

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Amine HAFİS ABDELSALAM

***COMMIPHORA MYRRHA* UÇUCU YAĞININ İN VİTRO
SİTOGENOTOKSİK VE MUTAJENİK ETKİLERİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA-2020

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

COMMIPHORA MYRRHA UÇUCU YAĞININ İN VİTRO SİTOGENOTOKSİK VE MUTAJENİK ETKİLERİ

Amine HAFİS ABDELSALAM

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman : Prof. Dr. Hasan Basri İLA
Yıl: 2020, Sayfa: 113
Jüri : Prof. Dr. Hasan Basri İLA
: Prof. Dr. Sadık DİNÇER
: Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

Bu çalışma, *Commiphora myrrha* esansiyel yağın sitogenotoksik ve mutajenik etkileri ortaya koymak amacıyla planlanmıştır. Çalışmalar *in vitro* koşullarda insan periferik lenfositlerinde mikronukleus (MN) ve komet (kuyruklu yıldız) testleriyle gerçekleştirilmiştir. Ayrıca DNA koruyucu aktivite testi için ticari PBR322 plazmidi kullanılmıştır. Ames testi için *Salmonella typhimurium*'un mutant suşları olan TA98 ve TA100 suşları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan testlerin tamamında test maddesi ile akut muamele yöntemi benimsenmiştir. İnsan periferik lenfositlerde MN için 24 ve 48 saat, komet için 1 saat ve DNA koruyucu aktivite 100 dk boyunca *Commiphora myrrha* uçucu yağın ile 0.03125, 0.0625 ve 0.125 µL/mL konsantrasyonlarda muamele edilmiştir. Ames testinde ise *Commiphora myrrha* uçucu yağın 0.0625, 0.125, 0.25, 0.50 ve 1 µL/petri konsantrasyonları kullanılmıştır.

Çalışmada *Commiphora myrrha* esansiyel yağın 24 saat süresinde MN 0.0625 ve 0.125 µL/mL konsantrasyonlarda muamelesiz kontrole göre önemli düzeyde artmıştır. 48 saatlik muamele süresinde ise sadece en yüksek konsantrasyonda (0.125 µL/mL) anlamlı çıkmıştır. NBI ise sadece en yüksek konsantrasyonda (0.125 µL/mL) hem 24 hem de 48 saatlik muamele süresinde tüm kontrollere göre önemli bulunmuştur. Komet testinde sağlıklı lenfositlere yapılan mür yağı muamelesi sonucunda hasarlı hücre yüzdesi ve genetik hasar indeksi değerlerinde bir miktar artış gözlenmiştir ancak sadece en yüksek konsantrasyonda saptanan artışın muamelesiz kontrole göre önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Test maddesinin tek başına Plazmid DNA'sına zarar vermediği, fakat pozitif kontrol olarak kullanılmış H₂O₂ ve UV'nın tek veya kombine etkisine karşı düşük şekilde DNA'ya koruduğu gözlenmiştir. Son olarak oksidatif stres parametrelerinde kontrollere göre önemli bir farklılık saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: *Commiphora myrrha* uçucu yağı, Mür, Mikronukleus (MN), Ames/Salmonella/Mikrozom, komet, DNA koruyucu aktivite

ABSTRACT

MSc THESIS

IN VITRO CYTOGENOTOXIC AND MUTAGENIC EFFECTS OF COMMIPHORA MYRRHA ESSENTIAL OIL

Amine HAFİS ABDELSALAM

**ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOLOGY**

Supervisor : Prof. Dr. Hasan Basri İLA
Year: 2020, Pages: 113
Jury : Prof. Dr. Hasan Basri İLA
: Prof. Dr. Sadık DİNÇER
: Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

This study is planned to reveal the cytogenotoxic and mutagenic effects of *Commiphora myrrha* essential oil. *In vitro* micronucleus (MN) and comet assay tests were performed on human peripheral lymphocytes. Additionally, for DNA protective activity testing the commercial PBR322 plasmid was used. for the Ames test it was carried out using TA98 and TA100 strains, which are mutant strains of *Salmonella typhimurium*. The acute treatment method with test substance has been adopted in all tests performed. Human peripheral lymphocytes were treated with *Commiphora myrrha* essential oil concentrations of 0.03125, 0.0625, or 0.125 µL/mL for 24 or 48 hours, for MN tests respectively. Similarly in the comet assay and DNA-protecting activity tests, cells were treated with myrrh oil concentrations in 60 min and 100 min respectively. In the Ames test, *Commiphora myrrha* essential oil concentrations were administered fashion 0.0625, 0.125, 0.25, 0.50 or 1 µL/Petri plate.

In the study, *Commiphora myrrha* essential oil increased MN formation significantly at 24 hours treatment only two concentrations (0.0625 and 0.125 µL/mL) compared to control. On the other hand, the 48 hours treatment period, a statistically significant difference was observed at the highest concentration of (0.125 µL/mL). Nuclear division index (NDI) was found to be significant at the highest concentration (0.125 µL/mL) compared to all controls at 24 or 48 hours of treatment time. Also, myrrh treatment on healthy lymphocytes in the comet test, some increase in the damaged cell percentage, and genetic damage index values were observed, but only the increase detected at the highest concentration was found to be significant compared to the control. Furthermore, It has been depicted observed the test substance does not damage the plasmid DNA alone but it protects DNA lowly and insignificant against the single or combine effect which positive control H₂O₂ and UV. Finally, there was no significant difference in oxidative stress parameters compared to controls.

Keys Words: *Commiphora myrrha* essential oil, Myrrh, Micronucleus (MN), Ames/Salmonella/Microsome Mutagenicity Assay, comet, DNA protective activity.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Son zamanlarda doğal bitki özütleri ve fitokimyasalların, dermatolojik rahatsızlıklar (egzama vb.) dâhil olmak üzere birçok hastalığı potansiyel olarak tedavi ettiği rapor edilmiştir. Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan bitkisel yağ endüstriyel olarak *Commiphora myrrha*'dan izole edilmiş ve ticari temin yoluyla satın alınmıştır. Burseraceae bitki ailesinin bir üyesi olan *Commiphora myrrha* (*C. molmol* (Nees) Engler ayrıca *C. myrrha* (Nees) Engler olarak da bilinir) Güney Arabistan ve Kuzey Afrika'da (başlıca Somali) Güneydoğu Kenya'ya kadar güneyde bulunan değişken bir tür olan kısa dikenli dalları olan küçük ağaç veya çalı formunda bir yapıya sahiptir. Bu bitkinin reçineli atıkları mür olarak bilinen gıda katkı maddesi, koku ve geleneksel tıpta tedavi edici olarak kullanılan önemli bir ticari ve tıbbi üründür. Antik çağlardan beri *Commiphora* cinsi 200'den fazla türden oluşur ve bunlara ait bitkisel ürünler ağrı, cilt enfeksiyonları, enflamasyon durumları, diyare ve periodontal hastalıkları tedavi etmek için doğal bir ilaç olarak kullanılır. Daha yakın bir tarihte yapılan çalışmalarda, *Commiphora myrrha* ve diğer çeşitli *Commiphora* türlerinden elde edilen ürünlerin önemli antiseptik, anestetik ve antitümör özelliklerine sahip olduğu kabul edilmektedir. Geleneksel uygulamalar ve kanıta dayalı araştırmalar, bu özelliklerin doğrudan esansiyel yağda bulunan aktif bileşikler olan terpenoidlerle ilgili olabileceğini öngörmektedir.

Esansiyel yağlar, tarih boyunca halk hekimliğinde kullanılmıştır. Uçucu yağlara olan ilgi, aromaterapinin popüleritesi ile son yıllarda yeniden canlanmıştır. Bu tedavide etkili yağlar bir başka taşıyıcı yağda seyreltilerek uçucu hale getirilir ve vücut masajlarında kullanılır. Kadim ve ilginç geçmişi olan Mür (Myrrh) yağı modern aromaterapi uygulamalarında; zihnin rahatlaması, kaygı bozukluğu ve endişe duygusunun hafifletilmesine, bazı fiziksel ve duygu durum rahatsızlıkların tedavisine yardımcı olduğu belirtilmektedir. Bu yağın birçok faydası bulunmakla birlikte özellikle içeriğindeki bileşenlerin doğal yaşlanma karşıtı niteliğe sahip olup normal cilt bakımı ve problemli ciltlerde ki kullanımından ötürü literatüre

geçmiştir. Tüm bunlarla beraber uçucu yağların bazı istenmeyen yan etkileri de bulunmaktadır. Bu kapsamda herhangi bir kimyasal maddenin olası genotoksik ve sitotoksik risklerinin belirlenmesi için güvenilirliği evrensel normlarca kabul edilen kısa süreli genotoksisite testleri geliştirilmiştir. Bu çalışmada test maddesi olan *Commiphora myrrha* uçucu yağının (mür yağı) *in vitro* genositotoksik, mutajenik veya antigenotoksik potansiyelini ortaya çıkarmak amacıyla yürütülmüştür. Mikronükleus (MN) testi, tek jel elektroforez (Komet) testi ve Total oksidan ve antioksidan (TOS/TAS) testi için sağlıklı kişilerden alınmış kültüre edilmiş lenfositleri kullanılmıştır. Ayrıca nokta mutasyonu ve çerçeve kayması mutasyonlarını tespit etmesi için *Salmonella typhimurium* mutant suşları (TA98 ve TA100) geri mutasyon (Ames testi) testi ve DNA koruyucu aktivite testi için ise pBR 322 plazmidi kullanılmıştır.

Araştırmada mikronükleus oluşumunu saptamak için sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın dört kişiden (2 kadın 2 erkek) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 0.2 mL ekilmiş ve hücreler $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat inkübe edilmiştir. Mür yağın etkilerini belirlemek için emülgatör olarak su ile çözülmüş %0.5 Tween 80 (polisorbat 80) içerisinde hazırlanmış son konsantrasyon 0.03125, 0.0625 ve 0.125 $\mu\text{L/mL}$ olacak şekilde mür yağı kültür ortamına, kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra ilave edilmiştir. Test maddesi konsantrasyonları ön çalışma ile saptanmıştır. Her deneyin birlikte muamelesiz kontrol, çözücü kontrol (çözülmüş Tween 80) ve pozitif kontrol (MMC) grubu oluşturulmuştur. İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra her tüpe konsantrasyonu 6 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde sitokalsin-B maddesi ilave edilmiş ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenmiştir.

MN sayısını belirlemek amacı ile her kişiye ait preparatlarda iki nukleusa sahip (binukleer) toplam 1000 hücre incelenmiş ve bu binükleer hücreler içerisinden mikronukleuslu olanlar saptanarak iki nukleuslu hücre %'si ve nukleus bölünme indeksini (NBI) hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre test maddesinin MN artışları muamelesiz kontrole göre olup tween 80 ile arasında

anlamalı farklılık bulunmamıştır. *Commiphora myrrha* esansiyel yağının sitotoksik potansiyeli ise NBI ile değerlendirilerek muamelesiz kontrole göre hafif düşüş göstermekle birlikte sadece en yüksek derişimde istatistiksel önem saptanmıştır.

Kuyruklu yıldız (comet, komet) testi (tek hücreli jel elektroforezi) ökaryotik hücrelerde DNA iplik kopmalarını ölçmek için basit bir yöntemdir. Son yıllarda, genotoksisite kuyruklu yıldız veya tek hücreli jel elektroforezi testi, moleküler epidemiyoloji, ekogenotoksikoloji ve ayrıca DNA hasarını değerlendirmek için standart yöntemlerden biri haline gelmiştir. Bu çalışmada Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın bir kadın bir erkekten alınan kandan lenfosit hücreleri izole edilerek test prosedürü gerçekleştirilmiştir. Sonuçları değerlendirmek için Etidyum bromid ile boyanmış preparatlar Olympus altında 400X büyütmede incelenmiştir. Kullanılan test maddesinin her muamele grubu ve kontrollerinde rastgele seçilmiş 100'er hücre incelenmiş ve fotoğrafları çekilerek görüntüleri kaydedilmiştir. Hücreler hasar düzeylerine göre 0'dan 4'e kadar skorlanarak incelenmiştir. Test maddesin tüm konsantrasyonlarında hasarlı hücre yüzdesi ve genetik hasar indeksi değerlerini artırmış olduğunu ancak yalnızca en yüksek konsantrasyondaki artışın muamelesiz kontrole göre anlamlı olduğu bulunmuştur. 1975 yılında Dr. Ames ve meslektaşları tarafından yayınlanan çalışma, yeni kimyasalların ve ilaçların toksikolojik değerlendirmesinin ayrılmaz bir parçası olan genetik toksikolojinin standardizasyonunda önemli bir rol oynamıştır. Deneyin bilimsel esası; çoğalması için histidin amino asidine gereksinim duyan *Salmonella typhimurium* mutant oksotrofik suşların, mutajenik etkiler ile tekrar histidin sentezleyebilir atasal (prototrof) forma dönüşmesi temeline dayanmaktadır. Bu yolla test maddelerinin neden olacağı geri mutasyonların frekansı saptanmaktadır. TA98 suşu çerçeve kayması, TA100 suşu ise baz çifti değişimi tipindeki mutasyonların saptanmasında kullanılmıştır. Mür yağının 0.0625, 0.125, 0.25, 0.50, 1 µL/petri konsantrasyonları ve deneye paralel olarak spontan muamelesiz, çözücü ve pozitif kontrol grupları kullanılmıştır. 72 saat inkübasyon süresi sonunda petrilerdeki gözle görülür koloniler sayılmıştır.

Sonuçlara göre *Commiphora myrrha* esansiyel yağının olasılıkla mutajenik etki göstermemekle birlikte önemli olmayan hafif bir sitotoksik etkisine dikkat çekilebilir. ROS kaynaklı oksidatif hasara karşı koruyucu aktivite gösteren eksojen ve endojen bileşiklerin etkilerini test etmek için çeşitli analizler geliştirilmiştir. DNA koruyucu aktivite testi ve total oksidan ve anti oksidan (TOS ve TAS) testleri bu analizler içinde değerlendirilebilir. DNA hasarı oluşturma veya DNA hasarlarına karşı koruma aktivitesini belirlemek için pBR322 plazmid DNA (vivantis) kullanılmıştır. Plazmid DNA, doğrudan mür konsantrasyonlarına veya mür varlığında H₂O₂ ve UV uygulamasına maruz bırakılmıştır. Daha önce bilinen metodu laboratuvar koşullarımıza uyacak şekilde modifiye edilerek kullanılmıştır. Daha önceden belirlenmiş test maddesi (mür yağı) son konsantrasyonu 0.03125, 0.0625 ve 0.125 µL/mL olacak şekilde 5 µL içerisinde pBR 322 Plazmidine eklenerek 5-10 dk muamele edilerek elektroforez cihazında 100V'ta 100dk yürütülmüştür. Çözücü ve pozitif kontrol (UV ve H₂O₂) grupları kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre test maddesinin DNA'da herhangi bir hasara yol açmadığı gibi H₂O₂ ve UV'nin neden olduğu DNA hasarlarına karşı önemli koruma sağlamadığı saptanmıştır. Oksidatif stres parametreleri (TOS ve TAS) Rel Assay kitleri kullanılarak spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre maddesinin kan kültürüne uygulanan tüm mür konsantrasyonlarında kültürün hücresiz sıvı fazında toplam oksidan (TOS), toplam antioksidan (TAS) ve oksidatif stres indeksleri (OSI) değerleri kontrole ile kıyasladığında istatistiksel önemli olmayan bir takım artışlar bulunmuştur. Sonuçlar toplu halde değerlendirilecek olursa çalışmada yüksek dozlarda genotoksik etki görülmekle birlikte bu etkinin muamelesiz kontrole göre önemli olduğu ancak tween 80 kontrolüne yakın olduğu ortaya çıkmaktadır. Bununla birlikte yüksek konsantrasyondaki sitotoksik etki dikkat çekmektedir. Bu sitotoksik potansiyel, ajanın gelecek projeksiyonunda önemli bir ivme yaratmasına imkan tanıyabilir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansın ders döneminden itibaren tez konumun belirlenmesinde, yürütülmesinde ve yazılmasına kadar her konuda bana destek olan, bilgi ve tecrübesi ile sabrı, hoşgörüsü ve her daim samimi yardım ve desteğini gönülden hissettiğim, öğrencisi olmaktan onur ve gurur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan Basri İLA'ya en içten duygularıyla sonsuz minnetlerimi sunarım.

Ayrıca birçok konuda fikir aldığım ve hayata dair tecrübesinden faydalandığım emekli Öğr. Üyesi Sayın Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ'a çok teşekkür ederim.

Genetik laboratuvarında birlikte çalıştığımız ve çok büyük yardımlarını gördüğüm başta Arş. Gör. Mehmet Tahir HÜSUNET ve Dr. Erman Salih İSTİFLİ hocalarıma, laboratuvar arkadaşlarım Uzman Biyolog Rumeysa MEŞE'ye, Uzman Biyolog Goulzar ULAYA'ya, Biyolog Büşra BOZ'a ve Biyolog Sedat POLAT'a teşekkür ederim.

Ayrıca, Yüksek Lisans yapmamı sağlayan Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına ve tez çalışmamı maddi yönden destekleyen Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Son olarak tüm aileme, ayrıca hem okumamı hem de hayatımın her anında maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen babam Hafis ABDELSALAM ve annem Rachida MAHAMAT'a bütün emekleri için gönül dolusu teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIV
ŞEKİLLER DİZİNİ	XVI
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XVIII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	13
2.1. <i>Commiphora myrrha</i> 'nın (yağı, reçinesi ve bileşenleri) İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	14
3. MATERYAL VE METOD	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
3.1.1.1. <i>Commiphora myrrha</i> uçucu yağı (test maddesi)	25
3.1.1.1.(1). <i>Commiphora myrrha</i> uçucu yağının Kimyasal Özellikleri.....	25
3.1.1.1.(2). Mür yağı ve mür etanol özü kimyasal bileşimi	26
3.1.1.1.(3). Mür yağının Kullanım Şekli	30
3.1.1.1.(3).1. Direkte cilde sürülerek.....	30
3.1.1.1.(3).2. Soğuk kompres olarak.....	30
3.1.1.1.(3).3. Direk içmek.....	30
3.1.1.2. Tween 80 (Çözücü)	30
3.1.1.2.(1) Tween 80 Kimyasal Özellikleri.....	31
3.1.2. Kullanılan Diğer Kimyasalların Hazırlanması	31
3.1.2.1. Ampisilin Çözeltisi (%0.8/0.02 NaOH)	31

3.1.2.2. (%0.13) Biotin Çözeltisi.....	32
3.1.2.3. Elektroforez Tamponu.....	32
3.1.2.4. Entellan (Merck No: 7961).....	32
3.1.2.5. Etidium Bromid (EtBr) (Sigma, Merck, No: 1239-45-8).....	32
3.1.2.6. Etil Alkol (Sigma No: 32205)	33
3.1.2.7. Fiksatif.....	33
3.1.2.8. Fosfat Tamponu (Phosphate Buffer Saline = PBS).....	33
3.1.2.9. Giemsa Boyası.....	33
3.1.2.10. Glasiyal Asetik Asit.....	33
3.1.2.11. Glikoz Çözeltisi (%20).....	34
3.1.2.12. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂).....	34
3.1.2.13. Hipotonik Eriyik.....	34
3.1.2.14. (%0.5) Histidin Çözeltisi	35
3.1.2.15. Histidin/Biyotin Plakları (HB Agar)	35
3.1.2.16. Histidin/Biyotin (HB) Solüsyonu (0.5 mM).....	35
3.1.2.17. Histidin/Biyotin/Ampisilin Plakları (HBA).....	36
3.1.2.18. HMA Agar (High Melting Agar=Yüksek Kaynama Dereceli Agar)	36
3.1.2.19. Kromozom Medyumu	37
3.1.2.20. Kolşisin (Colchicine).....	37
3.1.2.21. Lizis Çözeltisi.....	38
3.1.2.22. LMA Agar (Low Melting Agar=Düşük Erime Dereceli Agar).....	38
3.1.2.23. Lysing Çözeltisi.....	38
3.1.2.24. Metanol (Methanol, Metil Alkol, Karbinol).....	39
3.1.2.25. Minimal Glukoz Agar (MGA) Plakları	39
3.1.2.26. Mitomisin C (MMC) (Sigma No: Y0000378).....	39
3.1.2.27. Nitrik Asit (HNO ₃)	40
3.1.2.28. Nötralizasyon Tamponu	40

3.1.2.29. 4-Nitro-o-Fenilendiamine (4-NPD) (20 µg/petri) CAS No: 99-56-9	40
3.1.2.30. Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)	41
3.1.2.31. Sitokalsin B.....	41
3.1.2.32. Sodyum Azid Çözeltisi (SA) (1 µg/petri) CAS No: 26628-22-8	42
3.1.2.33. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)	42
3.1.2.34. Top agar (yumuşak agar).....	43
3.1.2.35. Tripan Blue.....	43
3.1.2.36. Vogel-Bonner-E Ortamı (50XVB tuzları).....	43
3.1.3. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	44
3.1.3.1. Elektroforez Tankı (27.5/25 cm)	44
3.1.3.2. Elektroforez Güç Kaynağı.....	44
3.1.3.3. Hassas Terazî.....	44
3.1.3.4. İnkübatör	44
3.1.3.5. Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı	44
3.1.3.6. Mikroskop	45
3.1.3.7. Otoklav	45
3.1.3.8. Petri Kutuları	45
3.1.3.9. pH Metre.....	45
3.1.3.10. Santrifüj	45
3.1.3.11. Soğutmalı Santrifüj.....	46
3.1.3.12. Steril Kabin (Flow Kabin)	46
3.1.3.13. Vorteks	46
3.1.3.14. Lamların Temizlenmesi.....	46
3.1.3.15. Sterilizasyon	46
3.2. Metod.....	47
3.2.1. Mikronükleus (MN) Oluşumunu Saptaması	47

3.2.1.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	47
3.2.1.2. Preparatların Boyanması	48
3.2.1.3. Mikronukleus (MN) Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme.....	48
3.2.1.4. Mikronukleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBİ) Saptanması	48
3.2.1.5. Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	52
3.2.2. Komet Testi (Tek hücre jel elektroforez testi / Kuyruklu yıldız testi).....	52
3.2.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	52
3.2.2.2. Mikroskopik İnceleme.....	55
3.2.3. AMES/Salmonella Bakteriyel ters mutasyon testi	62
3.2.3.1. <i>Salmonella typhimurium</i> Test Suşları ve Özellikleri.....	62
3.2.3.2. Salmonella Suşlarının Kültürlerinin Canlılıklarının Belirlenmesi.....	64
3.2.3.3. Bakteri Suşlarının Dondurulması ve Saklanması	64
3.2.3.4. Çalışmada Kullanılacak Test Suşlarının Genetik Kontrolü... 64	
3.2.3.4.1. Histidin Gereksinimi Kontrolü.....	64
3.2.3.5. Gecelik Kültürün Hazırlanması	65
3.2.3.6. Test Maddelerinin Dozlarının Belirlenmesi	65
3.2.3.7. Pozitif Mutajenler.....	65
3.2.3.8. Ames Testinin Yapılışı (Metabolik Aktivasyon Yokluğunda).....	65
3.2.4. DNA Koruyucu Aktivite testi	67
3.2.5. Toplam Oksidan (TOS) ve Antioksidan Seviyesi (TAS) Ölçümü ...	70
3.2.6. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi	70
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	73

4.1. Bulgular	73
4.1.1. <i>Commiphora myrrha</i> Uçucu Yağının Mikronukleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri	73
4.1.2. <i>Commiphora myrrha</i> Uçucu Yağının DNA Hasarı Oluşumu Üzerine Etkileri (Komet Testi Bulguları).....	78
4.1.3. <i>Commiphora myrrha</i> Uçucu Yağının Geri Mutasyon (Ames) Oluşumu Üzerindeki Etkileri	81
4.1.4. <i>Commiphora myrrha</i> uçucu yağının Plazmid DNA Oksidatif Hasarı Üzerindeki Etkileri.....	82
4.1.5. <i>Commiphora myrrha</i> Uçucu Yağının Sitotoksik Etkileri.....	84
4.1.5.1 Nukleus Bölünme İndeks (NBI) Verileri.....	84
4.1.5.2 Bakteri Koloni Sayısı Verileri.....	84
4.1.5.3 <i>Commiphora myrrha</i> Uçucu Yağının Oksidatif Stres Verileri	84
4.2. Tartışma	86
4.2.1 <i>Commiphora myrrha</i> (Mür) Yağının Klastojenik ve Anöjenik Etkileri.....	86
4.2.2 <i>Commiphora myrrha</i> (Mür) Yağının Gen Mutasyonu Oluşumu Üzerine Etkileri	88
4.2.3 <i>Commiphora myrrha</i> (Mür) Yağının Oksidatif Potansiyeli	89
4.2.4 <i>Commiphora myrrha</i> (Mür) Yağının Hücre Bölünmesi Üzerine Olan Etkileri.....	90
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	95
5.1. Sonuçlar	95
5.2. Öneriler	96
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	113



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. <i>Commiphora myrrha</i> uçucu yağının bileşenlerinin nispi konsantrasyonu (%) ^c ve kapalı formülleri	27
Çizelge 3.2. En Yaygın olarak kullanılan <i>Salmonella</i> Test Suşlarının Genotipleri.....	63
Çizelge 4.1. Farklı Konsantrasyonlarda <i>C. myrrha</i> uçucu yağı ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferel Kan Lenfositlerinde Hücre Başına Düşen Toplam MN %'si, MN İçeren İki Nukleuslu Hücre %'si Nükleer Bölünme İndeksi(NBİ) ve Oranları	74
Çizelge 4.2. Üç Farklı Konsantrasyonlarda <i>Commiphora myrrha</i> Uçucu Yağı ile 1 Saat Muamele Edilen İnsan Periferel Lenfositlerinde Komet Testi Kapsamında Saptanan DNA Hasar Oranları	79
Çizelge 4.3. Farklı Konsantrasyonlarda <i>C.myrrha</i> Uçucu Yağı İle Metabolik Aktivasyon Yokluğunda Muamele Edilen <i>Salmonella typhimurium</i> TA98 ve TA100 Suşlarındaki Revertant Koloni Sayısı Ortalamaları	81
Çizelge 4.4. <i>Commiphora myrrha</i> uçucu yağının DNA Koruyucu Aktivite Testinde Kullanılan Doz ve Süreleri	83
Çizelge 4.5. <i>Commiphora myrrha</i> uçucu yağın İnsan Periferel Lenfosit Kültüründe Oluşturduğu Toplam Oksidan Seviye (TOS), Toplam Antioksidan Seviye (TAS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Değerleri.....	85



Şekil 3.1. <i>Commiphora myrrha</i> uçucu yağı ana bileşenlerinin açık formülleri ...	29
Şekil 3.2. Tween 80 açık formülü	31
Şekil 3.3. Kolşisin'in açık formülü	38
Şekil 3.4. Mitomycin C'nin açık formülü	40
Şekil 3.5. Sitokalsin B	42
Şekil 3.6. Bir nükleuslu hücre. X1000	50
Şekil 3.7. İki nükleuslu hücre. X1000	51
Şekil 3.8. Üç nükleuslu hücre. X1000.	51
Şekil 3.9. Dört nükleuslu hücre. X1000	52
Şekil 3.10. DNA hasarına uğramış hücrede baş ve kuyruk oluşumu	58
Şekil 3.11. Komet tekniği genel aşamaları (Fidan, 2008)	59
Şekil 3.12. Komet testi ile farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri.	60
Şekil 3.13. DNA'sı göç etmemiş (kuyuksuz=a) nükleuslar. X1000	61
Şekil 3.14. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=b) nükleuslar. X1000.	61
Şekil 3.15. <i>Salmonella typhimurium</i> TA100 suşunun kontrol koloni görünümü	66
Şekil 3.16. DNA Koruyucu Aktivite görüntüsü	69
Şekil 4.1. Bir mikronükleus içeren binükleer hücre (0.0625 µl/mL Mür yağı, 24 saatlik muamele) (x1000)	75
Şekil 4.2. İki mikronükleus içeren binükleer hücre (0.125 µL/mL Mür yağı, 24 saatlik muamele) (x1000)	75
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda mür yağı ile 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre yüzdesinin (% MNBN) konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı	77

Şekil 4.4. Mür yağı 0.0625 µL/mL'lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (a= DNA'sı göç etmemiş nükleuslar) X40.	80
Şekil 4.5. Mür yağı 0.0625 µL/mL'lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (b= DNA'sı göç etmiş nükleuslar) X40. ...	80
Şekil 4.6. H ₂ O ₂ ve UV yokluğunda ve varlığında, mür yağı ile muamele edilmiş pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi DNA bant paternleri.....	83

SİMGELER VE KISALTMALAR

% IC ₅₀	: Yarı maksimal İnhibitör konsantrasyonu
°C	: Santigrat derece
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
µg	: Mikrogram
µg/µL	: Mikrogram/mikrolitre
µg/mL	: Mikrogram/Mililitre
AGS	: İnsan Mide Kanseri Hücre Hattı
AKI	: Akut böbrek hasarı
ark.	: Arkadaşları
bw	: Vücut ağırlığı
CA	: Chromosome Aberration
CBMN	: Sitokinezi-Bloklayan Mikronukleus Testi
CDDP	: Sisplatin
CHO	: Chinese Hamster Ovary
cm	: Santimetre
CM1	: 2-metoksifuranodien
CM2	: 2-asetoksifuranodien
Cyt-B	: Cytochalsin-B
ÇK	: Çözücü kontrol
dk.	: Dakika
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
EAC	: Ehrlich asit karsinomu
EO	: Uçucu yağı
EtBr	: Etidyum Bromid
ETOAC	: Etil asetat
g	: Gram

GBM	: Glioblastom Multiforme
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi
GI	: Gastrointestinal
GST	: Glutasyon S-transferaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HB	: Histidin/Biyotin
HBA	: Histidin/Biyotin/Ampisilin
HCl	: Hidroklorik asit
HCT-116	: İnsan kolon karsinomu
HEK-293	: Embriyonik böbrek hücre hattı
HeLa	: Rahim ağzı kanseri hücre hattı
Hep G2	: İnsan karaciğer kanseri
HepG-2, Hepal-6	: Karaciğer kanseri hücre hattı
HNO ₃	: Nitrik Asit
HR	: Hougari Regular
HS-1	: Cilt kanseri
HUVEC	: İnsan göbek damarı endotel hücresi
KA	: Kromozom Aberasyonu
KCl	: Potasyum klorür
KK	: Kalsiyum Karbonat
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
MCF-7	: İnsan meme adenokarsinomu
ME-OH	: Metanol
mg/kg	: Mikrogram/Kilogram
MGA	: Minimal glikoz agar
MGA	: Minimal Glukoz Agar
MgCl	: Magnezyum klorür
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MI	: Mitotik İndeks

MIC	: Minimum inhibitör konsantrasyon
mL	: Mililitre
Mm	: Milimolar
MMC	: Mitomycin C
MN	: Mikronükleus
MNC	: Mononükleer hücre
MSC	: Mezenkimal kök hücreler
MTT	: Hücre çoğalma önleyici analiz
MTX	: Metotreksat
N	: Normal
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
NB	: Nutrient Broth
NBI	: Nükleus Bölünme İndeksi
NCE	: Normokromatik eritrosit
nm	: Nanometre
NO	: Nitrik oksit
O	: Oksijen
p53	: Tümör protein 53
PBS	: Fosfat tamponu
PC-3	: Prostat kanseri hücre hattı
PCE	: Polikromatik eritrosit
PE	: Petrol eter
Ph	: Power of hydrogen (Hidrojenin Gücü)
PK	: Pozitif Kontrol
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)

RRME	: Zengin metanolik ekstraktlarının
RKSAO	: Revertant koloni sayısı aritmetik ortalaması
S9 mix	: Memeli Karaciğer Fraksiyonu [S9]
SA	: Sodyum azid
SCE	: Sister Chromatid Exchange
SCGE	: Single cell gel electrophoresis (Tek Hücre Jel Elektroforezi
SH	: Standart hata
UV	: Ultraviyole
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

1. GİRİŞ

Tıbbi bitkilerle şifa, insanlığın kendisi kadar eskidir. İnsanın doğadaki ilaç arayışı geçmişten beri sürmektedir (Petrovska 2012). Bu etkileşimin işaretleri orta paleolitik çağ olan 60 bin yıl öncesine dayanan fosillerde rastlanmaktadır. İnsanoğlu bitkilerden, hayvanlardan, su ve topraktan tedavi amaçlı yararlanmıştır. Hangi bitkinin hangi hastalığı iyileştirdiğini deneme-yanılma-izleme yöntemi ile ampirik olarak saptayarak zamanla yaşadıkları bölgede bir kültür oluşturmuşlardır. Başlangıçta ilaç olarak doğrudan bitki veya bitki kısımları kullanılırken sonrasında bunlardan elde edilen özüt, tentür ve distilasyon ürünleri kullanılmaya başlanmıştır. Bitkilerin terapötik amaçlı kullanım nedenleri arasında şunlar sayılabilir;

- 1- Bitkinin tamamını veya ilaç olarak tanımlanan bir kısmını tedavi amaçlı kullanılmak,
- 2- Doğrudan ilaç olarak kullanmak üzere bilinen biyoaktif maddeleri izole etmek,
- 3- Yeni moleküller veya yapısı bilinen biyoaktif moleküller ile yüksek verimli, daha yüksek aktiviteye sahip ve de daha az toksisiteye sahip yarı sentetik türevlerini üretmek,
- 4- İzole edilen aktif maddeleri farmakolojik ajan olarak kullanmaktır (*Fabricant ve Farnsworth 2001*).

Kadim kültürlerde kullanıldığı bilinen en eski tıbbi bitkilerden birisi olan *Commiphora myrrha* (Mür) bitkisi ürünleri Eski Mısır'da mumyaları korumak amaçlı, Çin tıbbında cilt enfeksiyonların tedavisinde, Hindistan'da ise hem baharat hem safra kesesi hastalıkları hem de göğüs hastalıklarını tedavi etmek için kullanıldığı kayıtlıdır (Massoud ve ark.2001).

Son zamanlarda doğal bitki ekstraktlarının ve fitokimyasalların, atopik dermatit (AD) (egzama) dâhil olmak üzere birçok hastalığı potansiyel olarak

önlediği ve tedavi ettiği rapor edilmiştir (Başer ve ark. 2003). Burseraceae bitki ailesinin bir üyesi olan *Commiphora myrrha* (*C. molmol* (Nees) Engler ayrıca *C. myrrha* (Nees) Engler olarak da bilinir) Güney Arabistan ve Kuzey Afrika'da (başlıca Somali) Güneydoğu Kenya'ya kadar güneyde bulunan değişken bir tür olan kısa dikenli dalları olan küçük ağaçlar veya çalılardır (Anand ve ark. 2016; Shen ve ark. 2008). Bu bitkinin reçineli atıkları mür olarak bilinen gıda katkı maddesi, koku ve geleneksel Çin tıbbı olarak kullanılan önemli bir ticari ve tıbbi üründür (Zhu ve ark. 2001; Shen ve ark. 2009).

Antik çağlardan beri *Commiphora* cinsi 200'den fazla türden oluşur ve ağrı, cilt enfeksiyonları, enflamatuvar durumlar, diyare ve periodontal hastalıkları tedavi etmek için doğal bir ilaç olarak kullanılır. Daha yakın bir tarihte, *Commiphora myrrha* ve diğer çeşitli *Commiphora* türlerinden elde edilen ürünler önemli antiseptik, anestezik ve antitümör özelliklerine sahip olduğu kabul edilmektedir. Geleneksel uygulamalar ve kanıta dayalı araştırmalar, bu özelliklerin doğrudan esansiyel yağda bulunan aktif bileşikler olan terpenoidlere atfedilebildiğini desteklemiştir. Son zamanlarda güncel çalışmalar, mür ürünlerinin antineoplastik, antiparaziter bir ajan ve yaraların iyileşmesinde yardımcı olarak kullanımının doğrulanması için klinik deneme metodolojilerinin uygulanmasına odaklanmıştır ([https://journals.lww.com/hnpjournal/Abstract/2007/.](https://journals.lww.com/hnpjournal/Abstract/2007/)). Mür'ün avantajlarından biri, birçok bitki ve bitkisel ürün gibi insanlar ve hayvanlar için güvenli olmasıdır. Bu doğal aroma maddesi ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmıştır. Son zamanlarda antiparaziter bir ajan olarak mür üzerinde iyi organize edilmiş bilimsel çalışmalar mevcuttur (Ford ve ark 1992).

Esansiyel yağlar, tarih boyunca halk hekimliğinde kullanılmıştır. Uçucu yağları üretmek için erken zamanlı kullanılan teknik ve yöntemlerden birisi bir Al-Endülüs (Müslüman İspanya) hekimi, eczacı ve kimyager olan Ibn al-Baitar'a (1188-1248) ait olduğuna inanılmaktadır (Houtsma, 1993).

Uçucu yağlara olan ilgi, aromaterapinin (uçucu yağlar ve diğer aromatik bileşiklerin kullanıldığı alternatif bir tıp dalı) popülaritesi ile son yıllarda yeniden

canlanmıştır. Bu tedavide yağlar başka bir taşıyıcı yağda seyreltilerek uçucu hale getirilir ve masajda kullanılır. Ayrıca havada bir nebulizatör ile yayılır veya mum alevi üzerinde ısıtılarak da tütsü olarak yakılmaktadır (*Klaassen, Curtis D., 1991*).

Mür (Myrrh) yağının eski ve ilginç geçmişi vardır. Çeşitli tarihi kayıtlarda yaklaşık 4.000 yıllık geçmişe dayanandığı ortaya çıkmıştır. Eski Mısır'da çok popüler olan mür yağı zengin kadınlar için cilt bakım ürünlerinin hazırlanması ve cilt tedavisi gibi bir dizi kozmetik ve tıbbi amaçlarla kullanılmıştır. Ayrıca Eski Yunanlılarda da mür yağının iyileştirici özelliğinden dolayı iltihaplanma ve enfeksiyonu önlemeye yardımcı olmak için yaralara yüzeysel tarzda uygulandığı ve aynı zamanda da mistik aromatik kokusundan da bir çok yerde seremonik amaçla kullanıldığı gözlenmiştir. Günümüzde çeşitli amaçlarla kullanılan mür yağının elde etmek için mür ağacı gövdesinin uygun şekilde kesilerek içindeki aromatik reçinenin açığa çıkarılması gerekir. Reçine ağaç gövdesi boyunca gözyaşı gibi akarak kuruması beklenir. Daha sonra bu reçine toplanır ve distilasyon (damıtma) işleminden geçirilerek çok yönlü ve şifalı mür yağı elde edilir (<https://www.tisserand.com.tr/urunler/organik-yaglar>).

Modern aromaterapi uygulamalarına göre mür yağı; zihnin rahatlaması, kaygı bozukluğu ve endişe duygusunun hafifletmesine, bazı fiziksel ve duygusal rahatsızlıkların tedavisine yardımcı olduğu belirtilmektedir. Bu yağın bir çok faydası bulunmakla birlikte özellikle içeriğindeki bileşenlerin doğal yaşlanma karşıtı olup normal cilt bakımı ve problemli ciltlerdeki kullanımından ötürü literatüre geçmiştir (*Tisserand Aromaterapi*).

Tüm bunlarla beraber uçucu yağların bazı yan etkileri de bulunmaktadır (*Şarer, 1991; Leal-Cardoso ve Fonteles, 1999*). Gıda ve tedavi amacıyla aromatik bir bitkinin kendisi veya bir bileşeni kullanılıyorsa bunların insan sağlığına olan etkileri; özellikle hücre bütünlüğünün korunması ve kalıtsal yapıda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılması son derece önemlidir. Herhangi bir kimyasal maddenin olası genotoksik ve sitotoksik risklerinin belirlenmesi için güvenilirliği evrensel normlarla kabul edilen kısa süreli genotoksikite testleri tercih

edilmektedir. Kısa süreli genotoksisite testleri bir kimyasal maddenin genotoksik/antigenotoksik ve/veya sitotoksik/proliferatif olup olmadığının belirlenmesinde kullanılan yöntemlerdir.

Bir maddenin mutasyonları indüklemesi, genleri aktive veya inaktive hale getirmesi gibi doğrudan veya dolaylı etkilerinden ötürü hücrelerin genetik bilgisine (DNA yapı, sekans veya gen sayısındaki değişiklikler) potansiyel zarar verme kabiliyeti genotoksisite olarak ifade edilir. DNA tamir mekanizması veya apoptoz yollarının uyarımı normal olarak hasarı onarmak veya kontrol etmek için aktive edilir. Ancak eğer hasar tamir edilmeden kalırsa, mutasyon ve hatta kanser ortaya çıkabilir. Çoğu zaman genomdaki değişiklikler kalıcı ve kalıtsal olup hem somatik hücreleri hem de gelecek nesillere aktarılabilecek olan germ hücrelerini etkileyebilir. Tüm mutajenlerin genotoksik etkiye sahip olduğu söylenebilir ancak genotoksik bileşiklerin her zaman mutlaka mutajenik olmadıkları bilinmelidir. Genotoksisite testlerinin amacı herhangi bir ajanın hücrelerdeki genetik maddelere zarar verip kansere neden olup olmayacağını belirlemektir. Bu tür testler sayesinde hücrenin şüpheli etkene maruz kaldıktan sonra ortaya çıkacak DNA hasarlarını (nokta mutasyonları, DNA iplik kopması, yapısal veya sayısal kromozomal anormallikler vb.) saptamak amacıyla bakteriyel, maya ve memeli hücrelerinde yapılabilecek çeşitli genotoksisite testleri geliştirilmiştir.

Standart *in vitro* testler, kardeş kromatid değişimi (KKD) (Tucker ve ark., 1993), kromozom aberasyonu (KA (Carrano ve Natarajan, 1988, Anderson, 1988, Hagmar ve ark., 1994), mikronükleus (MN) (Heddle ve ark., 1991, Fenech, 2002) ve tek hücre jel elektroforez (Comet) (Singh ve ark., 1988) testleridir. Perry ve Evans (1975)'in bilinen mutajen ve kanserojenlerin Çin hamsteri (*Cricetulus griseus*) yumurta (CHO) hücrelerinde KKD ve KA'yı uyardığını saptamalarından sonra bu testler mutajen ve kanserojenlerin belirlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Salmonella bakteriyel reverse (geri) mutasyon testi (Ames testi); basit, anlamlı ve kabul edilebilir kısa süreli mutajenite ve antimutajenite test sistemlerinden biridir. Test ilk olarak 1971 yılında Ames tarafından geliştirilmiştir

(Ames ve ark., 1973, Maron ve Ames, 1983, Zeiger, 2004, 2010). Yukarıda da belirtildiği gibi mikronukleus (MN) testi genotoksik kanserojenler için en başarılı ve güvenilir testlerden biri kabul edilmektedir. MN'lar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dâhil olmayan, tam kromozom (iğ, kinetokor veya sentromer hasarından dolayı) veya asentrik kromozom fragmentlerinden (DNA iplikçik kırılması nedeniyle) köken alan oluşumlar olarak tanımlanmaktadır.

In vitro MN testi ile hem anöjenlerin hem de klastojenlerin saptanması mümkündür ve aynı anda mitotik gecikmeyi, apoptozu, kromozom kırılmasını, kromozom kaybını ve ayrılmayı aynı anda tespit edebilmektedir (Kirsch-Volders ve ark. 2003, Parry ve Sorrs 1993). Hedeflenen *in vitro* mitoz sırasında aktin inhibitörü sitokalsin-B ilavesi ile Fenech ve Morley (1986) tarafından sitokinez-blok metodolojisinin geliştirilmesi, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift veya daha fazla çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. *In vitro* MN testini iyileştirmek için Fenech ve Morley (1985a, 1986) spontan veya uyarılmış MN frekansının doğru ve güvenilir bir tahminini için sadece bir nükleer bölünmeyi tamamlamış hücrelerde skorlanması gerektiğini önermişlerdir.

In vitro mikronukleus testi şu anda kimyasalların ve farmasötiklerin genotoksitesini test etmek için uygun bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu testin en önemli avantajları:

- *In vitro* MN testi basit bir test yöntemi olup bulguların hesaplanması kolay, daha objektif ve hızlıdır, bu da yüksek bir verim sağlaması,
- *In vitro* MN testinin, herhangi bir primer hücreye veya hücre hattına uygulanabilen bir test olduğu olmasıdır (Kirsch-Volders, ve ark. 2003).

Ames Salmonella/mikrozom mutajenite testi (Salmonella testi; Ames testi), gen mutasyonlarına yol açan genetik hasar üretebilecek çok çeşitli kimyasal maddelerin tespit edilmesi için özel olarak tasarlanmış kısa süreli bir bakteriyel mutasyon testidir (Mortelmans ve Zeiger 2000). Ames testi 1970'lerde UC-

Berkeley'deki Biyokimya Profesörü Bruce Ames tarafından kimyasal bir bileşiğin veya karışımın DNA'da mutasyonlara neden olma kabiliyetinin hızlı ve hassas bir analizi için geliştirilmiştir. Bu testte canlı bir hayvan modeli kullanılmama zorunluluğu olmadığı için, ucuz, kolay ve hızlıdır. 1975 yılında Dr. Ames ve Berkeley'deki California Üniversitesindeki meslektaşları tarafından yayınlanan çalışma, yeni kimyasalların ve ilaçların toksikolojik değerlendirmesinin ayrılmaz bir parçası olan genetik toksikolojinin stabitasyonunda önemli bir rol oynamıştır (Ames ve ark., 1975). İlgili yayında geri mutasyon testi olan Ames Salmonella/memeli mikrosomu mutajenlik testinin gerçekleştirilmesine yönelik yöntemler tarif edilmiştir. Bu testte, test suşlarında mevcut baz çifti değişimi ve çerçeve kayması mutasyonlarını geri döndüren mutasyonları tespit eden özel olarak tasarlanmış birkaç histidin oksotrofik *Salmonella typhimurium* suşu kullanılır. Reversiyon bakterilerin, temel bir amino asit olan histidini sentezleme işlevselliğini geri kazandırır.

Ames testte kullanılan Salmonella suşları, histidin operonundaki çeşitli genlerde farklı mutasyonlara sahiptir. Bu mutasyonların her biri farklı mekanizmalarla etki eden mutajenlere duyarlı olacak şekilde tasarlanmıştır. Çok çeşitli maddelere karşı daha hassas olmalarını sağlamak için bu suşlara ek mutantlar da geliştirilmiştir (Ames ve McCann 1975).

Bu mutasyonlar farklı mekanizmalar yoluyla DNA hasarına neden olan mutajenler için sıcak noktalar görevi görür. Ames test suşları, eser miktarda histidin içeren minimal bir ortam agar plakası üzerinde çoğaltıldığında sadece geri mutasyonla histidine gereksinim duymayan suşlar (his+) koloni oluşturabilir. Plaka başına kendiliğinden indüklenen revertant kolonilerin sayısı nispeten sabittir. Bununla birlikte plakaya bir mutajen eklendiğinde, petri başına geri mutasyon sonucu gözlenen kolonilerin sayısı, genellikle doza bağlı bir şekilde artmaktadır (Ames ve ark. 1975).

TA98 (çerçeve kayması mutasyonu) ve TA100 (baz çifti değişimi) suşları Ames testinde değerlendirilen iki yaygın *Salmonella typhimurium* suşudur.

Kuyruklu yıldız (komet) testi (tek hücreli jel elektroforezi) ökaryotik hücrelerde deoksiribonükleik asit (DNA) iplik kopmalarını ölçmek için basit bir yöntemdir. Son yıllarda, genotoksisite kuyruklu yıldız testi veya tek hücreli jel elektroforezi testi, insan biyomonitörlüğü ve moleküler epidemiyoloji, ekogenotoksikoloji ve ayrıca DNA hasarını değerlendirmek için standart yöntemlerden biri haline gelmiştir. DNA hasarı ve onarımında temel araştırmalar arasındadır. Komet testinin sadeliği, duyarlılığı, çok yönlülüğü, hızı ve maliyeti öne çıkan yanlarıdır. Ayrıca bu komet testinin yapıldığı yayın sayısı her geçen yıl artmaktadır (<https://www.researchgate.net>).

Yeni kimyasalların ve çevresel kirleticilerin genotoksik etkisinin izlenmesi, moleküler epidemiyoloji, DNA hasarı ve onarımı ile ilgili temel araştırmalar için bu test güvenilir şekilde kullanılabilir (<https://www.researchgate.net>).

DNA iplik kırılmalarını doğrudan ölçmek için yapılan en erken girişim 1978'de Rydberg ve Johanson tarafından lamlar üzerinde agaroz içine gömülmüş ve hafif alkalin koşullar altında lizi edilmiş hücrelerle yapılmıştır. 1984 yılında Ostling ve Johanson, yukarıda açıklanan yaklaşıma dayanarak, tek hücreli jel elektroforezi (SCGE) olarak da adlandırılan kuyruklu yıldız testi geliştirdiler (Piperakis 2009).

Komet testi lizis ve elektroforezin nötr koşullar altında yapıldığı bir testtir. DNA'nın boyanması akridin turuncusu ile yapılmıştır. Elde edilen görüntü, hasarlı veya kırık DNA parçalarından oluşan bir kuyruk ve sağlam DNA içeren kafaya sahip "kuyruklu yıldız" gibi görünmektedir. Bunun bir sonucu olarak kuyruklu yıldız testi adı verilmiştir. Kuyruklu yıldızın kafasından serbest kalan DNA miktarı, kullanılan mutajen dozuna bağlıdır. Bununla birlikte bu prosedürde sadece çift zincirli kopmaları analiz edilebilir. (Ostling ve ark., 1984). Bu test daha sonra iki farklı araştırma grubu tarafından (Singh ve ark. 1988'de ve Olive ve ark. 1990) modifiye edilmiştir.

İlk araştırma grubunun yüksek alkalin koşullar altında (pH> 13) elektroforez yapmaları DNA süper heliksinin gevşemesini sağlar ve elektroforez sırasında

DNA'daki alkali kararsız bölgelerin aynı anda çift ve tek sarmal kopmalarının saptanmasını mümkün kılar. Bu yöntem yüksek hassasiyetle düşük iplik kırığı seviyesini ölçmektedir. İkinci grup nötr (hafif alkalin) koşullar altında elektroforez gerçekleştirdiğinde DNA molekülü çift sarmal kopmalarının tespit etmesine izin veren bir yöntemdir. Bu nedenle Singh ve ark. tarafından geliştirilen alkalin komet test versiyonunun nötr varyanta kıyasla daha duyarlı olduğu bulunmuştur (Peycheva ve ark. 2009).

Bu tekniğin büyük faydası ve araştırmalar arasındaki hızlı yayılması, aşağıdakiler gibi diğer tekniklerle karşılaştırıldığında çeşitli avantajlardan kaynaklanmaktadır:

- Hücre hatları için uygundur.
- Geniş bir hücre yelpazesinde uygulanmıştır (birçok prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde).
- Tek hücre seviyesinde hasar tespit eder.
- Çok hassas (50–15.000 kırılma / hücre).
- Sonuçlar aynı gün elde edilir.
- Hızlı, basit ve ucuzdur.
- Non-invaziv (cerrahi işlem gerektirmeyen) bir tekniktir.
- Taze veya dondurulmuş numuneler (örnekler) için uygundur.
- Numune boyutu çok küçüktür (10.000 ila 50.000 hücre).

Yukarıda değinildiği gibi teknik tek hücrede DNA iplik kopmalarını saptamak için birçok çalışmada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunların bazıları aşağıda belirtilmiştir:

- 1) İnsan çalışmaları: Kuyruklu yıldız testi, radyoaktivite veya diğer zararlı prosedürlerle ön etiketleme gerektirmediği için insan araştırmaları için

idealdir. Genotoksik kimyasallara veya radyasyona mesleki maruziyet de dahil olmak üzere biyo-izlemede (biyomonitorizasyonda) kullanılmıştır. Beslenme çalışmalarında diyetin DNA hasar onarımına etkileri değerlendirilebilir. Kuyruklu yıldız testi, tanıya yardımcı olma (Xeroderma pigmentosum, Nijmegen kırık sendromu) ve bireyde DNA hasar seviyelerini değerlendirmek için kullanılabilir.

- 2) Ekolojik izleme: Uygun organizmalar (midye, solucan, küçük kemirgenler) ile birlikte kuyruklu yıldız testi, çevrenin genotoksinlerle kontaminasyonunu ölçmek için biyosensör olarak kullanılabilir.
- 3) Genotoksisite testi: Kuyruklu yıldız testi yeni kimyasalların veya farmasötiklerin güvenliğini değerlendirmek için standart bir test olarak kullanılmaktadır.
- 4) DNA onarımının tahmini: Teknik, hücresel düzeyde onarım kapasitesinin ölçülmesinde kullanılabilir. Alternatif olarak, hücre ekstraktının onarım kapasitesi bir *in vitro* analizde değerlendirilebilir (Piperakis 2009)

Komet yönteminde hasarsız hücrelerin (lenfosit) incelemesinde yuvarlak kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası (çekirdek) parlak bir ışık görünümü vardır. Bu hücrelerin görünümü göç etmemiş (nonmigration) olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamışsa normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün de başlaması nedeni ile düzensiz kenarlı bir görünüm alır (low migration). Hasar arttıkça lenfositler kuyruklu yıldız (comethigh migration) şeklini alırlar. Son aşama ise apoptozistir. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olur. Bu kuyruk uzunluğu hasar ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesi ile paralellik gösterir (Fairbain ve ark. 1995).

Ekzojen kimyasallar, fiziksel kaynaklar ve insan vücudundaki endojen metabolik süreçler, yüksek derecede reaktif oksijeni türleri (ROS) üretebilir. Kontrolsüz ROS üretiminin fazla olması, hücrede oksidatif stresin tetiklenmesine

yol açar bu da hücre hasarına ve homeostatik denge bozulmasına yol açar ve sonuçta bir dizi insan hastalığına neden olur. Lipidler, DNA ve proteinler ROS'un vücuttaki ana hedefleridir (Lobo ve ark. 2010). ROS kaynaklı oksidatif hasara karşı koruyucu aktivite gösteren eksojen ve endojen bileşiklerin etkilerini test etmek için çeşitli analizler geliştirilmiştir. DNA koruyucu aktivite testi ve total oksidan ve anti oksidan (TOS ve TAS) testleri bu analizler içinde değerlendirilebilir.

DNA parçalayıcı veya koruyucu aktivite için, pBR322 plazmid DNA ve UV-C yöntemi kullanılmaktadır. Metabolizmada ortaya çıkan en etkili radikallerden biri hidroksil ve hidrojen peroksit radikalidir. Bu radikaller nükleotidlere kolayca saldırabilir ve en önemli genetik nükleotid olan DNA'nın yapısında kalıcı hasara neden olabilir (Gutteridge ve Halliwell, 2000). H_2O_2 varlığında plazmid DNA'nın UV ışınlaması, süper sarmal DNA'nın yarılmasının dairesel ve ayrıca lineer formlara açılmasına neden olmaktadır (linDNA: heriki zincirde bir veya daha fazla parçalanma) (Tepe ve ark. 2011). Bu arada, DNA zincirindeki parçalanmaların bir sonucu olarak genetik bozukluklar gelişebilir. Geri dönüşümsüz DNA hasarı karsinogenez, yaşlanma ve diğer dejeneratif hastalıklara neden olabilir (Russo ve ark, 2000). Bu nedenle bu çalışmada pBR322 plazmid DNA (vivantis), test maddesinin DNA parçalama etkisini saptamak için doğrudan kendisine veya oksidatif stresin neden olduğu hasarlardan DNA'yı koruma aktivitesini belirlemek oksitleyici ajandan (H_2O_2 ve UV) sonra kullanıldı. Plazmid DNA, bileşende mür yağı varlığında H_2O_2 ve UV uygulanarak hasara maruz bırakılır. (Russo ve ark, 2000).

Hücre kültürü ortamındaki aselüler fazın total oksidan (TOS) ve total antioksidan kapasitesi (TAS), hücrelerin maruz kaldığı oksidatif stres etkisi hakkında fikir vermektedir. Bu test (TOS) hidrojen peroksit kullanılarak kalibre edilir. Oksidan varlığında, demir iyonu şelatlayıcı kompleksini demir iyonuna okside eder. Oksidasyon reaksiyonunun yoğunluğu, reaksiyon ortamında oksidanların varlığına bağlı olarak artar. Ferrik iyon asidik bir ortamda renkli bir kompleks oluşturur. Renk yoğunluğu spektrofotometrik (530 nm) olarak ölçülür.

Absorbans değeri numunedeki oksidan değerini gösterir. Elde edilen sonuçlar TOS değerini belirlemek için $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ eşdeğeri / L ile karşılaştırılmaktadır (Tarpey ve ark. 2000).

Test maddesinin antioksidan kapasitesini (TAS) belirlemek için ticari olarak temin edilebilen kitler kullanılır. Numunedeki antioksidan ajanlar, koyu mavi-yeşil ABTS radikalini indirgenerek ABTS formuna dönüştürür ve 660 nm'deki absorbanstaki değişiklik, numunenin toplam antioksidan seviyesini gösterir. Radikal olarak ABTS (2,2 azinobis (3-etil benzo tiazolin-6-sülfonik asit) ve bu çalışmada. pozitif kontrol olarak E vitamini analogu Trolox kullanıldı (Halliwell, 1994).

Oksidatif stres indeksi (OSI)

Oksidatif stres indeksi (OSI), oksidatif stres seviyesinin bir göstergesidir ve aşağıdaki gibi hesaplanır (Ulas ve ark. 2013).

$$\text{OSI} = (\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri} / \text{L}) / (\text{TAS}, \mu\text{mol Trolox eşdeğeri} / \text{L}) \times 10$$

Farklı konsantrasyonlarda test maddesinin numunelerindeki oksidatif stres seviyesi, total antioksidan ve total oksidan değer ölçümlerini takiben hesaplanır (Ulas ve ark., 2013).

Bu çalışmada test maddesi olarak *Commiphora myrrha*'dan elde edilmiş ve ticari olarak satın alınmış Mür yağı (*Commiphora myrrha* uçucu yağının) sitogenotoksik ve mutajenik etkilerinin olup olmadığını saptanmak amacıyla planlanmıştır. Test ortamı olarak seçilen sağlıklı ve gönüllü dört kişiden (2 kadın 2 erkek) alınmış kültüre edilmiş periferik kan lenfositleri ile mikronükleus (MN) testi, *Salmonella typhimurium* mutant suşları (TA98 ve TA100) geri mutasyon testi (Ames testi), lenfositlerde tek hücre jel elektroforez (Comet) testi ve çıplak plazmid DNA üzerine olan radikal veya antiradikal etkileri araştırılmıştır. Ayrıca toplam oksidan (TOS) ve antioksidan(TAS) verileri değerlendirilerek oksidatif stres indeksleri (OSI) saptanmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Commiphora cinsi içinde yer alan *C.eritraea* (Burseraceae) reçinesi, küçük bir ağaç olan bitkinin kabuk yaralanması sonucu elde edilir. Reçine yaygın şekilde mür olarak bilinir ve geleneksel olarak çiftlik hayvanlarını kene gibi böceklerden korumak ve iltihaplanma ile ilgili hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmaktadır (Marcotullio ve ark. 2018). Bizim çalışmamızda test maddesi olarak kullanılan mür yağı *Commiphora myrrha* reçinesinden endüstriyel olarak özütlenmiştir. Bu yağın kimyasal bileşenleri içinde; şeker, terpenoid (esas olarak seskiterpen hidrokarbonlar ve furanoseskuiterpenler), steroidler, flavonoidler ve büyük bir polifenol grubunun yer aldığı bildirilmiştir. Son zamanlarda, *Commiphora* türlerinden saflaştırılmış materyaller, antimikrobiyal, antienflamatuar, antiproliferatif, hepatoprotektif ve kardiyovasküler ajanlar olarak tanımlanabileceği çeşitli farmakolojik araştırmalarda rapor edilmiştir (Hanus ve ark., 2005; Shena ve ark., 2008). *Commiphora myrrha* özütünün sahip olduğu biyoaktif özellikler furanodien iskeletleri olan seskiterpenlerin varlığı ile ilgilidir. Özüt yüksek oranda toplam furanodien içeriğine sahip olup belli oranlarda standartlaştırılmış curzerene, furanoeudesma-1,3-dien ve lindestrene bileşikleri içermektedir (Germano ve ark. 2017). *Commiphora* türlerinin sahip olduğu güçlü antioksidan, antibakteriyel ve antikanserojen aktivite oldukça dikkat çekicidir (Paraskeva ve ark. 2008). *Commiphora erythraea* reçinenin buharla damıtılmış esansiyel yağında monoterpenler (%6.1), monoterpenoidler (%0.4), seskiterpenler (%36.6) ve seskiterpenoidler (%53.7), bu seskiterpenoidler içinde özellikle furanoseskuiterpenoidlerin (%50) mevcut olduğu raporlanmıştır. Ayrıca, a-thujene ve a-pinen, monoterpenler ve monoterpenoidler ve a-kopaen, aromadendren ve germacren D amon (uçucu organik hidrokarbon sınıfıdır), gibi bileşikler seskiterpenler arasında en çok bulunanlardır (Marcotullio ve ark. 2018). Başka bir *Commiphora* türü olan *Commiphora mukul*, antimikrobiyal, antienflamatuar, anti kanserojen aktivite ve diğer çeşitli önemli tıbbi özelliklerin kaynağı olan farklı

biyolojik aktivitelere sahip flavonoid, terpenler, fitosteroller gibi çok sayıda fitokimyasal bileşeni bünyesinde barındırır (Jasuja ve ark. 2012).

2.1. *Commiphora myrrha*'nın (yağı, reçinesi ve bileşenleri) İle Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Lamichhane ve ark. (2019) tarafından fare modeli kullanılarak yapılan kapsamlı bir çalışmada mür esansiyel yağının deri altı enjeksiyonundan sonra akut ve subakut toksisite analizi gerçekleştirilerek olası riskleri, yan etkileri ve güvenli doz aralığı değerlendirmiştir. İlk faz çalışması olarak farelere yüksek konsantrasyonda mür esansiyel yağı (20, 40 ve 80 μ L) enjekte edilmiştir. İkinci faz çalışmasında her gruba üç gün boyunca düşük dozda mür esansiyel yağı (1, 5 ve 10 μ L) enjekte edilerek farelerin hematolojik parametrelerin ve çeşitli enzimlerin aktivitesinin araştırılması için kan örnekleri alınmıştır. Histolojik parametrelerin saptanması için karaciğer, böbrek, dalak, akciğerler ve kalp incelenmiştir. Vücut ağırlığı ve cilt anormallikleri de değerlendirilmiştir. İlk faz çalışmaları sonucunda, farelerin enjeksiyon bölgelerinde granülom oluşumu ve karaciğerde genişlemiş sinüzoidler ve genişlemiş merkezi toplardamar gözlenmiştir. Dalakta kırmızı-beyaz pulpa arasındaki farkın kaybolduğu ve böbrek glomerulus dejenerasyonu gösterilmiştir. Enzim aktivitesi ve vücut ağırlığının da doz artışına bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. Beyaz kan hücresi sayısının yaklaşık iki kat arttığı, kaşıntı ve self travma alanının belirgin olduğu belirlenmiştir. İkinci faz çalışması sonucunda, cilt anormallikleri (granülom) ve doku yapısındaki hasar (karaciğer, dalak ve böbrekte), enzim seviyeleri, kan parametreleri ve vücut ağırlığında kontrole göre önemli değişiklik gözlenmemiştir. İlgili çalışmanın genel sonuçlarına göre düşük dozajlı mür esansiyel yağının cilt nodülü / enflamasyonu ve organlarda fizyolojik hasar yönünden güvenli olduğunu ancak bu esansiyel yağın yüksek dozlarının bazı organlara (karaciğer, böbrek ve dalak) zarar verdiğini kanıtlamıştır.

Farklı bir çalışmada El-Sharkawy ve ark (2003), *Schistosoma* (şistozoma) enfeksiyonunun kardeş kromatid değişimini ve kan lenfositlerinde kromozomal

aberasyonu arttırdığını ve *Commiphora molmol*, sitotoksik potansiyelini gösteren polikromatik eritrosit/normokromatik eritrosit oranını önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır. Fawzia ve ark. (2016), *Commiphora molmol*'ün (Mirazid) şistozomiyazisin tedavisinde mikronükleus testi ile etkinliğini değerlendirmeyi amacıyla otuz olgun erkek fare ile yaptıkları çalışmada mürden özütlenen antişistozomal ilacın (Mirazid), şistozomiyazın polikromatik eritrositler üzerindeki bilinen klastojenik etkisine karşı koruma sağladığı kanıtlanmıştır.

Omer ve ark. (2011) tarafından *C.myrrha*'nın etanol ve eter özütlerinin ikişer farklı Gram negatif (*E. coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) ve Gram pozitif (*Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus albus*) organizmaya ve fungal organizma olarak da *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. *C.myrrha*'nın etanolik özütü, *S. albus* ile birlikte incelenen Gram negatif organizmalara karşı antimikrobiyal aktivite sergilemiştir. Öte yandan, eterik mür özütü, incelenen Gram pozitif organizmalara ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermekle birlikte antifungal aktivitesinin daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. Etanolik özütün *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye karşı minimum inhibitör konsantrasyonunun sırasıyla 20 ve 40 mg/mL düzeyinde olduğu bulunmuştur. Eter özütünün hem *S. albus* hem de *C. albicans*'a karşı minimum inhibitör konsantrasyonu sırasıyla 10 ve 40 mg/mL olarak bulunmuştur. Shuaib ve ark. (2013) *Commiphora myrrha*'nin reçine bakımından zengin metanolik ekstraktlarının (RRME'ler) *in vitro* antibakteriyel aktivitesi agar disk difüzyon yöntemi ile araştırmışlardır. Araştırmacıların Gram pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*) ve Gram negatif bakteri suşları (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella tyellaphi*, *Salmonella tyellaphi*) üzerindeki antibakteriyel aktivitesini belirleyip değerlendirmek üzere yaptıkları çalışmada, zengin metanolik özütün tüm Gram (+) bakteri suşlarına karşı önemli aktivite gösterirken Gram (-) bakteri suşlarına karşı değişken etkiler gösterdiğini bulmuşlardır.

El-Ashmawy ve ark. (2006)'nın yaptığı çalışmada farelerin diyetle aldıkları kurşun asetatın (%0.5w/w) bazı enzimatik antioksidanlar (redükte glutasyon GSH, glutasyon S-transferaz (GST)), karaciğer homojenatında lipid peroksidasyonu ve kemik iliği kromozomları üzerindeki etkisi 8 hafta boyunca özel diyet verilen farelerde araştırılmıştır. Hem pozitif kontrolde (diyet + kurşun asetat) hem de mür muamele edilen deney grubunda (diyet + kurşun asetat + %1 mür tozu) saptanan GSH düzeyi negatif kontrole (sadece diyet) göre azalmıştır. Pozitif kontrolde saptanan GST seviyesi azalmış ancak muamele edilen grupta gözlenen GST düzeyinin hem negatif hem de pozitif kontrole göre artmış olduğu bulunmuştur. Muamele edilen grupta saptanan lipid peroksidasyonu hem pozitif hem de negatif kontrole göre %45 azalmıştır. Bölünen hücre sayısındaki anlamlı azalma, toplam anormal hücre sayısı ve artmış kromozomal anormallik sıklığı verilerine göre kurşun genotoksitesinin varlığı doğrulanmış ve mür ile muamelenin genotoksitesiyi önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir.

Fraternale ve ark. (2011) tarafından yapılan ve *Commiphora eritreae*'den elde edilen mür reçinesi heksan ekstraktının topikal antienflamatuar, serbest radikal süpürücü ve antifungal aktivitelerinin araştırıldığı çalışmada farelerde Croton yağının neden olduğu kulak ödemeine karşı heksan özütünün topikal olarak uygulandığında ödemi önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur. Aynı özüt DPPH radikal süpürme analizinde antioksidan aktivite göstermiştir. Heksan özütünden izole edilen bileşenlerden furanoseskuiterpenoid 1 ve 2 bileşikleri zayıf bir antifungal aktivite gösterirken, 3-5 numaralı bileşikleri antioksidan (sırasıyla EC (50) 4.28, 2.56 ve 1.08 mg / mL) ve anti-enflamatuar (sırasıyla% 30, 26 ve % 32 ödem azalması) etki göstermişlerdir.

Al-Harrasi ve ark. (2013) özütleme metoduna bağlı farkları ortaya koymak için yaptıkları çalışmada, *Boswellia sacra*'nın (Burseraceae ailesinden) Hougari Regular (HR) dereceli reçinesinin metanol özütünün antioksidan aktivitesinin (DPPH radikallerine karşı temizleme etkinliğinin) aynı konsantrasyonda reçine esansiyel yağından daha düşük olduğu bildirilmiştir.

Mohamed, ve ark. (2014)'nın yaptıkları farklı bir çalışmada *Commiphora myrrha* reçinesinin metanol (ME-OH), etil asetat (ETOAC) ham özleri ve uçucu yağının (EO) antioksidan ve antimikrobiyal potansiyeli araştırılmıştır. *C. myrrha* reçinesinden tanımlanan uçucu yağın üç ana bileşeni; β -elemene (% 12.86), 7-izopropil-1,4-dimetil-2-azulenol (% 12.22), curzeren (% 11.64), ve germacra-1 (10) 7,11-trien-15-oik asit, 8,12-epoksi-6-hidroksi-cp-lakton (%6.20) bileşikleridir. Çalışmada hem DPPH süpürme hem de Fe²⁺ + şelatlama deneyleri yapılmıştır. *C. myrrha* reçinesinin DPPH radikal süpürücü aktivitesi farklı konsantrasyonlarda (0.2-2 mg/ml) metanol özütü, etil asetat özütü ve uçucu yağının konsantrasyona bağlı bir temizleme etkinliği açıkça gösterilmiştir. 0.5 mg/mL konsantrasyonda ME-OH, ETOAC ekstraktları ve EO'nun inhibisyon yüzdeleri sırasıyla % 71.1, 33.4 ve % 6.6 olarak belirlenmiştir. Yine IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.07, 0.32, 0.93 ve 11.33mg/ml değerleri bulunmuş olup, bütil hidroksitoluen BHT <ME-OH özü <ETOAC özü <EO düzeyinde belirlenmiştir. Bu sonuçlar, ME-OH ekstraktının, ETOAC ekstraktı ve EO'ya kıyasla en yüksek DPPH radikal süpürme aktivitesini sergilediği gözlenmiştir.

Başka bir çalışmada Seif-Eldin ve ark. (2015), *Commiphora molmol*'ün reçineli eksüda petrol eter özütünün (IC₅₀ = 5µg/mL) iki fare hücre hattı KA31T ve NIH3T3'e (sırasıyla non-transform ve transform fare fibroblastları) karşı diferansiyel sitotoksik aktivitesini ortaya koymak amacıyla petrol eter özütünden dördü yeni (γ -Elemene lactone., 5- α H,8- β H-eudesma-1,3,7(11)-trien-8,12-olide., 2-Hydroxy-11,12-dihydrofuranodiene., 2-Hydroxyfuranodiene) ve bilinen beş bileşik (2-Acetoxyfuranodiene., 2-Methoxyfuranodiene., 2-Methoxy isofuranogermacrene., Furanoeudesma-1,3-diene., 1(10)E,4E-furanodiene) olmak üzere toplam 9 bileşik izole edilmiştir. Bu özütlerin 20, 50, 100 ve 200 µg/mL konsantrasyonları çeşitli hücre hatlarındaki sitotoksik potansiyeli analiz edilmiştir. Özütler NIH3T3 hücrelerine karşı en yüksek sitotoksik aktiviteyi gösterirken, KA31T hücrelerine karşı ise orta düzeyde aktivite gösterdiği açıklanmıştır.

Ayman ve ark., (2018) tarafından yapılan çalışmada *C. molmol* reçine özütünün metotreksat (MTX) kaynaklı oksidatif stres, inflamasyon ve böbrek hasarına karşı *in vitro* antioksidan aktivitesini ve koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. MTX, akut böbrek hasarını indükleyebilen bir dihidrofolat redüktaz inhibitörüdür. Erkek Wistar sıçanlarına 15 gün boyunca 125 ve 250 mg/kg *C. molmol* reçine özütü ve 16. günde tek doz MTX enjeksiyonu yapılmıştır. *C. molmol*, DPPH süperoksit ve nitrik oksit (NO) radikallerine karşı radikal temizleme etkinliği göstermiştir. MTX verilen sıçanlarda önemli ölçüde yüksek serum kreatinin ve üre ve histolojik değişiklikler ile kanıtlanan böbrek hasarı görülmüştür. Yine MTX ile indüklenen sıçanların böbreklerinde artmış lipid peroksidasyonu, NO, NF- κ B ve pro-enflamatuar sitokinler görülmüştür. *C. molmol* ile ön muamele, MTX kaynaklı böbrek hasarını ve azaltılmış oksidatif stres ve enflamasyonu önlemiştir. *C. molmol* azaltılmış Bax geni ifadesi ve antioksidan savunma sistemini uyarmıştır. Ayrıca MTX ile indüklenen sıçanların böbreğinde Bcl-2, Nrf2, NQO-1 ve HO-1 ifadeleri azaltılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, *C. molmol* reçinesi, Nrf2 sinyalinin aktivasyonu ve oksidatif stresin azaltılması yoluyla MTX ile indüklenen akut böbrek hasarına karşı koruma sağlamıştır. Sonuç olarak *C. molmol* reçinesinin güçlü bir *in vitro* radikal süpürücü aktivite gösterdiği, Nrf2/ARE sinyalleşmesinin yukarı regülasyonu ile MTX ile sıçanların böbreklerinde indüklenen oksidatif / nitrosatif strese karşı artmış antioksidan etkiye sahip olduğu ve zayıflatılmış inflamasyonu ve apoptozu önlediği belirtilmiştir.

Alqahtani ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışma, on yedi (S1-S17) mür örneği ve iki furanoseskuiterpenoid (CM-1 ve CM-2) bileşiğinin sitotoksik ve antioksidan özelliklerini değerlendirmek için tasarlanmıştır. Sitotoksikite deneyi HepG2, MCF-7 ve HUVEC hücre hatları üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bazı mür örnekleri (S2, S5, S10, S12) ve CM-1, CM-2, bileşikler HepG2/MCF-7 hücre hatlarına karşı vinblastin (IC_{50} (μ g / mL): 2 / 2.5) ile karşılaştırıldığında önemli sitotoksik etki gösterdikleri ortaya çıkmıştır [IC_{50} (μ g / mL): 13.8 / 10, 14/10, 14.5 / 11.3, 18 / 13.2, 9.5 / 12.5, 10 / 15.8). Geri kalan örnekler ya hafif aktif veya inaktif

olarak bulunmuştur. Numunelerin antioksidan özellikleri β -karoten ağartma ve DPPH serbest radikal süpürme yöntemleriyle test edilmiştir. Burada S8 numunesi (1000 $\mu\text{g/mL}$) en yüksek β -karoten ağartma (% 76.2) ve serbest radikal temizleme aktivitesini (% 79.8) sergilemiştir. En yüksek/en düşük CM-1 ve CM-2'nin içeriği sırasıyla S12 / S5 ve S5 / S17'de bulunmuştur. CM-1 ve CM-2'nin insan DNA topoizomerez II ile yapılan moleküler kenetlenme çalışmaları, her iki bileşiğin de ilgili enzimlerin aktif bölgelerine bağlandığını göstermiştir. Moleküler dinamik simülasyon çalışmaları ayrıca CM-1 ve CM-2'nin topoizomerez ile kararlı etkileşimlerinin olduğu doğrulanmıştır.

Alqahtani ve ark., (2020) *Commiphora myrrha* reçinesinin etanolik ekstraktının kloroform fraksiyonundan iki furano-seskiterpenoid olan; 2-metoksifuranodien (CM1) ve 2-asetoksifuranodien (CM2) izole etmişlerdir. Bileşiklerin sitotoksitesi, insan karaciğer karsinomu, meme kanseri hücreleri (sırasıyla HepG2 ve MCF-7) ve normal insan göbek damarı endotel hücreleri (HUVEC'ler) hücre hatları kullanılarak değerlendirilmiştir. Her iki bileşiğin gelişme toksisitesi ve anti-anjiyogenik aktivitesi de zebra balığın embriyoları kullanılarak değerlendirilmiştir. Hücre hayatta kalma deneyleri, her iki bileşiğin HepG2 ve MCF7 hücre hatlarında sırasıyla 3.6 ve 4.4 μM IC_{50} değerleri ile yüksek oranda sitotoksik etkili olduğunu göstermiştir. Her iki bileşik de apoptozu indüklemiş ve işlenmiş HepG2 hücrelerinde akış sitometrik analizi kullanılarak gözlenen hücre döngüsü durmasına neden olmuştur. Her iki bileşiğin sahip olduğu kronik toksisite Zebra balığı embriyolarında gelişme toksisitesi olarak gösterilmiştir. Embriyolar üç günden fazla bileşiklere maruz kaldığında toksisite görülmüştür. CM2 bileşiğinin subletal dozları transgenik zebrabalıkları embriyolarında önemli düzeyde anti-anjiyogenik aktivite göstermiştir.

Pradella ve Oliveira., (2019) *Commiphora myrrha* özütünün olası antitümör etkilerini hücre ölümü çalışmalarıyla değerlendirmeyi amaçlanmıştır. Bunun için, lösemi ile ilişkili Jurkat hücre hatlarında ölüm mekanizmalarını tanımlamak için farklı özüt konsantrasyonlarıyla muameleye tabi tutularak gerçekleştirilen hücre

canlılığı testleri sonucunda kullanılan özütün doza bağlı bir şekilde antiproliferatif / sitotoksik aktiviteye sahip olduğu ifade edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, bu çalışmada değerlendirilen özütün 400 µg/mL dozunun sitotoksik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Qureshi ve ark. (1993) *Commiphora molmol*'ün (oleo gum reçinesi) genotoksik, sitotoksik ve antitümör özelliklerini normal ve Ehrlich asit karsinom hücre taşıyan farelerde incelemiştir. Ajanın potansiyel genotoksik ve sitotoksik aktivitesi sağlıklı farelerde, mikronukleus sıklığı, hepatik hücrelerdeki biyokimyasal değişiklikler ve kemik iliğindeki polikromatik / normokromatik hücrelere oranı bağlamında değerlendirilmiştir. Ehrlich asit karsinom hücrelerini taşıyan farelerde *C. molmol*'ün antitümör aktivitesi; moleküler, biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikler ve sağ kalım açısından değerlendirilmiştir. *C. molmol* (125-500 mg/kg) ile yapılan muamele hiçbir klastojenite göstermemiş, *C. molmol* sitotoksitesisi standart sitotoksik ilaç olan siklofosfamidi ile eşdeğer olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada gözlemlendiği üzere *C. molmol*'ün mutajenik olmamakla birlikte, potansiyel antioksidatif ve sitotoksik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Al-Harbi ve ark. (1994) tarafından yapılan çalışmada *Commiphora molmol*'ün (oleoresin) antikanserojenik potansiyeli Ehrlich katı tümör taşıyan farelerde araştırılmıştır. *C. molmol* (250 ve 500 mg/kg bw/gün) ile muamelenin Ehrlich katı tümör hücrelerinde sitotoksik olduğu bulunmuştur. *C. molmol*'ün 50 günlük muamelesinin neden olduğu sitotoksik etki 25 günlüğe oranla daha az belirgindir. Bu sonuçlara göre *C. molmol*'ün anti-tümör potansiyelinin standart sitotoksik ilaç siklofosfamid ile karşılaştırılabileceği ifade edilmiştir.

Zhu ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada Furano-seskitерpenoid rel-1S, 2S-epoksi-4R-furanogermacr-10 (15) -en-6-on adlı ajanın MCF-7 meme tümör hücre hattına karşı zayıf sitotoksik aktivite sergilediği bulunmuştur. Tipton ve ark. (2003) tarafından icra edilen apoptoz indüklemeye çalışmalarında, mür bileşenleri arasında yer alan a-cadinen, 2-metoksifuranodien, cuminaldehid ve 3-epi-a-aminrin seskitерpen moleküllerinden özellikle seskitерpenlerin prostat kanseri hücrelerinde

G₀/G₁ fazındaki hücre döngüsünü duraklattığı gözlenmiştir. Bu çalışmada mürün hem antiproliferatif hem de bağışıklık/inflamatuvar modüle edici etkileri içerikte yer alan seskiterpenlerle ilişkilendirilmiştir.

Shoemaker ve ark. (2005) tarafından, *Commiphora myrrha*, ve 11 Çin şifalı bitkisinin (*Anemarrhena asphodeloides*, *Artemisia argyi*, *Duchesnea indica*, *Gleditsia sinensis*, *Ligustrum lucidum*, *Rheum palmatum*, *Rubia cordifolia*, *Salvia chinensis*, *Scutellaria barbata*, *Uncaria rhychophyl*) sulu ekstraktları, antikanser aktivitesi değerlendirilmiştir. Çalışmada toplam sekiz hücre hattı (normal meme epitel ve kanserli meme, akciğer, pankreas ve prostat hücreleri ile temsil edilen beş insan ve üç kemirgen kanseri hücre hattı) kullanılmıştır. Tüm ham sulu özütlerin kanser hücre soylarının bir kısmı veya tamamı üzerinde büyüme inhibe edici aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Su ve ark. (2011) *Commiphora myrrha* reçinesinden izole edilen özüt ve terpen bileşikler dördü insan jinekolojik kanser hücre dizisi, A2780, SK-VO-3, shilawa ve SiHa üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. Sitotoksiste analizinde, AE (%85 EtOH özü) fraksiyonu, *in vitro* olarak doza bağlı tarzda dört hücre hattının tamamında hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe etmiştir. Ajanın 50 µg/mL konsantrasyondaki miktarının insan yumurtalık kanser (A2780 hatları) üzerinde inhibisyon oranı %81.85'tir. A2780, SK-VO-3, shilawa ve SiHa üzerindeki AE'nin IC₅₀'leri sırasıyla 15.81, 22.08, 20.73 ve 57.83 µg/mL olarak bulunmuştur. Petrol eter özütünün (PE) endometriyal karsinom hücre dizileri (Shikawa) üzerindeki antiproliferatif etkisi AE'den daha hassastır. Elde edilen veriler *C. myrrha* kimyasal bileşenlerinin, dört insan jinekolojik kanser hücre hattı üzerinde önemli aktiviteler sergilediğini göstermiştir.

Chen ve ark. (2013)'nın yaptıkları çalışma, iki tür mür ve sığla (buhur) bitkisinden elde edilen uçucu yağların kompozisyon ve potansiyel antikanser aktivitelerini hidrodistillasyon ile incelemeyi amaçlamıştır. Gaz kromatografisi - kütle spektrometrisi (GC-MS) kullanılarak, mür ve sığla esansiyel yağlarında bulunan bileşenlerle, iki uçucu yağın, tek başına ve karışım halinde, beş tümör

hücre hattı (MCF-7, HS-1, HepG2, HeLa ve A549) üzerindeki etkileri MTT deneyi kullanılarak araştırılmıştır. MTT analizi, mür ve buhur esansiyel yağlarının hücre hatları üzerindeki inhibe edici etkisinin doza bağlı olduğunu göstermiştir. Buna göre, MCF-7 ve HS-1 hücre hatlarının, diğer hücre hatlarına göre mür ve buhur esansiyel yağlarına karşı artmış hassasiyet gösterdiği bulunmuştur.

Shalaby ve Hammouda. (2014) *Commiphora myrrha* özütünün analjezik, antienflamatuar ve anti-hiperlipidemik aktivitelerini, vücut ağırlığı ve kan lipitleri üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Farelerde merkezi ve periferik ağrıyı indüklemek için termal (sıcak plaka testi) ve kimyasal (kıvrınma testi) uyaranları kullanılarak mür özütünün analjezik etkisi değerlendirilmiştir. Antienflamatuar aktivite, sıçanlarda formalin kaynaklı pençe ödemi kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre *C. myrrha* özütünün önemli analjezik, antienflamatuar ve anti-hiperlipidemik etkilere sahip olduğu, vücut ağırlığı artışı yavaşlattığı ve kan lipit profilini geliştirdiği gözlenmiştir.

Ghaedi ve ark., (2014)'nın yaptıkları çalışmada *Commiphora myrrha* sakızının etanol özütü % 85 etanol hidroalkolik çözücü kullanılarak hazırlanmıştır. Bu özüt özellikle mide ülseri gibi birçok gastrointestinal (GI) problem ve kanser ile ilişkili yaygın bir insan patojeni olan *Helicobacter pylori*'nin üç klinik izolata karşı disk difüzyonu ve agar seyreltme yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Özütün insan mide karsinomu AGS hücreleri üzerindeki etkileri, MTT analizi ve tripan mavisi boyaması ile değerlendirilmiştir. Ayrıca özütün normal hücre (periferik kan mononükleer hücreleri (MNC'ler) ve mezenkimal kök hücreler (MSC'ler)) üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. MTT analiz yöntemi kullanılarak *C. myrrha* etanol özütünün AGS hücreleri üzerindeki inhibisyon etkisinin doza bağlı olduğu anlaşılmıştır. Bu çalışmada özütün AGS hücrelerine karşı önemli anti-proliferatif ve sitotoksik aktivitelere sahip olduğu gözlenmiştir. Aktivite zamana ve konsantrasyona bağlı olarak, 100 pg/mL ve 24 saatlik temas süresi ile canlı hücre sayısı neredeyse sıfırlanmış ve 50 pg/mL konsantrasyon ile ve 72 saatlik temas

süresi, hücrelerin% 90'ından fazlası öldürülmüştür. *Commiphora myrrha*'nın sakızı önemli anti-*Helicobacter pylori* ve antikanser etki gösterdiği vurgulanmıştır.

Gao ve ark. (2015)'nın yaptığı bu çalışmada *C. myrrha*'dan izole edilmiş bir tetrasiklik triterpenoid (MY-1) bileşiğinin sitotoksik etkisini değerlendirmek ve MY-1'in mitokondriyal yolla insan prostat kanserinde apoptozu indükleyip indüklenmediği araştırılmıştır. Bu çalışmada, MTT sonuçları MY-1'in PC-3 hücrelerine karşı ılımlı bir sitotoksik etkiye sahip olduğu ve akış sitometrik analiz verilerine göre G₀/G₁ fazında hücre döngüsü durmasına neden olduğu gösterilmiştir. Karakteristik morfolojik değişikliklere göre MY-1 tarafından apoptozun indüklendiği ve anti-onkogen p53'ün aktivasyonu yoluyla kanser oluşumunun baskılanmasında önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. Bu sonuçlara göre, *C. myrrha*'dan izole edilmiş bir tetrasiklik triterpenoid (MY-1) bileşiği, PC-3 hücrelerinde apoptoz indüksiyonu yoluyla potansiyel antikanser aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Khalil ve ark. (2020)'nin yaptıkları çalışmada, insizyonla elde edilen reçineli eksüda olan mür heksan ekstraktı ile uçucu yağının (MEO) karşılaştırmalı bakterisidal aktivitesi, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya (*Ps. Aeruginosa*) organizmalarında canlı sayım tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. MEO ile 2 saatlik temas süresinden sonra test edilen her iki suşun >% 99,999'unun öldüğü ortaya çıkmıştır. Yine bu çalışmada insan karaciğer kanseri (Hep G2), insan meme kanseri (MCF-7) ve kolon kanseri hücre hatları (HCT-116) üzerindeki hem esansiyel yağın hem de heksan ekstraktının sitotoksik çalışmaları umut verici bir *in vitro* aktivite göstermiştir. Uçucu yağ için en yüksek aktivite (IC₅₀ 10.93 ± 0.32 µg / mL) MCF-7 üzerinde kaydedilmiştir. Hekzan özütü ve uçucu yağda tanımlanmış başlıca bileşikler; Furano-eudesma-1, 3-dien (% 15.99) ve 2-asetoksi-furano-dien (% 26.82) adlı bileşiklerdir. Bu sonuçlar, myrrh esansiyel yağının, uygun dozaj formlarında formüle edilebilen umut verici bir antibakteriyel ve sitotoksik ajan olduğunu göstermektedir.

C. myrrha dahil çeşitli bitkilerde aktif bileşen olarak yer alan β -elemene'in (bu çalışmada *Curcuma wenyujin*'den izole edilmiş) anti-tümör etkisi araştırılmıştır. İnsan kanserlerinin en ölümcülleri arasında en sık görülen beyin tümörü olan glioblastom multiforme (GBM) dâhil farklı tümörler için β -elemene antitümör ilacı olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada, β -elemenein glioblastoma hücrelerinin büyümesini inhibe edip etmediği ve olası baskılama mekanizması araştırılmıştır. Aktif bileşen β -elemene bu hücrelerin büyümesini p38 MAPK'ya bağımlı bir yolla inhibe ettiği bulunmuştur (Yao ve ark. 2008).

Farklı çalışmalarda HeLa hücrelerinin ultrastrüktürel morfolojisinde (10 μ g/mL) Sisplatin (CDDP) ve mür kullanıldığında apoptoz belirtileri ortaya çıkarken, nekrotik hücre ölümü özellikle daha yüksek dozda CDDP veya mür kombine muamelesinde gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre cisplatinin doza ve hücrelerin metabolik ve enerji durumuna bağlı olarak apoptoz ve nekrozu indükleyebileceği bildirilmiştir (Gonzalez ve ark. 2001; Swift ve Golsteyn. 2016). Ramadan ve ark. (2017) insan serviks kanserinde mürün terapötik mekanizması ile sitotoksik, apoptotik ve otofajik potansiyelini modellemek için HeLa hücrelerini kullanmışlardır. Çalışmada, tek başına mür ve cisplatin (CDDP) + mür kombine muamelesinin sonuçları incelenmiştir. Elde edilen verilere göre mür HeLa hücrelerinin canlılığında konsantrasyona bağlı bir azalmaya neden olmuş ve ayrıca mürün tek başına ve CDDP ile birlikte kullanılması apoptoz ve otofajiyi uyarmıştır.

Yukarıda bir kısmının sonuçlarına değinilmiş önceki çalışmalar dikkate alındığında büyük bir coğrafyada antik dönemden bu güne kadar kadim medeniyetler tarafından yaygın bir kullanıma sahip mürün genotoksik, sitotoksik, oksidatif ve proliferatif etkilerinin kapsamlı bilimsel çalışmalarla irdelenmesi daha da önem kazanmıştır. Önceki çalışmaların bir çoğunda dikkat çeken en önemli veri mür veya bileşenlerinin kanser hücre hatlarındaki potansiyel sitotoksik etkidir.

Bizim yapmış olduğumuz çalışma ise sağlıklı hücre hatlarıyla ve farklı testlerle gerçekleştirilmiş olması bu tezin özgün tarafını oluşturmaktadır.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmadaki deneylerin tamamı *in vitro* koşullarda yapılmıştır. Çalışmada test maddesi olarak *Commiphora myrrha*'dan ticari yolla elde edilmiş Mür yağı, deney materyali olarak da sigara içmeyen yaşları birbirini yakın (26-28 yaşlarında) sağlıklı ve gönüllü iki kadın ve iki erkekten alınan periferik kan kullanılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. *Commiphora myrrha* uçucu yağı (test maddesi)

Commiphora myrrha, kökünde bulunan ve dünya çapında kullanılan sarı bir oleo-sakız reçinesine sahiptir. Mürün bileşenleri arasında uçucu yağ (% 2-8), reçine (% 23-40), sakız (% 40-60) ve acı özleri (% 10-25) bulunur. Düşük basınçlı buhar damıtma yoluyla *Commiphora myrrha* reçinesinden özütlenerek elde edilen mür yağı ticari bir firmadan satın alınmıştır. Bu yağ 20 °C'de 0.995 - 1.025 arasında değişen özgül ağırlığa sahip, kalın ve soluk sarı bir sıvıdır (Chen ve ark. 2013). Daha önce az sayıda yapılan çalışmalarda *Commiphora myrrha* uçucu yağı sitotoksik, anti-kanser, analjezik, antienflamatuar, antiparaziter ve hipolipidemik aktiviteler sergilediği gösterilmiştir. Geleneksel uygulama ve kanıta dayalı araştırmalar, bu özelliklerin mür esansiyel yağında bulunan aktif bileşiklere bağlı olduğunu rapor etmiştir (Effie ve Nomico, 2007). Bu kapsamda mür yağının sağlıklı hücre kültüründe *in vitro* şartlardaki sitogenotoksik potansiyeli önem arz ettiği için bu çalışma planlanmıştır.

3.1.1.1(1). *Commiphora myrrha* uçucu yağının Kimyasal Özellikleri

Sistemik isim: *Commiphora myrrha* uçucu yağı

CAS kayıt no: 8016-37-3

Kapalı Formülü: Çizelge 3.1. *Commiphora myrrha* uçucu yağın bileşikleri

Açık Formülü: Şekil 3.1. *Commiphora myrrha* uçucu yağın ana bileşikleri

Kaynama noktası: 220°C

Alevlenme Noktası: >230°F

Fiziksel Durumu: Sıcak, baharatlı, balzamik; kahverengi sıvı

Sudaki çözünürlük: Çözünmez

Buhar Yoğunluğu (Hava = 1): > 1

Elde etme yöntemi: Buhar distilasyon

3.1.1.1.(2). Mür yağı ve mür etanol özü kimyasal bileşimi

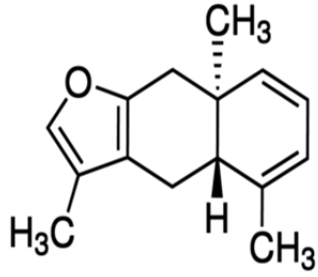
Commiphora myrrha uçucu yağının bileşenleri hidrodistilleme ile gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS) kullanılarak tanımlanmıştır. Toplam yağ bileşiminin% 98.3'ünü oluşturan mür yağında elli altı bileşen tespit edildiği bildirilmiştir. Furanoendesma 1,3-dien (% 50.0), menthofuran (% 13.5), lindestren (% 4.9), β -elemene (% 4.6), furanodien (% 3.6), 3,4,4-trimetil-3- (3- okso-but-1-enil) -bisiklo (4.1.O) heptan 2-one (% 3.5) ve γ -kadinen (% 2.6), mür yağının ana bileşenleridir (Çizelge 3.1), (Mahboubi ve Leila., 2015).

Çizelge 3.1. *Commiphora myrrha* uçucu yağının bileşenlerinin nispi konsantrasyonu (%)^c ve kapalı formülleri

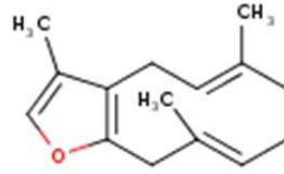
Bileşimlerin adı	(%) ^c	Kapalı Formülü
Furanoeudesma 1,3-diene	50,00	C ₁₅ H ₁₈ O
Menthofuran	13,50	C ₁₀ H ₁₄ O
Lindestrene	4,90	C ₁₅ H ₁₈ O
β-Elemene	4,60	C ₁₅ H ₂₄
Furanodiene	3,60	C ₁₅ H ₂₀ O
3,4,4-Trimethyl-3-(3-Oxo-but-1-enyl)-bicyclo[4.1.0]heptan-2-one	3,50	C ₁₄ H ₂₀ O ₂
γ-Cadinene	2,60	C ₁₅ H ₂₄
Germacrene B	2,30	C ₁₅ H ₂₄
Cyclopenta[h]-2-benzopyran-9(1H)-one	1,20	C ₁₂ H ₈ O ₂
α-Terpinene	1,10	C ₁₀ H ₁₆
β-Bourbonene	0,98	C ₁₅ H ₂₄
5-Methylxanthotoxin	0,90	C ₁₃ H ₁₀ O ₄
2,20 -Dihydroxy-40 -methyl-5-methoxybiphenyl	0,70	C ₁₄ H ₁₄ O ₃
Calarene	0,64	C ₁₅ H ₂₄
Germacrene D	0,60	C ₁₅ H ₂₄
2-Methoxy-30-fluoro-40-methylbiphenyl	0,60	C ₁₄ H ₁₃ FO
2-Methoxy-30-fluoro-40-methylbiphenyl	0,60	C ₁₄ H ₁₃ FO
Germacrone	0,60	C ₁₅ H ₂₂ O
7-(Phenylethynyl)-1-indanone	0,50	C ₁₇ H ₁₂ O
γ-Elemene	0,40	C ₁₅ H ₂₄
2-Ethylthiophene	0,40	C ₁₄ H ₁₂ S
α-Copaene	0,35	C ₁₅ H ₂₄
δ-Cadinene	0,30	C ₁₅ H ₂₄

Çizelge 3.2 (devamı)

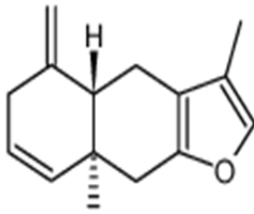
β -Panasinsene	0,30	$C_{15}H_{24}$
Seselin	0,30	$C_{14}H_{12}O_3$
Valencene	0,25	$C_{15}H_{24}$
Methacrylic acid, dodecyl ester	0,24	$C_{16}H_{30}O_2$
β -Cubebene	0,20	$C_{15}H_{24}$
α -Caryophyllene	0,20	$C_{15}H_{24}$
β -Patchoulene	0,20	$C_{15}H_{24}$
β -Maaliene	0,20	$C_{15}H_{24}$
α -Selinene	0,20	$C_{15}H_{24}$
3-Stilbenol	0,20	$C_{14}H_{12}O$
6-Methylxanthotoxin	0,15	$C_{13}H_{10}O_3$
β -Gurjunene	0,15	$C_{15}H_{24}$
α -Cubebene	0,10	$C_{15}H_{24}$
3-Ethylidibenzothiophene	0,10	$C_{14}H_{12}S$
8,9-Dihydrocyclohepta[a]phenalene-6(10H)-one	0,10	$C_{18}H_{14}O$



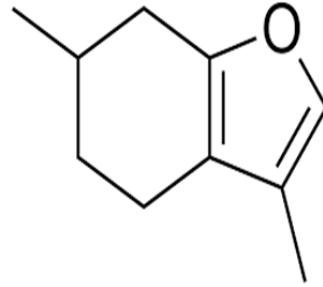
Furanoeudesma 1,3-diene



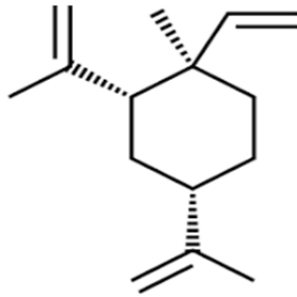
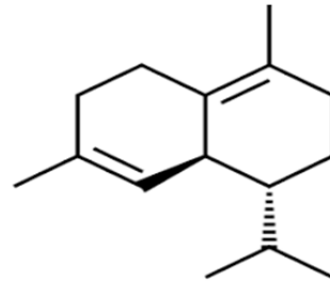
Furanodiene



Lindestrene



Menthofuran

 β -Elemene γ -CadineneŞekil 3.1. *Commiphora myrrha* uçucu yağı ana bileşenlerinin açık formülleri

3.1.1.1.(3). Mür yağının Kullanım Şekli**3.1.1.1.(3).1. Direkte cilde sürülerek**

Deriye uygulamadan önce mür yağını taşıyıcı olarak görev yapan jojoba, badem veya üzüm çekirdeği yağı ile karıştırmak en iyisidir. Ayrıca kokusuz bir losyon ile karıştırılabilir ve doğrudan cilt üzerinde kullanılabilir. Antioksidan özelliklerinden ötürü anti-aging (yaşlanma önleyici), cilt yenilenmesi veya yaraların iyileşmesi için mükemmeldir.

3.1.1.1.(3).2. Soğuk kompres olarak

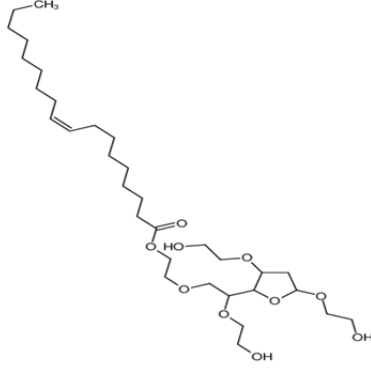
Mür yağı birçok şifa özelliğine sahiptir, bu nedenle birkaç damla yağ soğuk bir suya ilave edilerek doğrudan enfekte veya enflamasyonlu bölgelere uygulanır. Anti-bakteriyel, anti-fungal, şişme ve iltihaplanmayı azaltmaya yardımcı olur.

3.1.1.1.(3).3. Direk içmek

Uçucu yağları içmek gerektiği zamanlarda oldukça dikkatli olunmalıdır. Diş hastalıklarında diş enfeksiyonlarını önlemeye yardımcı olmak için genel bir kullanım olarak mür yağı bir gargara olarak kullanılmaktadır. Her ne kadar FDA güvenli bir gıda katkı maddesi olarak mür yağı onaylamış olsa da, konsantre formlar ve yüksek dozlarda almak bazı durumlarda istenmeyen yan etkilere neden olabilir (<https://www.aysetolga.com/mur-yagi->) .

3.1.1.2. Tween 80 (Çözücü)

Bu çalışmada Tween 80 (polysorbate 80), farklı fazlardaki su bazlı sıvı hücre kültürü ile mür yağının birbiri ile homojen şekilde karışmasını sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Tween 80, sorbitan esterlerinden türetilmiş noniyonik bir yüzey aktif maddedir. Tween 80 gıdalarda, farmasötik preparatlarda ve kozmetiklerde emülgatör, dağıtıcı ve stabilizatör olarak yaygın olarak kullanılan noniyonik bir yüzey aktif maddedir.

3.1.1.2.(1) Tween 80 Kimyasal Özellikleri**Kimyasal adı:** polysorbate 80**Kapalı formülü:** C₂₄H₄₄O₆**Molekül ağırlığı:** 428.600006**Kaynama noktası:** >100°C**Alevlenme Noktası:** >230°F**CAS No:** 9005-65-6**Fema No:** 2917**Fiziksel Durumu:** soluk sarı yağlı sıvı**Saklama koşulu:** oda sıcaklığı

Şekil 3.2. Tween 80 açık formülü

3.1.2. Kullanılan Diğer Kimyasalların Hazırlanması**3.1.2.1. Ampisilin Çözeltisi (%0.8/0.02 NaOH)**

Salmonella typhimurium'un mutant suşlarıyla yapılan geri mutasyon (Ames) testinde kullanılan suşların ampisiline olan dirençlilik özelliklerinin kontrolünde kullanılmıştır. Öncelikle 0.02 N NaOH çözeltisi hazırlanarak ampisilin çözeltisi bu çözgen içinde hazırlanır.

0.02 N NaOH Hazırlanışı: 250 mL için

NaOH: 0.2 g

Son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlanır.

Ampisilin Hazırlanışı: 100 mL için

Ampisilin Trihidrat: 0.8 g

0.02 N Sodyum Hidroksit: 100 mL

Ampisilin Trihidrat, 0.02 N NaOH içinde çözündürülmüştür. Sterilizasyon için 0.22 µm çaplı bakteri tutan filtreden geçirilmiştir. Ampisilin solüsyonu filtre yöntemi ile steril edileceğinden daha önceden bunun için bir beher ya da mavi kapaklı şişe steril edilerek +4°C'de saklanmıştır.

3.1.2.2. (%0.13) Biotin Çözeltisi

Genotip kontrolü ve master plakların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Hazırlanışı:**100 mL için**

D-Biotin:0.0013 g

Distile Su: 100 mL

Biotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözündürülmüştür.

Otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

3.1.2.3. Elektroforez Tamponu

Komet testinde elektroforez işlemini gerçekleştirmek için kullanılan elektroforez tamponu 10 M NaOH ve 0.2 M EDTA bileşenlerinden oluşmuştur. Bu kimyasallar uygun oranlarda tartıldıktan sonra üzerine 1350 ml saf su ilave edilmiştir. Bir gün önceden hazırlanarak + 4 °C'de saklanmıştır.

3.1.2.4. Entellan (Merck No: 7961)

Reçine kökenli ve tolüen solventli, ksilen ile temizlenebilen, kuruduktan sonra hava kabarcığı oluşturmeyen, iyi kaplama sağlayan, yapışkan özelliğinde olup lam ile lameli birbirine yapıştırarak sabitlemek için kullanılan şeffaf ve akıcı bir sıvıdır. Hazırlanan preparatları daimi hale getirmek için kullanılmıştır (Cat No: 7961).

3.1.2.5. Etidium Bromid (EtBr) (Sigma, Merck, No: 1239-45-8)

DNA koruyucu aktivite testinde EtBr nükleik asitlerin bazıları arasına bağlanarak DNA fragmentlerinin elektroforetik jelde saptanmalarını sağlayan floresan boyadır.

3.1.2.6. Etil Alkol (Sigma No: 32205)

Deneyin birçok aşamasında sterilizasyon amaçlı %70'lik etil alkol hazırlanarak yüzeylerin ve kullanılan araç-gereç ve materyalin temizlenmesinde kullanılmıştır.

3.1.2.7. Fiksatif

MN testini incelemek için yapılan preparasyonda iki farklı fiksatif kullanılmıştır. Birinci fiksatif muamelesi için 1 hacim glasiyal asetik asit 5 hacim metanol ve 6 hacim %0.9 NaCl (1:5:6 v/v/v = glasiyal asetik asit/metanol/%0.9'luk NaCl) karıştırılarak hazırlanmıştır. İkinci fiksatif ise 1 hacim glasiyal asetik asit ve 5 hacim metanolün (1/5= glasiyal asetik asit/metanol) karıştırılması ile elde edilmiştir. Fiksatifler kullanılmadan iki saat öncesinde hazırlanmış ve ağzı kapalı cam bir şişede +4°C'de bekletilmiştir. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

3.1.2.8. Fosfat Tamponu (Phosphate Buffer Saline = PBS)

PBS tamponu tek hücre jel elektroforez (komet) testinde hücre kültürü için kullanılmıştır.

3.1.2.9. Giemsa Boyası

İlk defa Alman mikrobiyolog Gustov Giemsa tarafından keşfedilmiş olup hücrelerin renklendirilmesini sağlamak amacı ile kullanılmıştır. Giemsa boyası, adenin-timin yoğunluğunun yüksek olduğu DNA bölgelerine bağlanır. Sorensen tamponu içerisinde %5'lik olacak şekilde ve filtre edilerek hazırlanan boya eriyiği, kromozomları ve MN testinde nukleusları boyamak için kullanılmıştır.

3.1.2.10. Glasiyal Asetik Asit

Glasiyal asetik asit (CAS No: 64-19-7) MN testinde fiksatif hazırlanmasında kullanılmıştır.

3.1.2.11. Glikoz Çözeltisi (%20)

Ames testinde minimal agarlı ortam için karbon kaynağı olarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı:**100 mL için**

Glikoz..... 20 gr

Distile su 100 mL

Belirtilen miktarda glikoz tartılıp distile su eklenerek son hacme tamamlanmış olup, bu karışım berraklaşana kadar manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu stok buzdolabında (+4°C) saklanmıştır.

3.1.2.12. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit (CAS No: 7722-84-1) komet ve DNA koruyucu aktivite testleri için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Saf haldeki %35 H₂O₂’den 6 µl alınıp 1000 µl saf su ile tamamlanarak stok hazırlanmıştır (%0.21 H₂O₂ komet testi için). H₂O₂’nin bekletilmesinden doğabilecek olumsuz etkileri önlemek amacıyla her komet testi için taze olarak hazırlanmıştır.

3.1.2.13. Hipotonik Eriyik

Çalışmada %0.4’lük KCl (Merck No: P9333) hipotonik çözelti olarak kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanıp, ağzı kapalı cam bir kap içerisinde buzdolabında (+4°C) saklanmıştır. Yapılan her deneyden (MN test) yaklaşık iki saat önce yeterli miktarda hipotonik eriyik stoğundan alınmış, inkübatörde 37°C’ye kadar ısıtılarak kullanılmıştır. Hipotonik çözeltinin yoğunluğu hücre plazmasının yoğunluğundan daha az olduğu için lenfositlerin şişmesini ve preparasyonun kaliteli olmasını sağlamaktır

3.1.2.14. (%0.5) Histidin Çözeltisi

Genotip kontrolü ve master plakların hazırlanmasında kullanılmıştır.

Hazırlanışı:..... **100 mL için**

L-Histidin-HCl (F.W.191.7):0.5 gr

Distile Su: 100 mL

Otoklavda 121 °C’de 15 dk steril edilmiş ve +4°C’de saklanmıştır.

3.1.2.15. Histidin/Biyotin Plakları (HB Agar)

Ames testinde suşların histidin gereksinimi kontrolünde kullanılmıştır.

Hazırlanışı: **1000 mL için**

Agar: 15 gr

%20 Glikoz: 100 mL

50xVB Tuzu: 20 mL

Histidin HCl.H₂O: 10 mL

0.5 mM Biyotin: 6 mL

Distile Su: 864 mL

Agar ve su karıştırıldıktan sonra 121°C’de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir. Daha sonra 45 °C’ye soğutulup (20-30 dk) %20 glikoz, 50xVB tuzları ve histidin çözeltisi eklenmiştir. Solüsyonun biraz daha soğuması beklendikten sonra biyotin eklenerek karıştırılmıştır. 25 mL olacak şekilde petri kutularına dağıtılmış ve +4 °C’de saklanmıştır.

3.1.2.16. Histidin/Biyotin (HB) Solüsyonu (0.5 mM)

Bakteri suşları mutajenik kimyasallar varlığında veya besin eksikliğinde üreyemezler. Bundan dolayı ortama konan çok az miktardaki Histidin/Biyotin solüsyonu bakteri suşlarının birkaç bölünme geçirmelerine olanak tanır. Mutajenite deneylerinde 2 mL top (yumuşak) agara 0.2 mL Histidin/Biyotin

solüsyonu eklenerek kullanılmıştır.

Hazırlanışı: **250 mL için**

D-Biyotin (F.W. 247.3): 0.0309 gr

L-Histidin-HCl (F.W. 191.7): 0.024 gr

Distile Su: 250 mL

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözündürülmüştür. Daha sonra histidin ilave edilerek otoklavda 121°C’de 15 dk veya 0.22µm membran filtre ile steril edilerek, +4°C’de saklanmıştır.

3.1.2.17. Histidin/Biyotin/Ampisilin Plakları (HBA)

Ampisiline dirençlilik testi ve master plak hazırlanmasında kullanılmıştır.

Hazırlanışı: **1000 mL için**

Agar: 15 gr

%20 Glikoz: 100 mL

50xVB Tuzu: 20 mL

Histidin HCl.H₂O: 10 mL

0.5 mM Biyotin: 6 mL

(%0.8/0.02 NaOH) Ampisilin: 3150 µL

Distile Su: 860 mL

Agar ve su otoklavlanarak 45°C’ye kadar soğutulup %20 glikoz, 50xVB tuzları ve histidin bu sıcak solüsyona eklenip karıştırılmış ve biraz daha soğuyunca biyotin ve ampisilin de eklenerek plaklar petrilere 25mL olacak şekilde aktarılmıştır. Bu plaklarda bakteriler +4°C’de 2 ay saklanabilmektedir.

3.1.2.18. HMA Agar (High Melting Agar=Yüksek Kaynama Dereceli Agar)

HMA agar (Sigma CAS No: 9012-36-6) komet testinde lamaların kaplanması amacıyla kullanılmıştır. Bunun için HMA agardan 0.65 gr alınıp 100 mL saf suda ısıtılarak çözülmüştür. Daha sonra rodajlı lamaların tek tarafı hazırlanan bu agarla

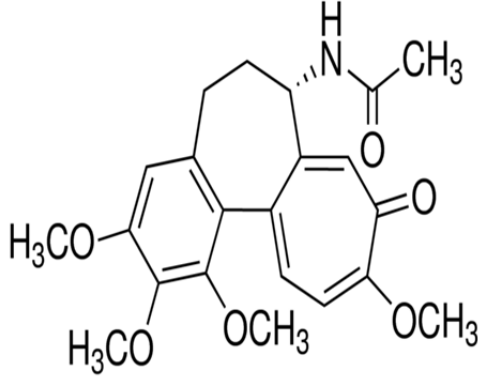
kaplanmış ve lamalar kurumaya bırakılmıştır. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Lamaların agarla kaplanması işlemi deneyden 1 gün önce yapılmıştır.

3.1.2.19. Kromozom Medyumunu

Hücre kültürü için Gibco firmasının ürettiği PB Max. kromozom mediumu (Cat. No. 12557-013) kullanılmıştır. Bu medium her tüpe 2.5 mL olacak şekilde paylaştırılmıştır. Enjektöre 1/10 oranında heparin çekilerek istenilen miktarda kan alınmış ve heparin içermeyen bu mediuma heparinli kan ilave edilmiştir. Cellstar® polystyrene hücre kültür tüpleri (Cat No. 164 160) steril olarak temin edilmiştir.

3.1.2.20. Kolşisin (Colchicine)

Ticari olarak temin edilmiş kolşisin mitotik iğ ipliklerinin oluşumunu engelleyerek hücre bölünmesini metafaz evresinde durduran mitotik bir zehir olarak kullanılmıştır. Kolşisin eriyiği, steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom mediumun her mL'sinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/mL) 2.7 mL'lik kromozom mediumu inkübasyonun sona ermesinden iki saat önce 10µL hacim içerisinde ilave edilmiştir. Kolşisin'in kimyasal teknik özellikler aşağıda verilmiştir.



Kimyasal adı: Colchicine

Kapalı formülü: C₂₂H₂₅NO₆

Açık formülü: Şekil 3.3.

Molekül ağırlığı: 399.44

Etil asetat içeriği: %3.4

Kloroform içeriği: < %0.1

CAS No : 64-86-8

Sigma No : C-9754

Şekil 3.3. Kolşisin'in açık formülü

3.1.2.21. Lizis Çözeltisi

Komet testinde lysing solüsyonunun bir bileşeni olarak kullanılmıştır. Lizis solüsyonu 2.5 M NaCl (Merck CAS No: 1.06404), 10 µM EDTA (Sigma CAS No: 6381-92-6), 10 mM Tris (Merck CAS No: 77-86-1) ve saf su bileşenlerinden oluşmuştur. Bu kimyasallar uygun oranlarda tartıldıktan sonra üzerine 270 mL saf su konup bir erlen kabı içerisinde ısıtılarak çözölmüş ve soğuma işlemi gerçekleştirildikten sonra 10 M NaOH ile pH'ı 10'a ayarlanmıştır. Kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.2.22. LMA Agar (Low Melting Agar=Düşük Erime Dereceli Agar)

LMA agar (Sigma CAS No: 39346-81-1) komet testinde hücrelerin sandviç modeli gibi agara gömölmesi amacıyla kullanılmıştır. Bunun için LMA agardan 0.065 gr tartılıp 10 mL saf suda kaynatılmıştır. Hücrelerin agarla karıştırılması işleminde agarın el yakmayacak sıcaklıkta olmasına özen gösterilmiştir.

3.1.2.23. Lysing Çözeltisi

Komet testinde DNA'daki hasar boyutunu belirlemek için çıplak DNA'nın elde edilmesi işleminde kullanılmıştır. Lysing solüsyonu 3 mL Triton X (Merck CAS No: 9036-19-5), 30 mL DMSO (Carlo ERBA CAS No: 67-68-5) ve 267 mL

lizis çözeltisi kullanılarak son hacmi 300 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bir gün önceden hazırlanarak +4 °C’de saklanmıştır.

3.1.2.24. Metanol (Methanol, Metil Alkol, Karbinol)

MN testinde fiksatif hazırlanmasında kullanılmıştır

3.1.2.25. Minimal Glukoz Agar (MGA) Plakları

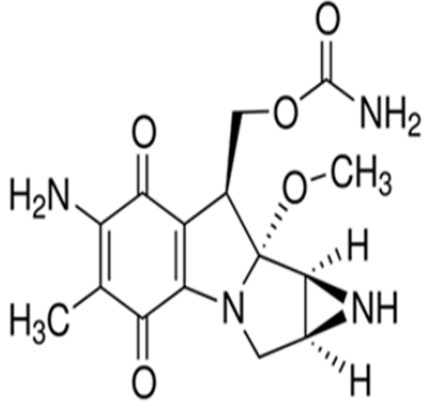
Mutajenite deneylerinde ve suşların kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının saptanması amacı ile kullanılmıştır.

Hazırlanışı:	<u>1000 mL için</u>
Agar:	15 gr
%20 Glikoz:	100 mL
50xVB Tuzu:	20 mL
Distile Su:	880 mL

Yukarıda yazıldıkları sıra ile distile suya ilave edilerek son hacimlerine tamamlanmıştır. Karışım otoklavda 121 °C’de 15 dk steril edilmiştir. 45 °C’ye kadar soğutulan bu karışım petri kutularına 25 mL olacak şekilde dağıtılmıştır.

3.1.2.26. Mitomisin C (MMC) (Sigma No: Y0000378)

MN testinde kuvvetli bir mutajen olduğu bilinen mitomisin C, pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Mitomisin C steril saf suda çözülerek stok çözelti hazırlandıktan sonra kültür tüplerine son konsantrasyonu 0.25 µg/mL olacak şekilde 10 µl içerisinde ilave edilmiştir.



Kimyasal adı : 6-Amino-1,1a,2,8,8a,8b-hexahydro-8-(hydroxymethyl)-8a-methoxy-5-methyl-azirino[2',3':3,4]pyrrolo[1,2-a]indole-4,7-dionecarbamate (ester)

Kapalı formülü : C₁₅H₁₈N₄O₅

Açık formülü : Şekil 3.4.

Molekül ağırlığı :
334.33 g/mol

Erime noktası : >360 °C

CAS No : 50-07-7

Şekil 3.4. Mitomycin C'nin açık formülü

3.1.2.27. Nitrik Asit (HNO₃)

Kuvvetli bir asit olan nitrik asit (Sigma 438073) ve HNO₃ formülüyle gösterilir. Nitrik asitin konsantrasyonu arttıkça tehlikesi artar bu yüzden istenilen konsantrasyon dikkatli bir şekilde hazırlanmalıdır. MN testinde kullandığımız lamaları temizlemek amacıyla 1N HNO₃ çözeltisi kullanılmıştır. Lam temizleme solüsyonu laboratuvarında ağzı kapalı uygun plastik bir kaptaki saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

3.1.2.28. Nötralizasyon Tamponu

Komet testinde elektroforezden çıkan preparatlarda pH dengesini sağlamak amacıyla kullanılmıştır. 0.4 M Tris (Merck Cas No: 77-86- 1) alınıp üzerine 300 mL saf su eklenmiştir. Daha sonra HCl ile çözeltinin pH'ı 7.5'e ayarlanmıştır ve kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

3.1.2.29. 4-Nitro-o-Fenilendiamine (4-NPD) (20 µg/petri) CAS No: 99-56-9

Ames testinde metabolik aktivasyon yokluğu şartlarında TA98 bakteri suşu

için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Stok, 0,02 g 4-NPD tartılıp 10 ml DMSO'da çözülerek hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlık ortamda saklanmıştır. Deneyde kullanılan pozitif kontrol (4-NPD)1/10 oranında seyreltilmiştir. Bu seyreltilen çözeltiden petri başına 100 µL ilave edilmiştir.

3.1.2.30. Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)

Ames testinde, bakterilerin gecelik kültürde üreyebilmeleri için kullanılmıştır.

Hazırlanışı: **200 mL için**

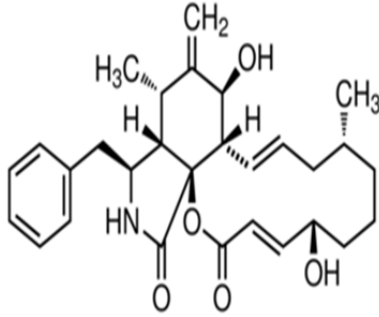
Oxoid nutrient broth: 5 gr

Distile Su: 200 mL

Toz halinde bulunan nutrient broth distile su ile iyice çözülünceye kadar elle karıştırılmıştır. Karışım otoklavda 121 °C'de 15 dk steril edilerek oda sıcaklığında karanlıkta saklanmıştır.

3.1.2.31. Sitokalsin B

Sigma Aldrich'den satın alınan sitokalsin B (Cat No: 2743) mikronükleus testinde hücreler bölünürken sitokinezi inhibe etmek ve iki nukleustan meydana gelen hücreler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. 5 mg sitokalsin-B 6 mL %50'lik etanol çözeltisinde çözülerek 6 µg/mL stok sitokalsin B çözeltisi elde edilmiştir.



Kimyasal adı	: Cytochalasin B
Kapalı formülü	: $C_{29}H_{37}NO_5$
Açık formülü	: Şekil 3.4
Molekül ağırlığı	: 479.60 g/mol
Erime noktası	: 221-223 °C
Kaynama noktası	: 221-223 °C
Safılık düzeyi	: % 98
CAS No	: 14930-96-2
Sigma No	: C-67

Şekil 3.5. Sitokalsin B

3.1.2.32. Sodyum Azid Çözeltisi (SA) (1 µg/petri) CAS No: 26628-22-8

Ames testinde TA100 bakteri suşu için metabolik aktivasyon yokluğunda pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Stok, 0,01 g SA tartılıp 100 mL distile suda çözülerek hazırlanmıştır. +4°C'de saklanmıştır. Deneyde kullanılan pozitif kontrol 1/10 oranında seyreltilmiş SA çözeltisidir

3.1.2.33. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

Sorensen Tamponu olarak anılan bu tampon %5'lik Giemsa boyası hazırlanırken boya çözeltisinin pH değerini ayarlamak için kullanılmıştır. Bu tampon eriyik tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

Tamponların Hazırlanışı:

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 mL saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8).

Tampon B: 14.83 gr $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 250 mL saf su içinde eritilmiştir (pH=9.3).

3.1.2.34. Top agar (yumuşak agar)

Mutajenite deneylerinde kullanılmıştır.

Hazırlanışı: **1000 mL için**

Agar: 6 gr

NaCl: 5 gr

Histidin/biyotin solüsyonu: 100 mL

Distile Su: 1000 mL

Karışım otoklavda 121°C’de 15 dk steril edilmiştir.

3.1.2.35. Tripan Blue

Komet testi yapılırken izole lenfositlerin canlılık oranını belirlemek amacıyla tripan blue (Sigma CAS No: 72-57-1) boyası kullanılmıştır. Stok tripan blue hazırlamak için %0.4’lük tripan blue boyasından 4 mL alınıp üzerine 1 mL saf su eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanan stok tripan blue boyasından 10 µL alınıp üzerine 10 µL stok lenfosit ilave edilip canlılık testine bakılmıştır. Canlı hücreler şeffaf, ölü hücreler ise mavi renkte görülmüştür.

3.1.2.36. Vogel-Bonner-E Ortamı (50XVB tuzları)

Ames testinde Minimal glikoz agar (MGA) plaklarının tuzu olarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı: **1000 mL için**

Magnezyum sülfat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$): 10 gr

Sitrikasit monohidrat: 100 gr

Potasyum fosfat (K_2HPO_4): 500 mL

Sodyum amonyum fosfat ($NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$): 175 gr

Distile Su: 670 mL

Maddeler yukarıda yazdıkları sıra ile distile suya eklenmiştir. Son hacimlerine tamamlanıp otoklavda 121°C’de 20 dk. sterilize edilmiştir. Oda sıcaklığında karanlıkta saklanmıştır.

3.1.3. Kullanılan Deney Ekipmanları**3.1.3.1. Elektroforez Tankı (27.5/25 cm)**

Komet testinde DNA örneklerini elektroforez tamponunda yürütmek amacıyla kullanılmıştır.

3.1.3.2. Elektroforez Güç Kaynağı

DNA örneklerini jelde yürütmek amacıyla elektroforez tankına bağlanabilen Cleaver nanoPAC-300 mA’lık güç kaynağı kullanılmıştır.

3.1.3.3. Hassas Terazi

Hava akımına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0.0001 gr hassasiyetindeki GEC AVERY marka terazi, kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.1.3.4. İnkübatör

Deneyler sırasında kullanılan eriyiklerin ve kan kültürlerinin 37°C’de tutulması amacı ile INCUCCELL marka, 0°C-100°C’ye kadar ayarlanabilir inkübatör kullanılmıştır.

3.1.3.5. Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı

Deneylerde kullanılan bazı kimyasal maddeleri hazırlamak için CHILTERN HOTPLATE HS31 marka karıştırma devri ve ısıtma sıcaklığı ayarlanabilir manyetik karıştırıcı ısıtıcı tabla kullanılmıştır.

3.1.3.6. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan Olympus marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır. Fotoğraflar ise yine Olympus marka mikroskopta dijital fotoğraf makinesi (Olympus CX31RTSF, 7.1 Megapixel) ile çekilmiştir. Komet testinde nükleus incelemeleri için de aynı marka floresan mikroskobu kullanılmıştır.

3.1.3.7. Otoklav

Deneylerde kullanılan donanım ve eriyiklerin sterilizasyonu amacıyla HIRAYAMA marka otoklav kullanılmıştır. Sterilizasyon, 121°C sıcaklık ve 1.2 atm basınçta 15 dk. süre ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.3.8. Petri Kutuları

Ames testi için FIRATMED markası tarafından cleanroom odalarında IVD 98/79/EC direktiflerine uygun olarak üretilen ve bir paketi 28 adetten oluşan petri kutuları kullanılmıştır. Her bir petri kutusu 8.5 cm çapa sahip olup toplam hacim 25 mL MGA besiyeri+2000 µL top agar+100 µL organizma kültürü+100 µL test maddesinden oluşmaktadır.

3.1.3.9. pH Metre

Kimyasalların pH değerlerini saptamak için Thermo Fischer marka pH metre kullanılmıştır.

3.1.3.10. Santrifüj

Rotor çapı 21 cm olan ve 4000 devir/dk'ya (rpm) kadar yükselebilen devir hızı, 99 dk'lık zaman ayarlayıcı, açılabilir başlığa sahip ve 28 tüp kapasiteli HETTICH UNIVERSAL marka santrifüj çalışmalarda kullanılmıştır.

3.1.3.11. Soğutmalı Santrifüj

Komet testinde ependorf tüplerindeki örneklerin santrifüj edilmesi amacıyla VWR MICRO STAR 17 R marka soğutmalı santrifüj cihazı (24 x 2.2 - 1.5 mL rotor için maksimum 9.000 rpm hızına erişebilen) kullanılmıştır.

3.1.3.12. Steril Kabin (Flow Kabin)

Hücre kültürü tüplerine kromozom medium konulması, kan ekiminin yapılması, test eriyiklerinin ve kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, %99.9 partikül tutma özellikli filtreye sahip, 1500 m³/h emme kapasiteli, UV ve floresan ampülü olan LABORMED marka flow kabin kullanılmıştır.

3.1.3.13. Vorteks

Bazı sıvıların karıştırılması amacıyla 2 farklı hız kademesine sahip VELP SCIENTIFICA marka vorteks cihazı kullanılmıştır.

3.1.3.14. Lamaların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce etiketli olan lamalar şaleye dizilerek üzerlerini iyice örtecek şekilde 1 N nitrik asit konmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak bu şekilde 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamalar yaklaşık 15 dk. akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. Lamalar 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında (+4°C) saklanmıştır. Deney esnasında soğuk olarak kullanılmıştır.

3.1.3.15. Sterilizasyon

Deney aşamasında kullanılan cam malzemeler, pipet uçları, ependorf tüpler ve diğer tüm araç-gereçler alüminyum folyoya sarılmıştır. Daha sonra 121°C sıcaklık ve 1.2 atm basınçta 15 dk süre ile sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. Mikronükleus (MN) Oluşumunu Saptaması

3.2.1.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

In vitro MN testinde Rothfuss ve ark. (2000)'nın geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntemle göre,

- Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın dört kişiden (2 kadın 2 erkek) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 mL) ekilmiş ve hücreler $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat inkübe edilmiştir.
- Çalışmada *Commiphora myrrha* esansiyel yağının (mür yağı) etkilerini belirlemek için emülgatör olarak %0.5 Tween 80 içerisinde hazırlanmış son konsantrasyon 0.03125, 0.0625 ve 0.125 $\mu\text{L/mL}$ olacak şekilde mür yağı kültür ortamına, kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra ilave edilmiştir. Test mür yağının sitotoksik olmayan konsantrasyonları ön çalışmalarla saptanmıştır. En yüksek konsantrasyon olarak hücre bölünmesini %50 civarında azaltan doz seçilmiştir.
- İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra her tüpe konsantrasyonu 6 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde sitokalsin-B maddesi ilave edilmiş ve böylece bölünen hücrelerde sitokinez engellenmiştir.
- İnkübasyonun sonunda kültür tüpleri 2000 devir/dk.'da 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve hücrelerin bulunduğu tüplere hipotonik eriyik (%0.4 KCI) yavaşça ve pipetaj yapılarak ilave edildikten sonra tüpler inkübasyon yapmaksızın direkt olarak santrifüje alınmıştır.
- Kültür tüpleri 1200 devir/dk.'da 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılarak birinci fiksatif (1/5/6=glasiyal asetik asit/metanol/%0.9 NaCI) ilave edilmiş ve hücreler bu fiksatif ile muamele edilmiştir. oda sıcaklığında 20 dk. boyunca tüpler bekletilmiştir.
- Birinci fiksatif muamelesinden sonra 1200 devir/dk.'da 10 dk. santrifüj

edilerek süpernatant atılmıştır.

- İkinci ve üçüncü fiksatif muamelesi ise 1 kısım glasiyal asetik asit, 5 kısım metanol karışımının sonucunda hazırlanmış (1/5) fiksatif ile yapılmış ikinci ve üçüncü fiksatif muamelesi ise 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Her fiksatif muamelesinden sonra tüplerdeki hücre süspansiyonu 10 dk. 1200 devir/dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Kültür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilmiştir.
- Daha sonra hücre süspansiyonu soğuk ve temiz lamalar üzerine 10 cm yükseklikten damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır.

3.2.1.2. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar bir gün sonra Sorensen tamponunda hazırlanmış %5'lik Giemsa boyası ile 5-7 dakika boyanmış ve boyanmış preparatlardaki fazla boyanın alınması için üç ayrı kapta bulunan saf sudan geçirilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra preparatlara entellan ile lamel kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

3.2.1.3. Mikronukleus (MN) Testi İçin Hazırlanan Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

Hazırlanan daimi mikronukleus preparatları Olympus marka ışık mikroskopunda $10 \times 40 = 400$ büyütmede incelenmiştir.

3.2.1.4. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBİ) Saptanması

Mikronukleus sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiye ait (4 kişi) daimi preparatlarda her kişinin her muamele grubu ve kontrollerinde iki nükleusa sahip (binükleer) toplam 1000 hücre incelenmiş, (4 kişi x 1000=4000 hücre) ve bu binükleer hücreler içerisinde mikronukleuslu olanlar saptanmıştır. Bundan

mikronukleuslu binükleer hücre ‰'si hesaplanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronukleus sayısı belirlenmiştir. Toplam mikronukleus sayısından MN ‰'si hesaplanmıştır.

Binükleer hücre ve mikronükleus ayırımı Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)'in belirlediği özelliklere göre yapılmıştır;

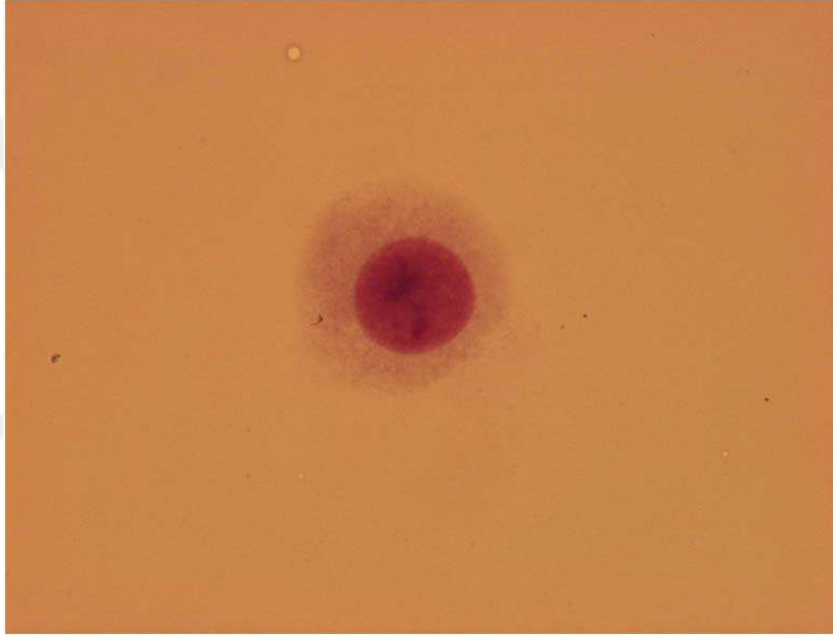
- Hücreler belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak ya da oval görünüme sahip olmalıdır.
- Benzer olarak nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır.
- İçerisinde MN sayılan hücreler sadece bir nükleus bölünmesi geçiren hücrelerdir.
- MN'lar sadece ana nükleusun 1/3'ü ya da daha küçük olduklarında hesaba katılmalıdır.
- MN'lar ana nükleus gibi boyanmalıdır.
- MN'lar ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır.

Sitokinez bloklama yönteminin en önemli yararı, bölünen hücre popülasyonunda nükleus bölünmesinin ilerleyişini ve çoğalmasını belirleyecek imkânı vermesidir. Bu durum, sitokalsin-B ilavesinin ardından oluşan bir nükleuslu, iki nükleuslu, multinükleuslu(>2) hücrelerin sayılmasıyla yapılır. Nükleus bölünme indeksi Eastmond ve Tucker (1989) tarafından önerilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$NBİ = \frac{(1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3 + 4 \times M4)}{N}$$

Formüle göre, M1 bir nükleuslu (Şekil 3.6), M2 iki nükleuslu (Şekil 3.7), M3 üç nükleuslu (Şekil 3.8), M4 dört nükleuslu (Şekil 3.9) hücrelerin sayısını, N ise toplam hücre sayısını göstermektedir. NBİ'nin hesaplanması kimyasal

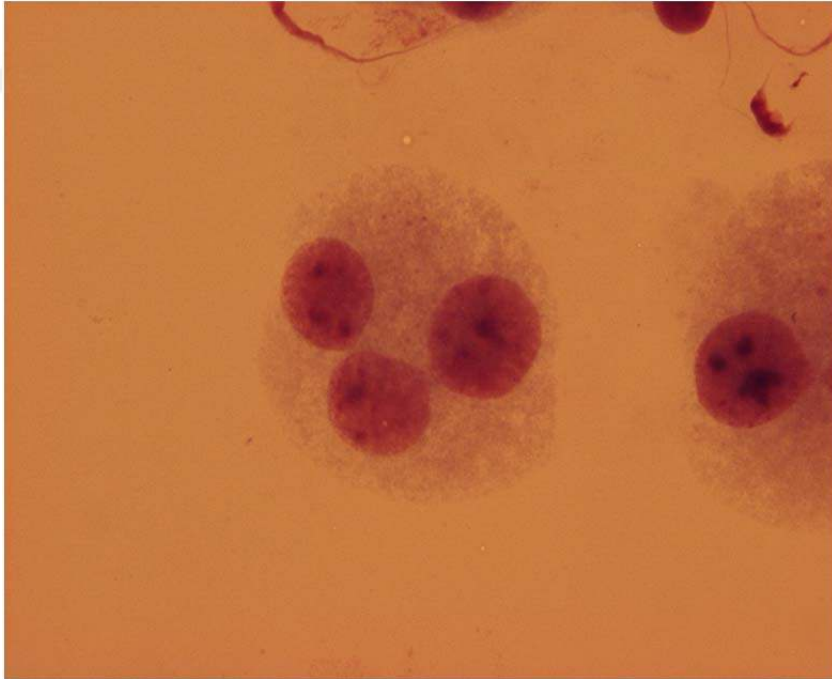
maddenin veya fiziksel bir etkenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (Fenech, 1997). Bu nedenle, MN bakımından incelenen preparatlar daha sonra nükleus bölünme indeksini (NBİ) (Nuclear Division Index=NDI) belirlemek için tekrar incelenmiştir. Bu çalışmada NBİ için, her bir kişinin preparatlarından tesadüfî seçilmiş alanlarda toplam 1000 hücre (4 kişide toplam 4000 hücre) incelenmiştir.



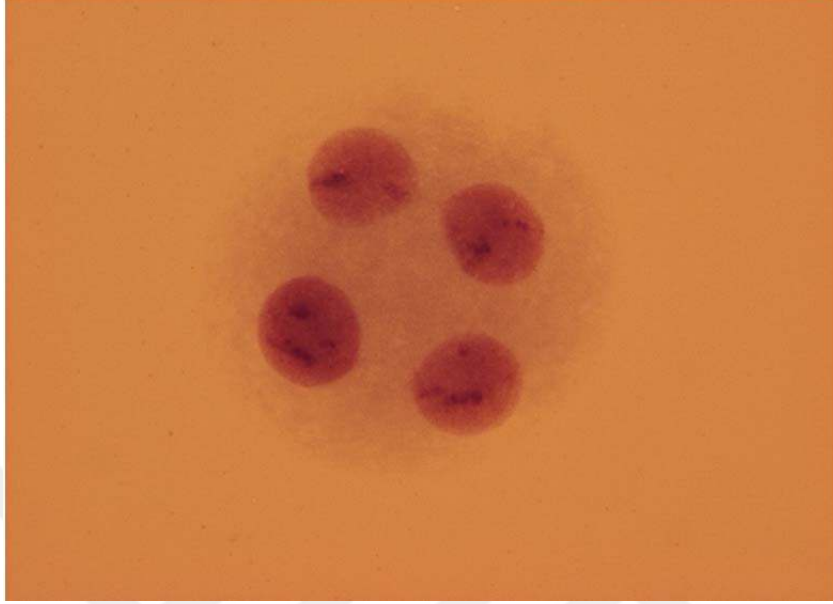
Şekil 3.6. Bir nükleuslu hücre. X1000.



Şekil 3.7. İki nükleuslu hücre. X1000.



Şekil 3.8. Üç nükleuslu hücre. X1000.



Şekil 3.9. Dört nükleuslu hücre. X1000.

3.2.1.5. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraf çekme işlemi Olympus marka trinoküler mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinasında 1000 büyütmede yapılmıştır (Olympus CX31RTSF, 7.1 Megapixel) binükleer hücrelerden mikronükleusa sahip olanların ve 1, 2, 3 ve 4 nükleuslu hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.2. Komet Testi (Tek hücre jel elektroforez testi / Kuyruklu yıldız testi)

3.2.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Komet testinin uygulanması için preparatların hazırlanması ve gerekli diğer işlemler için Singh ve arkadaşlarının (1988) kullandıkları metot laboratuvar koşullarımıza uyacak şekilde modifiye edilerek kullanılmıştır.

- Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın bir kadın bir erkekten alınan kandan lenfosit hücreleri izole edilmiştir.

- Lenfosit örnekleri ependorf tüplerine 100 µL olacak şekilde paylaştırılmış ve üzerine 1000 µL PBS (Fosfat Tamponu) ilave edilerek lenfosit süspanse edilmiştir.
- Bu aşamadan sonra yapılacak tüm işlemler ışığın DNA molekülü üzerinde neden olabileceği tüm olumsuz etkileri engellemek amacıyla karanlıkta gerçekleştirilmiştir.
- Daha sonra bekletilmeden tüpler + 4 °C ve 1000 devir/dakika (rpm) 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüpler buz üzerine konulmuş ve lenfositlerin bulutsu bir yapı oluşturarak ara katmanda toplanması sağlanmıştır.
- Ara katmandan (lenfositler) 100 µL alınıp stok lenfosit oluşturmak üzere ayrı bir ependorf tüpüne aktarılmıştır.
- İzole edilmiş lenfositlerden 10 µL alınarak 10 µL seyreltilmiş tripan blue ile karıştırılarak bir lamın üzerine konularak lamel ile kapatılarak lenfositlerin canlılık oranına incelenmiştir. Şeffaf olarak görünen hücreler canlı, mavi renge boyalı olarak görünen hücreler ise cansız kabul edilmiştir (Deneye devam edebilmek için canlılık alt sınırının ≥ 90 olması dikkate alınmıştır.).
- Canlılık testinin ardından daha önceden belirlenen dozlardaki test maddesi (mür yağı) son konsantrasyonu 0.03125, 0.0625 ve 0.125 µL/mL olacak şekilde 100 µL içerisinde stok lenfositlere eklenerek hücrelerin test maddesiyle muamele olması sağlanmıştır.
- Pozitif kontrol olarak %35 H₂O₂ 'dan (% 35'lik hidrojen peroksit'ten 6 µl üzerine 9994 µL distile su) 100 µL, çözücü kontrol olarak Tween 80'den (0.1 µL tween80 + 99.9 µL distile su) 100 µL ve kontrol olarak ise distile su 100 µL kullanılmıştır.

- Tüplere test maddesi, pozitif kontrol, çözücü kontrol ve steril distile su ilave edildikten sonra hücreler 37 °C’ de 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonunda tüpler +4°C ve 3000 devir/dk’da 5 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrası tüplerdeki süpernatant atılmıştır.
- Kalan lenfositlerin üzerine 100 µL PBS tamponu ilave edilerek tüpler dikkatlice karıştırılmıştır.
- Daha önceden hazırlanan düşük kaynama dereceli LMA (low melting agar) agardan 75 µL alınıp ependorf tüplerinde bulunan 100 µL lenfosit ile hızlıca karıştırılmış ve bu karışımdan 150 µL alınıp bir gün önceden yüksek erime dereceli HMA (high melting agar) agar kullanılarak kaplanmış olan lama yayılarak üzeri lamel ile kapatılmıştır.
- Kapatılan preparatlar kapalı kutu içerisinde 20-25 dakika buzdolabında bekletilmiş. Süre sonunda lam üzerindeki lameller tek bir hamlede yana çekilerek çıkartılmış ve lamalar içerisinde lysing solüsyonu bulunan şale içerisine yerleştirilmiştir. Bu şekilde preparatlar buzdolabında 16 saat (en az 1 saat en fazla ise 16 saat) bekletilmiştir.
- Lizis işleminden sonra lamalar elektroforez tankında bulunan tampon içerisine konulmuş ve 25 V ve 300 mA’da 20 dakika elektroforezde DNA iplik parçalarının yürütme işlemi yapılmıştır (Elektroforez tankı bir gün önceden +4°C’de bekletilmiştir).
- Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra lamalar elektroforez tamponundan dikkatli bir şekilde alınarak bir gün önceden hazırlanıp +4°C’de bekletilen nötralizasyon tamponu içeren şale içerisine konulmuş ve yine +4°C’de 5 dakika bekletilmiştir. Bu işlem 2 defa tekrarlanmıştır.
- Nötralizasyon işleminden sonra ilgili tampondan çıkartılan her bir lama 50 µL Etidyum Bromid (EtBr) (100 µg/mL) ilave edilerek hücrelerin

boyanması sağlanmış ve lamel ile kapatılarak preparatlar kapalı kutu içerisinde 15-20 dakika buzdolabında bekletilmiştir.

- Süre sonunda fazla boyanın uçmasını sağlamak amacıyla lamalar karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir.

Bu şekilde elde edilen preparatlarda EtBr'nin uçucu etkisinden dolayı görüntü kalitesinin bozulmaması için aynı gün içerisinde inceleme yapılmıştır

3.2.2.2. Mikroskopik İnceleme

Etidyum bromid ile boyanmış preparatlar olympus (CX31RTSF, 7.1 Megapixel) marka floresan mikroskop (546 nm eksitasyon ve 590 nm bariyer filtre) altında 400X büyütmede incelenmiştir. Kullanılan test maddelerinin etkisini belirleyebilmek amacıyla her bir kişiye ait preparatlarda her muamele grubu ve kontrollerinde rastgele seçilmiş 100'er hücre incelenmiş ve fotoğrafları çekilerek görüntüleri kaydedilmiştir. Mikroskopik incelemeler sırasında nükleustan dışarı doğru göç etmiş DNA parçaları nükleusa bağlı bir kuyruk halinde (kuyruklu yıldız benzer bir görünüm) görülür. Bu nükleuslarda DNA hasarının meydana geldiği anlaşılır (Şekil 3.10). Daha sonra nükleustaki DNA hasarının gözle değerlendirmiştir. Bu yöntemde hücreler hasarsız olmaları ve hasar düzeylerine göre 0'dan 4'e kadar skorlanmaktadır.

Dünyada uygulanan komet test tekniğinin genel basamakları Şekil 3.11'da gösterilmiş ve aşağıda özetlenmiştir (Tice ve ark, 2000; Çavaş ve Könen, 2007-2008):

1. **Hücrelerin İzolasyonu:** Lenfositlerin tam kandan ayrılması işlemidir.
2. **Preparasyon Aşaması:** Hücrelerin agar ile karıştırılarak lam üzerine yayılmasını içeren safhadır.
3. **Lizis:** Agara gömülü halde lam üzerine yayılmış olan hücrelerin hücre zarlarının ve proteinlerinin yıkımının gerçekleştiği aşamadır. Bu aşamanın sonunda çıplak DNA elde edilir. Lizis işlemini gerçekleştirmek için

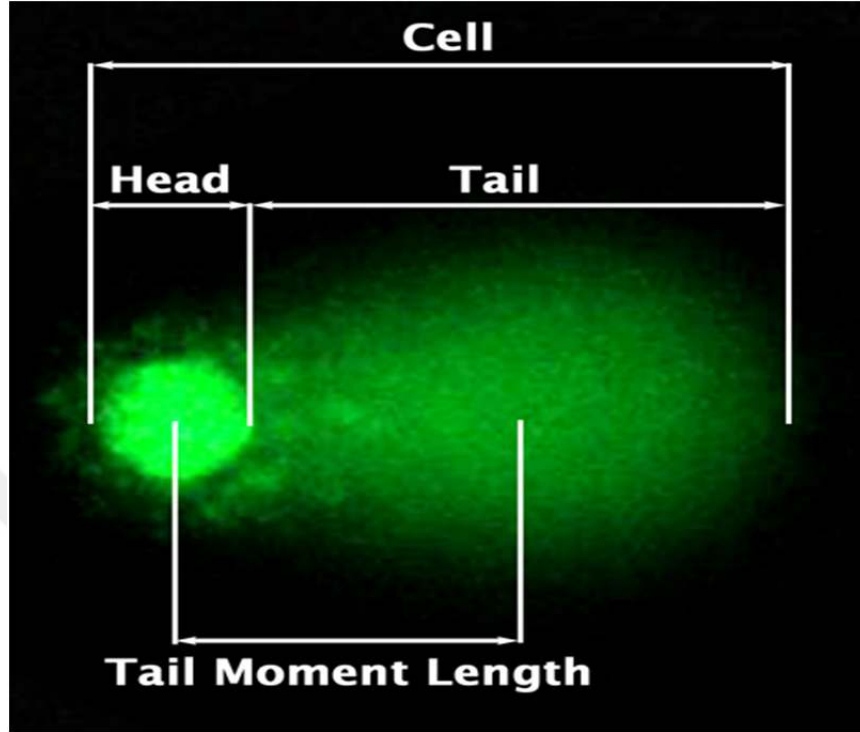
önceden hazırlanan ve +4°C’de soğutularak saklanan lizis solüsyonu kullanılmaktadır. Lizis çözeltisinin bileşeninde bulunan tuz proteinlerin hücre ile olan bağlarını ve RNA yapısını bozarken, deterjanlar ise hücre membran yapısını bozmaktadır. Böylece lizis işlemi sonrasında hücre yapısındaki membran, proteinler, RNA, sitoplazmik ve nükleer bileşenler parçalanmaktadır. Sonuçta nükleoid olarak adlandırılan ve komet oluşumunun gözlenebileceği DNA yumağının kalması sağlanmaktadır.

4. **DNA Sarmalının Çözülme Aşaması:** Lizis işleminden çıkan preparatlar soğuk elektroforez solüsyonu içeren (pH>13) tanka yerleştirilir ve burada 20 dakika süreyle bekletilir. Bu aşamada DNA zincirlerinin ayrılarak tek iplikli hale geçmesi sağlanır.
5. **Elektroforez Aşaması:** DNA sarmalı çözüldükten sonra aynı tank ve solüsyon içerisinde elektrik akımı uygulanarak elektroforez işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem sonucunda tek iplikli DNA molekülünde bulunan kırık fragmentler ve kırılma sonucu oluşan DNA ilmekleri negatif (-) yüklü oldukları için boyutlarına bağlı olarak değişen hızlarda anoda (+ uca) doğru hareket etmektedir.
6. **Nötralizasyon Aşaması:** Elektroforez işleminden sonra tanktan çıkarılan preparatlar pH ayarlamasını sağlamak için nötralizasyon işlemine tabi tutulur. Bu işlem için preparatlar önceden hazırlanarak +4°C’de bekletilen soğuk nötralizasyon tamponu içeren şalelere alınarak 30 dakika süreyle bekletilir.
7. **Boyama Aşaması:** Nötralizasyon tamponundan çıkarılan preparatlar 2 kez soğuk distile sudan geçirilerek boyama işlemine tabi tutulur. Bu işlem için en yaygın olarak kullanılan floresan boya Etidyum bromidtir (EtBr). Ancak EtBr oldukça iyi sonuç vermesine rağmen yüksek oranda genotoksik etkiye sahip olduğu için bu boyaya alternatif olarak komet testinde akridin oranj, DAPI, YOYO-1 veya propidyum iyodit boyaları da kullanılmaktadır.

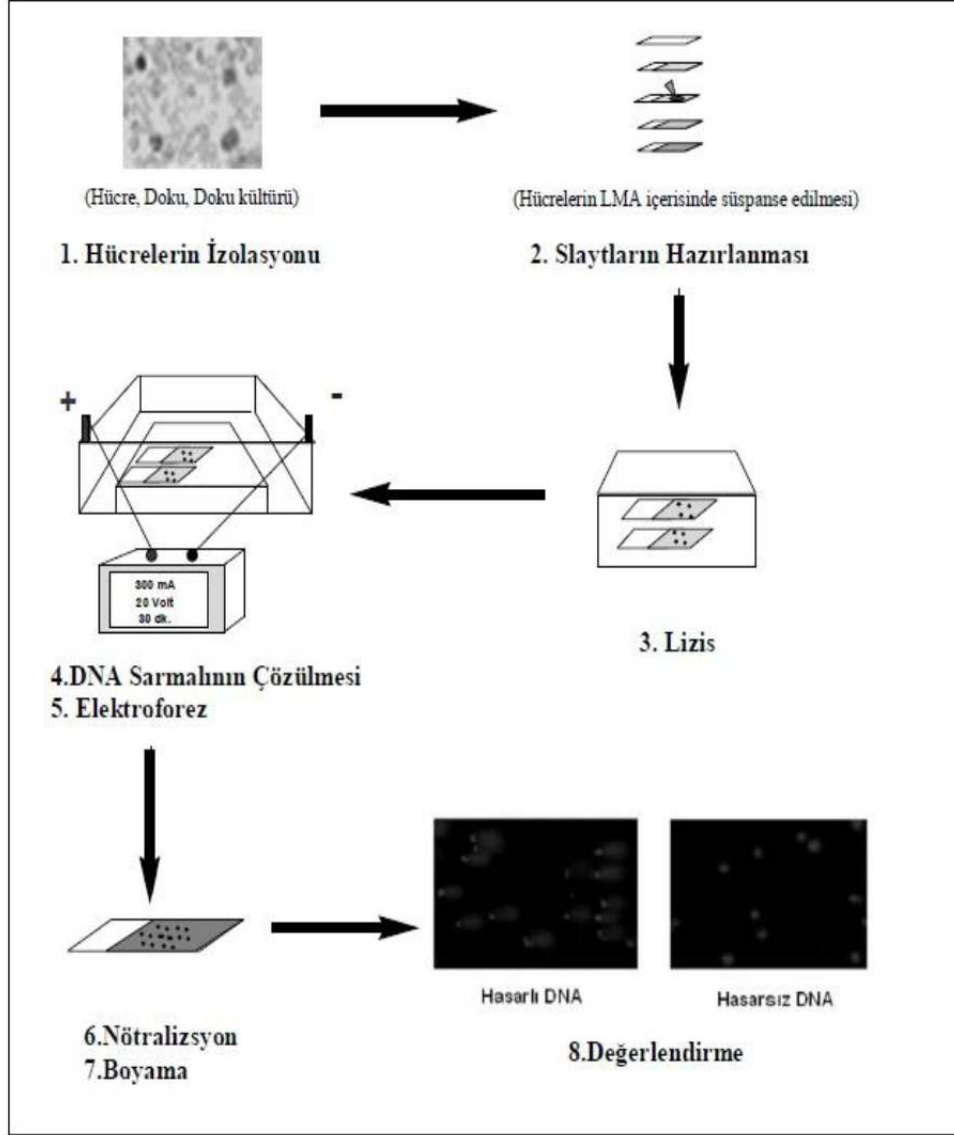
8. Değerlendirme Aşaması: Komet ölçümlerinde kullanılmak üzere birçok parametre geliştirilmiş olmakla birlikte kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi en yaygın olarak kullanılan parametrelerdir. Komet test tekniği kullanılarak DNA’da oluşabilecek hasarların kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirmeye dayalı ölçümler kullanılabileceği gibi en garantili yöntem olarak bilgisayarlı komet analiz programları da kullanılmaktadır. Komet yapısı içerisinde belirli bir bölgede bulunan DNA miktarı ile o bölgede bulunan floresan yoğunluğu arasında doğru orantı bulunmaktadır. Bu özellikten faydalanılarak dijital görüntü sistemleri ve bilgisayar yazılım programlarında kullanılan çeşitli tayin yöntemleri geliştirilmiştir (Şekil 3. 11). Bunlar;

- **Kuyruk Uzunluğu:** Çekirdek baş bölge dış kısmından itibaren göç eden DNA uzunluğunun ölçümüdür.
- **Merkezden Kuyruk Uzunluğu:** Kuyruk uzunluğu + Baş çapı/2
- **Kuyruktaki DNA %’si:** Kuyrukta bulunan DNA’nın hücrede bulunan toplam DNA’ya olan yüzdesidir
- **Kuyruk Momenti:** Kuyrukta bulunan toplam DNA yüzdesi ile baş bölgesinin merkezinden itibaren kuyruğun merkez kısmına kadar olan mesafenin ortak olarak hesaplanmasıdır.

$$\text{Kuyruk momenti} = \frac{\text{Kuyruk uzunluğu} \times \text{Kuyruktaki DNA yoğunluğu}}{100}$$



Şekil 3.10. DNA hasarına uğramış hücrede baş ve kuyruk oluşumu.

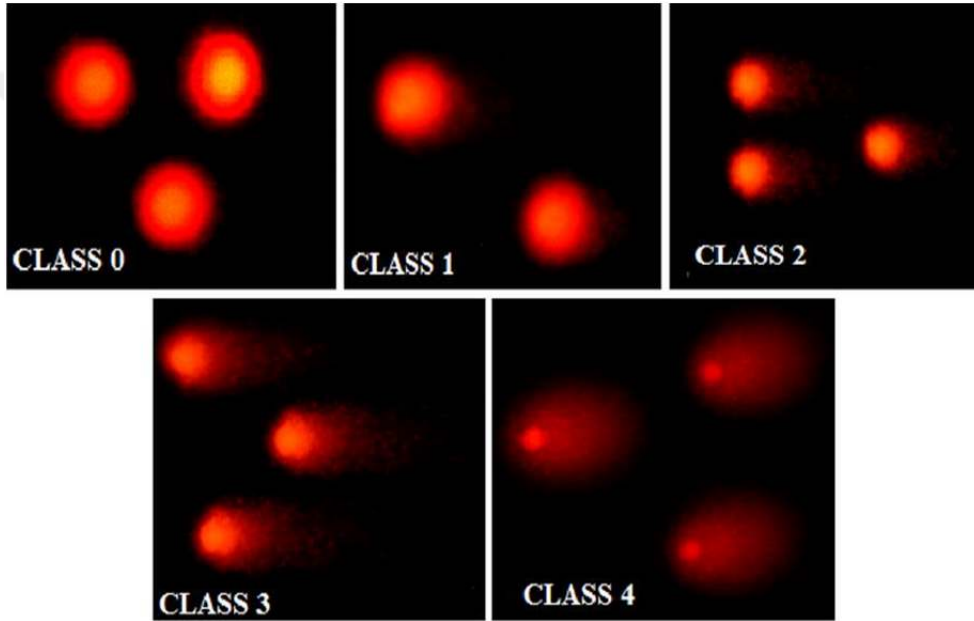


Şekil 3.11. Komet tekniği genel aşamaları (Fidan, 2008).

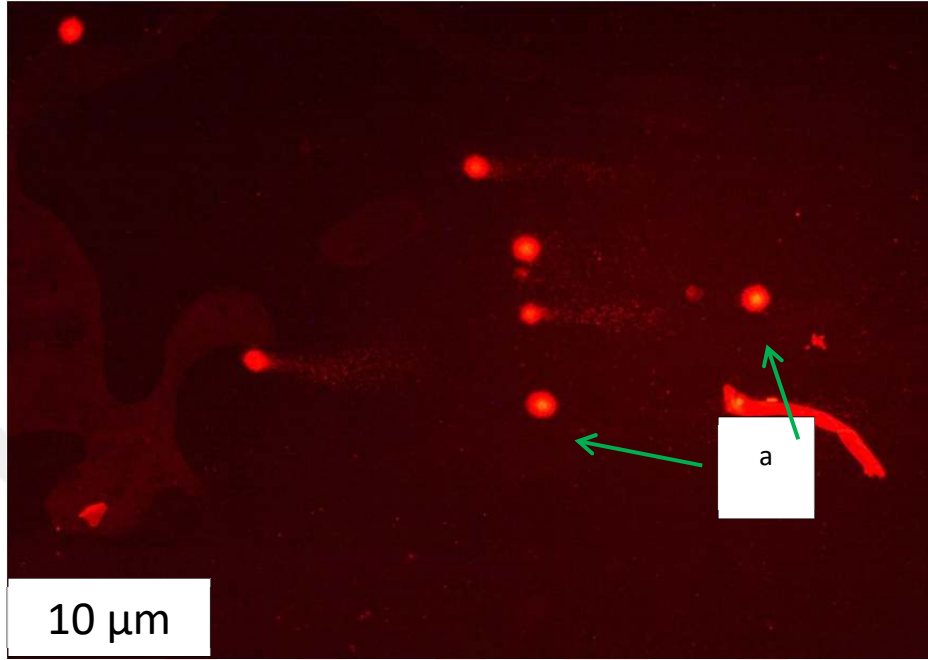
Nükleustaki DNA hasarının diğer bir değerlendirme yöntemi manuel (gözle) değerlendirmedir. Bu yöntemde hücreler hasarsız olmaları ve hasar düzeylerine göre 0'dan 4'e kadar skorlanmaktadır (Şekil 3.12). Bu skorlamada;

- | | | |
|---------|---|---------------------------------------|
| Class 0 | → | kuyruğun hiç olmadığını |
| Class 1 | → | kuyruk uzunluğunun çok az olduğunu |
| Class 2 | → | kuyruk uzunluğunun az olduğunu |
| Class 3 | → | kuyruk uzunluğunun çok olduğunu |
| Class 4 | → | kuyruk uzunluğunun çok fazla olduğunu |

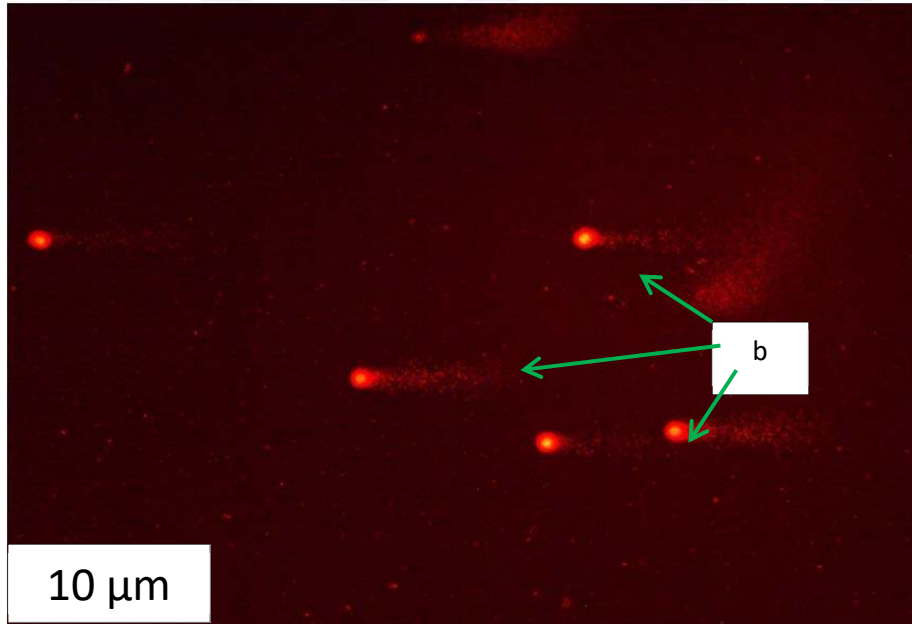
göstermektedir. (Bandyopadhyaya ve ark., 2008; Çavaş ve Könen, 2007, 2008).



Şekil 3.12. Komet testi ile farklı seviyelerde hasara uğramış DNA'ların görüntüleri.



Şekil 3.13. DNA'sı göç etmemiş (kuyruksuz=a) nükleuslar. X1000.



Şekil 3.14. DNA'sı göç etmiş (kuyruklu=b) nükleuslar. X1000.

3.2.3. AMES/Salmonella Bakteriyel ters mutasyon testi

Deneyin bilimsel esası, çoğalması için histidin amino asidine gereksinim duyan *Salmonella typhimurium* mutant oksotrofik suşlarının, mutajenik etkiler ile tekrar histidin sentezleyebilir atasal (prototrof) forma dönüşmesi temeline dayanmaktadır. Bu yolla test maddelerinin neden olacağı geri mutasyonların frekansı saptanabilecektir. TA98 suşu çerçeve kayması, TA100 suşu ise baz çifti değişimi tipindeki mutasyonların saptanmasında kullanılmıştır. Ames testine metabolik aktivasyon olmaksızın çalışılmıştır.

Bu çalışma ile biyoaktif etkinliği araştırılan test maddelerinin (mür yağı) mutajenik etkileri Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemi ile araştırılmıştır.

3.2.3.1. Salmonella typhimurium Test Suşları ve Özellikleri

1983 yılında Maron ve Ames tarafından *in vitro* mutasyonlarla geliştirilen TA98 ve TA100 suşları ticari olarak temin edilip kullanılmıştır.

Standart test suşları (TA97, TA98, TA100 ve TA102) R-faktör plazmidi olan pKM101'i içerir. Bu R-faktörü suşları, R-faktörü olmayan ana suşlarla zayıf bir şekilde algılanan veya hiç saptanmayan bir dizi mutajen tarafından geri döndürülür (McCann ve ark., 1975; Levin ve ark., 1982). Hem *Escherichia coli* hem de *Salmonella typhimurium*'da pKM101, normalde bu organizmalarda mevcut olan hata eğilimli bir DNA onarım sistemini geliştirerek kimyasal ve spontan mutagenezi artırır (McCann ve ark., 1975; Walker ve Dobson, 1979; Shanabrukh ve Walker, 1980).

Mutajenite çalışmalarında en yaygın kullanılan *Salmonella* test suşlarının genotipleri ve mutasyona uğrayan hedef DNA bilgileri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. En Yaygın olarak kullanılan *Salmonella* Test Suşlarının Genotipleri (Kristien 2000).

Suşlar	Mutasyon	Hedef DNA	uvrB-biotin	LPS hasr	Plazmid
TA97	hisD 6610	-C-C-C-C-C-C- Çerçeve kayması (+1)	Delesyon	rfa	PKM101
TA98	hisD3052	-C-G-C-G-C- Çerçeve kayması (-1)	Delesyon	rfa	PKM101
TA100	hisG46	-G-G-G- Çift baz değişimi	Delesyon	rfa	PKM101
TA102	hisG428	TAA	Delesyon	rfa	PKM101 PAQ1
TA104	hisG428	TAA	Delesyon	rfa	PKM101
TA1535	hisG46	-G-G-G- Çift baz değişimi	Delesyon	rfa	yok
TA1537	hisC3076	-C-C-C- Çerçeve kayması (+1)	Delesyon	rfa	yok
TA1538	hisD3052	-C-G-C-G-C- Çerçeve kayması (-1)	Yabancı tip	rfa	yok

*rfa : R-faktör

3.2.3.2. Salmonella Suşlarının Kültürlerinin Canlılıklarının Belirlenmesi

Saklanan (-80°C) bakteri suşlarından erimeden platin bir öze yardımı ile kazıntı alınmıştır. TA98 ve TA100'ün Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA) plaklarına çizgi ekimleri yapıp 37°C'de 48 saat inkübasyona alınmıştır. Sürenin sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2 mL Nutrient Broth (NB) ortamı içinde süspanse edilerek bir gece 16 saat 37°C'de çalkalamalı inkübatörde 140 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra platin öze ile bir öze dolusu sıvı kültür alınıp tekrar yeni HBA üzerine çizgi ekim yapılmıştır. Yeterli üremenin gözlenebilmesi için plaklar 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu plaklar alüminyum folyoya sarılarak +4°C'de 2 ay süre ile saklanabilmekte ve pasajlar yapılabilmektedir.

3.2.3.3. Bakteri Suşlarının Dondurulması ve Saklanması

Test suşlarının uzun süre canlılıklarını ve mutant özelliklerini koruyabilmek amacı ile dondurulmuş örnekler hazırlanmıştır. Bunun için steril edilmiş olan endorf tüplerine önceden gecelik kültürü hazırlanan NB ortamından 500 µL bakteri alınarak üzerine 1:1 oranında olacak şekilde (500 µL) glisin eklenerek iyice karıştırılmıştır. Kültür -20°C'de bir gece bekletildikten sonra tekrar kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Test suşlarının genetik özellikleri bozulmadan bu şekilde 3 yıl saklanabildiği rapor edilmektedir.

3.2.3.4. Çalışmada Kullanılacak Test Suşlarının Genetik Kontrolü**3.2.3.4.1. Histidin Gereksinimi Kontrolü**

Bakterilerin MGA üzerine ekilmeleri sonucu his⁻ bakteriler his⁺ olanlardan ayırt edilir. Bu amaçla besi yerinden gecelik kültür hazırlanır. NB'da, bir gece üretilen bakterilerden sabah MGA ve histidin/biyotin (HB) plaklarına çizgi ekim yapılır. İnkübasyondan sonra (37 °C'de 48-72 saat) HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir. Böylece kullanacağımız bakterilerin his⁻ mutasyonunu taşıdığı anlaşılır.

3.2.3.5. Gecelik Kültürün Hazırlanması

Önceden hazırlanan ve -80 °C’de saklanan suş stokları eritilmiş ve içerisinde 500 µL alınıp hazırlanan 50 mL NB ortamına ilave edilmiştir. Bu kültür 37 °C’lik inkübatörde 16 saat süre ile üremeye bırakılmıştır.

3.2.3.6. Test Maddelerinin Dozlarının Belirlenmesi

MN ve komet testlerinde µL/mL olarak kullanılan dozlar, Ames testi için µL/petri olarak hesaplanıp kullanılmıştır. Ames testinde, MN ve komet’den farklı olarak iki doz daha eklenerek beş doz şeklinde kullanılmıştır (*C. myrrha* uçucu yağının 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 µl/petri). Her dozdan ayrı ayrı 8.5 cm çapa sahip petrilere 100 µl eklenmiştir.

3.2.3.7. Pozitif Mutajenler

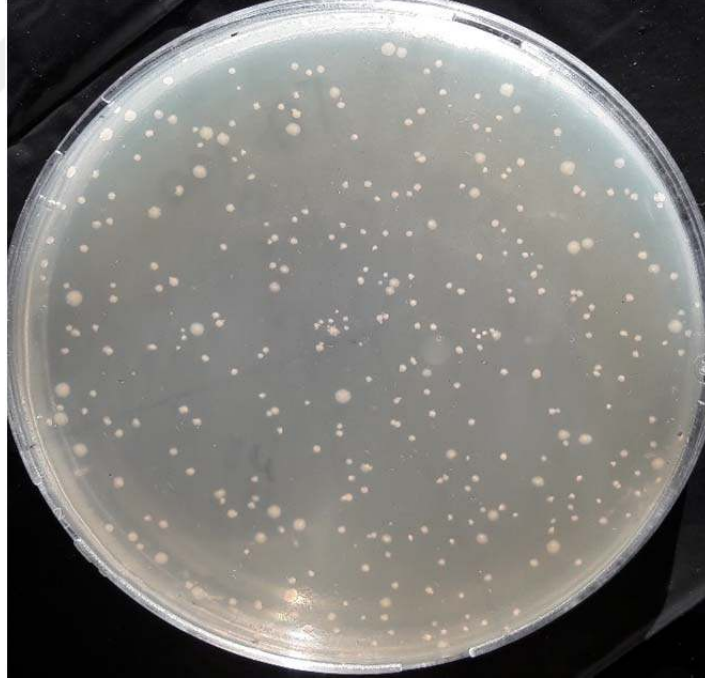
Suşların pozitif kontrollerini sağlamak amacı ile daha önceden mutajen oldukları tespit edilen uygun kimyasal maddeler kullanılmıştır. *Salmonella typhimurium* TA98 için pozitif mutajen olarak 4-Nitro-o-Fenilendiamine (4-NPD) ve *S. typhimurium* TA100 için Sodyum Azid (SA) kullanılmıştır. Bu pozitif kontroller 1/10 oranında seyreltilmiş ve petri başına 100 µL kullanılmıştır.

3.2.3.8. Ames Testinin Yapılışı (Metabolik Aktivasyon Yokluğunda)

- Hazırlanan top (yumuşak) agar, otoklavda steril edilerek 45°C’ye kadar soğumaya bırakılmıştır. Bakterilerin yüksek sıcaklıkta ölmelerini engellemek için sıcaklık tayinine dikkat edilmiştir.
- Steril ortamda yapılan deneyde 2 mL top agardan (histidinli) alınıp, steril edilen tüpe aktarılmış ve gecelik kültür olarak hazırlanan NB ortamındaki bakterilerden 100 µL alınarak üzerine eklenmiştir.
- Daha önceden belirlenen dozlardan da (*C. myrrha* uçucu yağının 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1 µg/petri) 100 µL alınarak tüpe aktarılmış ve önceden

hazırlanan MGA'lı plaklara dökülmüştür.

- Top agarın petri üzerinde homojen dağılmasını sağlamak için hızlı bir şekilde 8 işareti yapılmıştır.
- Petri kutularındaki agarların yoğunlaşması için 15 dk bekletildikten sonra petri kutuları ters çevrilerek 37°C'lik inkübatörde 72 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrasında petrilerdeki gözle görülür koloniler sayılmıştır.
- Elde edilecek sonuçların değerlendirilmesi için de kontrol grupları kullanılmıştır. Çözücü kontrol olarak Tween 80, pozitif kontrol olarak; TA98 suşu için 100 µL 4-NPD, TA100 suşu için ise 100 µL SA top agar ve bakteri üzerine eklenmiştir.
- Her test konsantrasyonu üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. (Şekil 3.15)



Şekil 3.15. *Salmonella typhimurium* TA100 suşunun kontrol koloni görünümü.

3.2.4. DNA Koruyucu Aktivite testi

Bu çalışmada, test maddesinin doğrudan DNA hasarını uyarması veya tersine uyarılmış DNA hasarlarına karşı koruma aktivitesini belirlemek için pBR322 plazmid DNA (vivantis) kullanılmıştır. Plazmid DNA, doğrudan mür konsantrasyonlarına veya mür varlığında H₂O₂ ve UV uygulamasına maruz bırakılmıştır. Russo ve arkadaşları (2000) tarafından belirlenen metodu ve laboratuvar koşullarımıza uyacak şekilde modifiye edilerek kullanılmıştır.

- 0.5 X TBE Elektroforez tamponu hazırlanmış (10X TBE 50 mL üzerine 950 mL distile su).
- % 1.25'lik agoroz jel hazırlanmış: 0,8 gr agorozu 100 mL TBE(0.5X TBE) tamponun içine çözüne kadar ısıtılmış ve elle tutulur sıcaklığa gelince bekletilmiş.
- Hazırladığımız agorozu tarakları yerleştirilmiş jel tankına dökerek donmasını bekletilmiş. Donduktan sonra tarakları yavaşça çıkartarak yürütme tankına yerleştirilmiş.
- Elektroforez yürütme tankını 0.5 X TBE tamponu ile doldurulmuş.
- pBR322 plazmid(172 ng/μL) hazırlanmış (34.4 μL pBR322 distile suyla 100'μL'e tamamlanmış).
- Test edilecek örnekleri hazırlanmış (MN testinde kullanılan dozları 0.03125, 0.0625 ve 0.125 μL/mL aynısı kullanılmış, çözücü kontrol Tween 80, Pozitif kontrol ise H₂O₂ ve UV kullanmıştır):

1. Kontrol : DNA(5 μL) + saf su (8 μL)
2. Kontrol : DNA (5 μL) + saf su (8 μL) + UV
3. Kontrol : DNA (5 μL) + saf su (5 μL) + H₂O₂ (3 μL)
4. Kontrol : DNA (5 μL) + saf su (5 μL) + UV + H₂O₂ (3 μL)

5. ÇK(Tw80): DNA (5 µL) + Çk (8 µL)
6. Çk(Tw80): DNA (5 µL) + Çk (8 µL) + UV
7. Çk(Tw80): DNA (5 µL) + Çk (5 µL) + H₂O₂ (3 µL)
8. Çk(Tw80): DNA (5 µL) + Çk (5 µL) + UV + H₂O₂ (3 µL)

9. D(doz1) : DNA (5 µL) +1.doz (5 µL) + saf su (3 µL)
10. D(doz2) : DNA (5 µL) +2.doz (5 µL) + saf su (3 µL)
11. D(doz3) : DNA (5 µL) + 3.doz (5 µL) + saf su(3 µL)

12. D(UV) : DNA (5 µL) +1.doz (5 µL) + saf su (3 µL) + UV
13. D(UV) : DNA (5 µL) +2.doz (5 µL) + saf su (3 µL) + UV
14. D(UV) : DNA (5 µL) + 3.doz (5 µL) + saf su(3 µL) + UV

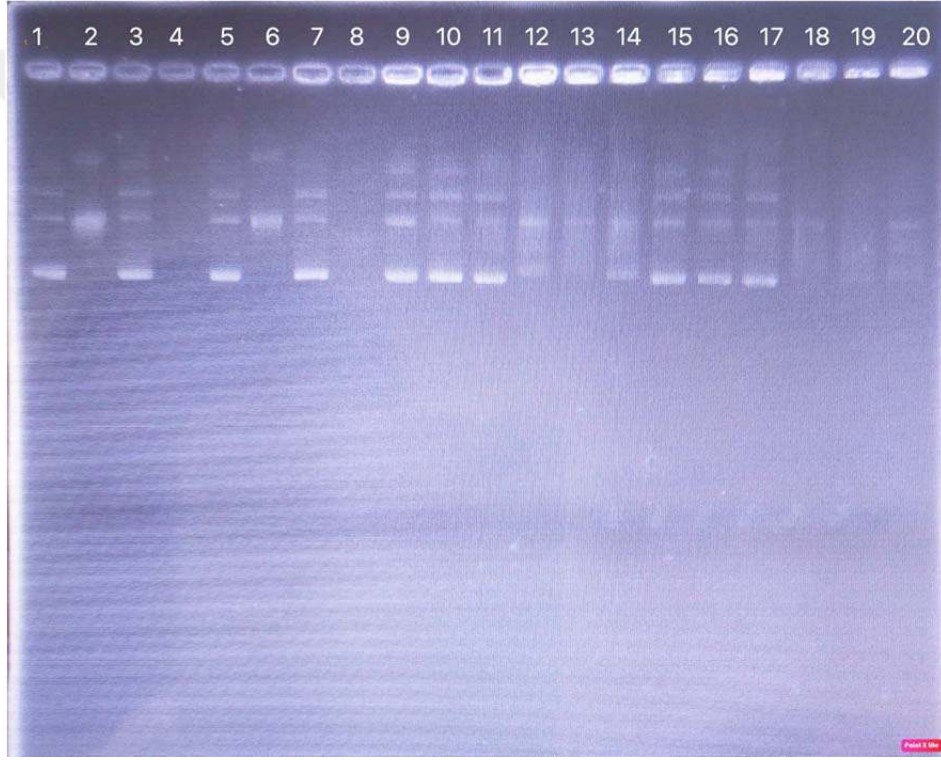
15. D(H₂O₂): DNA (5 µL) +1.doz (5 µL) + H₂O₂ (3 µL)
16. D(H₂O₂): DNA (5 µL) +2.doz (5 µL) + H₂O₂ (3 µL)
17. D(H₂O₂): DNA (5 µL) +3.doz (5 µL) + H₂O₂ (3 µL)

18. D(2Pk) : DNA (5 µL) +1.doz (5 µL) + UV + H₂O₂ (3 µL)
19. D(2Pk) : DNA (5 µL) +2.doz (5 µL) + UV + H₂O₂ (3 µL)
20. D(2Pk) : DNA (5 µL) +3.doz (5 µL) + UV + H₂O₂ (3 µL)

- UV'li olanları bir ultraviyole ışık kaynağı (UV lambası Camag, cıva tüplü 8000 µw'lık 302 nm kısa dalga boyu) altında 5-10 dk. maruz bırakılmıştır.
- Daha sonra örneklerin sırasıyla 3 µL jel loading boyasından alıp örnekler ile karıştırılmış.
- Örnekleri boyandıktan sonra 10 µL çekerek elektroforez tankında bulunan kuyucuklu agaroz jelin kuyucuklarına yüklenmiştir.
- Tankın kapağını kapatarak, 100V'ta 100dk yürütülmüştür (elektrik akımı

uygulandığında moleküller porların içerisinde geçerek hareket etmeye başlarlar).

- Yürütme işlemi bitince geniş kapaklı tankında bulunan Ethidium bromide boyası agaroz jel içine 5-10 dk boyayarak görüntülemiş.
- Fotoğraf makinasın UV ışığını altında jele bakarak fotoğrafını çekilmiş (şekil 3.).



Şekil 3.16. DNA Koruyucu Aktivite görüntüsü

Nükleik asitlerin fosfatlarına bağlı olarak sabit negatif yüklü (katod) olduğu için pozitif (anod) kutba hareket ederler. Moleküllerin elektriksel alan boyunca hareket oranları uygulanan akım şiddetine, moleküllerin büyüklük ve şekline bağlıdır. Burada elde edilen görüntü kontrol guruplarıyla karşılaştırarak değerlendirilmiştir.

3.2.5. Toplam Oksidan (TOS) ve Antioksidan Seviyesi (TAS) Ölçümü

TOS ve TAS ölçümü için 72 saat muamele edilmiş hücre kültürlerinin ilk santrifüjünden sonra alınan ve -80 °C'de saklanan süpernatantlar kullanılmıştır. TOS değerlerinin ölçülmesi, numune içindeki mevcut oksidanların, divalent demiri (ferrous iyon = Fe^{+2}) trivalent demire (ferric iyon = Fe^{+3}) okside etme esasına dayanmaktadır. Ferric iyon asidik bir mediumda kromojenle renkli bir kompleks oluşturur. Örnekte var olan oksitleyici moleküllerin miktarıyla orantılı olan bu renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Test hidrojen peroksit ile kalibre edilmekte olup sonuçlar litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğer (μmol eşdeğeri $\text{H}_2\text{O}_2/\text{L}$) şeklinde ifade edilmektedir (Erel, 2005).

TAS değerlerinin belirlenmesi ise oldukça kararlı bir yapıda ve karakteristik bir renkte olan ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sülfonik asit)) radikal katyonunun antioksidanlar tarafından renginin ağartılması esasına dayanmaktadır. Sonuçlar mmol Trolox eşdeğeri/L olarak ifade edilmektedir (Erel, 2004). Oksidatif stres indeksi (OSI) ise şu şekilde hesaplanmaktadır: $\text{OSI (rastgele ünit)} = \text{TOS } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L}) / \text{TAS } (\mu\text{mol Trolox eşdeğeri/L})$ (Harma ve ark, 2003; Kösecik ve ark, 2005; Yumru ve ark, 2009). TOS ve TAS ölçümleri, ticari faaliyet gösteren Baran Medikal (Ankara) (ISO 14001:2004 Çevre Yönetim Standardı sertifikasına sahip, Sertif. No: T14.001.09) laboratuvarlarına hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Lenfositlerin test maddesi mür yağının belirlenen konsantrasyonlarıyla muamele sonucunda elde edilen; MN, NBI, KOMET ve bir başka test olan Ames testi parametrelerine ait veriler, DNA koruyucu aktivite testi ve TOS/TAS testi sonuçları değerlendirilmiştir. Bunun için her bir muameleli gruptan belirlenen bulgu ortalamaları ile kontrol (muamelesiz, çözücü ve pozitif kontrol) gruplarının ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı IBM SPSS Statistics 23 programı kullanılarak One-Way Anova (ANOVA) Dunnett testi ile kontrol

edilmiştir ($P \leq 0.05$). Konsantrasyon-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapılmış, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir.





4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Bu çalışmada test maddesi olarak *Commiphora myrrha* (Mür)'dan ticari yolla elde edilmiş mür yağı (esansiyel yağ) kullanılmıştır. Bu ajanın genotoksik, sitotoksik ve oksidatif potansiyeli insan periferel kan lenfosit kültürlerinde mikronukleus (MN), komet (kuyruklu yıldız), Ames geri mutasyon (*Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarıyla yapılan) ve plazmid DNA hasar testleri ile ortaya çıkarılmıştır. Test maddesinin sitotoksik/proliferatif etkisi; nukleus bölünme indeksi (NBI) ve bakteri koloni sayı verilerinin kontrollere göre istatistiksel olarak karşılaştırılmasıyla değerlendirilmiştir. Ayrıca kültürdeki hücreler üzerine oksidatif stres indeks verileri total oksidan (TOS) ve total antioksidan statülerinden (TAS) spektrometrik ölçümlerinden saptanmıştır.

4.1.1. *Commiphora myrrha* Uçucu Yağının Mikronukleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

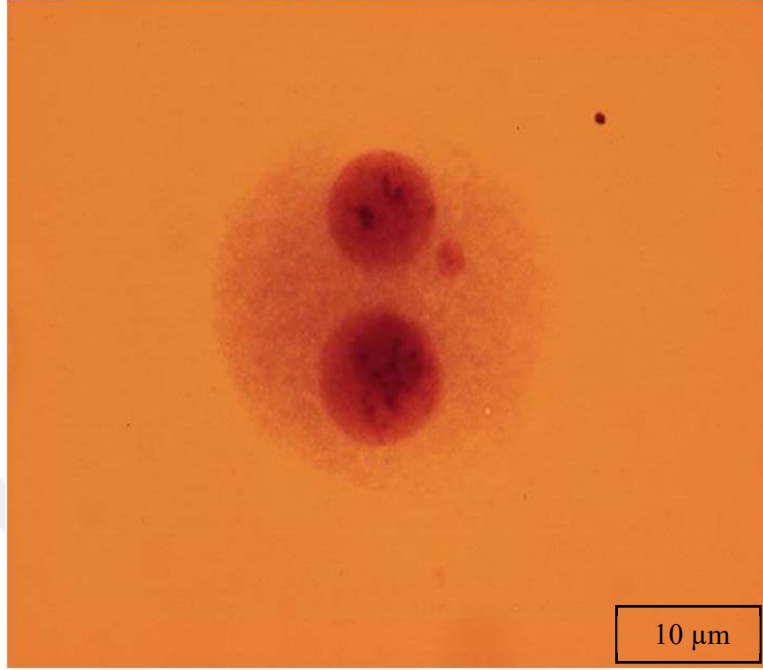
Ticari olarak piyasadan temin edilmiş saf mür yağının emülgatör (Tween 80 = Polisorbat 80) içinde hazırlanmış üç farklı konsantrasyonu (0.03125, 0.0625 ve 0.125 µL/mL) 24 veya 48 saat süre ile muamele edilen insan periferel lenfosit kültüründe saptanan MN oluşumu üzerindeki etkileri Çizelge 4.1.'de toplu olarak gösterilmektedir. Ayrıca test maddesinin binükleer hücrelerde neden olduğu MN oluşumuyla ilgili şekiller (Şekil 4.1 ve 4.2) eklenmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı Konsantrasyonlarda *C. myrrha* uçucu yağı ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde Hücre Başına Düşen Toplam MN %'si, MN İçeren İki Nukleuslu Hücre %'si Nükleer Bölünme İndeksi(NBI) ve Oranları

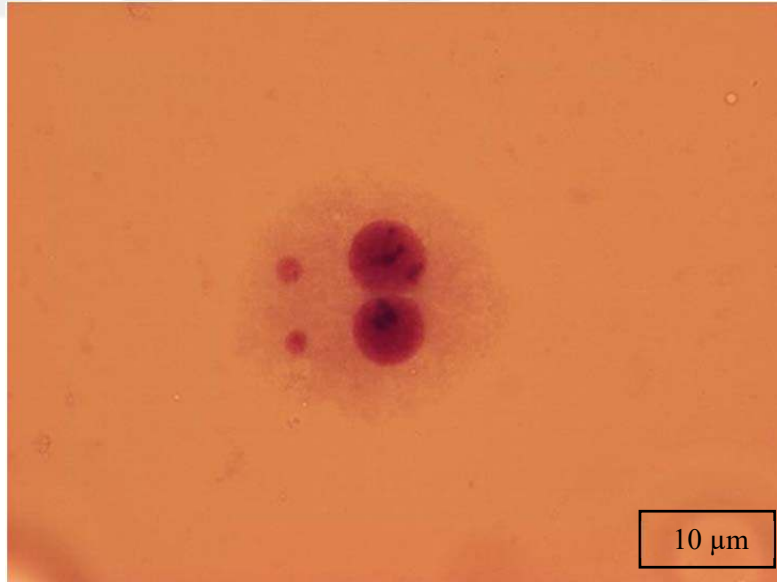
Test Maddesi	Muamele		MN % si	MN içeren iki nukleuslu hücre % si	Nukleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI ± SH
	Süre (saat)	Kons (µL /mL)			1	2	3	4	
KONTROL			0.35±0.028	0.35±0.029	2551	1262	119	68	1.39±0.019
ÇK(Tween8)	24	0.025	0.70±0.040	0.70±0.041	2800	1085	70	45	1.36±0.029
PK(MMC)	24	0.25µg/mL	1.45±0.064	1.28±0.085	3311	685	4	00	1.14±0.039
Mür yağı	24	0.03125	0.43±0.025b ₃ c ₃	0.43±0.025b ₂ c ₃	2766	1152	57	25	1.35±0.010c ₃
		0.0625	0.65±0.028a ₃ c ₃	0.65±0.029 a ₃ c ₃	2967	924	74	35	1.30±0.025c ₃
		0.125	0.78±0.025a ₃ c ₃	0.70±0.071 a ₃ c ₃	3068	881	30	9	1.25±0.022a ₃ b ₂ c ₂
ÇK	48	0.025	0.60±0.040	0.60±0.041	2723	1147	74	56	1.37±0.017
PK	48	0.25µg/mL	1.45±0.108	1.35±0.104	3799	196	3	2	1.07±0.020
Mür yağı	48	0.03125	0.48±0.047 c ₃	0.48±0.043 c ₃	2888	1072	28	12	1.32±0.030c ₃
		0.0625	0.53±0.062 c ₃	0.53±0.063 c ₃	3025	907	44	24	1.34±0.018c ₃
		0.125	0.68±0.025 a ₃ c ₃	0.65±0.050 a ₃ c ₃	3222	759	11	8	1.23±0.007a ₃ b ₃ c ₃

a: Muamelesiz kontrol ile; b: Çözücü Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile; aradaki fark önemlidir.

a₁b₁c₁: P≤0.05; a₂b₂c₂: P≤0.01; a₃b₃c₃: P≤0.001



Şekil 4.1. Bir mikronukleus içeren binükleer hücre (0.0625 µL/mL Mür yağı, 24 saatlik muamele) (x1000)



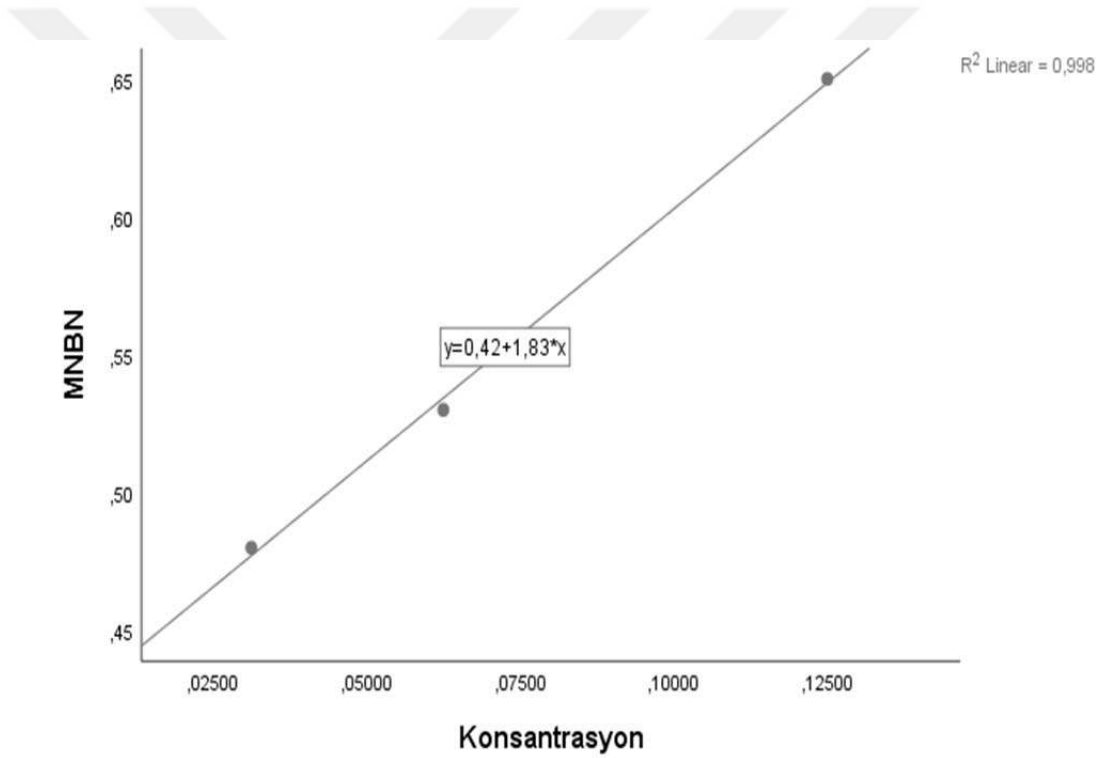
Şekil 4.2. İki mikronukleus içeren binükleer hücre (0.125 µL/mL Mür yağı, 24 saatlik muamele) (x1000)

Mür yağının 24 saatlik muamelesi sonucunda lenfositlerde ortaya çıkan klastojenik veya anöjenik etki ile ilişkilendirilen mikronukleus (MN) oluşumu istatistiksel olarak değerlendirildiğinde en düşük test dozu hariç orta ve yüksek konsantrasyonda (0.0625 ve 0.125 µL/mL) saptanan MN oranlarının muamelesiz kontrole göre önemli düzeyde artmış olduğu gözlenmiştir ($P \leq 0.001$). Ancak bu artış düzeyinin çözücü kontrol olarak kullanılan emülgatör tween 80'nin neden olduğu MN frekansına yakın olduğu dolayısıyla kontrole göre olan anlamlı MN artışlarının tween 80 kaynaklı olabileceği değerlendirilmektedir. Bununla birlikte en yüksek mür yağı konsantrasyonunda saptanan MN yüzdesi, çözücü kontrol tween 80'e göre de bir miktar yüksek olmasına rağmen aralarındaki bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Burada dikkat çeken nokta, en düşük konsantrasyonda ortaya çıkan MN oranının çözücü kontrolün neden olduğu MN frekansından anlamlı seviyede düşük olmasıdır. Özetle en düşük konsantrasyondaki mür yağı uygulaması tween 80'nin neden olduğu MN frekansını anlamlı düzeyde azaltmıştır ($P \leq 0.001$). Çalışmanın MN yönünden 24 saatlik projeksiyonu yapılacak olursa:

- 1- Ortaya çıkan MN oranlarının tamamı pozitif kontrol MMC muamelesinde ortaya çıkan değerden önemli düzeyde daha düşüktür ($P \leq 0.001$) (Çizelge 4.1),
- 2- Kültürdeki hücrelerde ortaya çıkan MN oranları tween 80 değerlerine yakın çıkmıştır,
- 3- MN oranlarının dağılımları ile MN içeren iki nukleuslu hücre oranı bir istisna (en düşük doz) hariç büyük ölçüde birbirleriyle örtüşmektedir.

Mür yağının 48 saatlik muamelesi sonucu ortaya çıkan MN oranları en yüksek konsantrasyon hariç kontrol ve çözücü kontrol düzeyinde bulunmuştur. Bu dozlarda gözlenen varyasyonlar güven aralığı içinde kalmıştır. En yüksek konsantrasyonda (0.125 µL/mL) MN oranında muamelesiz kontrole göre önemli

bir artış (yaklaşık 2 katı) gözlenmiştir ($P \leq 0.001$). Ayrıca bu periyotta test maddesi muamelesi sonucu saptanan MN oranları ile pozitif kontrol saptanan MN oranları arasında çok önemli farklılıklar olduğu gözlenmiştir ($P \leq 0.001$) (Çizelge 4.1). 48-saatlik muamele periyotunda da MN yüzdesi ile mikronukleus içeren binükleer hücre yüzdesi dağılımları büyük ölçüde benzer bulunmuştur. Mikronukleus deneyi bulgularında doğrusal bir konsantrasyon-etki ilişkisi sadece 48 saat test maddesinin uygulandığı kültürlerde belirlenen MN içeren binükleer hücre (MNBN) yüzdesinde anlamlı olduğu ($P \leq 0.05$) saptanmıştır (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda mür yağı ile 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre yüzdesinin (% MNBN) konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.

MN bulgularının 48 saatlik projeksiyonu aşağıdadır:

- 1- Gözlenen MN ve MNBN oranlarının tamamı pozitif kontrol MMC'den önemli düzeyde düşüktür,
- 2- Yine gözlenen MN oranlarının tamamı tween 80 muamelesinde saptanan oran civarındadır,
- 3- Yüksek konsantrasyondaki MN artışı muamelesiz kontrole göre anlamlıdır,
- 4- MNBN oranında doz-etki ilişkisi anlamlı bulunmuştur.

4.1.2. *Commiphora myrrha* Uçucu Yağının DNA Hasarı Oluşumu Üzerine Etkileri (Komet Testi Bulguları)

Mür yağı ile muamele edilen insan periferik lenfosit hücrelerindeki nükleer DNA kırıkları, komet (kuyruklu yıldız) yöntemi ile değerlendirilmiştir. Mür yağının 0.03125, 0.0625 ve 0.125 µL/mL'lik konsantrasyonları ile toplam 1 saat muamele edilen kültürdeki lenfositlerde saptanan hasarlı hücre oranı (% HHO) ve genetik hasar indeksi (GHI) Çizelge 4.2'de görülmektedir. Kuyruklu yıldız görünümüne ait örnekler Şekil 4.4 ve Şekil 4.5 'de verilmiştir.

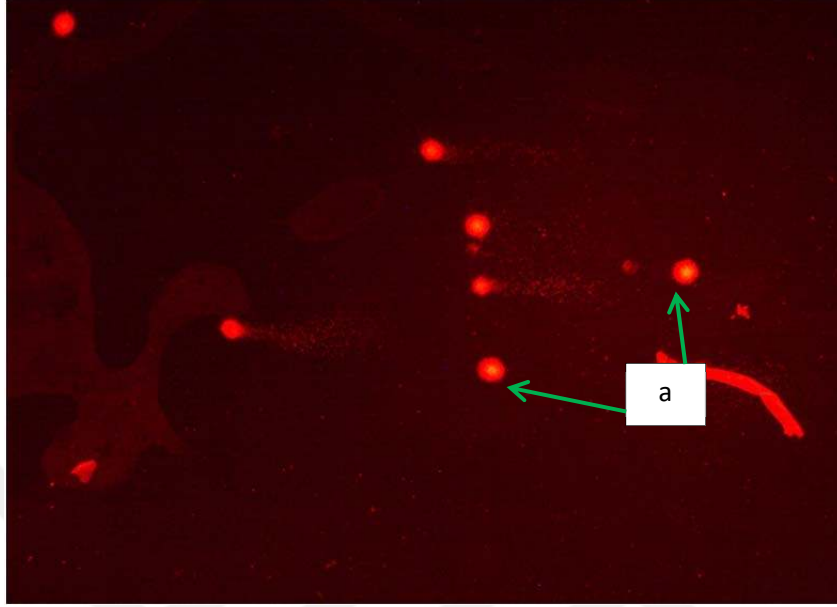
Çizelge 4.2. Üç Farklı Konsantrasyonlarda *Commiphora myrrha* Uçucu Yağı ile 1 Saat Muamele Edilen İnsan Periferik Lenfositlerinde Komet Testi Kapsamında Saptanan DNA Hasar Oranları

Test Maddesi	Muamele			
	Süre (Saat)	Kons. (µL/mL)	Hasarlı Hücre Oranı (%)’si (HHO)	Genetik Hasar İndeksi (GHI)
Kontrol	----	----	14.50 ± 0.50	0.50 ± 0.00
Tween 80 (ÇK)	1	0.1 µl	27.00 ± 6.00	0.95 ± 0.20
H ₂ O ₂ (PK)	1	100 µM	63.00 ± 4.00	2.09 ± 0.09
Mür yağı	1	0.03125	34.00 ± 2.00	1.22 ± 0.03
		0.0625	33.50 ± 11.50	1.09 ± 0.34
		0.125	44.00 ± 6.00 ^{a₂}	1.43 ± 0.19 ^{a₂}

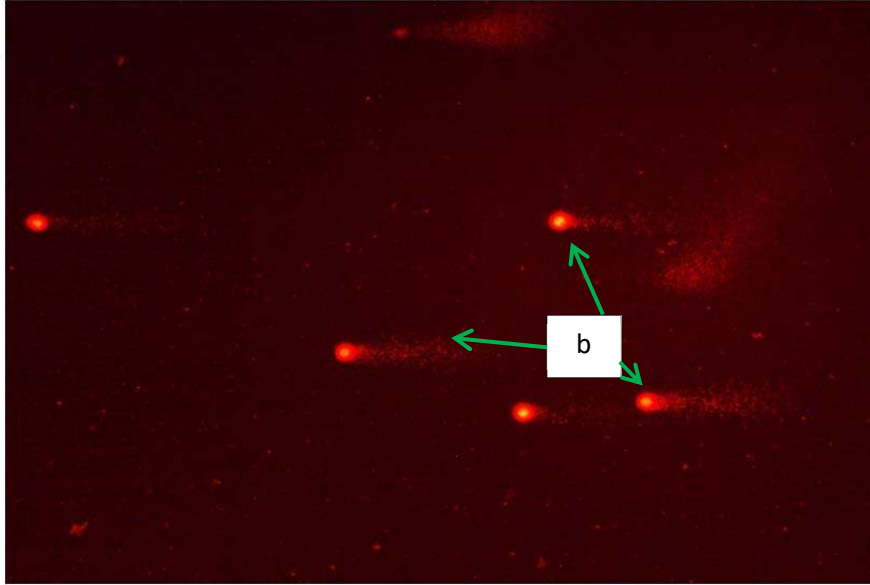
a: Kontrol ile; b: Çözücü kontrol ile; c: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

a₁b₁c₁: P≤0.05 ; a₂b₂c₂: P≤0.01 ; a₃b₃c₃: P≤0.001

Kültürdeki hücrelerin mür yağı ile 1 saatlik muamelesi sonucunda HHO yüzdesi ve GHI değerlerinde minör artışlar gözlenmekle birlikte en yüksek konsantrasyondaki (0.125 µL/mL) saptanan önemli artışların muamelesiz kontrole göre yaklaşık üç katı kadar olduğu anlaşılmıştır (P≤0.01). Fakat mür yağın neden olduğu hasarlı hücre ve genetik hasar indeksi değerlerinin pozitif kontrol olarak kullanılmış hidrojen peroksitin (H₂O₂) indüklediği etkilere göre düşük olmakla birlikte aralarındaki fark anlamlı bulunmamıştır.



Şekil 4.4. Mür yağı 0.0625 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (a= DNA'sı göç etmemiş nükleuslar) X40.



Şekil 4.5. Mür yağı 0.0625 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 'lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (b= DNA'sı göç etmiş nükleuslar) X40.

Bu değerlendirmede de en yüksek konsantrasyon, muamelesiz kontrole göre önemli düzeyde yüksek bulunmuştur ($P \leq 0.01$). Bu veri, MN bulgularının trendiyle benzerlik göstermektedir. Elde edilen HHO ve GHI bulgularında konsantrasyon-etki ilişkisi gözlenmemiştir (Çizelge 4.2).

4.1.3. *Commiphora myrrha* Uçucu Yağının Geri Mutasyon (Ames) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Commiphora myrrha uçucu yağının ortamda herhangi bir metabolik aktivatör olmaksızın *Salmonella typhimurium* mutant (TA98 ve TA100) suşlarını geri mutasyonla (nükleotid değişimi ve çerçeve kayması) prototrof hale dönüştürme potansiyeli, ortaya çıkmış koloni skorları incelenerek belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Farklı Konsantrasyonlarda *C.myrrha* Uçucu Yağı İle Metabolik Aktivasyon Yokluğunda Muamele Edilen *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 Suşlarındaki Revertant Koloni Sayısı Ortalamaları

Test Maddesi	Kons (µL/petri)	TA98	TA100
		RKSAO±SH	
Kontrol		38±18.00	403.3±5.69
ÇK	100 µL	26.6±5.89	404.6±2.90
4-NPD	20 µg/petri	47.3±7.35	--
SA	1 µg/petri	--	549.6±74.35
Mür yağı	0.0625	35.3±19.41	400.6±7.35
	0.125	36±2.64	403.3±22.73
	0.25	35.6±20.86	346.3±22.43 c ₃
	0.50	35±15.69	369.0±30.43
	1	32.6±8.87	304.0±35.34 c ₃

4-NPD: 4-Nitro-o-fenilendamine; SA: Sodyum Azid

a: Kontrol ile; b: Çözücü kontrol ile c: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

a₁b₁c₁: $P \leq 0.05$; a₂b₂c₂: $P \leq 0.01$; a₃b₃c₃: $P \leq 0.001$

RKSAO: Revertant koloni sayısı aritmetik ortalaması

Çizelgede görüldüğü gibi beş farklı konsantrasyonda (0.0625, 0.125, 0.25, 0.50, 1 µL/petri) uygulanan test maddesi (Mür yağı) TA98 suşunda (çerçeve kayması mutanı) geri mutasyon sıklığı ile ilişkili olan koloni sayısında önemli artışa neden olmamıştır. Muamele sonucu ortaya çıkan koloni sayıları ile çözücü kontrol ve pozitif kontrolde gözlenen koloni sayıları arasında istatistiksel olarak önemli farklılık bulunmamıştır ($P \geq 0.05$).

TA100 suşunda (Baz çifti değişim mutanı) ise test edilen konsantrasyonlardan (0.0625, 0.125, 0.25, 0.50, 1 µL/petri) en düşük ikisi (0.0625 ve 0.125 µL/petri) hariç diğer muamelelerde gözlenen koloni sayıları bütün kontrollere kıyasla azalmıştır. Özellikle 0.25 ve 1 µL/petri konsantrasyondaki koloni azalması pozitif kontrole göre anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0.001$). Diğer muamelelerdeki saptanan koloni sayısı azalmaları herhangi bir kontrole göre önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.2). Her ne kadar anlamlı olmasa da özellikle yüksek konsantrasyonlarda sayılan koloni sayısının muamelesiz kontrol ve çözücü kontrol koloni sayısından daha düşük olması mür yağının sitotoksik etkisini akla getirmektedir.

4.1.4. *Commiphora myrrha* uçucu yağının Plazmid DNA Oksidatif Hasarı Üzerindeki Etkileri

Mür yağı ile doğrudan muamele edilen pBR322 plazmid DNA'da ortaya çıkan hasarlar ya da tersine oksitleyici radikal ajanların (H_2O_2 ve UV) plazmid DNA'da neden olacağı hasarlara karşı mür yağının koruyucu etkisi araştırmak için agaroz jel yöntemi kullanılmıştır. Deneyin muamele tarzı Çizelge 4.4'te görülmektedir. Mür yağının MN ve komet deneylerinde kullanılan konsantrasyonları (0.03125, 0.0625 ve 0.125 µL/mL) ile plazmid DNA toplam 10 dk. muamele edildikten sonra 100 dk/ 100 V süre ve voltajda elektroforezde yürütülen pBR322 plazmid DNA saptanan bant desenleri Şekil 4.6'de verilmiştir.

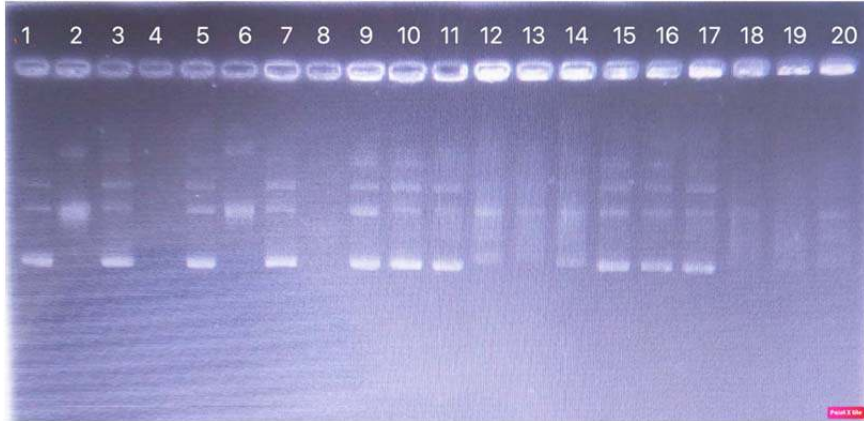
Agaroz jel görüntüsü Şekil 4.6'de incelendiğinde tek başına mür yağın konsantrasyonları (9, 10 ve 11 kuyu) ile kontrol (1 kuyu) karşılaştırıldığında test

maddesinin hiçbir konsantrasyonu pBR322 DNA'sına zarar verdiği gözlenmemiştir. Sadece mür yağı + H₂O₂ + UV (18, 19 ve 20 kuyu) ile H₂O₂ + UV (4 kuyu) karşılaştırıldığında test maddesinin neden olduğu silik bant kalıntıları düşük bir antiradikal etkiyi düşündürmektedir.

Sonuçlar topluca özetlenecek olursa test maddesinin tek başına Plazmid DNA'ya zarar vermediği, ancak pozitif kontrol olarak kullanılmış H₂O₂ + UV'nin etkisine karşı plazmid DNA'yı düşük düzeyde koruduğu elektroforez bant profillerinde gözlenmiştir.

Çizelge 4.4. *Commiphora myrrha* uçucu yağının DNA Koruyucu Aktivite Testinde Kullanılan Doz ve Süreleri

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Treatment	kont	Pk2	Pk3	Pk4	Çk	Çk Pk2	Çk Pk3	Çk Pk4	Doz 1.	Doz 2.	Doz 3.	Pk Doz1	Pk Doz2	Pk Doz3	Pk Doz1	Pk Doz2	Pk Doz3	Pk Doz1	Pk Doz2	Pk Doz3
pBR DNA322	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Mür yağı (µL)	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Tween 80 (µL)	0	0	0	0	8	8	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H ₂ O ₂ (µL)	0	0	3	3	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3
UV (dk)	0	10	0	10	0	10	0	10	0	0	0	10	10	10	0	0	0	10	10	10
SU (µL)	8	8	5	5	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0
Toplam	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13



Şekil 4.6. H₂O₂ ve UV yokluğunda ve varlığında, mür yağı ile muamele edilmiş pBR322 DNA agaroz jel elektroforezi DNA bant paternleri.

4.1.5. *Commiphora myrrha* Uçucu Yağının Sitotoksik Etkileri**4.1.5.1 Nukleus Bölünme İndeks (NBI) Verileri**

Kültüre alınmış insan periferik lenfositlerinin mür yağı ile 24 saat muamelesinde sadece en yüksek konsantrasyon (0.125 µL/mL), nukleus bölünme indeksini (NBI) muamelesiz kontrol ($P \leq 0.001$) ve çözücü kontrole göre önemli düzeyde azaltmıştır ($P \leq 0.01$). Ayrıca 24 saatlik muamele saptanan bütün NBI değerleri pozitif kontrole göre önemli düzeyde yüksektir ($P \leq 0.01$). Mür yağının 48 saatlik uygulamasında saptanan NBI değerleri 24 saatlik periyotta saptanan değerlere çok benzemekle beraber önem düzeylerinde küçük dalgalanmalar gözlenmiştir. Özetle 48 saatlik muamele sonucunda da sadece en yüksek konsantrasyon önemli NBI azalmalarına neden olmuştur ($P \leq 0.001$) (Çizelge 4.1). Verilerde konsantrasyon-etki ilişkisi saptanmamıştır. Ayrıca her iki muamele periyotunda mür en yüksek konsantrasyon dahil pozitif kontrol kadar sitotoksik etki göstermemiştir.

4.1.5.2 Bakteri Koloni Sayısı Verileri

Mür yağı uygulanmış *S.typhimurium* TA98 suşunda koloni sayısı en yüksek dozda muamelesiz kontrole göre önemli olmayan seviyede azalmakla birlikte bu değerler çözücü kontrolde sayılan koloni sayısından daha fazladır. Ancak bu suş ile yapılan çalışmada istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır. Öte yandan TA100 suşu ile yapılan çalışmada yüksek mür yağı konsantrasyonlarının uygulandığı kültürlerde belirgin koloni sayısı azalması gözlenmiştir. Bunlardan ikisindeki (0.25 ve 1 µL/petri) sitotoksik etkiden kaynaklanan koloni sayısı, pozitif kontrolde saptanandan bile daha düşük bulunmuştur ($P \leq 0.001$) (Çizelge 4.3).

4.1.5.3 *Commiphora myrrha* Uçucu Yağının Oksidatif Stres Verileri

Commiphora myrrha uçucu yağın 0.03125, 0.0625 ve 0.125µ/mL konsantrasyonları ile 24 veya 48 saat muamele edilen kan kültür ortamının toplam

oksidan (TOS) ve toplam antioksidan seviye (TAS) değerleri ölçülerek oksidatif stres indeksleri (OSI) hesaplanmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. *Commiphora myrrha* uçucu yağın İnsan Periferik Lenfosit Kültüründe Oluşturduğu Toplam Oksidan Seviye (TOS), Toplam Antioksidan Seviye (TAS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Değerleri

Test Maddesi	Muamele		TOS ± SH	TAS± SH	OSI ± SH
	Süre (saat)	Kons (µL/mL)			
Kontrol	-	-	2.62±0.57	1.73±0.25	1.53±0.23
Tween80(ÇK)	24	0.025	3.07±0.74	1.81±0.21	1.72±0.36
MMC (PK)	24	0.25µg/mL	2.89±0.20	1.81±0.16	1.61±0.10
Mür yağı	24	0.03125	2.25±0.39	1.90±0.08	1.16±0.15
		0.0625	2.25±0.34	2.22±0.10	1.14±0.12
		0.125	3.56±0.30	1.97±0.09	1.83±0.20
Tween80(ÇK)	48	0.025	3.89±1.21	1.75±0.18	2.16±0.48
MMC (PK)	48	0.25µg/mL	2.77±0.52	1.82±0.07	1.50±0.26
Mür yağı	48	0.03125	3.22±0.59	1.89±0.14	1.71±0.34
		0.0625	3.96±0.54	1.84±0.16	2.25±0.44
		0.125	3.56±0.87	2.04±0.07	1.78±0.49

a: Kontrol ile; b: Çözücü kontrol ile; c: Pozitif kontrol ile aradaki fark önemlidir.

a₁b₁c₁: P≤0.05 ; a₂b₂c₂: P≤0.01 ; a₃b₃c₃: P≤0.001

Uygulanan spektrofotometrik ölçümlerde toplam oksidan (TOS) değerleri hem 24 saat, hem de 48 saat muamele süresinde kontrollerle karşılaştırıldığında konsantrasyonların tamamı kontroller düzeyinde bulunmuştur. Muamelelerin bir kısmında küçük çapta dalgalanmalar olmakla beraber bunların tamamı güven aralığında olduklarından istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Toplam antioksidan değerleri (TAS) bakımından hücrelerin mür yağı ile muamelesi sonucunda test edilen konsantrasyonların (0.03125, 0.0625 ve 0.125µ/mL) tamamında hem 24 hem de 48 saat periyodunda kısmi artışlar göstermekle birlikte anlamlı bulunmamıştır ve veriler kontroller düzeyde kalmıştır.

Oksidatif stres indeksi (OSI) yönünden yapılan hesaplamalarda test maddesi 24 saatlik muamelede en yüksek konsantrasyon (0.125 µL/mL) hariç diğer konsantrasyonlarda kontrollerin tamamına göre anlamlı olmayan düşüş gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca *Commiphora myrrha* uçucu yağın 48 saatlik muamelesinde bütün konsantrasyonlarda ortaya çıkan OSI değerleri yönünden 0.0625 µL/mL muamelede saptanan belirgin yükselme dâhil tamamı kontroller düzeyinde bulunmuştur ($P>0.05$) (Çizelge 4.5).

Özetle TOS, TAS ve OSI değerleri bakımından mür yağının hücreler üzerine önemli bir oksidatif etkisi saptanmamıştır. Ayrıca doz-etki ve zamana bağlı etki ilişkisi gözlenmemiştir.

4.2. Tartışma

4.2.1 *Commiphora myrrha* (Mür) Yağının Klastojenik ve Anöjenik Etkileri

Bu çalışmada test maddesinin (mür yağı) klastojenik ve/veya anöjenik etkisinden kaynaklandığı bilinen mikronukleus (MN) oluşumları incelendiğinde mür yağı konsantrasyonu artışıyla doğrusal ilişki temelinde MN sayısında artışlar saptanmıştır. Ancak bu artışlardan 24 saat en düşük doz hariç diğer konsantrasyon verileri çözücü kontrol (emülgatör, tween 80) verilerine yakın bulunmuştur. Bir bütün olarak çalışmada test edilen mür yağı konsantrasyonlarının uyardığı MN oluşumlarının oranı negatif kontrolden yüksek ve bir kısmı anlamlı ancak verilerin tamamı pozitif kontrolden (mitomycin C) istatistiksel olarak önemli düzeyde düşük bulunmuştur. Bu sonuca göre, MN oluşturma aktivitesi yönünden mür yağı, mitomycin C (MMC) kadar etki göstermemiştir.

Yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkan ve muamelesiz kontrole göre anlamlı düzeyde yüksek olan MN oluşumları muhtemelen mür yağı ve emülsifiye

edici (emülgatör) olarak kullanılan tween 80 (polisorbat 80) bileşiklerinin kümülatif etkisiyle olabileceği değerlendirilmektedir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkan anlamlı MN artışının düşük konsantrasyonda bulunmamış olması düşük dozdaki mür yağının hücredeki MN oluşumuna karşı koruyucu etki göstermesiyle ilgili olabilir. Benzer şekilde çalışmada yapılan komet testi sonuçlarında mür yağının yüksek konsantrasyonda genetik hasar indeksi ve hasarlı hücre oranlarını yükseltmesi MN bulgularıyla belli ölçülerde tutarlılık göstermektedir. Öte yandan bazı ilaçlarda eksipiyen (ilaç katkı maddesi) olarak kullanılan tween 80 için üretici firma (Merck) tarafından hazırlanan güvenlik bilgi formunda *Salmonella typhimurium* ile yapılan Ames testinde negatif, memeli hücre kromozom anormalliği testinde pozitif, yine memeli hücre mutajenite testinde ise negatif etki gösterdiği belirtilmiştir (Tween® 80 (Polysorbate) SDS). Bizim çalışma bulgularında ortaya çıkan artmış MN verileri, tween 80 üreten firmanın güvenlik bilgi formunda belirtilen kromozom anormalliği verisiyle benzerlik göstermektedir. Ancak Ulusal Toksikoloji Programı (NTP, 1992) kapsamında daha önce yapılmış bir çalışmada polisorbat 80'in ekzojen metabolik aktivatör (S9) varlığında veya yokluğunda *Salmonella typhimurium* bazı suşlarında (TA100, TA1535, TA1537 ve TA98) mutajenik olmadığı belirtilmiştir. Aynı şekilde Avrupa Komisyonu tarafından yapılan bir çalışmada (European Commission, 1995) polisorbat 80'nin ekzojen metabolik aktivasyona bağlı olmaksızın bakterial gen mutasyon testinde dört bakteri suşunda mutajenik olmadığı ifade edilmiştir. Aynı raporda kültüre alınmış memeli hücrelerinde kromozom aberasyonu, kardeş kromatid değişimi ve ilaveten kemirgen kemik iliği hücrelerinde kromozom aberasyonu ve mikronukleus testlerinde herhangi bir etki göstermediği ifade edilmiştir. Son çalışmadaki sonuçlarla bizim tween 80 bulguları arasında var olan kısmi uyumsuzluk, uygulanan metot ve/veya konsantrasyon farklarından kaynaklanmış olabilir. Emülgatör olarak kullanılan polisorbatın yukarıda anılan etkilerini rezervde tutarak bu çalışmanın ana aktörü ve test maddesi olan mür yağının genotoksik sitotoksik etkilerine odaklanıldığında tek başına mür yağı ve bu

yağın bileşenleri ile yapılan çalışmalar ortaya çıkmaktadır. Bir kısmı mür yağı içinde de yer alan seskiterpenlerden furanodesma-1.3-dien, curzarene, furanodien, furanodien-6-one ve metitoksifuranoguaia-9-ene-8-on'un bileşiklerinin antibakteriyel, antifungal vd. etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (EMA 2011). Ayrıca Zhu ve ark. (2001)'nin *Commiphora myrrha*'nın zamk salgısından izole ettikleri altı seskiterpenoidin spektroskopik veri analizleri sonucunda bunlardan ikisini yeni furanoseskuiterpenoidler oldukları belirlenmiştir. Aynı araştırmacılar bileşik 1 olarak kodlanan izolatin MCF-7 meme tümör hücre hattına karşı zayıf sitotoksik aktivite sergilediğini ve diğer beş bileşenin ise etkisiz olduğunu rapor etmişlerdir. Farklı bir çalışmada Swiss albino farelerine yapılan *Commiphora molmol* muamelesinin femoral hücrelerde herhangi bir önemli mutajenik etki göstermediği ancak anlamlı ve doza bağımlı bir mitodepressant etkiye ve hepatik hücrelerde RNA seviyelerinin azalmasına neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca *C. molmol* ile yapılan ön muamelenin, bir mutajen olan siklofosfamidin hücreler üzerine olan biyokimyasal ve sitolojik etkileri değiştirmedeği saptanmıştır (Al-Harbi ve ark. 1994). Mür özünden oluşan ve güvenli bir anti-şistozomal ilaç olarak kabul edilen mirazid, kontrol grubuna kıyasla kromozomal anormalliklerin insidansında anlamlı olmayan bir artışa neden olmaktadır (Omar 2005). Özetle bizim çalışmamızda mikronukleus ve komet testinde yüksek test maddesi dozlarında muamelesiz kontrole göre saptanan anlamlı artışların emülgatör kaynaklı olabileceği üzerinde durulmaktadır. İlaveten mür yağı plazmid DNA iplik kırıklarını da uyarmamıştır. Bu durum, mür yağı veya bileşenleri ile yapılan az sayıda genotoksisite çalışmalarının sonuçlarına göre büyük ölçüde benzerlik göstermektedir.

4.2.2 *Commiphora myrrha* (Mür) Yağının Gen Mutasyonu Oluşumu Üzerine Etkileri

Çalışmamızdaki Ames testi sonuçları test maddesi *Salmonella typhimurium*'un mutant suşlarında (TA 98 ve TA 100) belirgin bir mutajenik etki

göstermemiştir. Bu sonuçlara göre mür yağı ve homojenizatör olarak kullanılan tween 80'in test edilen konsantrasyonları anılan suşlarda çerçeve kayması ve baz değişimi mutasyonlarına yol açmamıştır. Benzer şekilde buhur ve mür reçinesi gibi bitki esansiyel yağlarından türetilen terpenlerin metabolik aktivatörlü ve aktivatörsüz şartlarda *Salmonella typhimurium* üzerinde mutajenik aktivitesinin olmadığı belirtilmiştir (Lupi ve ark. 2009). Bu çalışmanın sonuçları ve tarafımızca yapılan Ames testi bulguları MN, komet ve plazmid DNA hasar testi sonuçlarıyla korelasyon göstermektedir.

4.2.3 *Commiphora myrrha* (Mür) Yağının Oksidatif Potansiyeli

Çalışmamızda kullanılan kültürdeki hücrelerde mür yağı herhangi bir oksidatif stres parametresini (TOS ve TAS), dolayısıyla oksidatif stres indeksini uyarmamıştır. Benzer şekilde mür yağı, hidrojen peroksit ve UV'nin plazmid DNA'da neden olduğu kırıklara karşı anti-radikal etki göstermemiştir. Bizim bulgularımızdan farklı olarak Swiss albino erkek farelerinde kurşun asetatlı diyetin neden olduğu GSH, GST azalması, lipid peroksidasyonu uyarımı ve kemik iliği kromozomlarındaki genotoksik etkisi üzerine %1'lik mür yağının koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada mür GST'de önemli artışa, lipid peroksidasyonunda pozitif kontrole göre önemli azalmaya (%45) neden olmuştur. Ayrıca mür kurşun uygulamasının neden olduğu genotoksisiteyi önemli ölçüde azaltmıştır (El-Ashmawy, 2006). Farklı bir çalışmada *Commiphora molmol* emülsiyonunun güçlü bir antioksidan olduğu ve tavşanlarda lipid peroksidasyonunu azalttığı ve de antioksidasyon mekanizması ile bağışıklık savunma sistemini uyararak kurşun asetat kaynaklı hepatik oksidatif hasara ve immünotoksisiteye karşı koruma sağlayabileceği açıklanmıştır (Ashry ve ark 2010). Bizim bulgularımız ile yapılan farklı birkaç çalışmanın sonuçları arasındaki farklılık testlerin *in vivo* ya da *in vitro* ortamlarda yapılmış olmasından kaynaklanmış olması büyük bir olasılıktır. Farklı bir ifadeyle bizim deneylerimiz *in vitro* ortamlarda doğrudan gerçekleştirildiği için organizmada var olan homeostatik müdahalelere yani büyük ölçekte etki-tepki

reaksiyonlarına maruz kalmamış olması çalışmalar arasındaki farklılığın nedeni olabilir.

4.2.4 *Commiphora myrrha* (Mür) Yağının Hücre Bölünmesi Üzerine Olan Etkileri

Çalışmamızda incelenen nükleus bölünme indeksi (NBI) ve bakteri koloni sayıları temel alındığında uygulanan en yüksek dozdaki mür yağının NBI değerini kontrole göre anlamlı şekilde azalttığı saptanmıştır. Ancak çözücü kontrol bulgularıyla karşılaştırıldığında 24 saatlik uygulamada NBI önemli düzeyde azalırken 48 saatlik uygulamada nükleus bölünme indeksi artmıştır. Bu sonuca göre zamana bağlı sitotoksik etki azalmıştır. Öte yandan bakteri koloni sayısında belirlenen ancak önemli olmayan azalmalar mür yağının hafif sitotoksik etkisini düşündürmektedir. Mür yağının sitotoksik etkisini araştıran çalışmalardan birisinde *Commiphora molmol* reçinesinin çeşitli konsantrasyonlarının Ehrlich katı tümörü taşıyan farelerin tümör hücrelerinde sitotoksik etkili ve bu anti-tümör potansiyeli standart sitotoksik ilaç siklofosamid ile karşılaştırılabilir ölçüde olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada önemli olan diğer bir bulgu; sitotoksik etkinin ortaya çıkmasında kısa süreli (25 günlük) muamelenin uzun süreli (50 günlük) muameleye kıyasla daha etkili olduğu yönündedir (Al-Harbi ve ark. 1994). Çalışmanın sonucu bu yönden bizim NBI bulgularındaki zamana bağlı değişimlerle benzer bir örüntü sergilemektedir. Yine *Commiphora molmol*'un klastojenik etki göstermediği bununla birlikte normal farelerde yüksek sitotoksik etkili olduğu bulunmuştur. Ayrıca ehrlich asit karsinom hücresi taşıyan farelerde elde edilen sonuçlar standart sitotoksik ilaç siklofosamidinkine eşdeğer olduğu bulunmuştur (Qureshi ve ark. 1993). Mür yağının sitoprotektif (Bazı hücreleri bazı kimyasalların etkisine karşı koruyan) etkisine örnek olarak yapılan bir çalışmada, farelere oral yoldan çeşitli konsantrasyonlarda mür verilmesinin çeşitli nekrotizan ajanların ülserojenik etkilerine karşı mide mukozasına önemli ve doza bağlı bir koruma sağladığı belirtilmiştir (Al-Harbi ve ark. 1997). Mür reçinesinin toksik etkisiyle ilgili yapılan

çalışmada farklı konsantrasyonlarda mür reçinesi verilmiş 6 aylık erkek oğlaklar, en düşük doz (0.25g/kg) alanlar hariç, 5-16. günler arasında ölmüşlerdir. Bulgulardaki gözlenen enterohepatonefrotoksisiteye; anemi, lökopeni, serum alkalen fosfataz aktivitesindeki artışlar ve bilirubin, kolesterol, trigliseritler ve kreatinin konsantrasyonları eşlik etmiş olup toplam protein ve albümin miktarı azalmıştır (Omer ve Adam 1999). Fareler üzerinde *Commiphora molmol*'un oleo-sakız-reçinesi ile akut ve kronik oral toksisitenin araştırıldığı çalışmada akut veya kronik muamelenin mortalite açısından kontrollere göre anlamlı bir farklılık göstermediği bulunmuştur. Ayrıca *C. molmol* ile muamele edilen grupta herhangi bir spermatotoksik etki görülmemiş aksine testislerin, kaudae epididimisinin ve seminal veziküllerin ağırlığında belirgin bir artış saptanmıştır. Hematolojik çalışmalar, kontrol grubuna kıyasla RBC ve hemoglobin düzeylerinde anlamlı bir artış olduğunu ortaya koymuştur (Rao ve ark. 2001). Mür özütünün kanser ve normal hücre hatlarında gösterdiği inhibitör konsantrasyonların (IC_{50}) araştırıldığı bir çalışmada, insan kanser hücre hatlarındaki özütün IC_{50} değerinin farklı hücre hatlarında değişmekle birlikte 208-419 $\mu\text{g/mL}$ aralığında olduğu ancak sağlıklı meme epiteli hücre hattında ise mür özütünün etkisiz olduğu bildirilmiştir (Shoemaker ve ark. 2005). Ayrıca murin nöroblastom hücre hattında mür yağının hücre canlılığı üzerindeki LC_{50} değerinin 0.158 mg / mL olduğu rapor edilmiştir (Mazzio ve Soliman 2009). *Commiphora molmol*'un ticari özütü olan Mirazid (MRZ)'nin düzenli in vivo muamelesinin Ehrlich asit karsinoma (EAC) hücrelerine karşı anti-tümör aktivitesine sahip olmadığı ve tek başına veya cisplatin ya da 5-Fluorourasil ile birlikte yapılan MRZ muamelesinin hematolojik profili değiştirmedeği ifade edilmiştir (El-Naggar 2011). Mür bileşenlerinden olan sesquiterpenoidlerden ikisinin (ST1 ve ST2) insan prostat kanseri hücre (LNCaP ve PC3) hatlarında androjen reseptör sinyallemesini inhibe ederek antiproliferatif etki gösterdiği belirtilmiştir (Wang ve ark 2011). Yine mür su özütünün insan dermal fibroblast hücrelerinde proliferasyonu bariz şekilde uyarak hücre döngüsünü hızlandırdığı ve fibroblastlardaki yara iyileşmesiyle ilgili olan tip III kollojen

mRNA ifadesini yukarı yönlü uyardığı bildirilmiştir (Bai ve ark. 2012). Hepatokarsinogenik sıçanlarda mürün biyokimyasal parametreleri iyileştirmediği veya hepatokarsinogenezi geciktirmediği rapor edilmiştir (El-Shahat ve ark. 2012). Farklı bir çalışmada mür yağının kendisinin, etanol özütlerinden daha yüksek bir antifungal aktivite sergilediği saptanmıştır (Mahboubi ve Kashani 2016). *Commiphora myrrha* esansiyel yağı ile yapılan in vitro antimikrobiyal analizler sonucunda esansiyel yağın sıvı ve buhar fazları ve tütsü dumanının bakteriyel ve fungal duyarlılık artışı sağladığı saptanmıştır. Ayrıca esansiyel yağda yüksek oranda yer alan bileşikler furanoeudesma-1,3-diene (% 17.65) içeriği, ardından curzerene (% 12.97), p-elemen (% 12.70) ve germacren B (% 12.15) olarak karakterize edilmiştir. (Ljaljević Grbić ve ark 2018). Bu başlık altındaki çalışmaların sonuçlarına göre; mür yağının kendisinin veya bileşenlerinin genel anlamda kanser hücreleri için sitotoksik etkili olduğu, birkaç çalışmada sitotoksisite yönünden etkisiz olduğu, az sayıda çalışmada proliferatif etki gösterdiği ve bir çalışmada ise normal hücreler için sitotoksik etkili olduğu açıklanmıştır. Yine bir çalışmada sonuçların akut ve kronik muameleler açısından farklılık gösterdiği ifade edilmişken başka bir çalışmada bu ikisi arasında anlamlı farklılık bulunmadığı belirtilmiştir.

Mür yağı ve bileşenleriyle az sayıda sitogenotoksisite ve mutajenite çalışmaları yapılmıştır. Bunların büyük çoğunluğu in vivo çalışmalardır. Az sayıda yapılmış in vitro çalışmaların neredeyse tamamında kanser hücre hattı kullanılmıştır. Çalışmamızın özgün tarafı mür yağının in vitro şartlarda, sağlıklı hücrelere akut muamele yoluyla uygulanmasıdır. Kendi çalışmamızın bulgularından ve daha önce yapılmış çalışmaların sonuçlara göre mür yağının genotoksik veya mutajenik olmadığı genellemesi yapılabilir. Ancak ajanın sitotoksik ve oksidatif etkisiyle ilgili daha önce yapılmış çalışmaların büyük çoğunluğunda mür yağının sitotoksik ve antioksidan niteliğiyle ilgili ifadeler yer verilmiş olsa da bizim bulgularımızda dikkat çeken anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Özetle bu çalışmada *Commiphora myrrha* esansiyel yağının (mür yağı) kültüre alınmış insan periferel lenfositlerinde genotoksik, mutajenik ve sitotoksik etkisi saptanmamıştır. Ayrıca oksidatif stresle ilgili parametrelerde önemli değişikliklere neden olmamıştır. Daha önce az sayıda benzer çalışmaların yapılması bu çalışmanın önemini artırmaktadır. Mür yağı veya bileşenleriyle farklı hücre tiplerinde ve farklı metotlarla tarafsız laboratuvarlarca yapılacak özgün araştırmalar ajanın canlı sistem üzerindeki etkinliğinin netleştirilmesine önemli katkılar verecektir.





5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu çalışmadaki test maddesi *Commiphora myrrha* esansiyel yağının klastojenik, anöjenik ve sitotoksik etkilerini saptamak için insan periferik kan lenfositleriyle *in vitro* şartlarda yapılan mikronukleus testinde doz artışıyla artan ve minör bir kısmı önemli olan MN oluşumunu uyardığı saptanmıştır. Ancak test maddesi uygulamasında saptanan anlamlı MN artışları muamelesiz kontrole göre olup tween 80 ile arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. *Commiphora myrrha* esansiyel yağının sitotoksik potansiyeli ile ilgili veri nükleus bölünme indeksi ile değerlendirilerek muamelesiz kontrole göre hafif düşüş göstermekle birlikte sadece en yüksek derişimde istatistiksel önem saptanmıştır.

Test maddesinin geri mutasyon oluşturma potansiyelini ortaya çıkarmak için gerçekleştirilen Ames Salmonella/mikrozom testi bulgularına göre TA 98 suşuna uygulanan tüm derişimlerde geri mutasyona bağlı ortaya çıkan koloni sayısı ile pozitif kontrolde ortaya çıkan koloni sayısı arasında istatistiksel olarak önemli olmayan farklılık gözlenmiştir. Ancak TA 100 suşunda ise muhtemelen test maddesinin sitotoksik etkisinden kaynaklanmış koloni azalması ortaya çıkmıştır. Belirlenen koloni sayıları bütün kontrollere kıyasla düşük olmasına rağmen sadece iki dozdaki koloni azalması pozitif kontrole göre anlamlı seviyede düşük bulunmuştur. Bu testte *Commiphora myrrha* esansiyel yağının olasılıkla mutajenik etki göstermemekle birlikte önemli olmasa bile hafif bir sitotoksik etkisine dikkat çekilebilir.

DNA hasarının saptanması için yapılan kuyruklu yıldız testi (komet) sonuçları, kullanılan test maddesi tüm konsantrasyonlarda hasarlı hücre yüzdesi ve genetik hasar indeksi değerlerini artırmış olduğunu bize göstermiştir. Ancak yalnızca en yüksek konsantrasyondaki artış muamelesiz kontrole göre anlam bulunmuşken diğerlerinde saptanan artışlarda istatistiksel olarak önem bulunmamıştır.

Commiphora myrrha esansiyel yağının plazmid DNA (pBR322) üzerine olan hasar verici etkisi ya da tersine bilinen oksitleyici radikal ajanların (H_2O_2 ve UV) neden olacağı etkilere karşı DNA koruyucu etkisini araştırmak için yapılan agaroz jel elektroforez yöntemi sonuçlarına göre test maddesinin DNA’da herhangi bir hasara yol açmadığı gibi H_2O_2 ve UV’nin neden olduğu DNA hasarlarına karşı önemli koruma sağlamadığı saptanmıştır. Ayrıca test maddesinin kan kültürüne uygulanan tüm konsantrasyonlarında kültürün hücresiz sıvı fazında toplam oksidan (TOS), toplam antioksidan (TAS) ve oksidatif stres indeksleri (OSI) değerleri kontrole ile kıyaslandığında istatistiksel önemli olmayan bir takım artışlar bulunmuştur.

5.2. Öneriler

Kadim medeniyetlerde özellikle Afrika toplumlarında birçok rahatsızlıkların tedavisinde oral ve topikal olarak sıklıkla *Commiphora sp.* ürünleri kullanılmaktadır. Dolayısıyla bu ürünlerin genotoksik ve sitotoksik etkilerinin ortaya çıkarılması oldukça önemlidir. Sağlıklı insan lenfositleri ve mutant bakteri suşlarının kullanıldığı sınırları daraltılmış bu çalışmada *Commiphora myrrha* uçucu yağının bariz bir genotoksik etkiye sahip olmadığı ancak yüksek konsantrasyonda sitotoksik etkinin ortaya çıktığı saptanmıştır. Mür yağının antik çağdan günümüze gelen kullanım alışkanlıklarının sonuçlarıyla bizim sonuçlarımız arasında ilginç bir korelasyon mevcuttur. Çünkü mür bizim çalışmamızda belirgin genotoksik etkili olmamakla birlikte kısmen sitotoksik potansiyele sahiptir. Bu realite mür yağının bir takım hastalıkların tedavisinde insanların kullanımına uygun hale getirmektedir.

Yine de bu çalışmanın sonuçlarıyla ajanın net perspektifi hakkında kesin kaniya varmak için yeterli olmayacağı unutulmamalıdır. Bu konuda araştırma yapacak bilim insanlarının test maddesi veya bileşenleriyle yapacak oldukları çalışmalarda farklı test sistemlerini ve hücre hatları tercih ederek mürün potansiyelinin ortaya çıkarılmasına önemli katkılar sağlayacağı bilimsel bir gerçektir.

KAYNAKLAR

- Al-Harbi, MM., Qureshi, S., Ahmed, MM., Rafatullah, S., Shah, AH., (1994). Effect of Commiphora molmol (oleo-gum-resin) on the cytological and biochemical changes induced by cyclophosphamide in mice. Am J Chin Med.;22(1):77-82. doi: 10.1142/S0192415X94000103.
- Al-Harbi, MM., Qureshi, S., Raza, M., Ahmed, MM., Afzal, M., Shah, AH. (1997). Gastric antiulcer and cytoprotective effect of Commiphora molmol in rats. J Ethnopharmacol. 55(2):141-50. doi: 10.1016/s0378-8741(96)01488-2.
- Al-Harbi, S., Qureshi, M., Raza, M.M., Ahmed, A.B., Giangreco and A.H. Shah. "Anticarcinogenic Effect of *Commiphora molmol* on solid Tumors induced by Ehrlich Carcinoma Cells in Mice. *Chemotherapy* 1994;40:337-347
- Al-Harrasi, A., Ali, L., Ceniviva, E., Al-Rawahi, A., Hussain, J., Hussain, H., Rehman, N., Abbas, G., Al-Harrasi, R., 2013. Antiglycation and antioxidant activities and HPTLC analysis of Boswellia sacra Oleogum resin: the sacred frankincense. Trop. J. Pharm. Res. 12 (4), 597–602.
- Alqahtani, A. S., Omar M.N., Tabish R. Md., Nasir A.S., Mohamed F.AL., Fahd A.N., Abdelaaty A.S. and Perwez A., The influence of variations of furanosesquiterpenoids content of commercial samples of myrrh on their biological properties. Saudi Pharmaceutical Journal 27 (2019) 981–989
- Alqahtani. A. S. Alqahtani, F.A. Nasr, O.M. Noman, M. Farooq, T. Alhawassi, W. Qamar and A. El-Gamal. Cytotoxic Evaluation and Anti-Angiogenic Effects of Two Furano-Sesquiterpenoids from *Commiphora myrrh* Resin. *Molecules* **2020**, 25, 1318; doi:10.3390/molecules25061318
- Ames B.N., McCann J., Yamasaki E., Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test, Mutat. Res. 31 (1975) 347–364.

- Ames, B. N.; Lee, F. D. & Durston, W. E., 1973. An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, (3), 782-786, ISSN-0027-8424.
- Ames, B.N. 1971. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria, in: A. Hollaender (Ed.). *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, Plenum, New York, Vol. 1, pp. 267-282.
- Anand S, Rajan M, Venkateshbabu N, Kandaswamy D, Shravya Y, Rajeswari K. 2016. Evaluation of the Antibacterial Efficacy of *Azadirachta Indica*, *Commiphora Myrrha*, *Glycyrrhiza Glabra* Against *Enterococcus Faecalis* using Real Time PCR. *Open Dent J*. 10:160–165.
- Anderson, D. 1988. Human Biomonitoring. *Mutation Res.*, 204:353-541.
- Ashry KM., El-Sayed YS., Khamiss RM., El-Ashmawy IM. Oxidative stress and immunotoxic effects of lead and their amelioration with myrrh (*Commiphora molmol*) emulsion. *Food Chem Toxicol*. 2010 Jan;48(1):236-41. doi: 10.1016/j.fct.2009.10.006.
- Ayman M.M., Mousa O.G., Khalid M. Al., Ahmed H.M., Mohammad Ab., Ahmed A.A. *Commiphora molmol* protects against methotrexate-induced nephrotoxicity by up-regulating Nrf2/ARE/HO-1 signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106 (2018) 499–509
- Bai XZ, Hu DH, Bai L, Liu Y, Su YJ, Tang CW. [Effects of myrrh extract on proliferation and collagen mRNA expression of human fibroblasts in vitro]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2012 Apr;28(2):130-3.
- Bandyopadhyaya, G., Sinha, S., Chattopadhyay, B.D. and Chakraborty, A. 2008. Protective role of curcumin against nicotine-induced genotoxicity on rat liver under restricted dietary protein. *European Journal of Pharmacology*, 588 (2–3):151–157.
- Başer KHC, Demirci B, Dekebo A and Dagne E: Essential oils of some *Boswellia* spp., Myrrh and *Opopanax*. *Flavour Fragr J* 18: 153-156, 2003.

- Carrano, A.V., Natarajan, A.T. 1988. Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques. *Mutation Res.*, 204:379-406.
- Chen Y., Zhou C., Zhendan GE., Yufa L., Liu Y., Feng W., Sen LI, Chen G. and Wei T., Composition and potential anticancer activities of essential oils obtained from myrrh and frankincense. *ONCOLOGY LETTERS* 6: 1140-1146, 2013
- Çavaş, T. and Könen, S. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22(4):263–268.
- Çavaş, T. and Könen, S. 2008. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Toxicology*, 90:154-159.
- Eastmond, D.A., Tucker, J.D. 1989. Identification of aneuploidy inducing agents using cytokinesis blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen.* 13: 34-43.
- Effie Y. ve Nomico H. 2007, Medical Marvel or Myth of the Magi, 10.1097/01.HNP.0000298616.32846.34
- El-Ashmawy IM, Ashry KM, El_Nahas AF, Salama OM. Protection by turmeric and myrrh against liver oxidative damage and genotoxicity by lead acetate in mice. *Basic & clinical pharmacology & toxicology* 2006;98:32-7. http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_228.x
- El-Naggar, S.A. (2011). Lack of the Beneficial Effects of Mirazid (*Commiphora molmol*) When administered with Chemotherapeutic Agents on Ehrlich Ascetic Carcinoma Bearing Mice. *Advances in Biological Research* 5 (4): 193-199.

- El-Shahat M., El-Abd S., Alkafafy M., El-Khatib G. Potential chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats: myrrh (*Commiphora molmol*) vs. turmeric (*Curcuma longa*). *Acta Histochem.* 2012 Sep;114(5):421-8. doi: 10.1016/j.acthis.2011.08.002.
- El-Sharkawy, I.M., Saleh, W.A., El-Alfy, N.M. (2003): Cytogenetics of acute and chronic schistosomiasis mansoni. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 33, 2: 341-52.
- EMA 2011. (European Medicines Agency, Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)) Assessment report on *Commiphora molmol* Engler, *gummi-resina*. Based on Article 16d(1), Article 16f and Article 16h of Directive 2001/83/EC as amended (traditional use).
- Erel, O., 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38(12): 1103-1111.
- European Commission (1995). Reports of the scientific committee for food (34th series). (<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/c4aca6b4-909b-48c2-9891-380649d9836a>)
- Fabricant DS, Farnsworth NR., The value of plants used in traditional medicine in drug discovery, Environmental Health Perspectives, 109, 1, 69-75, 2001.*
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., (1995): The Comet Assay: A Comprehensive Review, *Mutat. Res.*, 339, 3759.
- Fawzia. A. Z., Hasanat. El. M. A., and Amani, Ab. M., 2016. Effect of Mirazid on the Micronuclei Polychromatic Erythrocyte Cells (MNPCEs) In the Bone Marrow Cells of *Schistosoma* Infected and Non Infected Mice . 5th International Conference on Food, Agricultural and Biological Sciences (ICFABS-2016) , Bangkok, <https://doi.org/10.17758/URUAE.AE1216239>
- Fenech, M. 1997. The Advantages and Disadvantages of the Cytokinesis-Block Micronucleus Method. *Mutat Res.* 392: 11-18.
- Fenech, M. 2000. The *in vitro* Micronucleus Technique. *Mutat. Res.* 455: 81-95.

- Fenech, M. 2002. Biomarkers of Genetic Damage for Cancer Epidemiology. *Toxicology*, 181-182:411-416.
- Fenech, M. and Morley, A.A. (1985a) Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios*, **43**, 233–246.
- Fenech, M. and Morley, A.A. (1986) Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat. Res.*, **161**, 193–198.
- Fidan, A.F. 2008. DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Dergisi, 8(1). 52s.
- Ford RA, Api MA, Letizia CS. Monographs on Fragrance Raw Materials. Food Chem Toxicol 1992; 30: 1S-138S.
- Fraternale, D.; Sosa, S.; Ricci, D.; Genovese, S.; Messina, F.; Tomasini, S.; Montanari, F.; Marcotullio, M.C. Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal furanosesquiterpenoids isolated from *Commiphora erythraea* (Ehrenb.) Engl. resin. *Fitoterapia* **2011**, 82, 654–661. [CrossRef]
- Gao W., Su X., Dong X., Chen Y., Zhou C., Xin P., Yu C. and Wei T. Cycloartan-24-ene-1 α ,2 α ,3 β -triol, a cycloartane-type triterpenoid from the resinous exudates of *Commiphora myrrha*, induces apoptosis in human prostatic cancer PC-3 cells. CYCLOARTANE INDUCES PC-3 CELL APOPTOSIS, ONCOLOGY REPORTS 33: 1107-1114, 2015
- Germano, A., Occhipinti, A., Barbero F., Maffei, M. E. (2017). A Pilot Study on Bioactive Constituents and Analgesic Effects of MyrLiq®, a *Commiphora myrrha* Extract with a High Furanodiene Content. BioMed Volume 2017 |Article ID 3804356 | 11 pages | <https://doi.org/10.1155/2017/3804356> Research International / 2017 / Article

- Ghaedi M., Rezaee M.A., Fakhari S., Ghorashi M., Pirmohammadi H., Doost R.D. and Rahmani M.R., Effects of ethanol extract of *Commiphora myrrha* gum agcdnst *Helicobacterpylori* and inhibition ofproliferation ofthe human AGS cell Wie in vitro. Iran JAMS 2014 20(2) 111-106
- Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? Mol Pharmacol 2001; 59(4): 657-663
- Gutteridge, J.M., & Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. Annals of the New York Academy of Sciences, 899, 136-47.
- Hagmar, L., Brøgger, A., Hansteen, I. L., Heim, S., Høgstedt, B., Knudaen, L., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., Reuterwall, C., Salomaa, S., Skerfving, S. and Sorsa, M. 1994. Cancer Risk in Human Predicted by Increased Levels of Chromosomal Aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. Cancer Res., 54:2919-2922.
- Halliwell, B. (1994). Free radical sand antioxidants: A personal view. Nutrition Reviews, 52(8), 253- 265.<https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
- Hanus LO, Rezanka T, Dembitsky VM, Moussaieff A. Myrrh- *Commiphora* chemistry. Biomed Papers 2005;149:3–28.).
- Harma, M., Harma, M. and Erel, O., 2003. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. Swiss Medical Weekly, 133(41-42):563-566.
- Heddle, J. A., Cimino, M. C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M. D., Tucker, J. D., Vanparys, Ph. and MacGregor, J. T., 1991. Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present, and Future. Environ. and Mol. Mutagen., 18:277-291.
- Houtsma, M.Th. (1993). E. J. Brill's First Encyclopaedia of Islam, 1913–1936. 4. Brill. pp. 1011–. ISBN 978-90-04-09790-2.

- Ibrahim M., El-Ashmawyl , Khalid M., Ashry , Abeer F., El-Nahas., Osama M., Salama 2006. Protection by turmeric and myrrh against liver oxidative damage and genotoxicity induced by lead acetate in mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*; 98(1):32-7. doi: 10.1111/j.1742-7843.2006.pto_228.x.
- Jasuja, ND., Choudhary, J., Sharama, P., Sharma, N., Joshi, SC. (2012). A Review on Bioactive Compounds and Medicinal Uses of Commiphora mukul. *Journal of Plant Sciences*, 7: 113-137.DOI: 10.3923/jps.2012.113.13
- Khalil N., Fikry S., and Salama O. Bactericidal activity of Myrrh extracts and two dosage forms against standard bacterial strains and multidrug-resistant clinical isolates with GC/MS profiling. *AMB Expr* (2020) 10:21. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-0958-3>
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M. et al. (2003) Report from the in-vitro micronucleus assay working group. *Mutat. Res.*, 540, 153–163.
- Klaassen, Curtis D.; Amdur, Mary O.; Casarett, Louis J.; Doull, John (1991). *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. New York: McGraw-Hill. ISBN 978-0071052399.^[page needed]
- Kosecik, M., Erel, O., Sevinc, E. and Selek, S., 2005. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *International Journal of Cardiology*, 100(1):61-64.
- Kristien, M., 2000 The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Molecular and Genetic Toxicology Program, SRI International, Menlo Park, CA 94025-3493, USA*
- Lamichhane R., Lee K.H., Pandeya P.R., Sung K.K., Lee S.K., Kim Y.K. , and Jung H. J., 2019. Subcutaneous Injection of Myrrh Essential Oil in Mice: Acute and Subacute Toxicity Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* , Korea, 8497980, 13 , <https://doi.org/10.1155/2019/8497980> .

- Leal-Cardoso, J. H. and Fonteles, M. C. 1999. Pharmacological effects of essential oils of plants of the northeast of Brazil. *An Acad Bras Cienc*, 71(2): 207-213.
- Levin, D.E., Yamasaki, E., Ames, B.N. 1982. A new Salmonella tester strain for the detection of frameshift mutagens: A run of cytosines as a mutational hot-spot. *Mutation Res.* 94, 315-330.
- Ljaljević Grbić M, Unković N, Dimkić I, et al. Frankincense and myrrh essential oils and burn incense fume against micro-inhabitants of sacral ambients. Wisdom of the ancients?. *J Ethnopharmacol.* 2018;219:1-14. doi:10.1016/j.jep.2018.03.003
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 4:118–126.
- Moller P, Danielsen PH, Karottki DG, Jantzen K, Roursgaard M, Klingberg
- Lupi S., Marconi S., Paiaro E., Fochesato A., Gregorio P. Mutagenicity evaluation with Ames test of hydro-alcoholic solution of terpenes. *J Prev Med Hyg.* 2009 Sep;50(3):170-4.
- Mahboubi M., ve Leila M. (2015) The anti-dermatophyteactivity of Commiphora molmol, *Pharm Biol*, 10.3109/13880209.2015.1072831
<http://informahealthcare.com/phb>
- Mahboubi M, Kashani LM. The anti-dermatophyte activity of Commiphora molmol. *Pharm Biol.* 2016;54(4):720-725. doi:10.3109/13880209.2015.1072831
- Marcotullio, MC,* Rosati, O., Lanari, D. (2018). Phytochemistry of Commiphora erythraea: A Review. *Natural Product Communications Vol. 13 (9)*; 1209 - 1212

- Maron, D.M. & Ames, B. N., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113, (3-4), 173–215, ISSN 0165-1161.
- Massoud A, El Sisi S, Salama O (2001). Preliminary study of therapeutic efficacy of a new fasciolicidal drug derived from *Commiphora molmol* (myrrh). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65(2): 96-99.
- Mazzio, E.A., Soliman, K.F. (2009). In vitro screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs. *Phytotherapy research: PTR*, 23(3), 385–398. <https://doi.org/10.1002/ptr.2636>.
- McCann, J., Springam, N.E., Kobori, J., Ames, B.N. 1975. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R-factor plasmids, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 72, 979-983.
- Mohamed A.A., Ali S.I., El-Baz F.K., Hegazy A.K., Kord M.A., 2014. Chemical composition of essential oil and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts of *Commiphora myrrha* resin. *Industrial Crops and Products* 57 (2014) 10–16, Egypt , <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.017>
- Mortelmans, K., Zeiger, E. 2000 The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* 455 (2000) 29–60
- National Toxicology Program. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Polysorbate 80 (CAS No. 9005-65-6) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*. 1992;415:1-225.
- Olive P, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation- induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet assay” assay. *Radiat Res*. 1990;122:86–94.

- Omar A., Elmesallamy Gel-S., Eassa S. Comparative study of the hepatotoxic, genotoxic and carcinogenic effects of praziquantel distocide & the natural myrrh extract Mirazid on adult male albino rats. J Egypt Soc Parasitol. 2005 Apr;35(1):313-29.
- Omer SA ,Adam SEI and Mohammed OB. Antimicrobial Activity of Commiphora myrrha Against Some Bacteria and Candida albicans Isolated from Gazelles at King Khalid Wildlife Research Centre Research. Journal of Medicinal Plant. 2011; 5(1): 65-71. DOI:10.3923/rjmp.2011.65.71
- Omer, S A, Adam, SE. (1999). Toxicity of Commiphora myrrha to goats. Vet Hum Toxicol.;41(5):299-301.
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation- induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun. 1984;123:291–8.
- Paraskeva M.P., van Vuuren S.F., van Zyl R.L. and Viljoen A.M., The *in vitro* biological activity of selected South African *Commiphora* Species. Journal of Ethnopharmacology 119 (2008) 673–679
- Parry, J. M. and Sors, A. (1993) The detection and assessment of the aneugenic potential of environ mental chemicals: the European Community Aneuploidy Project. Mutat. Res., 287, 3–15.
- Perry, P., Evans, H. J. 1975. Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange. Nature, 258:121-125.
- Petrovska B.B. (2012) Historical review of medicinal plants' usage. Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, SS Cyril and Methodius University, Vodnjanska 17, 1000 Skopje, The Republic of Macedonia . 10.4103/0973-7847.95849
- Peycheva E., Georgieva M. and Miloshev G.(2009) Comparison Between Alkaline and Neutral Variants of Yeast Comet Assay, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 23:1, 1090-1092, <https://doi.org/10.1080/13102818.2009.10817618>

- Piperakis S. M. Comet assay: A brief history. *Cell Biol Toxicol* (2009) 25:1–3
10.1007/s10565-008-9081-y.
- Pradella M.B. and Oliveira C.R.. 2019 Evaluation of Cytotoxic Activity of Commiphora myrrha extract on jurkat cell line. *Escola de Ciências da Saúde, Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo/SP, Brazil*.
- Qureshi, S., M M al-Harbi, M M Ahmed, M Raza, A B Giangreco, A H Shah (1993). Evaluation of the genotoxic, cytotoxic, and antitumor properties of Commiphora molmol using normal and Ehrlich ascites carcinoma cell-bearing Swiss albino mice. *Cancer Chemother Pharmacol.*; 33(2):130-8. doi: 10.1007/BF00685330.
- Ramadan W. S., Sait K. H. and Anfinan N.M. 2017. Anticancer activity of aqueous myrrh extract alone and in combination with cisplatin in HeLa cells. *Trop J Pharm Res*, April 2017; 16(4): 889. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v16i4.21>
- Rao, R.M., Khan, Z.A., Shah, A.H., (2001). Toxicity studies in mice of Commiphora molmol oleo-gum-resin. *J Ethnopharmacol.* 76 (2): 151-4.
- Rothfuss, A., Schutz, P., Bochum, S., Volm, T., Elberhard, E., Kreinberg, R., Vogel, V., Speit, G. 2000. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in Breast cancer families. *Cancer Res.* 60: 390-394.
- Russo, A., Acquaviva, R., Campisi, A., Sorrenti, V., Di Giacomo, C., Virgata, G., Barcellona, M.L., & Vanella, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biology and Toxicology*, 16, 91. <https://doi.org/10.1023/A:1007685909018>
- Rydberg B, Johanson KJ. Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. In: Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF, editors. *DNA Repair mechanisms*. New York, NY: Academic; 1978. p. 465–8.

- Seif-Eldin, N. A., Thomas R.H., Walied M.A., Sana'a M. Al, Salim A.B., Mohamed A.G., and Farid A. Z. *Naturforsch.* 2015; 70(3-4)c: 87–92 .
Differential cytotoxic activity of the petroleum ether extract and its furanosesquiterpenoid constituents from *Commiphora molmol* resin.
- Shalaby M.A. and Hammouda A.Ab. 2014. Analgesic, anti-inflammatory and anti-hyperlipidemic activities of *Commiphora molmol* extract (Myrrh). *J Intercult Ethnopharmacol, Egypt*, 10.5455/jice.20140130015014
- Shanabruch, W.G., Walker, G.C. 1980. Localization of the plasmid (pKM101) gene(s) involved in *recA*⁺ *lexA*⁺-dependent mutagenesis. *Mol. Gen. Genet.*
- Shen T, Wan WZ, Wang XN, Sun LM, Yuan HQ, Wang XL, Ji M, Lou HX. 2008. Sesquiterpenoids from the Resinous Exudates of *Commiphora opobalsamum* (Burseraceae). *Helv Chim Acta.* 91:881–887.
- Shen T, Wan WZ, Wang XN, Yuan HQ, Ji M, Lou HX. *Helv Chim Acta* 2009;92:645.
- Shena T, Wana W, Wanga X, Suna L, Yuanb H, Wangb X, et al. Sesquiterpenoids from the resinous exudates of *Commiphora opobalsamum* (Burseraceae). *Helv Chim Acta* 2008;91:881–7.
- Shoemaker M, Hamilton B, Dairkee SH, Cohen I, Campbell MJ. *In vitro* anticancer activity of twelve Chinese medicinal herbs. *Phytother Res* 2005;19:649-51.
<http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1702>
- Shuaib M, Ali A, Ali M, Panda BP, Ahmad MI. Antibacterial activity of resin rich plant extracts. *J Pharm Bioall Sci* 2013;5:265-9.
- Singh, N. P., Mccoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Res.*, 175:184-191

- Su S, Wang T, Duan J-A, Zhou W, Hua Y-Q, Tang Y-P, Yu L, Qian D-W. Anti-inflammatory and analgesic activity of different extracts of *Commiphora myrrha*.J Ethnopharmacol 2011;134:251-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2010.12.003>
- Swift LH, Golsteyn RM. Cytotoxic amounts of cisplatin induce either checkpoint adaptation or apoptosis in a concentration dependant manner in cancer cells. Biol Cell 2016; 108(5): 127-148.
- Şarer, E. 1991. Uçucu yağların biyolojik etkileri ve tedavide kullanımları, 9. Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı, bildiriler kitapçığı, Eskişehir.
- Tarpey, M.M., Wink, D.A., & Grisham, M.B. (2000). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. Am J. Physiol., 286(3), 431–44. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00361.2003>
- Tepe, B., Degerli, S., Arslan, S., Malatyali, E., & Sarikurkcu, C. (2011). Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys siberica*. Fitoterapia, 82(2), 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.10.006>
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35:206-221.
- Tipton DA, Lyle B, Babich H, Dabbous MKH. In vitro cytotoxic and anti-inflammatory effects of myrrh oil B.on human gingival fibroblasts and epithelial cells. Toxicol in Vitro 2003; 17(3): 301-310.
- Tisserand Aromaterapi (<https://www.tisserand.com.tr/urunler/organik-yaglar-9ml/mur-myrrh-yagi-9ml/#tabs-list-description>)

- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M., Smith, M.T. 1997. Genotoxicity of Malathion in Human Lymphocytes Assessed Using the Micronucleus Assay *in vitro* and *in vivo*: a Study of Malathion-Exposed Workers. *Mutation Res.* 388(1): 85-95.
- Tucker, J. D., Auletta, A., Cimino, M. C., Dearfield, K. L., Jacobson-Kram, D., Tice, R. R. and Carrano, A. V. 1993. Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res*, 297(2): 101-180.
- Tween® 80 (Polysorbate) SDS,
(https://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/msds/MDA_CHEM-817061)
- Ulas, T., Büyükhatoğlu, H., Kirhan, I., Dal, M.S., Ulas, S., Demir ME., Eren M.A., Ucar, M., Hazar, A., Kürkcüoğlu, İ.C., & Aksoy, N. (2013). Evaluation of oxidative stress parameters and metabolic activities of nurses working day and night shifts. *Rev Esc Enferm USP*, 47(2), 471-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0080-62342013000200028>
- Volders, K. M. (1997) Towards a validation of the micronuclei test. *Mutat. Res.*, 392, 1–4 and contents of whole of this Special Issue.
- Walker, G.C., Dobson, P.P. 1979. Mutagenesis and repair deficiencies of *Escherichia coli umuC* mutants are suppressed by the plasmid pKMI01. *Mol. Gen. Genet.*, 172, 17-24.
- Wang XL, Kong F, Shen T, Young CY, Lou HX, Yuan HQ. Sesquiterpenoids from myrrh inhibit androgen receptor expression and function in human prostate cancer cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2011 Mar;32(3):338-44. doi: 10.1038/aps.2010.219.
- Yao Y. Q., Ding X., Jia Y. C., Huang C. X., Wang Y. Z. and Xu Y. H. 2008. Anti-tumor effect of b-elemene in glioblastoma cells depends on p38 MAPK activation. *Cancer Letters* 264 (2008) 127–134

- Yumru, M., Savas, H. A., Kalenderoglu, A., Bulut, M., Celik, H. and Erel, O., 2009. Oxidative imbalance in bipolar disorder subtypes: a comparative study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 33(6):1070-1074.
- Zeiger, E., 2004. History and Rationale of Genetic Toxicity Testing: An Impersonal, and Sometimes Personal, View. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44, (5), 363–371, ISSN 1098-2280.
- Zeiger, E., 2010. Historical Perspective on the Development of the Genetic Toxicity Test Battery in the United States. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51, (8-9), 781–791, ISSN 1098-2280.
- Zhu N, Kikuzaki H, Sheng S, Sang S, Rafi MM, Wang M, Nakatani N, DiPaola RS, Rosen RT, Ho CT. 2001. Furanosesquiterpenoids of *Commiphora myrrha*. *J Nat Prod*. 64:1460–1462.
- https://journals.lww.com/hnpjournal/Abstract/2007/11000/Myrrh_Medical_Marvel_or_Myth_of_the_Magi_.7.aspx
- <https://www.tisserand.com.tr/urunler/organik-yaglar-9ml/mur-myrrh-yagi-9ml/#tabs-list-description>
- https://www.researchgate.net/publication/11302262_The_Comet_Assay_Principles_Applications_and_Limitations.
- (<https://www.aysetolga.com/mur-yagi-nedir-mur-yagi-faydalari-nelerdir>)
- <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.00513.x>



ÖZGEÇMİŞ

25.12.1993 tarihinde N'Djamena / Çad (Tchad)'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini doğduğu yerde tamamladı. 2012 yılında başladığı N'Djamena Üniversitesi, Biyoloji Bölümünden 2016'da mezun oldu. Eğitiminin sonraki kısmına devam etmek üzere Ekim 2017'da Türkiye'ye gelip Türkçe hazırlık kursuna başladı. C1 düzey sertifikasını aldıktan sonra Eylül 2018'de Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı.