablo 2. Kontrol ve Deney Gruplarının Mikronükleus Test Sonuçları

Gruplar	Toplam PCE	MNPCE	MNPCE (%)	Grup Ortalaması	Toplam Eritrosit (PCE+ NCE)	PCE Sayısı	NCE Sayısı	PCE/ NCE Oranı
Negatif Kontrol	16000	312	1,950	39,00	8000	5533	2467	2,24
50 mg/kg CP	16000	913	5,70	114,125	8000	3912	4088	0,95
75 mg/kg AD	16000	329	2,056	41,12	8000	5382	2618	2,05
150mg/kg AD	16000	338	2,106	42,25	8000	5422	2578	2,09
75 mg/kg AD + 50 mg/kg CP	16000	695	4,34	86,875	8000	4099	3901	1,04

150 mg/kg AD + 50 mg/kg CP	16000	617	3,85	77,125	8000	4719	3281	1,43
-----------------------------------	-------	-----	------	--------	------	------	------	------

*PCE: Polikromatik Eritrosit, NCE: Normokromatik Eritrosit, MNPCE: Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit.

PCE/NCE oranları açısından değerlendirme yapıldığında; negatif kontrol grubuna göre CP grubu değerlerinin oldukça düşük olduğu ($p<0.001$), CP ile birlikte 75 mg/kg AD yaprak ekstraktı uygulandığında ($p<0.05$) ve 150 mg/kg AD yaprak ekstraktı uygulandığında ($p<0.001$), CP grubuna göre PCE/NCE oranlarının azaldığı belirlenmiştir.

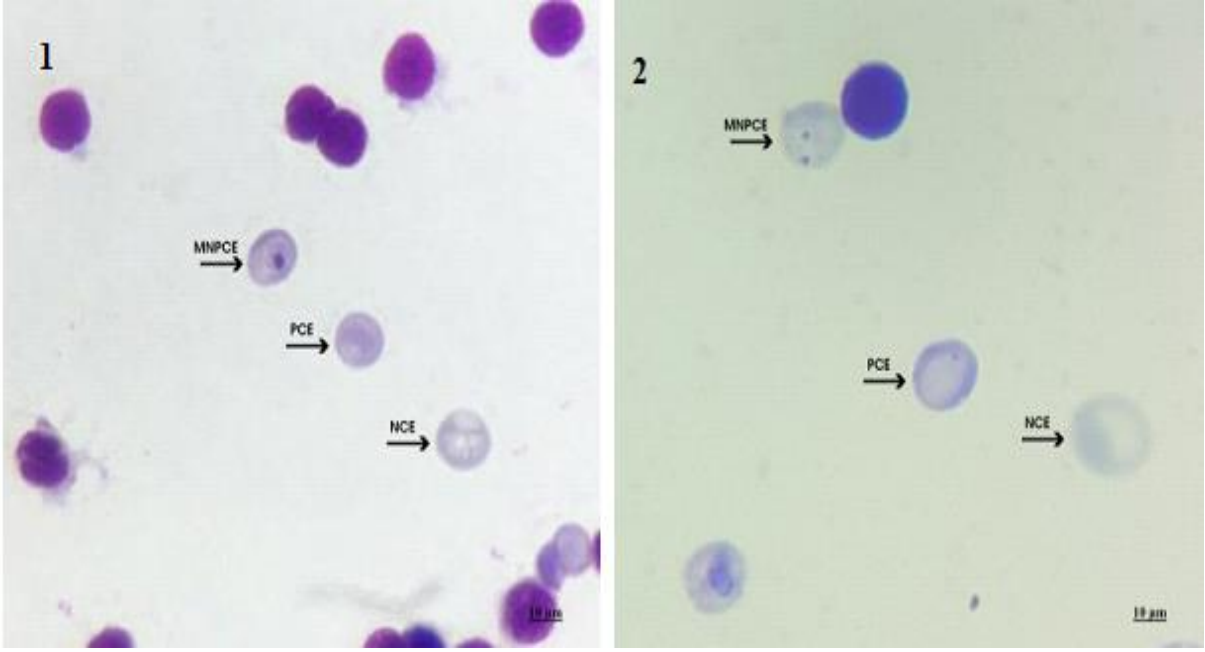
Mikronükleus sayılarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi neticesinde; negatif kontrol grubu ile kıyaslama yapıldığında, CP uygulanan grubun MN sayısının negatif kontrol grubuna göre artış gösterdiği belirlenmiş ($p<0.001$), CP ile birlikte 75 mg/kg ve 150 mg/kg dozlarında AD yaprak ekstraktı uygulamasına bağlı olarak ise MN sayılarında CP grubuna göre oldukça önemli düzeyde azalma tespit edilmiştir ($p<0.001$).

Tablo 3. Kontrol ve Deneysel Gruplarına Ait Mikronükleus ve PCE/NCE Oranlarının İstatistiksel Sonuçları

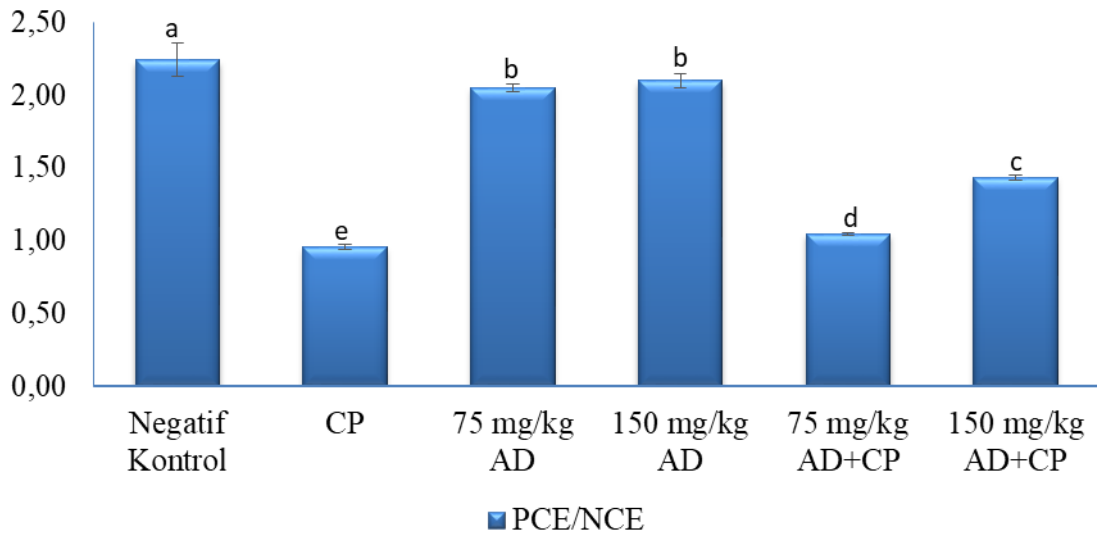
Gruplar	NK	50 mg/kg CP	75 mg/kg AD	150 mg/kg AD	75 mg/kg AD+ 50 mg/kg CP	150mg/kg AD+ 50 mg/kg CP	P Değeri
PCE/NCE Oranları	2,24 ±0,11 ^a	0,95 ±0,02 ^e	2,05 ±0,03 ^b	2,10 ±0,05 ^b	1,05 ±0,01 ^d	1,43 ±0,02 ^c	0.001
MNPCE Oranları	39,00 ±1,31 ^e	114,13±2,47 ^a	41,13 ±1,55 ^{de}	42,25 ±2,25 ^d	86,88 ±1,81 ^b	77,13 ±2,03 ^c	0.001

* Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel önemliliği ifade etmektedir.

Aşağıdaki resimlerde PCE, NCE ve MNPCE'ler gösterilmiştir (Resim 1).

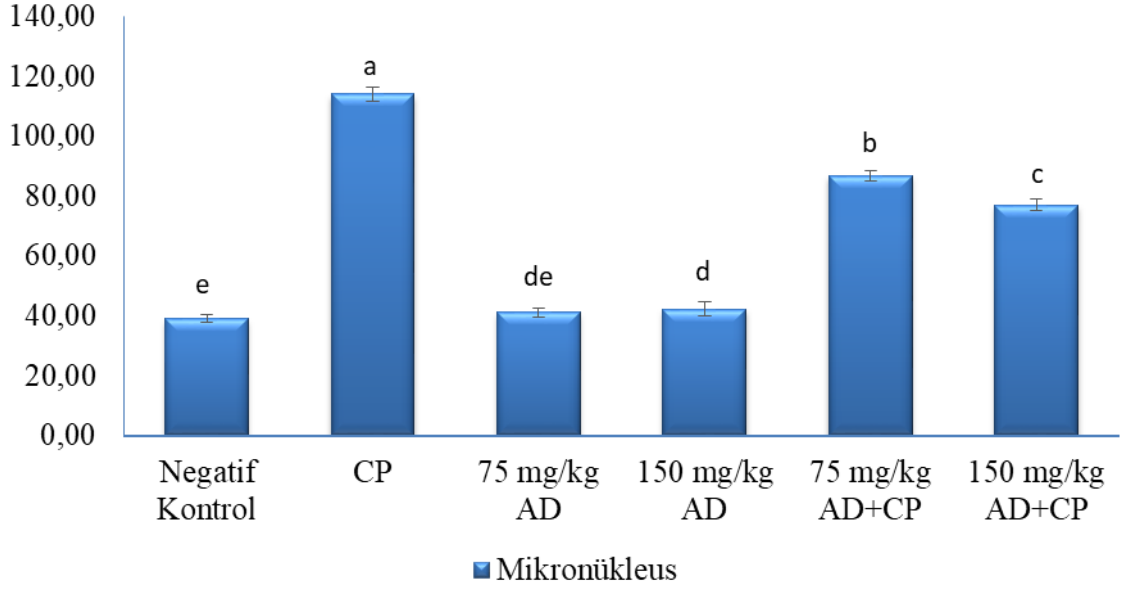


Resim 1: Deney Grubu Farelerinin Kemik İliği Hücrelerinde MNPCE, PCE ve NCE'lerin Mikroskopik Görüntüsü ($\times 1000$) 2: Deney Grubu Farelerinin Kemik İliği Hücrelerinde 2 Mikronükleuslu MNPCE, PCE ve NCE'lerin Mikroskopik Görüntüsü ($\times 1000$)



$a-e$, $e-c$ $p < 0.001$, $e-d$ $p < 0.05$

Şekil 2. Kontrol Grubu ve Uygulama Gruplarına ait PCE/NCE Oranları



a-e, a-b, a-c p<0.001

Şekil 3. Kontrol Grubu ve Uygulama Gruplarına ait MNPCE Oranları

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Son zamanlarda fiziksel ve kimyasal maddelerin DNA'da meydana getirdiği genotoksik etkileri en az seviyede tutabilmek için birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar ile doğal bitkisel ürünlerin antijenotoksik etkilerinin araştırılması, doğal antioksidanların önemini arttırmıştır (Ferguson et al., 2005).

İnsanoğlu, maruz kaldıkları mutajenlerin negatif etkilerine karşı, vücutlarında var olan doğal antioksidanlar ile korunmaktadırlar. Yaşın ilerlemesine bağlı olarak vücudumuzda var olan doğal antioksidanların üretiminde yavaşlama meydana gelmektedir. Bu sebepten ötürü insanlar dışarıdan antioksidan desteğine ihtiyaç duyarlar. Çeşitli antijenotoksik bileşiklerin kullanımı, canlıların vücudunda oluşan ve genotoksik ajanların neden olduğu DNA hasarlarının etkilerini en aza indirmek amacıyla arttırılmaktadır. Bu durumun, mutasyonların neden olduğu kanser ve bunun gibi hastalıklardan korunmak için önem taşıdığı bildirilmektedir. *Artemisia dracunculus* içeriğinde antioksidan aktivite özelliği olan bileşiklerin var olduğu, çeşitli *in vivo* çalışmalar ile belirlenmiştir. Polifenol olarak bilinen bu faydalı antioksidanlar, vücudumuzda bulunan serbest radikallere karşı güçlü bir savunma sistemidir (Garcia et al., 2006; Taner, 2007; Madrigal-Bujaidar et al., 1998; Malins et al., 2001).

Bu çalışmada bitkideki polifenolik içerikler belirlenmemiştir. Ancak bitkinin uçucu ve doymamış yağ asitleri yönünden analizi yapılmıştır. Doymamış olduklarından bu yağ

asitlerinin diğer araştırmacılar tarafından tespit edilen polifenoller gibi antioksidan etkide rol oynayabileceği düşünölmektedir.

Yapılan bir çalışmada, CCl₄ (karbon tetraklorür) ile 60 adet Wistar albino ratta oluşturulan akut karaciğer hasarına karşı, tarhun yaprak ekstraktının koruyucu etkisi araştırılmıştır. 6 hafta boyunca gün aşırı gavaj yoluyla 250, 500, 750 mg/kg dozlarında AD yaprak ekstraktı ve intraperitoneal yol ile zeytinyağı ile karıştırılmış CCl₄ (0.2 mg/kg) verilmiştir. Deney sonrasında ratların karaciğer dokuları histopatolojik açıdan incelenmiştir. Etanolik AD ekstraktı verilen bütün gruplarda, bitkinin histopatolojik ve biyokimyasal açıdan olumlu etki yarattığı, AD'nin ratların karaciğerinde CCl₄ etkisi ile oluşturulan hasara karşı koruyucu etki gösterdiği ve karaciğeri güçlendirdiği rapor edilmiştir (Gölpınar, 2012).

Zarezade ve arkadaşları, CCl₄ ile oluşturulan hepatotoksisiteye karşı, tarhun bitkisinin gövde ve yaprak kısımlarından elde edilen hidro-alkolik *Artemisia dracunculus* (HAAD) ekstraktının, ratlar üzerindeki antioksidan ve hepatoprotektif etkisini araştırmışlardır. 36 adet rata, 50, 100 ve 200 mg/kg HAAD 7 gün boyunca oral gavaj ile verilmiştir. Çalışmada yapılan FRAP (Fe³⁺ (ferik iyonu) indirgeme gücü), DPPH (Radikali giderme aktivitesi) ve ABTS (Radikal katyon yakalama aktivitesi) biyokimyasal testleri sonucunda; HAAD'in güçlü bir aktivite gösterdiği, oluşan hepatik hasara karşı koruyucu etki sergilediğini rapor etmişlerdir (Zarezade et al., 2018).

Hong ve Ying yaptıkları bir çalışmada; özofagus skuamöz hücre karsinomuna karşı, *Artemisia dracunculus* bitkisinin sürgün ve kök kısmından elde edilen ekstraktın ve bileşenlerinin antitümör etkisini araştırmışlardır. Mevcut karsinomun tedavisinde AD ekstraktı kullanılmıştır. Yapılan flow sitometri testi sonucunda; bitki ekstraktının özofagus hücre karsinomuna karşı güçlü şekilde hücre çoğalmasını önleyici aktiviteler gösterdiği görölmüştür. Ayrıca AD bitkisinden elde edilen sakuranetin ve 6-metoksikapillarisin bileşenlerinin, özofagus skuamöz hücrelerinde DNA hasarını indükleyerek güçlü antikanser etkiler sergilediği gözlenmiştir (Hong and Ying., 2015).

Modaresi ve arkadaşları fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, farelerin hematolojik parametreleri üzerinde, hidro-alkolik AD yaprak ekstraktının yaratacağı etkileri araştırmışlardır. 5 gruba ayrılmış 40 fareye 20 gün boyunca gün aşırı sırasıyla 50, 100 ve 200 mg/kg dozunda hidro-alkolik AD yaprak ekstraktı verilmiştir. Deney sonunda yapılan ölçüm (RBC, WBC, nötrofil, monosit ve lenfosit) ve analizler (varyans test) sonucunda; kontrol gruplarına oranla tedavi gruplarında monosit, RBC ve WBC oranlarında kayda değer bir değişikliğin yaşanmadığı görölmüştür. 100 mg/kg ve 200 mg/kg tedavi gruplarında, kontrol gruplarına oranla lenfosit sayısında azalış yaşanırken, nötrofil sayısında anlamlı bir artış

yaşanmıştır. Yapılan araştırma sonucunda, immünostimülatör bir ajan olarak tercih edilebilecek nötrofil üretiminin, etanolik AD yaprak ekstraktı sayesinde uyarıldığı sonucuna varılmıştır (Modaresi et al., 2018).

Abraham, farelerde trans-anetol ve öjenolün antigenotoksik etkisini mikronükleus testi ile araştırmıştır. Genotoksin olarak farelere 40-400 mg/kg oranında trans-anethol, 50-500 mg/kg oranında öjenol oral gavaj yol ile verilmiştir. Genotoksin olarak verilen maddelerden biri de siklofosamid olmuştur. CP farelere intraperitoneal olarak verilmiştir. Yapılan mikronükleus analizi sonucunda, farelere uygulanan trans-anethol ve öjenolün siklofosamidin neden olduğu genotoksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir (Abraham, 2001).

Tüylü ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; *Artemisia dracunculus* bitkisinden elde edilen esansiyel yağın, anti-mikrobiyal, genotoksik ve sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Çalışmada; *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Aspergillus niger* gibi toplam 28 adet mikroorganizma kullanılmıştır. Kirby ve Bauer disk difüzyon yöntemi ile *Artemisia dracunculus* esansiyel yağının belirtilen mikroorganizmalara karşı anti-mikrobiyal etki sergilediği görülmüştür. Ayrıca mikronükleus testi için iki sağlıklı insandan elde edilen periferik kan kullanılmıştır. Sonuç olarak bitki ekstraktının genotoksik etki yaratmadığı gözlemlenmiştir (Tüylü ve ark., 2009).

Bolandian ve arkadaşları; 70 wistar ratında asetik asit tarafından indüklenen ülseratif kolite karşı tarhun sulu yaprak ekstraktının etkilerini araştırmışlardır. 10 gün boyunca ratlara mesalazine, asacol ve asacol + tarhun sulu yaprak ekstraktı oral gavaj yol ile verilmiştir. Deneyde yapılan Elisa testiyle birlikte histopatolojik incelemeler sonucunda; kontrol grubuna göre, mesalazine ve asacol tedavi gruplarında histopatolojik hasar artmıştır. asacol + tarhun sulu yaprak ekstraktı verilen tedavi gruplarında ise oluşan histopatolojik hasarın önemli düzeyde azaldığı görülmüştür. Sonuç olarak tarhun sulu yaprak ekstraktının anti-kolit etki sergilediği ve kolit tedavisinde doğal bir ilaç olarak kullanılabilceği görülmüştür (Bolandian et al., 2019).

Reza ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; 48 wistar albino ratta tarhun sulu yaprak ekstraktının, sulandırılmış fruktoza karşı antienflamatuar ve nosiseptif etkileri araştırılmıştır. Oluşturulan 1. gruba hiçbir madde verilmemiştir. 2. gruba 100 mg/kg oranında tarhun sulu yaprak ekstraktı, 3. gruba ise % 10 oranında sulandırılmış fruktoz ve 100 mg/kg oranında tarhun sulu yaprak ekstraktı verilmiştir. 4 haftanın sonunda; ratlarda oluşturulan insülin direncinin, tarhun sulu yaprak ekstraktı tarafından önemli şekilde azaltıldığı gösterilmiştir (Reza et al., 2015).

Benli ve arkadaşları, AD'nin aseton, kloroform ve farklı iki konsantrasyondaki metanol ekstresinin antimikrobiyal aktivitesi üzerinde çalışmışlardır. Bu ekstraktlar, disk difüzyonu yöntemi ile 9 bakteri ve 4 maya suşuna karşı test edilmiştir. Sonuç olarak; AD'nin, metanol ekstraktının, aseton ve kloroform ekstraktlarına oranla mikroorganizmalara karşı daha yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir (Benli ve ark., 2007).

Ribnicky ve arkadaşları, tarhun bitkisinin diyet takviyesi olarak kullanımının toksikolojik değerlendirmesi ile ilgili ratlar üzerinde çalışmalarda bulunmuşlardır. Yapılan çalışmalar ve kullanılan AD yaprak ekstrakt dozları; 14 gün tekrar doz oral toksisite çalışması (1000 mg/kg), 90 gün tekrar doz oral toksisite çalışması (10, 100 ve 1000 mg/kg), ames testi (5000 mg/kg) ve akut oral toksisite testi (5000 mg/kg) şeklindedir. Yapılan çalışmalarda tarhun bitkisinin ratlar üzerinde mutajenik etki yaratmadığı, bitkinin kullanımının non-toksik ve güvenilir olduğu tespit edilmiştir (Ribnicky et al., 2004).

Halk arasında hem tıbbi amaçlı hem de tüketime yönelik olarak kullanılan *Artemisia dracunculus* L.'nin antigenotoksik, antifungal, antioksidan, antitümoral vb. özellikleri birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışma ile bildirilmiştir. Bu çalışma sonuçları, daha önce yapılan diğer çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bu araştırma sonucuna göre; tarhun yaprak ekstraktının uygulanan dozlarının (75-150 mg/kg) genotoksik etkili olmadığı ve siklofosamid tarafından indüklenen mikronükleus artışını azalttığı söylenebilir. Kullanılan bitki ekstraktının ortaya çıkardığı antigenotoksik etkilerin tam anlamıyla belirlenebilmesi ve antigenotoksik etkilerin hangi maddelerden kaynaklandığının tespit edilebilmesi için, bitki bileşenlerinin yapısındaki kimyasalların izole edilmesi gerekmektedir. Tarhun bitkisinden elde edilen ekstrakt içerisinde tespit edilecek kimyasal bileşiklerin etkilerinin sitogenetik analiz ve ileri moleküler testler ile tespit edilmesinin, konunun anlaşılmasına fayda sağlayacağı ileri sürülebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma 2020-FM-03 nolu proje ile Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (KAÜ BAP) tarafından Yüksek Lisans Tez projesi olarak desteklenmiştir. Bu çalışma "Fare Kemik İliği Hücrelerinde Siklofosamid Tarafından İndüklenen Genotoksisiteye Karşı Tarhun (*Artemisia dracunculus* L.) Yaprak Ekstraktının Olası Koruyucu Etkisinin Mikronükleus Testi ile Belirlenmesi" başlıklı Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir. Bu çalışmada maddi destek sağlayan KAÜ BAP'a teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- Abraham S. K. (2001). Anti-Genotoxicity of *trans*-Anethole and Eugenol in Mice. Food and Chemical Toxicology, 39, 493-498.
- Aksu P., Doğan A., Gül S., Kanıcı A. (2013). Farelerde 3-Metilkolantren İle İndüklenen Fibrosarkoma Üzerine Sisteaminin Etkileri: Genotoksisitenin Araştırılması. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19 (6): 955-961.
- Asımgil A. (1997). Şifalı Bitkiler. Timaş Yayınları, İstanbul. 176, 276.
- Azırak S. (2007). Thymol ve Carvacrol'un *in vivo* Genotoksik Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Benli M., Kaya I., Yiğit N. (2007). Screening Antimicrobial Activity of Various Extracts of *Artemisia dracunculus* L.. Cell Biochem Function; 25(6), 681-686.
- Bolandian M., Dorostkar R., Shadbad N. N., Ghaleh H. E. G. (2019). Use Aqueous Extract of Tarragon in Combination with Asacol on Cytomegalovirus Colitis Model: Synergistic Effect in Inflammatory Disease Therapy. Journal of Biochemical Technology, Special Issue (2), 143-150.
- Ceylan A. (1989). Tıbbi Bitkiler II. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yay. No: 481, Bornova-İzmir, 1,4, 12, 14.
- Chaleshtori R. S., Rokni N., Razavilar V., Kopaei M. R. (2013). The Evaluation of the Antibacterial and Antioxidant Activity of Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) Essential Oil and Its Chemical Composition. Jundishapur Journal of Microbiology, 6(9), 7877.
- Doğan A. (2019). İlaç ve Zehir Laboratuvar Uygulama Kitabı. Akademisyen Kitabevi, Ankara, 385-390.
- Doğan E. E. (2008). Bazı Flavonoidlerin *Drosophila Melanogaster*'de Antigenotoksik Aktivitesi ve Antioksidan Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Ferguson L. R., Bronzetti G., De-Flora S. (2005). Mechanistic Approaches to Chemoprevention of Mutation and Cancer. Mutation Research, 591(1), 3-7.
- Fernandez-Lizarazo J.C., Mosquera-Vasquez T., Chaves B., Sarmiento F. (2011). Phyllochron and Differential Growth Between Plants of French Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) with Different Source of Propagation. Agronomía Colombiana, 29(3), 387-397.
- Froushani S.M.A., Zarei L., Ghaleh H.E.G., Motlagh B.M. (2016). Estragole and Methyl-eugenol-free Extract of *Artemisia dracunculus* Possesses Immunomodulatory Effects. Avicenna Journal of Phytomedicine, 6(5), 526-534.
- Garcia C. L., Filippi S., Mosesso P., Calvani M., Nicolai R., Mosconi L., Palitti F. (2006). The Protective Effect of L-Carnitine in Peripheral Blood Human Lymphocytes Exposed to Oxidative Agents. Mutagenesis, 21(1), 21-27.
- Gholivand M. B., Yamini Y., Dayeni, M. (2014). Optimization and Comparison of Ultrasound-Assisted Extraction of Estragole from Tarragon Leaves with Hydro-Distillation Method. Analytical And Bioanalytical Chemistry Research, 2, 99-107.
- Graven E.H., Webber L., Venter M., Gardner J.B. (1990). The Development of *Artemisia afra* (Jacq.) as a New Essential Oil Crop, J. Essential Oil Research. 2(5), 215-220.
- Gülpınar Y. (2012). Tarhun Bitkisinin (*Artemisia drancunculus* L.) Wistar Albino Ratlarda Oluşturulmuş Akut Karaciğer Toksik Hasarına Karşı Koruyucu ve Tedavi Edici Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gaziantep.

- Güner A., Özhatay N., Ekim T., Başer K. H. C. (2000). Flora of Turkey and East Aegean Islands, Supplement II. Edinburgh University Press., Edinburgh, 11, 618-619.
- Hong L., Ying S. H. (2015). Ethanol Extract and Isolated Constituents From *Artemisia dracunculus* Inhibit Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Induce Apoptotic Cell Death. Drug Research, 65(02), 101-106.
- İlisulu K. (1992). İlaç ve Baharat Bitkileri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 360.
- Karaboğa M. (2018). Ratlarda Deneysel Siklofosfamid Toksikasyonunda Sodyum Selenit'in Karaciğer ve Böbrekte Metalloiyonin Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- Kırtunç E. (2002). Doğa Eczanesi Şifalı Bitkiler. 4 Renk Yayınları, 188.
- Klug W. S., Cummings M. R. (2002). Concepts of Genetic. Genetik Kavramlar, 6th Edition, Çeviri Editörü Prof. Dr. Cihan Öner, Palme Yayıncılık.
- Lamian A., Badi H. N., Mehrafarin A., Seifsahandi M. (2017). Changes in Essential Oil and Morpho-Physiological Traits of Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) in Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungus, AMF (*Glomus intraradices* N.C. Schenck & G.S. Sm.) Inoculation Under Salinity. Acta Agriculturae Slovenica, 109-2, 215-227.
- Madrigal-Bujaidar E., Barriga S. D., Cassani M., Marquez P., Revuelta P. (1998). In Cytogenetic Techniques. Mutation Research, 204(3), 379-406.
- Malins D. C., Johnson P. M., Wheeler T. M., Barker E. A., Nayak L., Polissar N. L., Mark, A., Vinson M. A. (2001). Age-related Radical-induced DNA Damage is Linked to Prostate Cancer Research., 61, 6025-6028.
- McEvoy G.K. (2004). American Society of Health-System. Editor, Bethesda, Maryland: AHFS Drug Information, Pharmacists, 929-952.
- Modaresi M., Zarasvand M. A., Madani M. (2018). The Effects of Hydro-Alcoholic Extract of *Artemisia dracunculus* L. (Tarragon) on Hematological Parameters in Mice. Journal of Basic Research Medical Science, 5(1), 10-14.
- Önen Ö., Kılıç A. P., Doğan A. N. C. (2017). Baharat Olarak Kullanılan Bazı Bitki Ekstraktlarının Memeliler Üzerindeki Genotoksik-Antigenotoksik Etkileri. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 10(2), 103-115.
- Özek, T., Karaburun, A. Ç. ve Eser, Ş., (2020). GC/MS Analiz Raporu, Anadolu Üniversitesi Bitki, İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi, GC-202000047 Nolu Kesin Raporu, Eskişehir.
- Özkara A., Akyıl D. (2015). Bitkilerde Mikronukleus Testi ile Genotoksik Hasarın Değerlendirilmesi. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 034, 27-40.
- Reza S. M., Hamideh M., Zahra S. (2015). The Nociceptive and Anti-Inflammatory Effects of *Artemisia dracunculus* L. Aqueous Extract on Fructose Fed Male Rats. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 895417, 5 pages.
- Ribnicky D.M, Poulev A., O'Neal J., Wnorowski G., Molek D.E, Jager R., Raskin I. (2004). Toxicological Evaluation of the Ethanol Extract of *Artemisia dracunculus* for Use as a Dietary Supplement and in Functional Foods. Journal of Hepatology, 42(4), 585-598.
- Schmid, W., (1975). The Micronucleus Test. Journal Mutation Research, 31, 9-15.

- Tak I. R., Mohiuddin D., Ganai B. A., Chishti M. Z., Ahmad F., Dar J. S. (2014). Phytochemical Studies on the Extract and Essential Oils of *Artemisia dracunculus* L. (Tarragon). African Journal of Plant Science, 8(1), 72-75.
- Taner G. (2007). Lipoik Asit ve Ferulik Asitin İnsan Lenfosit Kültüründe Mitomycin-C'ye Karşı Antigenotoksik Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Toroğlu S., Çenet M. (2006). Tedavi Amaçlı Kullanılan Bazı Bitkilerin Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Metotlar. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen ve Mühendislik Dergisi, 9(2), 12-20.
- Tüylü B. A., Yılmaz M., Kıvanç M. (2009). Study on the Antimicrobial, Cytotoxic and Genotoxic Activities of the Essential Oil *Artemisia dracunculus* L.. Fresenius Environmental Bulletin, 18(5), 885-889.
- Wang, L., Weller, C. L., (2006). Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants. Trends in Food Science and Technology, 17, 300-312.
- Wierdak R. N., Zawiślak G. (2014). Herb Yield and Bioactive Compounds of Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) as Influenced By Plant Density. Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus, 13(2), 207-221.
- Yiğit N., Benli M. (2005). Ülkemizde Yaygın Kullanımı Olan Kekik (*Thymus Vulgaris*) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 3(8), 1-8.
- Zarezade V., Moludi J., Mostafazadeh M., Mohammadi M., Veisi A. (2018). Antioxidant and Hepatoprotective Effects of *Artemisia dracunculus* Against CCL₄-Induced Hepatotoxicity in Rats. Aveyanne Journal of Phytomedicine, 8(1), 51-62.