

FENKONUN LETAL DOZ DÜZEYLERİ İLE ANTİENFLAMATUVAR AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Investigation of Lethal Dose Levels and Anti-Inflammatory Effect of Fenchone

Hanefi ÖZBEK

Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Farmakoloji AbD
VAN

İletişim:
Hanefi ÖZBEK
Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Tıp Fak.
Farmakoloji AbD
65300 VAN
Tel: 0542 477 1575
Faks: 0432 216 83 52
E-posta:
hanefiozbek@hotmail.com

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, fenkonun farelerde letal doz düzeyleri ile sıçanlarda carrageenan'la oluşturulmuş sağ-arka pençe ödemi modelinde antienflamatuvar etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Altı ayrı çalışma grubu (n=6) oluşturularak, buna göre serum fizyolojik kontrol, etil alkol kontrol, indometazin (3 mg/kg) referans grupları ile FN'nin 0.05 ml/kg, 0.10 ml/kg ve 0.20 ml/kg grupları oluşturulmuştur. Sıçanların sağ arka-pençeleri pletismometre aracılığı ile ölçüldükten sonra ilaçlar periton içine, lambda-carrageenan plantar bölgeye derialtı yolla uygulanmıştır. Bu uygulamadan üç saat sonra sağ-arka pençe hacmi tekrar ölçülmüştür. Her iki ölçüm arasındaki fark gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Çalışma sonunda indometazin'in % 95.70, FN 0.05 ml/kg dozunun % 45.87, FN 0.10 ml/kg dozunun % 53.15 ve FN 0.20 ml/kg dozunun ise % 70.60 oranında antienflamatuvar etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Her üç dozdaki FN'nin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede antienflamatuvar etkinlik gösterdiği ancak bu etkinliğin indometazin'e göre daha zayıf olduğu tespit edilmiştir. FN'nin medyan etkin doz (ED₅₀) seviyesi 0.133 ml/kg ve medyan letal doz seviyesi (LD₅₀) 0.943 ml/kg olarak hesaplanmıştır.

Sonuç: Rat modeli ile yapılan bu çalışmada FN'nin antienflamatuvar etkiye sahip olduğu söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Fenkon, carrageenan, sıçan, antienflamatuvar etki, letal doz.

ABSTRACT:

Objective: In this study, it was aimed to determine the median lethal dose (LD₅₀) level of Fenchone (FN) in mice and anti-inflammatory effect in rats by using carrageenan- induced right hind-paw edema model.

Method: The study involved six different groups these are; Serum physiologic, ethyl alcohol, indomethacin (3 mg/kg), FN (0.05 ml/kg) FN (0.10 mg/kg) and FN (0.20 ml/kg). After measuring the volumes of right hind-paws of rats using a plethysmometer, drugs were injected intraperitoneally and lambda-carrageenan were injected subcutaneously into the plantar region. Three hours after the injections the volume measurements of the right hind-paws were repeated and the differences between the groups were statistically compared.

Results: It was found that reduction of the inflammation was 95.70% with indomethacin, 45.87% with 0.05 ml/kg FN, 53.15% with 0.10 ml/kg FN and 70.60% with 0.20 ml/kg FN. All doses of the FN used showed statistically significant anti-inflammatory effect compared to the control groups. The anti-inflammatory effect of all doses of FN were weaker than the effect of indomethacin. The median effective dose (ED₅₀) of FN was determined as 0.133 ml/kg and the median lethal dose (LD₅₀) of FN was determined as 0.943 ml/kg.

Conclusion: It can be assumed that FN has anti-inflammatory effect.

Keywords: Fenchone, carrageenan, rat, anti-inflammatory activity, lethal dose.

Bu çalışma "Türk Farmakoloji Derneği 18. Ulusal Farmakoloji Kongresi'nde (28 Eylül-1 Ekim 2005)" 116 no'lu poster bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

(1R)-(-)-fenkon ($C_{10}H_{16}$), *Ocimum basilicum*, *Foeniculum vulgare*, *Tetradenia ripari* ve *Thuja orientalis* gibi bir çok bitkinin içeriğinde bulunan terpenik bir bileşiktir (1-4).

Fenkonun (FN) *Plasmodium falciparum*'un iki suşuna karşı orta derecede aktivite gösterdiği (1), Sartorius modelinde Ca, Mg, S ve Zn'nun yanında fenkonun da membranlardan geçtiği (5), *Dermatophagoides spp.*'ya karşı akarisidal aktiviteye sahip olduğu (3), kafein ve hidrokortizonun transdermal geçişini artırdığı (6) gösterilmiştir.

Ülkemizde tarımı yapılan *F. vulgare* (rezene) Miller'in uçucu yağ ekstresi ile ilgili olarak yapmış olduğumuz bir dizi fitoterapi çalışmasında, uçucu yağ ekstresinin antienflamatuvar etkisi gösterilmiş olup, gaz kromatografi analiziyle *F. vulgare* uçucu yağ içeriğinin % 74.8 trans-anetol, % 11.1 limonen, % 4.7 metil kavikol, % 2.5 fenkon, % 1.3 alfa-pinen ve % 1.2 Z-(B)-osimen'den oluştuğu saptanmıştır (7, 8).

F.vulgare uçucu yağına ait antienflamatuvar etkinliğin hangi kimyasal bileşik veya bileşiklerden kaynaklandığını araştırmak için planlanan bir dizi çalışmadan biri olan bu araştırmada, (1R)-(-)-fenkon (FN)'un letal doz düzeyleri ve antienflamatuvar etkisi deney hayvanları üzerinde çalışılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Fenkon, indometazin ve lambda-carrageenan Sigma'dan (Steinheim, Germany) sağlanmıştır. Lambda-carrageenan serum fizyolojik (% 0.9'luk NaCl) içerisinde, indometazin ise etil alkolde çözülmüştür.

Bu çalışmada *Mus musculus swiss albino* fareler (24-32 gram) ve *Sprague-Dawley* ırkı (150-200 gram) erkek ve dişi cinsiyette sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanları Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edilmiştir. Hayvanlar 12 saat ışık, 12 saat karanlık ritminde ışıklandırılan, 22 ± 2 °C'deki odalarda, çeşme suyu ve standart pelet yem (Van Yem Fabrikası) ile beslenmiş, yem ve su alımı serbest bırakılmıştır. Deney hayvanları standart plastik kafeslerde (Değişim Ltd.,

İstanbul) barındırılmıştır. Çalışma yapılmadan önce Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (Karar sayısı: 2004/05-03).

Her biri altışar adet erkek fare içeren altı adet çalışma grubu oluşturulmuş, birinci gruba sadece 0.1 ml % 0.9'luk serum fizyolojik (SF), diğer gruplara ise sırasıyla 0.4, 0.8, 1.6, 2.4 ve 3.2 ml/kg akut toksisitesi araştırılacak madde uygulanmıştır. Tüm uygulamalar (periton içi) IP yolla yapılmıştır. 72 saat sonra çalışma gruplarındaki ölü hayvanlar sayılmıştır. Probit analiz metodu uygulanarak letal doz düzeyleri (LD_{10} , LD_{50} , LD_{90} ve LD_{99} olacak şekilde) hesaplanmıştır (9, 10).

Winter ve ark.'nın metodu kısmen modifiye edilerek uygulanmıştır (11). FN dozları LD_{10} düzeyinin altında kalacak şekilde ayarlanmış ve çalışma grupları aşağıdaki gibi düzenlenmiştir:

Grup 1: Serum fizyolojik, 0.1 ml,

Grup 2: Etil alkol, 0.1 ml,

Grup 3: İndometazin (3 mg/kg) (12),

Grup 4: FN (0.05 ml/kg),

Grup 5: FN (0.10 ml/kg),

Grup 6: FN (0.20 ml/kg).

Sağ arka pençe, ilaç uygulamasından önce pletismometre (Ugo Basile 7140, İtalya) ile ölçülmüştür. İlaç uygulamasından sonra pençenin sub-plantar bölgesine 0.05 ml lambda carrageenan çözeltisi (antienflamatuvar madde) verilmiştir. Lambda carrageenan uygulamasından üç saat sonra pençe pletismometre ile tekrar ölçülmüştür. Enflamatuvar reaksiyonun yüzde cinsinden inhibisyonu, her bir hayvan için kontrol grubuyla karşılaştırılarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (9):

$$\%I = [(1 - (dt/dc))] \times 100$$

dt : İlaç uygulanan grubun pençesindeki hacim farkı.

dc : Kontrol grubunun pençesindeki hacim farkı.

Gruplara ait veriler ortalama \pm standart hata ortalaması olarak ifade edilmiş, istatistiksel analiz tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılığı göstermek için post-hoc

LSD (least significant difference) testi kullanılmıştır. Letal doz seviyesinin saptanmasında probit analizi yöntemi, medyan etkin dozun hesaplanmasında ise non-lineer regresyon analizi yöntemi kullanılmıştır. Hesaplamalar Sigmaplot 9.0 ve MS Office XP (Excel) paket programlarında yapılmıştır.

BULGULAR

Fenkona ait letal doz seviyeleri Tablo 1'de verilmiştir. Buna göre FN'nin LD₅₀ dozu 0.943 ml/kg olarak saptanmıştır.

Çalışma gruplarının antienflamatuvar etkinlik yönünden pençe ödemi hacmi ve % inhibisyon değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Buna göre lambda carrageenan'la oluşturulmuş enflamasyonu indometazin'in % 95.70, FN (0.05 ml/kg) grubunun % 45.87, FN (0.10 ml/kg) grubunun % 53.15 ve FN (0.20 ml/kg) grubunun ise % 70.60 oranında inhibe ettiği tespit edilmiştir. İndometazin ve FN gruplarının gösterdiği antienflamatuvar aktivite kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). FN grupları ile indometazin grubu arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmış, bu durum indometazinin tüm FN gruplarına göre daha güçlü bir antienflamatuvar aktiviteye sahip olduğu şeklinde yorumlanmıştır. FN'nin 0.05 ml/kg dozu FN grupları içerisinde en zayıf antienflamatuvar etkinliğe, FN 0.20 ml/kg dozu ise en güçlü antienflamatuvar etkinliğe sahip olarak tespit

edilmiştir. FN 0.05 ml/kg grubu ile FN 0.20 ml/kg grubu arasındaki fark da anlamlı bulunmuştur.

Tablo 1. Fenkon molekülünün probit analizi sonuçları.

	Letal Doz Düzeyleri(ml/kg)		
	Ortalama doz	%95 güven aralığı sınırları	
		Alt Sınır	Üst sınır
LD ₁	0.201	0.025	0.391
LD ₁₀	0.403	0.111	0.649
LD ₅₀	0.943	0.560	1.508
LD ₉₀	2.209	1.407	7.052
LD ₉₉	4.419	2.358	31.337

TARTIŞMA

Carrageenan'la oluşturulmuş akut enflamasyon modeli sıçan veya farelerin plevra (10) veya sağ arka pençesinde (13, 14) çalışılan ve yaygın olarak kullanılan bir antienflamatuvar aktivite araştırma yöntemidir. Bu yöntemde göre aktivitesi saptanan etkin maddenin bilinen bir antienflamatuvar ilaçla (referans ilaç) karşılaştırılması için genellikle indometazin (13) veya Fenilbutazon gibi bir antienflamatuvar ilaç kullanılmaktadır (15). Bu çalışmada yöntem olarak sıçanlarda carrageenan'la oluşturulmuş sağ-arka pençe ödemi yöntemi, referans ilaç olarak da indometazin seçilmiştir.

Bu çalışma ile fenkon molekülünün sıçanlarda lambda-carrageenan'la oluşturulmuş akut sağ pençe

Tablo 2. Grupların pençe ödemi ve % inhibisyon değerleri.

Gruplar	Doz	Pençe ödemi(%ml)	İnhibisyon(%)
Kontrol (SF)	0.1 ml	1.043 ± 0.127	-
Kontrol (etil alkol)	0.1 ml	0.988 ± 0.112	-
İndometazin	3 mg/kg	^{ab} 0.024 ± 0.006	95.70
FN	0.05 ml/kg	^{abc} 0.565 ± 0.056	45.87
FN	0.10 ml/kg	^{abc} 0.489 ± 0.075	53.15
FN	0.20 ml/kg	^{abcd} 0.307 ± 0.040	70.60
<i>F değeri / p değeri</i>		26.592 / 0.000	

FN için ED50: 0.133 ml/kg

Post-hoc LSD testi:

a: $p < 0.05$ kontrol-grubu ile (SF) karşılaştırma,

b: $p < 0.05$ kontrol-grubu ile (etil alkol) karşılaştırma,

c: $p < 0.05$ indometazin grubu ile karşılaştırma.

d: $p < 0.05$ FN (0.05 ml/kg) grubu ile karşılaştırma.

enflamasyonu modelinde, doza bağımlı olarak artan bir antienflamatuvar etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. *F. vulgare* Miller uçucu yağının 0.20 ml/kg (ip) dozunda carrageenan'la oluşturulmuş pençe ödemi % 56.78 oranında geriletliği Özbek tarafından bildirilmiştir (7). *F. vulgare* Miller uçucu yağının bir bileşiği olan fenkon molekülünün, bu çalışmada gösterilen antienflamatuvar etkisi, Özbek'in çalışması ile paralellik göstermektedir. Fenkonun tek başına % 70.60 oranında yaptığı inhibisyona karşılık, *F. vulgare* uçucu yağ ekstrelerinin % 56.78 oranında inhibisyon yapması, *F. vulgare* uçucu yağ içerisindeki diğer bileşiklerin (alfa-pinen, limonen, trans-anetol vs. gibi) birbirlerinin etkisini kısıtladığı yönünde yorumlanabilir.

F. vulgare Miller ve fenkonun antienflamatuvar etkinliği ile ilgili başka bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Farklı merkezlerde bu konuda yapılacak başka çalışmalar da aynı sonucu verdiği takdirde fenkon molekülünün antienflamatuvar etkili bir ilaç adayı olarak farmakolojik ve toksikolojik yönden faz çalışmalarına başlanıp ülkemiz adına yeni bir antienflamatuvar ilacın piyasaya sürülmesi umut edilebilir.

Sonuç olarak (1R)-(-)-fenkonun LD₅₀ dozunun 0.943 ml/kg olduğu, indometazinden daha zayıf olmakla birlikte anlamlı seviyede antienflamatuvar etkinliğe sahip olduğu (ED₅₀=0.133 ml/kg) söylenebilir.

KAYNAKLAR:

1. Campbell WE, Gammon DW, Smith P, Abrahams M, Purves TD. Composition and antimalarial activity in vitro of the essential oil of *Tetradenia riparia*. *Planta Med* 1997; 63(3): 270-2.
2. Chiang LC, Ng LT, Cheng PW, Chiang W, Lin CC. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32(10): 811-6.
3. Lee HS. Acaricidal activity of constituents identified in *Foeniculum vulgare* fruit oil against Dermatophagoides spp. (Acari: Pyroglyphidae). *J Agric Food Chem* 2004; 52(10): 2887-9.
4. Chizzola R, Hochsteiner W, Hajek S. GC analysis of essential oils in the rumen fluid after incubation of *Thuja orientalis* twigs in the Rusitec system. *Research on Veterinary Science* 2004; 76: 77-82.
5. Lado C, Hajdu M, Farkas E, Then M, Taba G, Szentmihalyi K. Study on the transfer of components of *Aetheroleum carvi* and *Aetheroleum foeniculi* oils. *Fitoterapia* 2005; 76(2): 166-72.
6. Godwin DA, Michniak BB. Influence of drug lipophilicity on terpenes as transdermal penetration enhancers. *Drug Dev Ind Pharm* 1999; 25(8): 905-15.
7. Özbek H. The anti-inflammatory activity of the *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil and investigation of its median lethal dose in rats and mice. *Int J Pharmacol* 2005; 1(4): 329-31.
8. Özbek H, Uğraş S, Bayram İ et al. Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil: A carbon-tetrachloride induced liver fibrosis model in rats. *Scand J Lab Anim Sci* 2004; 31(1): 9-17.
9. Kouadio F, Kanko C, Juge M et al. Analgesic and antienflammatory activities of an extract from *Parkia biglobosa* used in traditional medicine in the Ivory Coast. *Phytother Res* 2000; 14: 635-7.
10. Litchfield JT, Wilcoxon FWJ. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmac Exp Ther* 1949; 96: 99-113.
11. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rats as an assay for antienflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 111: 544-7.
12. Rimbau V, Cerdan C, Vila R. Antienflammatory activity of some extracts from plants used in the traditional medicine of North-African countries (II). *Phytother Res* 1999; 13: 128-32.
13. Süleyman H, Demirezer LÖ, Kuruüzüm A et al. Antienflammatory effect of the aqueous extract from *Rumex patientia* L. Roots. *J Ethnopharmacol* 1999; 65: 141-8.
14. Vijayakumar CS, Viswanathan S, Reddy MK, Parvathavarthini S, Kundu AB, Sukumar E. Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid. *Fitoterapia* 2000; 71: 564-6.
15. Narayanan N, Thirugnanasambantham P, Viswanathan S, Vijayasekaran V, Sukumar E. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of ethanol extract of *Clerodendron serratum* roots in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 1999; 65: 237-41.