

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARELERDE PARASETAMOL İLE OLUŞTURULAN AKUT
ZEHİRLENMEDE *ANETHUM GRAVEOLENS* (DEREOTU)'İN
ETKİSİ**

**Hazırlayan
Serap KORKMAZ**

**Danışman
Prof.Dr. Feride KOÇ**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TYL-2016-6375
numaralı proje ile desteklenmiştir.**

**Ekim 2016
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Serap KORKMAZ

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI

“Farelerde Parasetamol İle Oluşturulan Akut Zehirlenmede *Anethum Graveolens* (Dereotu)’in Etkisi” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Serap KORKMAZ

Danışman
Prof.Dr. Feride KOÇ

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Gökhan ERASLAN

Prof. Dr. Feride KOÇ danışmanlığında **Serap KORKMAZ** tarafından hazırlanan “**Farelerde Parasetamol İle Oluşturulan Akut Zehirlenmede *Anethum Graveolens* (Dereotu)’in Etkisi**” adlı bu çalışma jüri tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

13/10/2016

JÜRİ:

Danışman: Prof. Dr. Feride KOÇ (Farmakoloji ve Toksikoloji AD.)



Üye : Prof. Dr. Bilal Cem LİMAN (Farmakoloji ve Toksikoloji AD.)



Üye : Yrd. Doç. Dr. Emre ARSLANBAŞ (Farmakoloji ve Toksikoloji AD.)



ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince her türlü bilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Feride KOÇ'a, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarım Prof. Dr. Gökhan ERASLAN, Prof. Dr. Cem Bilal LİMAN, Prof. Dr. Murat KANBUR, Yrd. Doç. Dr. Mürsel KARABACAK, Arş. Gör. M. Yasin TEKELİ'ye, Jüri üyeleri Yrd. Doç. Dr. Emre ARSLANBAŞ, Doç. Dr. Ebru YILDIRIM'a, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP)'ne, çalışmamı yürüttüğüm Deneysel Klinik Araştırma Merkezi (DEKAM) Yöneticileri, Çalışanlarına ve Biyolog A. Celil ÜNVER'e teşekkür ederim.

Serap KORKMAZ
Kayseri, Ekim 2016

FARELERDE PARASETAMOL İLE OLUŞTURULAN AKUT ZEHİRLENMEDE *ANETHUM GRAVEOLENS* (DEREOTU)'İN ETKİSİ

Serap KORKMAZ

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Ekim 2016

Danışman: Prof. Dr. Feride KOÇ

ÖZET

Parasetamol (PT), para aminofenol grubu bir ilaç olup yüksek dozda kullanıldığında zehirli metaboliti n-asetil-p-benzokuinonenimin şekillenmesi ile karaciğer dokusundaki okside lipidlere ve sülfidril gruplarına kovalent olarak bağlanarak hasara yol açmaktadır. *Anethum graveolens* (AG) ise günümüzde yaygın olarak tüketilen, uçucu yağlar ve antioksidan maddelerce zengin aromatik bir bitkidir. Bu bitki antiinflamatuvar, antiülseratif, antihiperlipidemik, antibakteriyel, antifungal ve antioksidan etkilere de sahiptir. Bu çalışmada PT ile deneysel akut karaciğer toksikasyonu oluşturulan farelerde, oluşan hasara karşı AG ekstresinin koruyucu etkilerinin olup olmadığının belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, 50 adet, 2 aylık, 20-25 gr ağırlığındaki Balb-c erkek fareler her grupta 10 hayvan olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Uygulamalar oral gavaj yoluyla gerçekleştirildi. I. gruptaki (kontrol grubu) hayvanlara 7 gün sadece izotonik sodyum klorür çözeltisi; II. gruptaki hayvanlara PT 400 mg/kg tek doz, III. gruptaki farelere PT+AG1 7 gün süreyle (100 mg/kg AG ve son ekstre uygulamasından 1 saat sonra 400 mg/kg PT), IV. gruptaki farelere PT+AG2 (200 mg/kg AG+PT 400 mg/kg), V. gruptaki farelere ise 200 mg/kg AG 7 gün süreyle oral gavaj yoluyla verildi. Son uygulamalardan 5 saat sonra ketamin ve ksilazin anestezi altında kalpten kan alındı. Servikal dislokasyon sonrası karaciğer ve böbrek dokuları alındı. Serum örneklerinde sitokin düzeyleri (interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-10 ve tümör necrosis factor- α) bazı biokimyasal enzimler (ALT, AST), dokularda lipid peroksidasyon parametreleri (MDA, SOD, GSH) ile karaciğer ve böbrek histopatolojik incelemeleri yapıldı.

Çalışmada, PT verilmiş gruplarda serum AST, ALT ile sitokin ve doku MDA düzeylerinde yükselme, SOD ve GSH seviyelerinde düşüş belirlenmiştir. Diğer taraftan, iki farklı dozda (100 ve 200 mg/kg) ekstre alan grupları, sadece PT uygulanmış gruplar ile karşılaştırdığımızda, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, AG uygulamasının serumda IL-1 β , IL-10, IL-6, TNF- α , ALT ve AST düzeylerini azalttığı tespit edilmiştir. AG uygulanan grupların dokularında ise MDA düzeyinin azaldığı, GSH ve SOD'nin ise yükseldiği ve doza bağlı olarak değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Histopatolojik bulgular biyokimyasal bulgular ile uyumlu bulunmuştur. Sonuç olarak, AG uygulaması farelerde PT ile indüklenen akut karaciğer ve böbrek toksikasyonunda, oksidatif stresi, sitokin cevabını etkileyerek organ hasarını önlemektedir.

Anahtar Kelimeler: Fare, *Anethum graveolens*, Parasetamol, Lipid Peroksidasyon, Zehirlenme.

**THE PROTECTIVE EFFECTS OF *ANETHUM GRAVEOLENS* IN
PARACETAMOL-INDUCED ACUTE TOXICATION IN MICE**

Serap KORKMAZ

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Veterinary Pharmacology-Toxicology

Master of Science, October 2016

Supervisor: Prof. Dr. Feride KOÇ

ABSTRACT

Parasetamol (PT), para aminophenol group is a drug and cause damage on liver tissue by bonding covalently to oxide lipids and sulphidril groups when used in high doses with formation of its toxic metabolite n-asetil-p-benzokuinonimin. *Anethum graveolens* (AG) is an aromatic plant rich-essential oils and antioxidant substances, it has been widely consumed, nowadays. The plant has also antiinflammatory, antiulcerative, antihyperlipidemic, antibacterial, antifungal and antioxidant effects. The purpose of this study is to determine whether the protective effect of the AG extract against experimental liver acute toxication formed by PT in mice. For this purpose 2 months old, 20-25 g weight Balb-c male mice of 50 divided into 5 groups which each contain 10. Applications were made by oral gavage. Group I is designated as the control group and isotonic NaCl given for 7 days, Group II of animals 400 mg/kg a single dose PT applied orally, Group III is PT+AG1 (100 mg/kg AG given for 7 days and 1 hours after last extract application 400 mg/kg PT given, Group IV is PT+AG2 (200 mg/kg AG+PT 400 mg/kg), Group V. AG2 (200 mg/kg AG were given orally for 7 days. About 5 hours after these applications the blood was taken from heart under ketamin and xylazine anesthesia; liver and kidney tissue were taken after cervical dislocation. Assessments were performed serum cytokine levels (interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor- α), some biochemical enzymes (ALT, AST), lipid peroxidation levels in tissues (MDA, SOD, GSH) with liver and kidney histopathological examinations. In our study, it is determined that AST, ALT, cytokine and tissue MDA levels increased, SOD and GSH levels decreased in PT group. On the other hand, when we compare the groups received two different doses (100 and

200 mg/kg) of extract with only PT applied group, AG application significantly decreased IL-1 β , IL-10, IL-6, TNF- α , ALT and AST levels in serum. It is determined that MDA level decreased, and GSH and SOD levels increased depending on dose. Histopathological findings are consistent with biochemical findings. As a result, AG applications can prevent organ damage via affected cytokine answer and oxidative stress in PT-induced acute liver and kidney toxications in mice.

Key Words: Mice, *Anethum graveolens*, Paracetamol, Lipid peroxidation, Toxication.

İÇİNDEKİLER

KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
ONAY.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. PARASETAMOL.....	2
2.1.1. Parasetamolün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	3
2.1.2. Parasetamolün Emilimi ve Dağılımı.....	3
2.1.3. Parasetamolün Mekanizması.....	4
2.1.4. Parasetamol ile Zehirlenmenin Klinik Tablosu.....	5
2.1.5. Zehirlenmenin Tanısı.....	6
2.1.6. Parasetamol Zehirlenmesinde Tedavi Yöntemleri.....	7
2.1.7. Parasetamolün Analitik Toksikoloji.....	8
2.2. <i>ANETHUM GRAVEOLENS</i>	8
2.2.1 <i>Anethum Graveolens</i> 'in Kimyasal Özellikleri.....	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	12
3.1. CİHAZ, MALZEME VE KİMYASALLAR.....	12
3.1.1. Cihaz ve Malzemeler.....	12

3.1.2. Kimyasallar.....	13
3.1.3. Ekstre hazırlanması	13
3.2. YÖNTEM.....	13
3.2.1. Hayvan Materyali	13
3.2.2. Gruplar.....	13
3.2.3. Biyokimyasal Analizlerin Yapılması	14
3.2.3.1. Karaciğer ve böbrek dokularının homojenizasyonu ve MDA, SOD ve GSH düzeylerinin belirlenmesi	14
3.2.3.3. Serum ALT ve AST Düzeylerinin Belirlenmesi	22
3.2.4. Histopatolojik Değerlendirme	22
3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme.....	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. Biyokimyasal Bulgular.....	24
4.2. Histopatolojik Bulgular	27
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	31
6. KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR VE SİMGELER

PT:	Parasetamol
AG:	<i>Anethum graveolens</i>
IL-6:	İnterleukin-6
IL-1 β :	İnterleukin-1 β
IL-10:	İnterleukin-10
TNF- α :	Tümör necrosis factor- α
HE:	Hemotoksilen eozin
GSH:	Glutasyon
SOD:	Superoksit dismutaz
MDA:	Malondialdehit
GOT:	Glutamik oksaloasetik transaminaz
GPT:	Glutamik piruvik transaminaz
ALT:	Alanin transferaz
AST:	Aspartat aminotransferaz
AMDS:	Allil metil disülfid
ATZ:	Aminotriazole

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1: <i>Anethum graveolens</i> 'in uçucu bileşenlerinin gaz kromatografi-kütle spektrofotometresi yöntemiyle analizi	10
Tablo 2: <i>Anethum graveolens</i> in tohumları, yaprakları ve köklerinin fitokimyasal analizi.....	12
Tablo 3: Gruplar ve uygulanan maddeler	14
Tablo 4: <i>Anethum graveolens</i> ekstresinin fare karaciğer dokularında MDA, SOD ve GSH düzeyleri üzerine etkileri.	24
Tablo 5: <i>Anethum graveolens</i> ekstresinin fare böbrek dokularında MDA, SOD ve GSH düzeyleri üzerine etkileri.	25
Tablo 6: <i>Anethum graveolens</i> ekstresinin fare serumlarındaki IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α üzerine etkileri.	26
Tablo 7: <i>Anethum graveolens</i> ekstresinin fare serumlarındaki ALT ve AST üzerine etkileri.	27

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1:** Parasetamol ve n-asetil benzokuinonimin kimyasal formülasyonu 3
- Şekil 2:** Parasetamolün Mekanizması 4
- Resim 1:** Kontrol grubu fare karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü.....28
- Resim 2:** Parasetamol grubundaki fare karaciğerinde konfluent nekroz29
- Resim 3:** PT+AG1 grubu fare karaciğerinde belirgin nekroz ve kanama alanları.....29
- Resim 4:** PT+AG2 grubu fare karaciğerlerinde nekroz alanları30
- Resim 5:** AG2 grubu fare karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü.....30

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karaciğer hasarının en bilinen nedenlerinden biri de yüksek dozda parasetamol (PT) alımıdır. Sonuçta karaciğer için zehirli n-asetil-p-benzokuinonenimin şekillenmesi ve oluşan bu metabolit karaciğer dokusundaki okside lipidlere ve sülfidril gruplarına kovalent olarak bağlanarak hücre zarlarında şiddetli hasara yol açmaktadır (1-5). Karaciğeri koruyucu olarak ilaç ve bitkisel kaynaklı maddelerin kullanımına yönelik araştırmalar popülerliğini halen korumaktadır.

Anethum graveolens (AG) (dereotu) günümüzde hem dünyada hem de ülkemizde yaygın olarak tüketilen bir bitkidir. Uçucu yağlar ve antioksidan maddelerce zengin aromatik bir bitki olan AG, antiinflamatuvar (6,7), antiülseratif (8), antihiperlipidemik (9), antibakteriyel (10,11,12), antifungal (13,14), antidiyabetik (15,16), antioksidan (17,18), antikonvulzan (19) ve dişi üreme sistemi (20) üzerine olumlu etkilere de sahiptir. Bu güne kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde, AG ekstresinin deneysel olarak indüklenerek karaciğer hasarı oluşturulan farelerde, karaciğer ve böbreklerde oksidasyona, sitokin ve enzim düzeylerine etkilerine yönelik histopatolojik ve biyokimyasal yönden bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışma ile model olarak kullanılan deney hayvanları sonuçları üzerinden yorumlamalar yapılarak, başta insanlar olmak üzere tüm canlılarda karaciğeri koruyucu olarak yeni bir farmakolojik ajanın kullanımını hedeflendi.

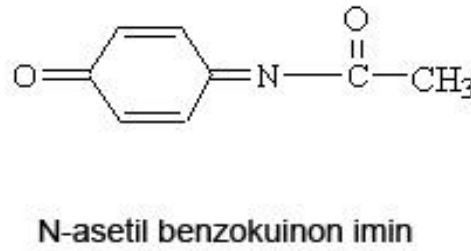
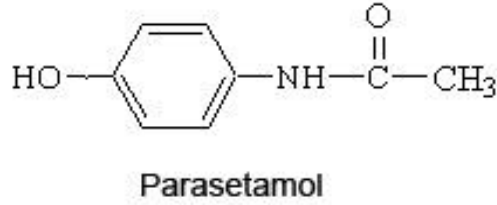
Bu çalışmada, PT ile deneysel akut karaciğer toksikasyonu oluşturulan farelerde, oluşan hasara karşı AG ekstresinin koruyucu etkilerinin olup olmadığını belirlenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. PARASETAMOL

Bir para aminofenol türevi olan PT, 19. asrın sonlarından itibaren antipiretik olarak tedavide kullanılmaya başlanmıştır. İlaç, hafif ve orta şiddetli ağrılarda ve ateşin düşürülmesinde yaygın olarak kullanılan, tedavi dozlarında oldukça güvenli bir ilaç olarak bilinmektedir (21). Yüksek dozda kullanıldığında ise karaciğer nekrozu, böbrek toksisitesi ve hatta ölüme neden olduğu deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (22). Tek başına veya kombine olarak çoğu ağrı kesici ve ateş düşürücünün içerisinde bulunmaktadır. PT'nin farmasötik şekilleri çoğu zaman tablet, süspansiyon, tek kullanımlık toz ve suppozituar şeklindedir. Ayrıca kafein, fenasetin, efedrin, pseudoefedrin, kodein, antihistaminikler vb. gibi ilaçlarla kombine edilmiş preparatlarla grip tedavisinde de kullanılmaktadır (23).

2.1.1. Parasetamolün Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 1. Parasetamol ve n-asetil benzokuinonimin kimyasal formülasyonu (24).

Parasetamol, diğer bir adıyla asetaminofenin formülü C₈H₉NO₂, molekül ağırlığı 151,2 g/mol, suda çözünürlüğü az, sentetik yapıda bir bileşiktir. Bu madde zayıf bir asit olması nedeniyle noniyonize şekildedir (25) ve para aminofenol türevi olan fenasetinin metabolitlerinden biridir. Erime noktası 170 °C, yoğunluğu 21 °C'de 1.293 g/cm³'dür (26). 4-hidroksi asetanilit veya n-asetil-p-aminofenol olarak da bilinen kokusuz, beyaz, acımsı bir tadı olan kristal tozdur (27).

2.1.2. Parasetamolün Emilimi ve Dağılımı

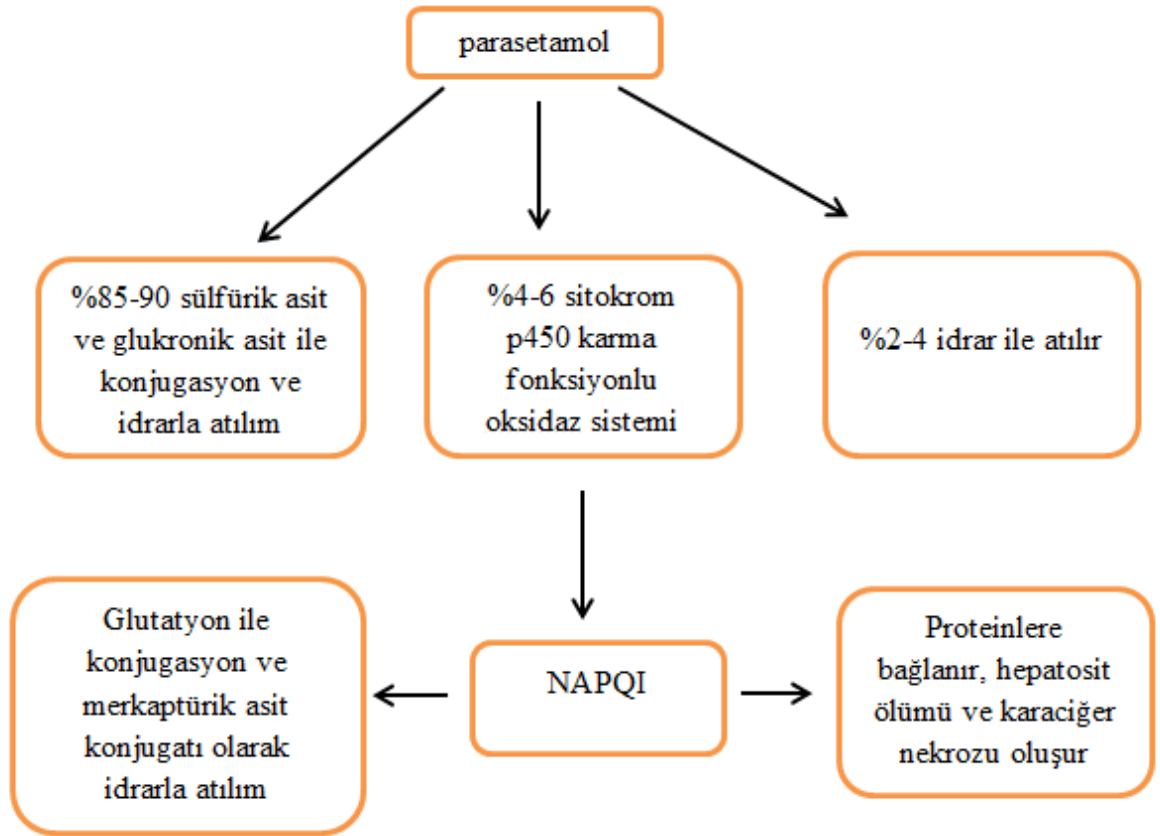
Parasetamol ağızdan alındığında gastrointestinal sistemde hızlı bir şekilde emilir ve etkisi hızla başlar (28). Yaklaşık 30-60 dakikada terapötik serum düzeyine ulaşır. Analjezik etkisi 3-4 saat kadar devam eder ve plazma yarılanma ömrü yaklaşık 2 saat tir. Yüksek dozda alındığında 2-4 saat içinde plazma pik yoğunluğu oluşur ve % 98'i karaciğerde metabolize olur, % 2'de oranında idrarla değişmeden atılır (29).

Normal dozda eliminasyon ile yarılanma ömrü 2,5 saat iken aşırı dozda ise eliminasyonu 7,5 saate kadar çıkabilir. Gastrointestinal sistemde toksin oluşturma ihtimalinin düşüklüğü göz önünde tutularak antiinflamatuvar analjeziklerin düşük dozları ile parasetamol tam dozda kombine edilmektedir (30). Yapılan çalışmalarda en yüksek ilaç konsantrasyonunun karaciğer, böbrek ve gastrointestinal kanalda olduğu

rapor edilmiştir. Beyine geçiş diğer dokulara oranla çok daha yavaştır ve ilacın çok küçük bir kısmı ise eritrositlere de bağlanmaktadır. Parasetamolün rektal yoldan da emilimi de vardır (31, 32).

2.1.3. Parasetamolün Mekanizması

Normal dozda alınan parasetamolün büyük bir kısmı sülfat ve glukuronik asitle birleşme tepkimeleriyle metabolize olur; çok az bir kısmı da karaciğer sitokrom P-450 enzimleriyle oksidasyon tepkimelerine maruz kalır ve karaciğer için zehirli n-asetil-p-benzokuinonenimin oluşmasına neden olur. Karaciğerde oluşan zehirli oksidasyon metabolitleri, sülfidril grupları içeren glutasyonla birleşerek idrarla atılan zehirsiz metabolitlere dönüşür (Şekil 2) (33). Fakat yüksek dozda alınan parasetamol, glutasyonun n-asetil-p-benzokuinonenimini etkisizleştirme kapasitesini sınırlandırır ve karaciğerde glutasyon depoları tükenir. Yüksek dozda alınan parasetamol karaciğerde öncelikle sülfasyon ve glukuranidasyon tepkimeleriyle reaktif olmayan metabolitlere dönüşür ancak bu metabolitler karaciğer sitokrom P-450 enzim sistemi ile karaciğer üzerine zehirli bir reaktif metabolite (n-asetil-p-benzokinonimin) dönüşmektedir. Oluşan metabolit karaciğer dokusundaki okside lipidlere ve sülfidril gruplarına kovalent olarak bağlanarak hücre zarlarında şiddetli hasara yol açmaktadır (1-5). Hepatotoksisite, glutamik oksaloasetik transaminaz (GOT) yükselmesi ile başlar, sonunda bilirubin yükselmesi ve protrombin zamanı uzamasına kadar ilerler. Hepatik hasara bağlı olarak parasetamolün yarı ömrü de uzamaya başlar. Yapılan çalışmalarda alımından yaklaşık 4 saat sonra oluşan ilaç serum düzeyi ile GOT yükselmesi arasında korelasyon olduğu ifade edilmiştir (29).



Şekil 2. Parasetamolün Etki Mekanizması (33).

2.1.4. Parasetamol ile Zehirlenmenin Klinik Tablosu

Parasetamol toksikasyonunda en çok etkilenen organlar karaciğer ve böbreklerdir. Karaciğerde P-450 oksidasyon sistemiyle açığa çıkan reaktif metabolit glutasyonda konjuge edilir. Glutasyonun azalması sonucunda konjuge olamayan ara metabolit karaciğer ve böbrek tubul hücrelerinde nekroz oluşturur. Hastalarda klinik tabloda 4 evre izlenir (29).

1. Evre: Bu evrede 6. saatte kusma başlar ve 14. saatte tüm belirtiler gözlenir; GOT, glutamik piruvik transaminaz (GPT), bilirubin, protrombin zamanı normal düzeydedir (29,34).

2. Evre: 24. saatten sonra genel durum bozukluğu düzelmeye başlar. Bulantı, kusma, terleme azalır veya tamamen ortadan kalkar. Ancak karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma gözlemlenir. Karaciğerin boyutunda ve hassasiyetinde artış olabilir (29,35,36).

3. Evre: Bu evre 48-96 saat arasını kapsar. Aşırı dozda alımlarda GOT çok yükselebilir. Hepatotoksisite oluşur ve histolojik bakıda karaciğerde sentrilobuler nekroz gözlemlenir (29,37). Akut parasetamol zehirlenmelerinde görülen karaciğer hasarından n-asetil-p-benzokinoniminin sorumlu olduğu bilinmektedir (38,39). Karaciğer yetmezliği ile birlikte hipotermi ve nörolojik bozukluklar ortaya çıkar.

4. Evre: Alımdan 7-8 gün sonra GOT yüksek olsa bile karaciğer fonksiyonları düzelir. Renal fonksiyonlarda bozulmalar bu devrede görülebilmektedir (29). Semptomların ve karaciğer fonksiyon enzimlerinin yavaş yavaş düzeldiği gözlenir ancak tam düzelme 3 ay kadar sürebilir (35,40).

Parasetamolün 300 mg/kg ve üzerindeki dozları farelerde de şiddetli akut karaciğer nekrozuna yol açtığı bildirilmiştir (41,42). Parasetamol zehirlenmelerinde karaciğer GSH depolarının da tükendiği bildirilmektedir (39). Farelerde parasetamolün oksidasyonunun azaltılması ve GSH sentezinin uyarılmasının, parasetamolün zehirliliğini azalttığı ortaya konmuştur (43). Vücutta GSH depolarının tükenmesi direkt olarak GSH aracılığı ile oksidatif strese sebep olabileceği gibi, dolaylı olarak antioksidan enzim aktivitesinin azalması da aynı yönde etki oluşturur (44,45). Yapılan literatür incelemelerinde, hayvanlarda parasetamole bağlı karaciğer hasarında GSH-Px ve tiyol transferaz enzim aktivitelerinde azalma gözlemlendiği bildirmektedirler (46,47).

2.1.5. Zehirlenmenin Tanısı

Toksik doz genellikle 140 mg/kg c.a. ve üzeri olarak kabul edilirken yapılan araştırmalarda 250 mg/kg c.a. ve üzeri dozda karaciğer hasarının geliştiği 350 mg/kg c.a. aşıldığında şiddetli karaciğer toksisitesi olduğu görülmüştür (29,41,42).

- a) Serum parasetamol düzeyinin ölçülmesi: İlaç alımında 4 saat içerisinde alınan serumdan PT düzeyine göre karar verilir.
- b) İdrardan tespit yöntemi: Parasetamol tayini hasta idrarında ekstraksiyon ölçümü ile yapılır.
- c) Karaciğer biyopsisi: Normal yapı bozulmuş, hepatositler normalden daha şişkin ve hepatoselluler nekrozun şekillenmiş olduğu görülür.
- d) Diğer laboratuvar testleri: 2. günden itibaren karaciğer fonksiyon testlerine bakılabilir. İlk olarak GOT seviyesi yükselir ardından GPT, bilirubin seviyesinde ve protrombin zamanında uzama belirlenir. Karaciğer yetmezliği ilerledikçe hipoglisemi, amonyak seviyesinde ve alkalin fosfatazda yükselme

şekillenir. Yoğun parasetamol zehirlenmesinde ise koma durumu ve erken metabolik asidoz gözlenebilir (29).

2.1.6. Parasetamol Zehirlenmesinde Tedavi Yöntemleri

- a) Gastrointestinal sistem dekontaminasyonu: Parasetamol yüksek doz alınımında ilk olarak bağırsak dekontaminasyonu düşünülse de rutin kullanımı önerilmez. Hastaya kusturmaya yönelik yardımcı girişimler yapılabilir. İpeka ile kusturulan hastaya ilk kusma başlamadan aktif kömür kullanılmamalıdır. Aktif kömür kusma sonrası ya da mide lavajı sonrası uygulanmalıdır (48).
- b) Metabolik aktivasyonun durdurulması: Parasetamol alımında glutasyonun baskılanması nedeniyle hepatotoksisite olduğu için P-450 oksidaz enzim sistemi bloke edilirse toksik metabolit oluşumu engellenmiş olur. Bu amaçla etanol ve simetidin hayvan deneylerinde kullanılmıştır (29).
- c) Diğer koruyucu maddeler: Hayvan deneylerinde E vitaminin parasetamole bağlı hepatotoksisiteyi önlediği belirtilmiştir. C vitaminin ise parasetamolun hepatik mikrozomlara bağlanmasını azalttığı ve n-asetil-p-benzokuinoniminin parasetamole tekrar redükte olmasını hızlandırdığı belirtilmiştir (31,33). Parasetamol zehirlenmelerinde bazı hayvansal kaynaklı doğal ürünlerin yararlı etkileri olduğu bildirilmektedir. Yedi gün boyunca 10 ve 25 mg/kg dozda propolis ve ardından 400 mg/kg dozda parasetamol verilen farelerde ölüm oranının ve hepatik nekrozun şiddetinin azaldığını, propolisin ve benzer bir başka çalışmada ise arı sütünün karaciğer hasarına ve hücre ölümlerine karşı koruyucu etkileri olabileceğini belirtmişlerdir (49,50,51).
- d) Antidotol tedavi: Tedavide ideal antidot glutasyondur. Parasetamolle zehirlenmelerde glutasyon depolarının tükenmesinden hareketle, tedavide n-asetil sistein gibi glutasyon öncüsü maddeler kullanılmaktadır (50). Farelerde 400 mg/kg dozda verilen parasetamolün karaciğer hasarına neden olduğunu, 7 gün boyunca 200 mg/kg/gün dozda verilen asetil sisteinin parasetamol ile şekillenen karaciğer hasarının göstergesi olan bazı biyokimyasal ve lipid peroksidasyon göstergelerinde düzelme sağladığını; asetil sisteinin parasetamol ile oluşan karaciğer hasarı üzerinde kısmen koruyucu etkiler gösterdiği tespit edilmiştir (40,42).

- e) Diğer tedavi yöntemleri: Hipotermi önlenir, kanamalar varsa taze plazma, vitamin K uygulanır. Sıvı elektrolit takviyesi yapılabilir, hipoglisemiye karşı uygun dekstroz solüsyonları verilir, metabolik asidozu önlemek için bikarbonat tedavisi yapılabilir (29).

2.1.7. Parasetamolün analitik toksikolojisi

Parasetamol izolasyonu kan ve idarda yapılabilir. Asit ya da nötr ortamda organik solventlerle (etilasetat, kloroform) ekstraksiyonu doğrudan ya da Stas-Otto yöntemiyle yapılabilmektedir. Daha sonra da aşağıdaki testler yapılarak nicelik ölçümleri gerçekleştirilir.

1. Kolorimetri
2. Spektrofotometre
3. Floresan polarizasyon tekniği
4. Gaz kromatografisi
5. Yüksek performanslı likit kromatografisi (29)

2.2. DEREOTU (*ANETHUM GRAVEOLENS*)

Günümüzde üretilen ilaçların yaklaşık % 25'i bitkisel kaynaklıdır. Bundan dolayı bitkisel kaynaklı ilaçların önemi oldukça artmıştır. Tıbbi bitkilerin canlı sistemler üzerinde sedatif, analjezik, antipiretik, kardiyoprotektif, antibakteriyel, antifungal ve antiviral gibi pek çok etkileri çalışmalarla ortaya konulmuştur (52,53). Bitkiler serbest radikalleri nötralize ederek, oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri ile bağlantılı bir çok kronik hastalığın ilerlemesini önlemektedir (53,54). Hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkilerinin çok olması bitkilere olan ilgiyi her geçen gün arttırmaktadır. Bu tür bitkilerin ilaç olarak tercih edilmesinin en önemli sebebi ilaçlara göre daha az toksik etkiye sahip olmalarıdır. Bu kapsamda, *Anethum graveolens* adlı bitki türü son yıllarda geniş çapta birçok araştırmaya konu olmuştur (6-20,55). Maydonozgiller (*Apiaceae*) ailesinden olan bu bitkinin botanik sinonimi *Peucedanum graveolens*'dir ve orijini Orta Asya'dır. Dereotu kısa ömürlü, aromatik, kokulu bir bitkidir fakat kurutulma yada ısıtılma işleminden sonra esansiyel yağlarının parçalanmasından dolayı aromatik ve koku özelliklerini kaybederler. Bu bitkinin medikal alandaki kullanımı Yunan ve Mısır medeniyetlerine kadar dayanmaktadır. Mısırlılar bu bitkiyi kozmetik ve parfüm yapımında kullanmışlardır. Bu aromatik bitki, turşu, salata, sos, ve çorba gibi mevsimlik tüketilen yiyeceklere tat vermesi için de kullanılmaktadır (56,57). Dereotu yağı;

çekirdeğinden, yaprağından ve bitkinin köklerinden üretilmekte ve bu yağ yiyecek sanayinde önemli boyutlarda kullanılmaktadır (56,58). Halk arasında ağız kokusunun giderilmesi, anne sütünün artırılması, idrar yolu hastalıkları, mide-bağırsak hastalıkları, hemoroit ve ruhsal hastalıkların tedavisi amacıyla tüketilmektedir (59,60). Bu güne kadar AG ile ilgili yapılan araştırmalar incelendiğinde, antioksidan nitelikli fitokimyasalları (yüksek oranda uçucu yağlar, flavonoidler, fenolik bileşikler vb.) içerdiği ve canlılarda oksidatif stresi azalttığı rapor edilmektedir (17,18,53,60). AG, antiinflamatuar (6,7), antiülseratif (8), antihiperlipidemik (9), antibakteriyel (10,11,12), antifungal (13,14), antidiyabetik (15,16), antioksidan (17,18), antikonvulzan (19) ve dişi üreme sistemi (20) olumlu etkileri ortaya konulmuştur. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, AG ekstresinin farelerde PT ile oluşturulmuş akut karaciğer toksikasyonunda etkilerinin belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan bu araştırmada PT ile indüklenerek oluşturulan akut karaciğer toksikasyonunda farelerde AG ekstresinin karaciğer koruyucu etkileri olup olmadığı ortaya konulmuştur.

2.2.1 *Anethum graveolens* kimyasal özellikleri

Yapılan araştırmalar, dereotu bitkisinin fitokimyasal yapısında 40 farklı uçucu bileşene sahip olduğunu gösterilmiştir (Tablo 1) (61). *Anethum graveolens*'in tohumları, yaprakları ve köklerinin fitokimyasal analizi Tablo 2'de gösterilmiştir. Terpenler dereotu bitkisinde en fazla görülen uçuculardır (56). Dereotu yağında gaz kromatografisi ile tanımlanan bileşiklerin yüksek oranda karvon ve limonen içerdiği rapor edilmektedir. Yapraklarda ana bileşenleri α -fellandren (% 62,71), limonen (% 13,28) ve anethofuran (% 16,42) olarak belirlenmiştir. Çiçeklerin ana bileşenleri α -fellandren (% 30,26), limonen (% 33,22), ve anethofuran (% 22) şeklindedir (61). Polifenoller, serbest radikalleri nötralize ederler, peroksitleri azaltırlar ve bu antioksidan aktiviteleri ile fenolik bileşiklerin miktarı arasında pozitif bir ilişki olduğu belirtilmektedir (63,64,65).

Tablo 1: *Anethum graveolens*'in uçucu bileşenlerinin gaz kromatografi-kütle spektrofotometresi yöntemiyle analizi (61).

Sıra No	KI	Alan (%)	Tespit edilen bileşik	Sıra No	KI	Alan (%)	Tespit edilen bileşik
1	933	1,43	α -Pinene	21	1480	0,45	Gremacene
2	1002	1,95	δ -2-Carane	22	1496	0,3	(Z)-Dihydroapofarnesol
3	1014	4,63	α -Phellandrene	23	1512	0,37	γ -Cadinene
4	1017	5,44	α -Terpinene	24	1527	0,25	Vetinene
5	1040	0,74	Trans β -ocimene	25	1540	0,25	α -Calacorene
6	1067	1,98	Sabinene	26	1553	0,25	Elemicin
7	1080	2,13	p-Cymene	27	1566	0,26	Caryophyllene alcohol
8	1110	0,97	Camphenol	28	1577	0,28	Spathulenol
9	1122	0,85	Cis-pinene hydrate	29	1648	0,69	β -Eudesmol
10	1143	1,07	Camphor	30	1675	0,14	Androencocalinol
11	1160	13,9	Limonene	31	1684	6,81	Epi- α -bisabolol
12	1205	0,83	Para-cymen-9-ol	32	1758	2,25	(E)-Nuciferol
13	1307	0,93	Iso-vebranol acetate	33	1760	2,5	β -Bisabolen-12-ol
14	1315	0,29	Terpinly acetate	34	1773	1,57	(E)- α -atlantone
15	1320	0,51	Dihydro citronellal acetate	35	1797	14,28	I-Carvone
16	1356	0,73	Eugenol	36	1808	2,12	Cryomeridiol
17	1389	0,58	Cubebene	37	1905	1,63	2-Phenylethyl-phenyl acetate
18	1418	0,47	(E)-Caryophyllene	38	1990	0,28	4-Methyl stilbene
19	1442	0,56	γ -Patchoulene	39	2136	0,51	Osthol
20	1462	0,38	Allo-aromadendrene	40	2234	24,43	7- α -hydroxy manool

KI: Kovalent indexi

Tablo 2: *Anethum graveolens* 'in tohumları, yaprakları ve köklerinin fitokimyasal analizi (56).

Metaboliti	Tohumlar	Yapraklar	Kökler
Tannin	+	+	+
Terpenoid	+	+	+
Saponin	+	-	+
Steroid	-	+	+
Flavanoid	+	+	+
Phylobatannin	-	-	-
Cardiac-glycoside	+	+	+
Antraquinone	+	-	-

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. CİHAZ, MALZEME VE KİMYASALLAR

3.1.1. Cihaz ve Malzemeler

1. Mouse IL-1 β platinum ELISA kit (eBioscience, BMS 6002, Farmasina, İstanbul)
2. Mouse IL-6 platinum ELISA kit (eBioscience, BMS 603/2, Farmasina, İstanbul)
3. Mouse IL-10 platinum ELISA kit (eBioscience, BMS 614/2, Farmasina, İstanbul)
4. Mouse TNF- α ELISA kit (İnvitrogen, Life tech, KMC3011, Lokus, Kayseri)
5. TBARS assay kit (elabscience, BC0184, Atlas med, Ankara)
6. SOD assay kit (elabscience, BC0020, Atlas med, Ankara)
7. GSH assay kit (Oxford biomed res, GT20, Ardi med, İstanbul)
8. Enjektör (21G)
9. Vakumlu kan alma tüpü 5 ml jelli
10. Ependorf tüp (mikrosanrifüj, 1,5 ml, 2 ml)
11. Vorteks (Heidolph Reax top)
12. Santrifüj (Sigma 3K30)
13. Deiyonize su cihazı (Millipore Milli-DI)
14. Derin dondurucu (Sanyo Ultra-MDF-U3086S -80 °C)
15. Buz dolabı (Profilo BD 2663TM)
16. Otomatik pipet ve uçları (Finnpipette 10-100 μ l, 100-1000 μ l, 1-10 ml)
17. Hassas terazi (Santorius BP121S)
18. Plate çalkalayıcı (Heidolph Rotomax 120)
19. ELISA microplate reader (Biotek synergy H1 reader)
20. ELISA Plate Yıkayıcı (Bio-Tek ELx 50)
21. Soğutmalı Santrifüj cihazı (Hettich 38 R)
22. Homojenizatör (MRC-HOG 24)
23. Işık mikroskobu (Olympus BX52 with DP72 camera system)
24. Rotary evaporatör (Büchi rotavapor R-200)
25. İnkubatör (Memmert WB-100 wnb-14)
26. pH metre (Mettler Toledo)
27. Rutin laboratuvar malzemeleri.

3.1.2. Kimyasallar

1. % 10'luk formol
2. Ksilazin (Rompun, Bayer)
3. Ketamin (Ketalar, 500 mg enjektabl 1 flakon)
4. Parasetamol (99,99999 saflık) (Dođa ila, İstanbul)
5. Bitki ekstresi (elde ediliŖi detaylı olarak 3.1.3.'de aıklanmıŖtır).

3.1.3. Ekstre hazırlanması

Kayseri civarındaki marketlerden temin edilen taze dereotunun tüm kısımları (yaprak ve kök) gölgede, havadar bir ortamda kurutuldu. Daha sonra toz edilerek 40 °C'de 4 saat geri çeviren soğutucu altında metanol ile ekstrakte edildi. Eksrakt süzölüp, süzöntü rotary evaporatörde yođunlaŖtırıldı. Elde edilen ekstre +4 °C'de muhafaza edildi ve hayvanlara verilmeden önce distile su ile çözüldü.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hayvan Materyali

alıŖmada, 50 adet 2 aylık 20-25 g ağırlığındaki Balb-c erkek fareler kullanıldı. Fareler Erciyes Üniversitesi DEKAM'dan temin edildi ve alıŖma burada gerekleŖtirildi. Hayvanlar deney öncesi gruplar halinde laboratuvarda normal oda sıcaklığında (22 °C), uygun Ŗartlarda, yeterli yem ve su verilerek barındırıldı. Hayvan deneyleri, Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu kararlarına (Etik Rapor No:15/128) uygun olarak gerekleŖtirildi.

3.2.2. Gruplar

Birinci gruptaki (kontrol grubu), 7 gün izotonik sodyum klorür çözeltisi oral yolla verildi. İkinci gruptaki farelere de 7 gün süreyle izotonik sodyum klorür çözeltisi oral yolla verildi ve son uygulamadan 1 saat sonra PT 400 mg/kg c.a. tek doz parasetamol oral yolla uygulandı. Üüncü gruptaki farelere 100 mg/kg c.a. oral yolla *Anethum graveolens* 7 gün süreyle verildi ve son ekstre uygulamasından 1 saat sonra PT 400 mg/kg parasetamol oral yolla verildi. Dördüncü gruptaki farelere 200 mg/kg *Anethum graveolens* oral yolla 7 gün süreyle verildi, son ekstre uygulamasından 1 saat sonra 400 mg/kg PT oral gavaj ile verildi. BeŖinci gruptaki farelere ise 200 mg/kg *Anethum graveolens* oral yolla 7 gün süreyle verildi. Son uygulamalardan 5 saat sonra tüm gruplardaki farelerden kalp punksiyonu ile kan örnekleri jelli tüplere alındıktan sonra

fareler servikal dislokasyonla ötanazi edilerek karaciğer ve böbrekleri alındı. Kanlar 4000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edilerek serumları çıkarıldı. Serumlar ELISA kitleri ile IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α düzeyleri ölçülerek sitokin etkinlik değerlendirilinceye kadar derin dondurucuda (-80 °C) saklandı. Bir kısım serumlar ise karaciğer fonksiyon enzimleri (ALT, AST) aktivitesi belirlenmek üzere +4 °C'de muhafaza edildi. Dokuların bir kısmı (karaciğer ve böbrek) MDA, SOD, GSH düzeylerinin belirlenerek antioksidan analizleri için derin dondurucuda (-80 °C) saklandı. Diğer kısım histopatolojik inceleme için % 10'luk formollu kaplara alındı.

Tablo 3. Gruplar ve uygulanan maddeler

Grup	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün	7.Gün
I.	0,09 NaCl (0,4 ml)	0,09 NaCl (0,4 ml)	0,09 NaCl (0,4 ml)	0,09 NaCl (0,4 ml)	0,09 NaCl (0,4 ml)	0,09 NaCl (0,4 ml)	0,09 NaCl (0,4 ml)
II.	0,09 NaCl (0,4 ml)	0,09 NaCl (0,4 ml)	0,09 NaCl (0,4 ml)	0,09 NaCl (0,4 ml)	0,09 NaCl (0,4 ml)	0,09 NaCl (0,4 ml)	0,09 NaCl (0,4 ml) + PT (0,45 ml)
III.	AG (100 mg/kg)	AG (100 mg/kg)	AG (100 mg/kg)	AG (100 mg/kg)	AG (100 mg/kg)	AG (100 mg/kg)	AG (100 mg/kg) +PT (0,45 ml)
IV.	AG (200 mg/kg)	AG (200 mg/kg)	AG (200 mg/kg)	AG (200 mg/kg)	AG (200 mg/kg)	AG (200 mg/kg)	AG (200 mg/kg) + PT (0,45 ml)
V.	AG (200 mg/kg)	AG (200 mg/kg)	AG (200 mg/kg)	AG (200 mg/kg)	AG (200 mg/kg)	AG (200 mg/kg)	AG (200 mg/kg)

AG: *Anethum graveolens*

PT:Parasetamol

NaCl: Sodyum klorür

3.2.3. Biyokimyasal Analizler

3.2.3.1. Karaciğer ve böbrek dokularının homojenizasyonu

Dokular homojenizasyon edilmeden önce PBS ile yıkandı. Daha sonra dokular porselen havanda sıvı azot ile parçalanmıştır. Daha sonra homojenize edilerek analiz için hazırlandı. Analizler kit prosedürlerine uygun olarak aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

Lipid peroksidasyon analizleri

a. MDA (TBARS) analizi

Doku örnekleri için; yaklaşık 20 mg doku için soğuk 200 μ l PBS (7,2 pH) eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Buz üzerinde homojenizatör ile dokular parçalandı. 1,5 ml'lik etiketlenmiş tüplere 100 μ l süpernatant konuldu.

Her 100 µl örnek için 200 µl TCA solüsyonu eklendi. Çalışmalar buz üzerinde yapılmıştır. Buz üzerinde 5 dk inkübe edildi. 14.000 rpm de 5 dk santrifüj edildi ve temiz 1,5 ml'lik eppendorflara süpernatant aktarıldı.

Analiz Protokolü

1. Su banyosu ya da ısıtıcı bloğu 100 °C'ye ayarlandı. Tüm bileşenleri oda sıcaklığına getirildi.
2. Standart 15 mM iken bunu 1,5 mM yapabilmek için; 45 µl standart+450 µl deiyonize su ile seyreltildi ve tekrar kullanmak için -20 °C 'de saklandı.
3. Standartlar 15 µl, 1,5 mM'lık MDA'dan alındı. Üzerine 750 µl ddH₂O ekleyip final 30 µM MDA oluşturuldu. Aşağıdaki tablo da gösterildiği gibi dilüe edildi.

Vida kapaklı tüplere 200 µl standartlardan eklendi.

<u>Tüp No</u>	<u>30 µM MDA+ddH₂O</u>	<u>Hacim (µL)</u>	<u>MDA (µM)</u>
1	300 µL+0 µL	300	30,0
2	180 µL+120 µL	300	18,0
3	90 µL+210 µL	300	9,0
4	0 µL+300 µL	300	0,0

Her bir örnekten 200 µl ayrı tüplere eklendi. Renk reaksiyonu için; standart ve örnek bulunan her tüpe 200 µl TBA reagent eklendi ve vorteks yapıldıktan sonra, 100 °C'de 60 dk bekletildi. Oda sıcaklığına gelen tüpler vorteks ve santrifüj yapıldı. 96 well plate'e dublike olacak şekilde her bir tüpten 100 µl yüklendi. 525-545 (535) nm'de ELISA'da okuma yapıldı.

b. SOD Analizi

Doku örneklerinin homojenizasyonu: Örnekler PBS ile yıkandı (pH 7,0-7,4). 1:9 oranında doku PBS solüsyonu kullanılarak buz üzerinde homojenizatör ile mekanik olarak parçalandı. 2500 rpmde 10 dk santrifüj edildi ve süpernatantlar eppendorflara alındı.

Bileşenler	Kör 1	Kör 2	Örnek	Kör 3
Örnek (µl)			20	20
ddH ₂ O (µl)	20	20		
Enzim çalışma solüsyonu (µl)	20		20	
Seyreltme solüsyonu (µl)		20		20
Substrat çalışma solüsyonu (µl)	200	200	200	200

Karışım 37 °C'de 20 dk boyunca inkübe edildi. Daha sonra 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

HESAPLAMA FORMÜLÜ:

$$\text{SOD AKTİVİTE (\% İNHİBİSYON ORANI)} : \frac{(A_{\text{kör1}} - A_{\text{kör2}}) - (A_{\text{örnek}} - A_{\text{kör3}}) \times 100}{A_{\text{kör1}} - A_{\text{kör2}}}$$

Doku örneği ile yapılan deneylerin hesaplama formülü: SOD aktivitesi (U/mg.protein):
% SOD inhibisyon oranı ÷ % 50 X reaksiyon sistemin çoklu dilüsyonu (0,24 ml /0,02 ml) ÷ Protein test konsantrasyon oranı (mg.protein/ml).

c. GSH Analizi

Doku örneklerinin homojenizasyonu; 1X PBS (pH 7,2) ile doku yıkandı. Kurutma kağıdında kurutuldu. Dokulardan 1 g alındı. Buz üzerinde % 5'lik MPA 10 ml eklendi. Homojenize edildi. Homojenatler 3000 rpm'de 4 °C'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant alındı.

- Her bir kuyucuğa dilue edilmemiş örnekler ile GSH standartından 50 µl eklendi.
- Her kuyucuğa 50 µl DTNB ve oksidoreduktaz solüsyonundan eklendi.
- Oda ısısında 10 dk inkübe edildi.
- Reaksiyonu başlatmak üzere her bir kuyucuğa 50 µl β-NADPH₂ eklendi.
- 0. ve 10. dakikalardaki 405-412 nm dalga boyunda ölçülerek sonuç belirlendi.

NADPH Hazırlanması: Şişenin içeriğini sulandırmak için 500 µl assay buffer eklenerek vorteks yapıldı, çözüldükten sonra 5,5 ml assay buffer eklenerek buz üzerine bırakıldı.

Oksidoreduktaz Hazırlanması: 30 µl oksidoreduktazın üzerine 6 ml assay buffer eklenerek ve buz üzerinde bırakılarak hazırlandı.

DTNB Hazırlanması: Şişenin içeriğini sulandırmak için 500 µl assay buffer eklenmiştir. Çözüldükten sonra 5,5 ml assay buffer eklenerek vorteks uygulanmıştır. Oda ısısında bırakıldı.

GSH çalışma solüsyon hazırlanması: 50 µl glutasyon standart ile 950 µl % 5 MPA eklendi ve vorteks uygulandı hazırlanan solüsyon buz üzerinde bekletildi.

STANDART HAZIRLAMA

Standart	Konsantrasyon GSH	% 5 MPA hacim (UL)	GSH çalışma stok solüsyonu
B0	0,0	1000	0
S1	0,5	995	5
S2	1,0	990	10
S3	2,5	975	25
S4	5,0	950	50
S5	10	900	100
S6	15	850	150
S7	20	800	200

Hesaplama: (10. dak. OD. değeri -0. dak. OD. değeri)/10

3.2.3.2. Serum Sitokin Düzeylerinin Belirlenmesi

Analizler kit prosedürlerine uygun olarak aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

a. IL-1β Analizi

Anti-mouse IL-1β kaplı olan stripler +4 °C'de muhafaza edilmektedir. İlk olarak external standard dilüsyonu hazırlandı.

7 adet ependorf tüp S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 olarak isimlendirerek hazırlandı ve S1...S7'ye kadar 225 µl kadar sulandırıcı konuldu. Standart çözelti 440 µl distile su ile seyreltilerek S1'e 225 µl eklendi; ardından S1'den S2 ye 225 µl, S2'den S3'e 225 µl, S3'den S4'e 225 µl, S4'den S5'e 225 µl, S5'den S6'a 225 µl, S6'dan S7'e 225 µl, S7'den 225 µl (kullanılmamak üzere) boş ependorfa aktarıldı. İkili halde 7 adet standart ve en sonda da blank (kör) kuyucuğu bulunacak şekilde dizayn edildi. Sırasıyla dilusyonlardan (S1...S7) standard kuyucuklarına 100 µl konuldu üzerine de 100 µl sample diluent solüsyon eklendi, en sondaki blank'e 200 µl numune konuldu.

- Standard 1: 500,0 pg/ml
- Standard 2: 250,0 pg/ml
- Standard 3: 125,0 pg/ml
- Standard 4: 62,5 pg/ml
- Standard 5: 31,3 pg/ml
- Standard 6: 15,6 pg/ml
- Standard 7: 7,8 pg/ml
- Kör

Standardlar dışındaki örneklerin bulunduğu kuyucuklara serum örneklerinden 50 µl konuldu ve üzerine 50 µl çözücü solüsyon eklendi. Uygulamadan hemen sonra assay buffer (1-6 strip için 2,5 ml assay buffer konjugat+47,5 distile su) ve kullanımından yarım saat önce biotin konjugat (1-6 strip için 0,03 ml biotin konjugat + 2,97 ml assay buffer) hazırlandı. Her bir kuyucuğa 50 µl biotin konjugat eklenerek oda ısısında 2 saat inkubasyona bırakıldı. Inkubasyonun ardından streavidin HRP solüsyonu (1-6 strip için 0,03 ml streavidin-HRP+5,97 assay buffer) hazırlanmıştır. Daha önceden hazırladığımız yıkama solüsyonu (1-6 strip için 25 ml wash buffer solüsyonu+475 ml distile su) ile 4 kere yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından 100 µl streavidin-HRP (1-6 strip için 0,06 ml streavidin-HRP+5,94 ml assay buffer) solüsyonunda blankte dahil bütün kuyucuklara uygulandı ve oda ısısında 1 saat inkubasyona bırakıldı. Inkubasyonun ardından 4 kere yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi yapılarak bütün kuyucuklara 100 µl TMB substrat solüsyonu eklendi ve 10 dk karanlık inkubasyonunun ardından kuyucuklarda mavi renkler gözlemlendi. Son olarak 100 µl stop solüsyonu eklenerek oluşan sarı rengin abserbansı 450 nm'de ELISA cihazında okundu.

b. IL-6 analizi

Anti-mouse IL-6 kaplı olan stripler +4 °C de muhafaza edildi. İlk olarak external standard dilusyonu hazırlandı. 7 adet ependorf tüp S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 olarak isimlendirilerek hazırlandı ve sample diluentten S1...S7'ye kadar 225 µl konuldu ve standard dissolve 600 µl distile su ile seyreltilerek S1 225 µl'e eklendi ardından S1'den S2 ye 225 µl, S2'den S3'e 225 µl, S3'den S4'e 225 µl, S4'den S5'e 225 µl, S5'den S6'a 225 µl, S6'dan S7'e 225 µl, S7'den 225 µl aktarıldı. İkili 7 adet standartlar oluşturuldu, en sonunda da blank (kör) kuyucuğu bulunduruldu. Sırasıyla dilusyonlardan S1...S7) standard kuyucuklarına 100 µl konuldu ve üzerine de 100 µl sample diluent eklendi, blank'e 200 µl sample diluent konuldu.

- Standard 1: 2000 pg/ml
- Standard 2: 1000,0 pg/ml
- Standard 3: 500,0 pg/ml
- Standard 4: 250,0 pg/ml
- Standard 5: 125,0 pg/ml
- Standard 6: 62,5 pg/ml
- Standard 7: 31,3 pg/ml
- Kör

Standartlar dışındaki örnek kuyucuklarına numune serumlardan 50 µl konuldu ve üzerine 50 µl sample diluent solüsyon eklendi. Uygulamadan hemen sonra assay buffer (1-6 strip için 2,5 ml assay buffer konjugat+47,5 distile su) ve kullanımından yarım saat önce biotin konjugat (1-6 strip için 0,03 ml biotin konjugat+2,97 ml assay buffer) hazırlandı. Her bir kuyucuğa 50 µl biotin konjugat eklenerek oda ısısında 2 saat inkubasyona bırakıldı. Inkubasyonun ardından streavidin HRP solüsyonu (1-6 strip için 0,06 ml streavidin-HRP+5,94 assay buffer) hazırlandı. Daha önceden hazırlanan yıkama solüsyonu (1-6 strip için 25 ml wash buffer solüsyonu+475 ml distile su) ile 5 kere yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından 100 µl streavidin- HRP (1-6 strip için 0,06 ml streavidin-HRP+5,94 ml assay buffer) solüsyonunda blankte dahil bütün kuyucuklara uygulanmış ve oda ısısında 1 saat inkubasyona bırakılmıştır. Inkubasyonun ardından 5 kere yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi yapılarak bütün kuyucuklara 100 µl TMB substrat solüsyonu eklenmiş ve 30 dk karanlık inkubasyonunun ardından kuyucuklarda

mavi renkler gözlemlendi. Son olarak stop solüsyonu 100 µl eklendi, sarıya dönen rengin absorbanansı ve 450 nm dalga boyunda ELISA'da okundu.

c. IL-10 Analizi

Anti-mouse IL-10 kaplı olan stripler +4 °C' de muhafaza edilmektedir. ilk olarak external standard dilusyonu hazırlanmaktadır. 7 adet ependorf tüp S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 olarak isimlendirilerek hazırlanır ve sample diluentten S1'den...S7'ye kadar 225 µl konuldu ve standard dissolve 590 µl distile su ile seyreltilerek S1 225 µl'e eklendi ardından S1'den S2 ye 225 µl, S2'den S3'e 225 µl, S3'den S4'e 225 µl, S4'den S5'e 225 µl, S5'den S6'a 225 µl, S6'dan S7'e 225 µl, S7'den 225 µl aktarılır. İkili 7 adet standardlar ve en sonda da kör kuyucuk bulunmaktadır. Sırasıyla dilusyonlardan (S1'den S7 ye kadar) standard kuyucuklarına 100 µl konuldu ve üzerine de 100 µl sample diluent solüsyon eklendi en sondaki kör kuyucuğa 200 µl sample diluent konuldu.

- Standard 1: 1000.0 pg/ml
- Standard 2: 500.0 pg/ml
- Standard 3: 250.0 pg/ml
- Standard 4: 125.0 pg/ml
- Standard 5: 62.5 pg/ml
- Standard 6: 31.3 pg/ml
- Standard 7: 15,6 pg/ml
- Kör

Standardlar dışındaki örnek kuyucuklarına numune serumlardan 50 µl konuldu ve üzerine 50 µl sample diluent solüsyon eklenmiştir. Oda ısısında 2 saat inkubasyona bırakılmıştır. Uygulamadan hemen sonra assay buffer (1-6 strip için 2,5 ml assay buffer konjugat+47,5 distile su) ve kullanımından yarım saat önce biotin konjugat (1-6 strip için 0.06 ml biotin konjugat+5,94 ml assay buffer) hazırlandı. Daha önceden hazırladığımız yıkama solüsyonu (1-6 strip için 25 ml wash buffer solüsyonu+475 ml distile su) ile 4 kere yıkama işlemi gerçekleştirildi. Her bir kuyucuğa 100 µl biotin konjugat eklenerek 1 saat oda ısısında inkubastona bırakılmıştır. İnkubasyonun ardından streavidin HRP solüsyonu (1-6 strip için 0,03 ml streavidin-HRP+5,97 assay buffer) hazırlanmıştır. İnkubasyonu takiben 4 kere yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından 100 µl streavidin- HRP solüsyonunda blankte dahil bütün kuyucuklara uygulanmış ve oda

ısısında 1 saat inkubasyona bırakılmıştır. İnkubasyonun ardından 4 kere yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi yapılarak bütün kuyucuklara 100 µl TMB substrat solüsyonu eklenmiş ve 10 dk karanlık inkubasyonunun ardından kuyucuklarda mavi renkler gözlemlenmiştir. Son olarak 100 µl stop solüsyonu eklenerek kuyucuklardaki renk sarıya dönmüş ve 450 nm dalga boyunda ELISA'da okutuldu.

d. TNF- α Analizi

İlk olarak standard dilusyonu hazırlanmaktadır.

7 adet ependorf S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7 olarak isimlendirerek hazırlanır ve sample diluentten S1'e 800 µl, S2, S3, S4, S5, S6, S7 ye ise 300 µl konuldu ve standard dissolve 1.7 ml standard diluent ile seyreltilerek S1 200 µl'e eklendi ardından S1'den S2 ye 300 µl, S2'den S3'e 300 µl, S3'den S4'e 300 µl, S4'den S5'e 300 µl, S5'den S6'a 300 µl, S6'dan S7'e 300 µl, S7'den 300 µl aktarılır. Striplerden dublike standardlar oluşturuldu, en sonda da blank (kör) kuyucuğu bulunur. Sırasıyla dilusyonlardan standard kuyucuklarına 100 µl konuldu. Serumlar ise 50 µl serum, 50 µl standart diluent buffer şekilde dilue edildikten sonra örnek kuyucuklarına 100 µl eklenmiştir.

- Standard 1: 1000,0 pg/ml
- Standard 2: 500,0 pg/ml
- Standard 3: 250,0 pg/ml
- Standard 4: 125,0 pg/ml
- Standard 5: 62,5 pg/ml
- Standard 6: 31,3 pg/ml
- Standard 7: 15,6 pg/ml
- Kör

Bütün kuyucuklara (blank hariç) 50 µl biotin konjugat konuldu ve 90 dk oda ısısında inkubasyona bırakıldı. Daha önceden hazırladığımız yıkama solüsyonu (1-6 strip için 16 ml wash buffer solüsyonu+384 ml distile su) ile 4 kere yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından uygulamadan 15 dk önce hazırladığımız (10 µl streavidin-HRP+990 µl streavidin-HRP solüsyonu) 100 µl streavidin-HRP solüsyonunda blank hariç bütün kuyucuklara uygulandı ve oda ısısında 30 dk inkubasyona bırakıldı. İnkubasyonun ardından 4 kere yıkama solüsyonu ile yıkama işlemi yapılarak bütün kuyucuklara 100 µl stabilized chromogen solüsyonu eklendi ve 30 dk karanlık inkubasyonunun ardından kuyucuklarda mavi renkler gözlemlendi. Son olarak stop

solüsyonu 100 µl eklenerek kuyucuklardaki renk sarıya döndü ve 450 nm'de ELISA'da ölçüldü.

3.2.3.3. Serum ALT ve AST Düzeylerinin Belirlenmesi

ALT ve AST; serum ve plazmadaki aminotransferaz aspartat ve alanin transferazın sayısal değerini belirlemek için Roche/Hitachi Cobas C sistemlerinin yapılan bir laboratuvar testidir. Enzim aspartat aminotransferaz ve alanin transferaz, en çok karaciğer dokusu üzerinde, deride, kalp kası ve böbreklerde geniş çapta etki göstermektedir. Testin kuralı; bu araştırma IFCC'nin önerileri doğrultusunda yürütülmektedir fakat performans ve stabilite üzerinde optimize edilmiştir. İzlenebilirlik: Bu method IFCC formülasyonuna karşı standardilize edilmiştir, manuel fotometre ile birlikte kalibre edilmiş pipetler mutlak değerler koşulu ve substrat spesifik soğurganlık ile kullanılır.

Hesaplama; Roche/Hitachi Cobas C sistemleri otomatik olarak her bir örneğin analit konsantrasyonunu hesaplamaktadır.

Özel Yıkama Programı: Roche/Hitachi Cobas C sistemlerinde belirgin test kombinasyonları bir araya geldiğinde özel yıkama programındaki adımların uygulanması zorunludur. Taşıma üzerinden kurtulmanın son versiyonu NaOHD/SMS/Multiclean/SCCS ya da NaOHD/SMS/Smpcln1+2/SCCS metot talimatları ile bulunmaktadır. Cobas C ile ilgili yapılacak olan bütün özel temizleme uygulamaları için el ile yapılacak olan müdahaleler daha geçerli sayılmaktadır. Yüksek konsantrasyonlar ile örnekleri bulma yolu 1:10 değeri ile örnekleri sulandırma işlemi yapılır. Testin düşük tespit edilen limiti sıfırdan başlayarak en düşük ölçülebilir analit seviyeyi temsil etmektedir. Bu durum üç standart sapma değeri ile yukarıdaki en düşük değer baz alınarak yapılmaktadır (standart 1+3, tekrar edilebilirlik, n = 21)

Metot karşılaştırması: Serum ve plazma örnekleri için AST değerleri ROCHE-HITACHI Cobas C 501 tarafından analiz edilmiş ve karşılaştırılmıştır.

3.2.4. Histopatolojik Değerlendirme

Rutin alkol-ksilol takip işlemleri sonrasında tüm örnekler parafin bloklara gömülerek mikrotom cihazı ile 5 µ kalınlığında seri kesitler alındı. Alınan kesitler hemotoksilen-eosin ile boyanarak (66) ışık mikroskobu altında (Olympus BX52 with DP72 camera system, Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Patoloji ABD) incelenerek fotoğraflandı.

3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Varyans homojenliği Levene testi ile test edildi. İki den fazla gruplar arası karşılaştırmalarda parametrik varsayımlar sağlandığında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sağlanmadığında ise Kruskal Wallis testleri kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar için Dunn-Bonferroni ve Tukey testi uygulandı. Veriler R Studio 3.2.2 programı ile değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Çalışma grupları arasında doku (karaciğer ve böbrek) antioksidan (MDA, SOD ve GSH), serum sitokin (IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α) ve karaciğer enzim (ALT ve AST) düzeyleri aşağıda tablolar halinde gösterildi.

Grupların MDA, SOD ve GSH seviyeleri Tablo 3, Tablo 3.1, Tablo 4 ve Tablo 4.1’de gösterildi.

Tablo 4: *Anethum graveolens* ekstresinin fare karaciğer dokularında MDA, SOD ve GSH düzeyleri üzerine etkileri.

Karaciğer	MDA (nmol/mg.prot)	SOD (U/mg.prot)	GSH (nmol/mg.prot)
Kontrol	3,33 \pm 0,49 ^a	3,33 \pm 1,50 ^a	3,47 \pm 0,33 ^a
PT	7,23 \pm 1,72 ^b	0,95 \pm 0,09 ^b	2,22 \pm 0,26 ^b
PT+AG1	5,91 \pm 0,60 ^b	3,37 \pm 1,56 ^a	2,30 \pm 0,22 ^b
PT+AG2	5,20 \pm 1,67 ^a	3,51 \pm 0,66 ^a	3,27 \pm 0,34 ^a
AG2	4,26 \pm 0,70 ^a	4,60 \pm 0,83 ^a	3,70 \pm 0,44 ^a

Veriler ortalama \pm standart sapma ve ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı sütunda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

^a PT fare grubundan önemli derecede farklı (P<0,05),

^b kontrol fare gruplarından önemli derecede farklı (P<0,05).

AG1: 100 mg/kg. c.a.

AG2: 200 mg/kg. c.a.

PT: 400 mg/kg. c.a.

Tablo 5: *Anethum graveolens* ekstresinin fare böbrek dokularında MDA, SOD ve GSH düzeyleri üzerine etkileri.

Böbrek	MDA (nmol/mg.prot)	SOD (U/mg.prot)	GSH (nmol/mg.prot)
Kontrol	5,68±0,38 ^a	2,1(1,5-2,6)	3,6(3,4-4,1) ^a
PT	7,01±0,50 ^b	1,6(1,0-2,2)	2,3(2,1-2,4) ^b
PT+AG1	5,94±0,32 ^a	1,4(1,1-2,2)	2,3(1,8-2,4) ^b
PT+AG2	5,98±0,21 ^a	1,2(0,6-2,9)	3,2(3,2-3,8) ^a
AG2	4,91±0,30	2,2(0,9-3,6)	3,3(3,2-3,5) ^a

Veriler ortalama±standart sapma ve ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı sütunda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

^a PT fare grubundan önemli derecede farklı (P<0,05),

^b kontrol fare grubundan önemli derecede farklı (P<0,05).

Çalışmadaki deney gruplarının karaciğer ve böbrek MDA seviyeleri karşılaştırıldığında, PT grubunda, diğer gruplara kıyasla belirgin ölçüde arttı (p<0,05). MDA (karaciğer) değişkeninin çoklu karşılaştırmasında PT grubu; kontrol, PT+AG2 ve AG2 gruplarına göre anlamlı düzeyde yükseldi ve kontrol grubu ile PT ve PT+AG2 grupları arasında anlamlı düzeyde farklılıklar belirlendi. MDA (böbrek) değişkeninin ikili karşılaştırmasında PT grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında PT grubu anlamlı düzeyde diğer gruplardan yüksek bulundu.

Çalışmada, PT grubundaki hayvanların karaciğer ve böbrek SOD seviyeleri diğer gruplara göre belirgin ölçüde düşmüştür (p<0,05). Ekstre alan grupların karaciğer SOD seviyelerinde gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir yükselme söz konusuysen, SOD böbrek seviyelerinde anlamlı düzeyde dağılım saptanamamıştır. SOD (karaciğer) değişkeninin çoklu karşılaştırmasında PT grubu; kontrol, PT+AG1, PT+AG2 ve AG2 gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük bulundu ve PT grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık mevcuttur.

Diğer taraftan, GSH bakımından gruplar arası mukayese yapıldığında, PT ve PT+AG1 gruplarında karaciğer ve böbrek dokularında GSH seviyeleri diğer gruplara oranla belirgin ölçüde azalmıştır (p<0,05). GSH (karaciğer) ve GSH (böbrek) değişkeninin çoklu karşılaştırmasında PT grubu ve PT+AG1 grubu; kontrol, PT+AG2 ve AG2

gruplarına göre anlamlı düzeyde düşük bulundu PT ve PT+AG1 grupları ile diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık belirlendi.

Grupların IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α seviyeleri Tablo 5’de gösterildi.

Tablo 6: *Anethum graveolens* ekstresinin fare serumlarındaki IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α üzerine etkileri.

	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)
Kontrol	1,81 \pm 0,60 ^a	52,67 \pm 7,12 ^a	260,50 \pm 42,33 ^a	3,37 \pm 0,73 ^a
PT	40,69 \pm 3,12 ^b	295,00 \pm 95,86 ^b	410,83 \pm 123,54 ^b	8,43 \pm 2,04 ^b
PT+AG1	9,54 \pm 4,73	103,00 \pm 16,92 ^a	333,00 \pm 43,56	3,96 \pm 0,70 ^a
PT+AG2	5,53 \pm 2,12 ^a	87,00 \pm 24,14 ^a	272,83 \pm 46,37 ^a	3,49 \pm 0,78 ^a
AG2	1,54 \pm 0,76 ^a	39,00 \pm 6,32 ^a	239,33 \pm 23,63 ^a	1,47 \pm 0,53 ^a

Veriler ortalama \pm standart sapma ve ortanca (1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı sütunda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

^a PT fare grubundan önemli derecede farklı (P<0,05),

^b kontrol fare grubundan önemli derecede farklı (P<0,05).

Yapılan çalışmada, farelerin serum IL-1 β seviyeleri diğer gruplara kıyasla PT grubunda belirgin ölçüde yüksekti ve gruplar arasındaki dağılımı istatistiksel olarak anlamlı düzeydeydi (p<0,05). Çoklu karşılaştırma testine göre IL-1 β değişkenin ikili karşılaştırmasında, kontrol grubu ile PT karşılaştırıldığında PT grubunda anlamlı bir artış belirlendi ve ekstre verilen gruplarda ise anlamlı düzeyde düşüşler mevcuttu.

Hayvanların serum IL-6 seviyeleri diğer gruplara kıyasla PT grubunda belirgin ölçüde yüksekti ve farklı dozlarda ekstre alan bütün gruplarda düşüşler gözlenmiştir. Farklılıklar istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulundu (p<0,05).

Farelerde serum sitokinlerinden IL-10 seviyeleri diğer gruplara kıyasla PT grubunda belirgin ölçüde yüksektir (p<0,05). İnterleukin 10 değişkeninin çoklu karşılaştırmasında PT grubunun; kontrol grubu, PT+AG2 grubu ve AG2 grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti ve farklılık önemliydi.

Çalışmada, ölçülen TNF- α seviyeleri de diğer gruplarla kıyaslandığında PT grubunda belirgin ölçüde arttı ve ekstre alan gruplar kontrol grubu ile de benzerdi ($p<0,05$).

Grupların serum ALT ve AST seviyeleri Tablo 6'de gösterildi. PT grubundaki hayvanların ALT ve AST seviyeleri diğer gruplarla kıyaslandığında belirgin ölçüde yüksekti ($p<0,05$). Ekstre alan gruplarda bu enzim seviyelerinde düşüşler izlendi. PT+AG1 grubu, PT+AG2 grubu ile, kontrol grubu da AG2 grubu ile benzerdi. Sonuçlar istatistiki olarak oldukça anlamlı idi.

Tablo 7: *Anethum graveolens* ekstresinin fare serumlarındaki ALT ve AST üzerine etkileri.

	ALT (U/L)	AST (U/L)
Kontrol	9,5(6,8-11,3) ^a	17,5(14,5-19,0) ^a
PT	172,0(42,8-1643,8) ^b	317,5(109,3-1436,8) ^b
PT+AG1	28,0(26,5-29,3)	64,0(63,8-66,0)
PT+AG2	26,0(22,3-28,0)	55,0(44,3-59,5)
AG2	9,5(6,8-12,5) ^a	19,5(14,5-25,5) ^a

Veriler ortalama \pm standart sapma ve ortanca(1.çeyrek-3.çeyrek) olarak ifade edilmiştir. Aynı sütunda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği farklı harfler gruplar arası farklılığı ifade etmektedir.

^a PT fare grubundan önemli derecede farklı ($P<0,05$),

^b kontrol fare grubundan önemli derecede farklı ($P<0,05$).

4.2. Histopatolojik Bulgular

Deney gruplarının histopatolojik bulguları resimlerde (Resim 1,2,3,4,5) verildi. Patolojik değişiklikler resimler üzerinde gösterildi.

Kontrol grubuna ait normal fare karaciğer dokusuna ait histolojik yapı Resim 1 olarak verildi.

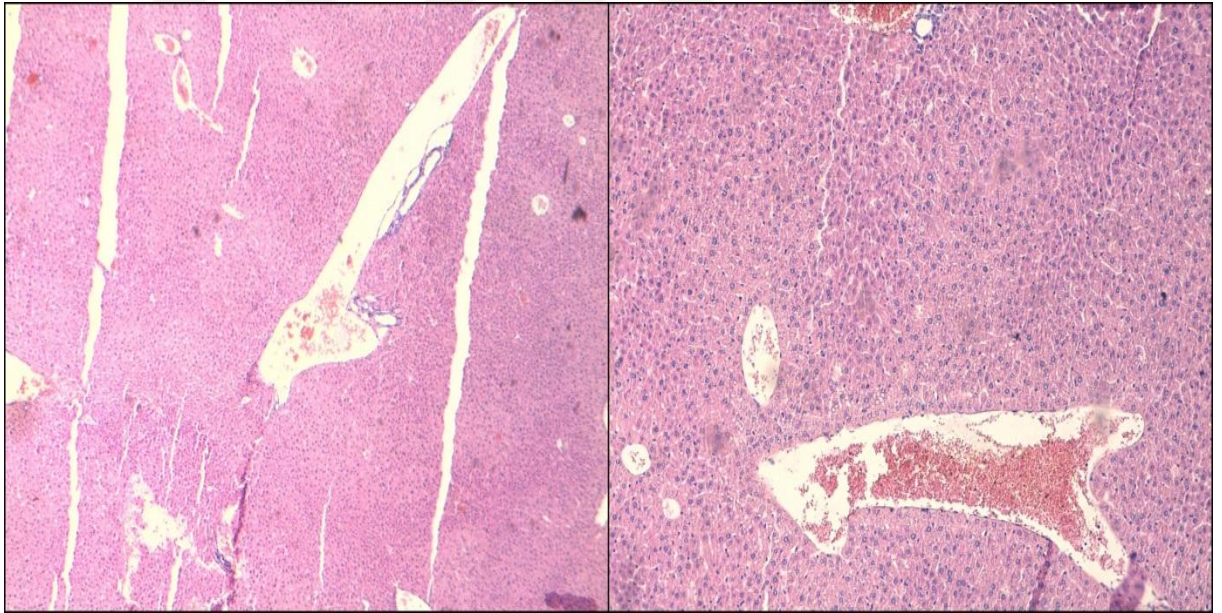
Parasetamol verilen deney grubu farelerinin karaciğer dokuları incelendiğinde orta düzeyde bağ dokusu artışı, nekrotik hücreler, lobül merkezinde nekroz, orta ve ciddi düzeyde enflamatuar hücre artışı ile konfluent nekroz alanları görüldü (Resim 2).

PT+AG1 (*Anethum graveolens* 100 mg/kg+Parasetamol 400 mg/kg) grubundaki hayvanların karaciğer dokusunda belirgin nekroz, kanama alanları ve lökosit birikimi izlendi (Resim 3).

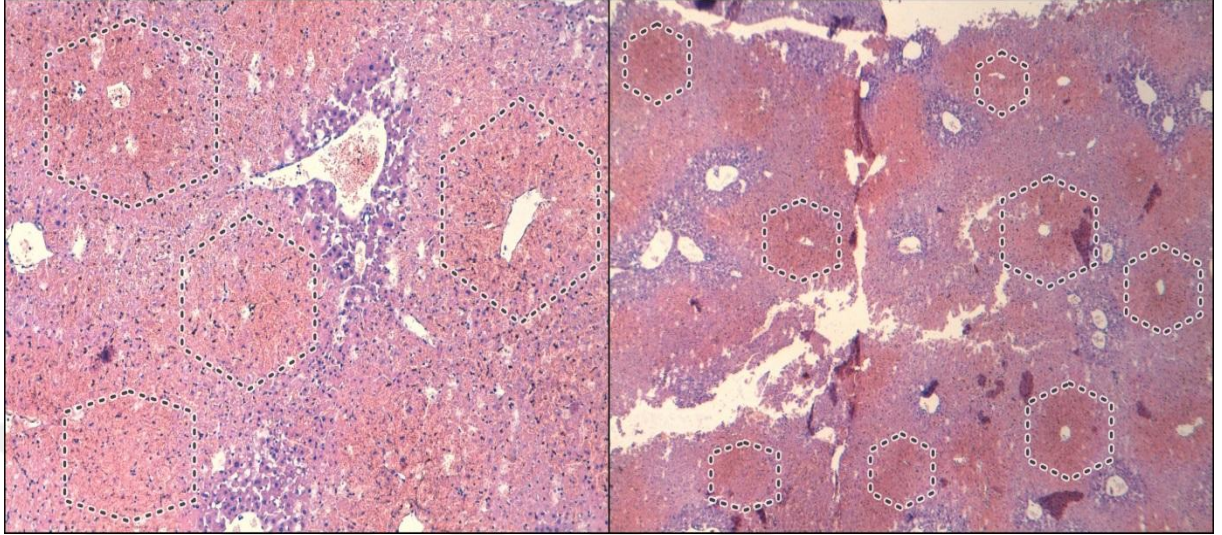
PT+AG2 (*Anethum graveolens* 200 mg/kg+Parasetamol 400 mg/kg) grubundaki hayvanların karaciğer dokusunda nekroz alanları gözlemlendi (Resim 4).

İzotonik sodyum klorür ve sadece AG2 (200 mg/kg) verilen deney gruplarının histopatolojik incelemesinde önemli patolojik bulgu olmaksızın normal karaciğer dokusu gözlemlendi. Karaciğer hücreleri radyal yerleşmiş, hasarsız büyük küresel çekirdek ve granüler sitoplazma gözlemlendi (Resim 5).

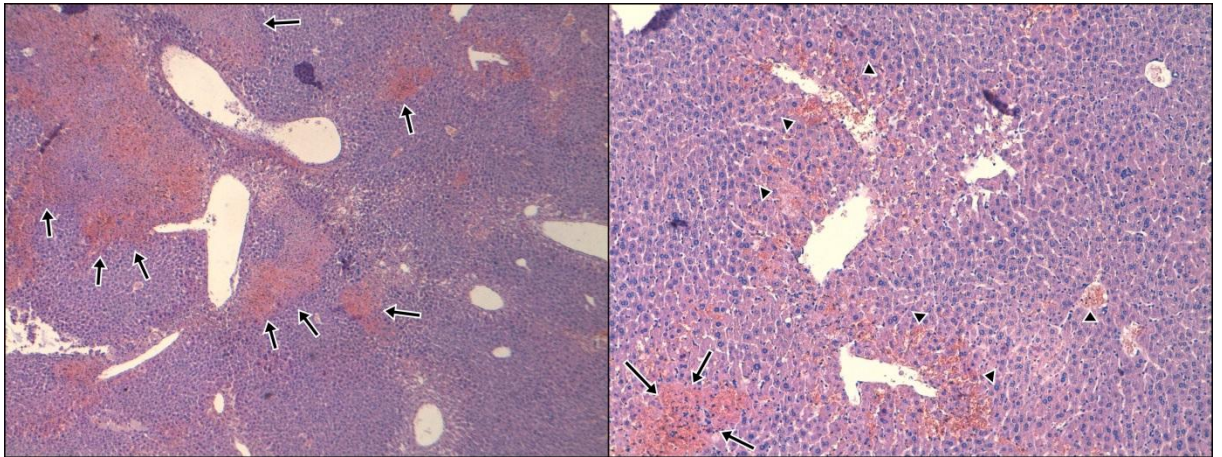
Böbrek dokularının histolojik incelenmesinde değişiklikler gözlenmedi, böbrek dokusunun histolojik görünümü genel olarak aynı karakterde olup gruplar arasında belirgin farklılıklar yoktur.



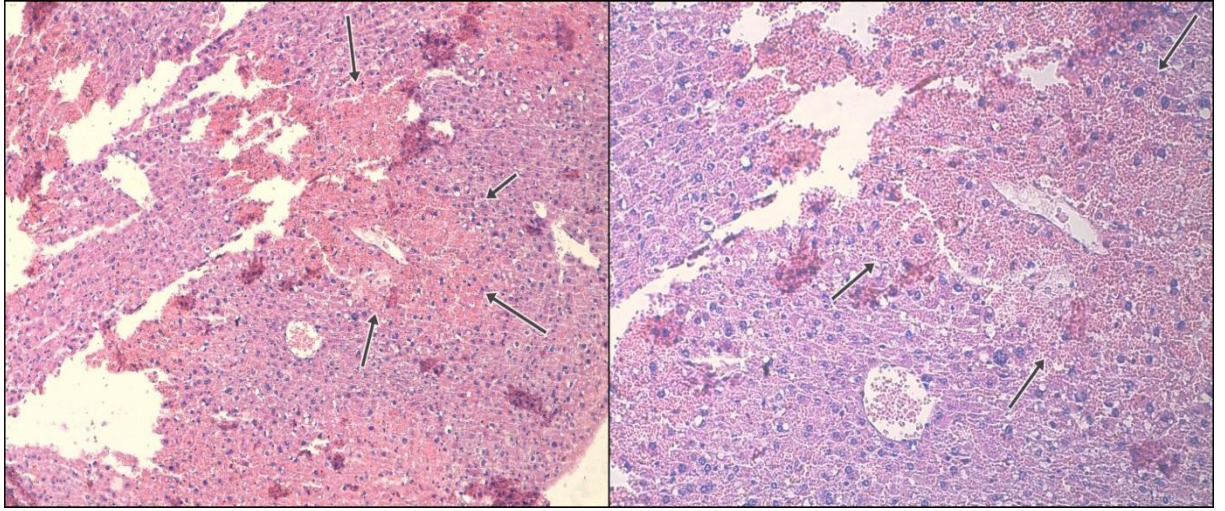
Resim 1: Kontrol grubu fare karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, HE, 100 µm, 200 µm.



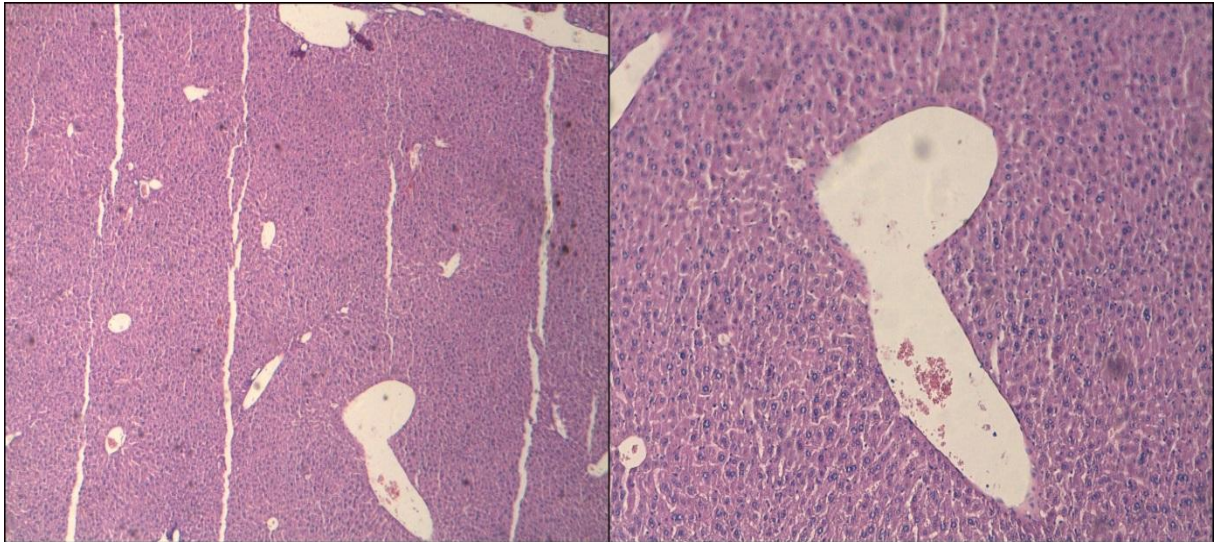
Resim 2: PT (Parasetamol) grubundaki fare karaciğerinde konfluent nekroz (altıgenler), HE, 100 μ m, 200 μ m.



Resim 3: PT+AG1 (*Anethum graveolens* 100 mg/kg+Parasetamol 400 mg/kg) grubu fare karaciğerinde belirgin nekroz alanları (oklar), kanama alanları (ok başları), HE, 100 μ m, 200 μ m.



Resim 4: PT+AG2 (*Anethum graveolens* 200 mg/kg + Parasetamol 400 mg/kg) grubu fare karaciğerlerinde nekroz alanları (oklar), HE, 100 µm, 200 µm.



Resim 5: AG2 (*Anethum graveolens* 200 mg/kg) grubu fare karaciğer dokusunun normal histolojik görünümü, HE, 100 µm, 200 µm.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Parasetamol, ağız yoluyla alındığında biyoyararlanımının yüksek ve gastrointestinal yan etkilerinin oldukça düşük olması nedeniyle sıklıkla kullanılan antipiretik ve analjezik bir ilaçtır (31,67,68). Tedavi dozunda alındığında oldukça güvenli olan parasetamol, yüksek dozda alındığında, zehirlenmelere neden olan ilaçların en başında yer alır ve başta karaciğer olmak üzere yaygın doku hasarına neden olur (69,70).

Oksidatif stres, hücrelerde oksidan ve antioksidanlar arasında bir dengesizliktir. Bu durum oksidatif hasara neden olur (71). SOD ve GSH, peroksit ve serbest radikaller gibi reaktif oksijen türlerinin hücre içi koruyucu mekanizmada oluşturduğu önemli antioksidanlardır (72). Malondialdehide (MDA), çoklu doymuş yağ asitlerinin peroksidasyonundan kaynaklanan ve oksidatif stresin en önemli göstergelerinden biridir. MDA miktarına göre lipid peroksidasyon düzeyi tahmin edilebilmektedir (73,74). PT yüksek dozlarda alındığında oluşan metaboliti n-asetil-p-benzokuinonenim (NAPQI) karaciğerdeki glutasyon depolarını tüketir ve serbest kalan NAPQI intraselüler proteinlere tutunur, membranlara ve proteinlerdeki sülfidriyle bağlanarak doku hasarı oluşturur (75,76). PT toksikasyonunda, serbest radikallerin oluşumu artarak doymamış yağ asitlerinin yıkılmasına neden olmakta ve sonuçta endojen antioksidan kapasitenin azaldığı, oksidan/antioksidan dengenin bozulması ile hücre hasarı olduğu ve oksidatif stres olarak tanımlanan bu tablonun bu süreçte serbest radikallerin artışından kaynaklandığı rapor edilmektedir (77,78).

Fenolik bileşikler, fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Flavanoidler, bitkilerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır. AG bitkisindeki; serbest radikalleri ortadan kaldıracak doğal antioksidanlardan birisi polifenoldür. Polifenoller, serbest radikalleri nötralize etmek ve peroksitleri yıkmak suretiyle antioksidan etkilerini ortaya koyarlar. Dereotu ekstresinin içinde TPC (Toplam fenolik madde tayini) Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir, antioksidaların aktivite potansiyeli ve fenolik bileşiklerin miktarı arasında pozitif bir

ilişki olduğuna dikkat çekilmektedir (63,64,65). AG içinde bulunan fenolik bileşikler, flavonoid ve flavonol antioksidan özelliklerinin esasını oluşturur (63). AG; alkaloid (% 2,8), flavonoid (%11,05), tannin (%19,71), saponin (0,55) içermektedir (64). AG içinde bulunan bu maddeler antioksidan kapasite ve antiinflamatuvar etkiler oluşturumaktadırlar (65). Önceki çalışmalarda, PT toksikasyonunda n-asetil sistein antidot olarak tedavide kullanılmakta ve koruyucu amaçla da pek çok farmakolojik ajanlar (Vit C, E, melatonin vb.) ve bitki ekstreleri farklı hayvan türlerinde araştırmacılar tarafından incelenmiştir (79-81). Ancak, farelerde PT toksikasyonunda, AG ekstresi ile yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan bu çalışmada ise, farelerde *in vivo* olarak oluşturulan deneysel PT toksikasyon modeli kullanılmıştır. Farklı iki dozda oral gavaj yoluyla uygulanan AG ekstrelerinin PT toksikasyonunda en çok etkilenen karaciğer ve böbrek gibi hayati organlara antioksidan/oksidan denge ve histopatolojik değişimler ile serum sitokin ve enzim düzeylerine etkileri yönünden araştırıldı.

MDA lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve lipid peroksidasyonunun en yaygın kullanılan belirleyicilerinden biridir. Oksidatif strese maruz kalan dokularda, MDA düzeyindeki artış, oksidatif stres için biyomarker olarak kabul edilmektedir (73,74). Benzer bir çalışmada ratlara toksik dozda asetaminofen (500 mg/kg) ve aspirin (200 mg/kg) vermişlerdir. Sonuçta asetaminofen ve aspirinin plazma ve karaciğerde MDA düzeylerinde önemli bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (82). Bir başka çalışmada ise ratlara yüksek doz asetaminofen vererek (400-600 mg/kg), MDA seviyesinin artıp GSH'nin azaldığı ve karaciğerde masif sentrilobuler hepatosit nekrozu yaptığını belirtilmiştir (83). Abdül Hamid ve arkadaşları'nın (84) 750 mg/kg parasetamol vererek böbrek hasarı oluşturdukları ve 7 gün boyunca oral yolla *Zingiber zerumbet* vererek koruyucu etkisi üzerine yapılan çalışmada parasetamol verilen grupta kontrol grubuna göre plazma ve böbrek dokusunda MDA seviyesinde önemli bir şekilde artış görüldüğünü, 200 ve 400 mg/kg c.a. dozlarda *Zingiber zerumbet* verilen gruplarda ise bu değerlerin kontrol grubuna yaklaştığını belirlemişlerdir (84). Ghosh ve arkadaşları'nın (85) *Cajanus indicus* L.'nin parasetamol ile oluşturdukları karaciğer ve böbrek hasarındaki rolünü inceledikleri çalışmalarında parasetamol verilen grubun, kontrol grubuna göre MDA seviyesinin önemli bir şekilde arttığı görülmüştür (85). Curhan ve arkadaşları'nın (86) ratlarda yaptıkları bir çalışmada, ratlara asetaminofen ve alkol uygulayarak, bu iki maddenin rat karaciğerinde oluşturduğu patofizyolojik değişikliğe, serum MDA ve ALT düzeyindeki artışlarına bakılmıştır. Sonuçta bu iki madde ile MDA

ve ALT düzeyleri artarken vitamin E tedavisi verilenlerde bu artış daha düşük düzeylerde olmuştur (86).

Enzimatik olmayan önemli antioksidanlardan biri olan GSH ise; kimyasal olarak reaktif toksik bileşikler ya da oksidatif strese karşı hücrel savunmada rol oynayan en önemli moleküllerdendir. Glutasyon redükte ve okside şekillerde bulunabilir. Redükte formunda, sistenin tiyol grubu reaktif oksijen ürünleri gibi stabil olmayan moleküllere, indirgeyici ekuvalanları verebilme yeteneğine sahiptir. Koruyucu etkisi bu mekanizma ile ortaya çıkar. Azalmış hücrel GSH seviyeleri ve GSH sentez kapasitesi gibi durumlarda hücreler radyasyona ve bazı ilaçlara duyarlı hale gelmektedir (4,80,83). Parasetamolün yeterli derecede yüksek dozlarında oksidatif stresin bir mediatörü olarak NAPQI'nın, GSH seviyesinde azalmaya ve bu azalmaya bağlı olarak lipit peroksidasyonunda artışa yol açtığı bilinmektedir. Bu toksik metabolit hücrel proteinlere bağlanarak hücrelerde nekroza sebep olmaktadır (5,87). Farelerde melatonin, vitamin E ve n-asetil sistenin parasetamolle indüklenen toksisitedeki koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmada, parasetamol uygulanan grubun kontrol grubuna göre böbrek dokusundaki GSH seviyesinin azaldığını göstermişlerdir (81). Abdel-Zaher ve arkadaşları'nın (88). 750 mg/kg uyguladıkları parasetamol kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarına karşı aminoguanidin, gadolinyum klorür ve oleanolik asitin etkilerini inceledikleri çalışmada, parasetamol grubunun kontrol grubuna göre böbrek dokularında ölçülen GSH seviyesinin önemli bir şekilde azaldığını gözlemişlerdir (88). Yapılan bir başka çalışmada, ratlara asetaminofen ve glutasyon glikozit (GSH-glyc) verildiğinde MDA ve GSH değişiklikleri önlenmiş ve ratların çoğunda karaciğer nekrozunun histolojik belirtileri ya tamamen kaybolmuş ya da büyük oranda azalmıştır (83). Organizmada SOD gibi antioksidan enzimler, lipit peroksidazlar ya da reaktif oksijen ürünleri tarafından kolayca inaktive olurlar. Bu nedenle parasetamol toksisitesinde bu enzim aktivitelerinde de azalmalar meydana gelir (89). Slater ve arkadaşları'nca (90) yapılan bir başka çalışmada ise SOD'nin parasetamol ile toksisite oluşturulan farelerde azaldığı belirlenmiştir (90). AG ekstresi, dişi ratlarda kortikosteroidlerle indüklenerek oluşturulan tip II diyabette hem antidiyabetik (serum glukoz ve insülin düzeylerini etkileyer) hem de antioksidan (kortikosteroidler tarafından etkilenen hepatik LPO, SOD, CAT ve GSH seviyesini düzelterek) etki göstermiştir (15). Yukarıdaki araştırmalarda olduğu gibi, bizim çalışmamızda da aynı şekilde PT uygulanan grupta MDA seviyesinde önemli bir şekilde artış, GSH ve SOD düzeyinde düşüş olduğu

görülmektedir. Çalışmada iki farklı dozlarda ekstre alan AG grupları, sadece PT uygulanmış gruplar ile mukayese ettiğimizde de, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, MDA düzeyinin azaldığı, GSH ve SOD düzeyinin ise yükseldiği görüldü. Çalışmanın sonuçları hem PT toksikasyonlu hayvanlardaki, hem de koruyucu amaçla kullanılan maddelerle yapılan MDA, SOD ve GSH seviyesindeki değişimler bakımından benzerlik göstermektedir. Larrey ve arkadaşları (91) yaptıkları bir çalışmada asetaminofenin karaciğer yetmezliği etiyojisinde önemli bir role sahip olduğunu ve ilk sırayı aldığını, aminotransferaz düzeylerinin ilk saatlerde normal olduğunu ve zehirlenmenin ilerleyen saatlerinde karaciğer yetmezliğinin göstergesi olarak artış gösterdiği belirtilmiştir (91). Yapılan bir başka çalışmada, PT ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı karnosit asitin (CA) etkinliğinin belirlenmesi amacıyla 400 mg/kg PT erkek farelere uygulanmış ve şekillenen hepatit nekroza bağlı olarak ALT-AST ve GSH seviyelerinde artış izlenmiştir. PT uygulanan gruptaki ALT-AST seviyesi oldukça yüksek, PT+CA grubunda ise düşüş şekillenmiş, MDA ve GSH seviyelerinde de anlamlı değişimler olmuştur. PT ile oluşturulan karaciğer hasarında IL-1 β , TNF- α ve hepatit makrofajda artış gözlenmiştir (92). 250 mg/kg PT uygulanarak oluşturulan akut karaciğer hasarına karşı Liuweiwuling tabletin etkinliğinin belirlenmesine yönelik başka bir çalışmada ise, ALT-AST seviyesinde toksikasyona bağlı ciddi bir yükseliş gözlenmiştir. Bu yükseliş Liuweiwuling tabletin uygulanmasını takiben 48 saat içinde normale yakın seviyeye düşmüştür. PT uygulaması sonucunda IL-1 β , TNF- α , IL-6 değerlerinde gözlenen yükselişin Liuweiwuling tabletin uygulanmasını takiben düştüğü belirlenmiştir (93). Allil metil disülfid (AMDS)'in PT toksikasyonu sonucunda oluşan karaciğer hasarına etkinliğini belirlemek amacıyla farelere 400 mg/kg PT uygulaması sonucu yükselen MDA, IL-6, TNF- α , ALT, AST seviyeleri 3 farklı dozda AMDS uygulaması sonucunda düştüğü ve SOD, GSH'nin yükseldiği belirlenmiştir (94). Geleneksel Kore sağlık içeceği olan Taemyeongcheong (TMC)'un PT ile oluşturulan hepatotoksisite üzerine etkinliğini belirlemek için yapılan bir çalışmada ise farelere 800 mg/kg PT uygulaması sonucunda GSH, ALT, AST, IL-6, TNF- α , IL-1 β değerlerinde ciddi bir yükseliş gözlenmiş ve TMC'nin farklı dozlarda verilmesini takiben doza bağlı olarak azalmalar gözlenmiştir (95). Aminotriazole (ATZ)'nin PT zehirlenmesine bağlı karaciğer hasarını azaltmaya yönelik etkisini belirlemek üzere farelere 350 mg/kg PT uygulamasını takiben, ALT, AST, TNF- α , MDA seviyelerinde artış izlenmiş ve ATZ (125-250-500 mg/kg) uygulanması sonucunda doza bağlı olarak değerlerde azalmalar gözlenmiştir

(96). *Anethum graveolens*'in etanollü ekstresi, sıçanlarda karbontetraklorür ile oluşturulan karaciğer hasarında denenmiş ve serum glutamat okzaloasetat transaminaz, serum glutamat pirüvat transaminaz, alkalın fosfataz, toplam bilirubin ve toplam protein düzeyleri ölçülmesi sonucunda, ekstrenin dikkate değer hepatoprotektif etki gösterdiği bulunmuştur (97). Erkek farelerde PT (400 mg/kg) uygulamasıyla oluşturulan böbrek ve karaciğer hasarına karşı *Moringo oleifera* (MO) bitki ekstresinin antioksidan ve antiinflamasyon etkisinin belirlenmesine yönelik bir çalışmada ise toksikasyon grubunda, MDA, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 seviyelerinde ciddi bir yükseliş, SOD ve GSH seviyesinde düşme belirlenmiştir. Ekstre uygulamasına takiben ise, MDA, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 değerlerinde anlamlı bir düşüş, SOD ve GSH düzeylerinde ise artışlar belirlenmiştir (98). Farelerde asetaminofen (250 mg/kg) uygulaması sonucu oluşan hepatotoksositeye karşı metforminin (100/200 mg/kg) koruyucu etkinliğinin belirlenmesine yönelik çalışmada PT uygulamasını takiben MDA, ALT, AST, ALP, IL-6 ve TNF- α yükselirken, GSH ve SOD seviyelerinde düşüşler izlenmiştir. Metformin uygulamasını takiben ise tam tersi değişimler meydana gelmiştir (99). Farelerde asetaminofen (200 mg/kg)'in intraperitoneal yolla uygulanması ile oluşan karaciğer hasarına karşı withaferin'nin (40 mg) etkinliğinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada hepatotoksosite grubunda ALT, IL-6, IL-1 β , TNF- α seviyelerinin yükseldiği ve withaferin'nin uygulamasını takiben ise bu değerlerin azaldığı kaydedilmiştir (100). Bir başka çalışmada, farelerde PT (400 mg/kg) ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı klorojenik asit kullanılmıştır. PT uygulamasını takiben ALT, AST, TNF- α , IL-1 β , IL-6 seviyelerinde yükseliş belirlenmiştir ve klorojenik asit uygulaması ile anlamlı bir düşüş kaydedilmiştir (101). PT ile oluşturulan karaciğer toksikasyonuna karşı paeonol'un oksitativ stres etkinliğinin belirlenmesi yönünden yapılan bu çalışmada ALT, AST, TNF- α , IL-1 β , IL-6, seviyesindeki yükselmelerin paeonol uygulaması sonucunda düştüğü bildirilmiştir. PT uygulaması sonucu yükselen MDA ve düşüş gösteren GSH ve SOD değerlerinin paeonol uygulaması ile MDA seviyesinde düşüş, SOD ve GSH'da ise yükseliş şekillendiği belirtilmiştir (102). Tavşanlarda yapılan bir çalışmada AG biyokimyasal değerleri etkiledi ve ALT, AST düzeyini düşürdü (103). Yukarıdaki çalışmalar doğrultusunda PT toksikasyonu oluşturulan canlılarda ALT, AST gibi enzimler ile sitokinler (IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve IL-10)'in arttığı ve koruyucu olarak düşünülen maddelerin verilmesi sonucu hem enzimlerin hem de sitokinlerin azalış gösterdiği anlaşılmıştır. Mevcut çalışmamızda da, PT uygulanan toksikasyon grubunda

ALT, AST, IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve IL-10 seviyesinde önemli bir şekilde yükseliş gözlemlenmiştir. AG ile yapılan bir çalışmada LPS ile indüklenerek oluşturulan inflamasyonda, nitrik oksit sentetazı (iNOS) ve IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin mRNA ekspresyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar özellik göstermiştir. AG içerisindeki polifenoller ve flavonoidler bu özellikte etkili olmuştur (7). Tip II diyabet hastalığında *Anethum graveolens*'in antiinflamatuvar özelliği üzerine yapılan çalışmada serum IL-6, TNF- α ve CRP seviyelerinde olumlu bir düşme belirlenmiştir (16). Çalışmada AG ekstresi alan gruplar hasta gruplarla kıyaslandığında, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, ALT, AST, IL-1 β , TNF- α , IL-6 ve IL-10 düzeylerinin düştüğü görülmüştür. Çalışmanın sonuçları önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Sonuç

Mevcut çalışma ile farelerde parasetamol toksisitesine karşı *Anethum graveolens* uygulanmasının serbest radikallerin temizlenmesi ve antioksidan enzimlerin artışıyla karaciğer ve böbrekte hasarı engelleyerek antioksidan aktiviteye katkı sağladığı ve sitokin düzeyindeki azalmalar ile antiinflamatuvar etkiler oluşturduğu belirlenmiştir. Antioksidan kapasite, karaciğer enzimleri ve sitokin bakımından sonuçlar histopatolojik değerlendirmeler ile karaciğer dokularında uyumludur ve birbirini desteklemektedir. Histopatolojik olarak böbreklere yönelik önemli bir bulguya rastlanmamıştır.

Anethum graveolens parasetamol ile birlikte alındığında, hem serbest radikal oluşumunun inhibe edilmesi hem de antioksidan düzeylerinin iyileştirilmesine katkı sağlayabileceği düşünüldüğünden klinik olarak yararlı olabilir. En önemli avantajı ise, bu bitki herkes tarafından kolayca temin edilebilmesi ve ülkemizde yaygın tüketilen bir bitki olması nedeniyle sadece parasetamol toksisitesi ile ilgili olaylarda değil, oksidatif stres oluşturan tüm olaylara olumlu yönde katkısı göz önünde bulundurularak daha sık tüketilebilir. Deneysel hayvan modelleri doğrudan klinik uygulamalara uyarlanmasa da yaptığımız çalışmanın sonuçlarının gelecekte bu konuya ışık tutmasını ümit ediyoruz. Bu çalışmamız sonucunda literatürde ilk kez *Anethum graveolens*'in farelerde PT ile indüklenen toksikasyonda organ hasarlarında koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

1. Jollow DJ, Thoregeirsson SS. Acetaminophen induced hepatic necrosis VI. metabolic deposition of toxic and non toxic doses of acetaminophen. *Pharmacology* 1974; 12: 251-257
2. Jollow DJ, Mitchell JR, Zampaglione N, Gillette, JR. Bromobenzene-induced liver necrosis. Protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. *Pharmacology* 1974; 11: 151
3. McLean AEM, Day PA. The effect of diet on the toxicity of paracetamol and the safety of paracetamol-methionine mixtures. *Biochemical Pharmacology* 1975; 24 (1): 37-42
4. Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. IV. Protective role of glutathione. *J of Pharm Exp Ther* 1973; 187(1): 211-217
5. Forrest JA, Clements JA, Prescott LF, Clinical pharmacokinetics of paracetamol, 1982; 7(2): 93-107
6. Naseri M, Mojab F, Khodadoost M, et al. The study of anti-inflammatory activity of oil-based dill (*anethum graveolens* l.) extract used tropically in formalin-induced inflammation male rat paw 2012; 11(4): 1169-1174
7. Kim YJ, Shin Y, Lee KH, Kim TJ. Anethum graveoloens flower extracts inhibited a lipopolysaccharide-induced inflammatory response by blocking iNOS expression and NF- κ B activity in macrophages. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012; 76(6): 1122-1127
8. Hosseinzadeh H, Karimi GR, Ameri M. Effects of *Anethum graveolens* L. seed extracts on experimental gastric irritation models in mice. *BMC Pharmacol* 2002; 19: 2-21
9. Kojuri J, Vosoughi AR, Akrami M. Effects of *anethum graveolens* and garlic on lipid profile in hyperlipidemic patients. *Lipids Health Dis* 2007; 1: 6-15
10. Kaur GJ, Arora DS,. Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. *BMC Complement Altern Med*. doi: 2009; 10.1186/1472-6882-9-30
11. Stavri M, Gibbons S. The antimycobacterial constituents of dill (*Anethum graveolens*). *Phytother Res*. Nov 2005; 19(11): 938-941

12. Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyus essential oils. *Int J Food Microbiol* 2002; 74: 101–109
13. Zeng H, Tian J, Zheng Y, et al. In Vitro and in Vivo Activities of Essential Oil from the Seed of *Anethum graveolens* L. against *Candida* spp. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011; 659704. doi: 10.1155/2011/659704
14. Tian J, Ban X, Zeng H, et al. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PLoS One*. 2012; 7(1): e30147. doi: 10.1371
15. Panda S. The effect of *Anethum graveolens* L. (dill) on corticosteroid induced diabetes mellitus: involvement of thyroid hormones. *Phytother Res*. 2008; 22 (12):1695-1697. doi: 10.1002/ptr.2553
16. Payahoo L, Ostadrahimi A, Mobasser M, et al. *Anethum graveolens* L. Supplementation has anti-inflammatory effect in type 2 diabetic patient. *Indian journal of traditional knowledge*, 2014; 13 (3): 461-465
17. Orhan İE, Şenol FS, Öztürk N, et al. Phytochemical content and enzyme inhibitory and antioxidant properties of *Anethum graveolens* L. (Dill) samples cultivated under organic and conventional agricultural conditions 2013; 59: 96-103
18. Bahramikia S , Yazdanparast R. Efficacy of different fractions of *anethum graveolens* leaves on serum lipoproteins and serum and liver oxidative status in experimentally induced hypercholesterolaemic rat models. *Am J Chin Med*. 2009; 37(4): 685-699
19. Arash A, Mohammad MZ, Jamal MS, Mohammad TA, Azam A. Effects of the aqueous extract of *Anethum graveolens* leaves on seizure induced by pentylentetrazole in mice. *Malays J Med Sci*. 2013; 20(5): 23–30
20. Monsefi M, Ghasemi M, Bahaoddini A. The effects of *Anethum graveolens* L. On female reproductive system. *Phytother Res*. Oct 2006; 20(10): 865-868
21. Clissold SP. Paracetamol and phenacetin. *Drugs* 32 (Suppl 4), 1986; 46-59
22. Ajith TA, Hema U, Aswathy MS. *Zingiber officinale* roscoe prevents acetaminophen-induced acute hepatotoxicity by enhancing hepatic antioxidant status. *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2007; 45: 2267-2272

23. Dökmeci İ. Toksikoloji. Zehirlenmeler de tanı ve tedavi. 3.baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri: 2001; 53-72.
24. Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, et al. Goldfrank's toxicologic emergencies, 3.ed. Appleton-Century-Crofts/Norwalk, Connecticut: 1986
25. Slattery JT, Levy G. Pharmacokinetic model of acetaminophen elimination. American journal of hospital pharmacy 1979; 36: 440
26. Lide DR. Handbook of chemistry and physics. 78th ed. Boca, Raton: CRC Press. :1997
27. Verschueren K. Handbook of environmental data on organic chemicals. 3rd ed. New York, Van Nostrand Reinhold Co, 1996; 1444
28. Brodie BB, Axelrod J. The estimation of acetanilide and its metabolic products, aniline, n-acetyl p-aminophenol and p-amino-phenol, free and total conjugated, in biological fluids and tissues. J Pharmacol Exp Ther 1948; 94(1): 22-28
29. Kurtoğlu S. Zehirlenmeler Teşhis ve Tedavi. Eru yayınları, 1992: 287-295
30. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 12. Baskı. Ankara, Pelikan Tıp ve Teknik Yayıncılık, 2009: 849-850
31. Prescott LF. Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. British journal of clinical pharmacology 1980; 10 Suppl 2: 291-298
32. Graham G, Hicks M. Pharmacokinetics and metabolism of paracetamol, Aspirin and related drugs; (Rainsford K.D. ed), London, Taylor & Francis 2004; 181-215
33. Dargan PI, Jones AL. Management of paracetamol poisoning. Trends in pharmacological sciences 2003; 24: 154-157
34. Schilling A, Corey R, Leonard M, Eghtesad B. Acetaminophen: old drug, new warnings. Cleveland Clinic journal of medicine 2010; 77: 19-27
35. Chun LJ, Tong MJ, Busuttil RW, Hiatt JR. Acetaminophen hepatotoxicity and acute liver failure. Journal of clinical gastroenterology 2009; 43: 342-349
36. Larson AM. Acetaminophen hepatotoxicity. Clinics in liver disease, 2007; 11: 525-548
37. MacNaughton SM. Acetaminophen toxicosis in a dalmatian, Can Vet 2003; J 44 (2): 142-144
38. Dahlin DC, Miwa GT, Lu AYH, Nelson SD. *n*-acetyl- *p*-benzoquinone imine: a cytochrome P-450 mediated oxidation product of acetaminophen. Proc Natl Acad Sci (USA) 1984; 81: 1327-1331


39. Potter DW, Hinson JA. Mechanisms of acetaminophen oxidation to *n*-acetyl- *p*-benzoquinone imine by horseradish peroxidase and cytochrome P-450. *J Biol Chem* 1987; 262: 966-973
40. Heard KJ. Acetylcysteine for acetaminophen poisoning. *The New England journal of medicine* 2008; 359: 285-292
41. Douidar SM, Boor PJ, Ahmed AE. Potentiation of the hepatotoxic effect of acetaminophen by prior administration of salicylate. 1985; 233(1): 242-248
42. Corcoran GB, Racz WJ, Smith CV, Michell JR. Effects of *n*-acetylcysteine on acetaminophen covalent binding and hepatic necrosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 232: 864-872
43. Tee LBG, Davies DS, Seddon CE, Boobis AR. Species differences in the hepatotoxicity of paracetamol are due to differences in the rate of conversion to its cytotoxic metabolite. *Biochem Pharmacol* 1987; 36: 1041-1052
44. Kelly EJ, Bruschi SA, Kalhorn T, et al. Role of CYP1A2 in the hepatotoxicity of acetaminophen: investigations using Cyp1a2 null mice 1998; 153(1): 102-108
45. Roder JD. Acetaminophen. In: *Veterinary toxicology*, butterworth-heinemann, United States of America 2001; 65-69
46. Tirmenstein, MA, Nelson SD. Acetaminophen-induced oxidation of protein thiols: Contributions of impaired thiol-metabolising enzymes and the breakdown of adenosine nucleotides. *J Biol Chem* 1990; 265: 3059-3065
47. Mirochnitchenko O, Weisbrot-Lefkowitz M, Reuhl K, et al, Acetaminophen toxicity. Opposite effects of two forms of glutathione peroxidase 1999; 9;274(15): 10349-10355
48. Bond GR, Requa RK, Krenzelok EP, et al. Influence of time until emesis on the efficacy of decontamination using acetaminophen as a marker in a pediatric population. *Annals of emergency medicine*, 1993; 22: 1403-1407
49. Uzbekova D, Chugunova L, Makarova V, Ryabkov A, Mirgorodskaya L,. Efficacy of royal jelly and lactulose on thyroxin-induced liver damage in rats. *J Hepatol* 28 (Supplement), 2006; 157
50. Boobis AR, Fawthrop DJ, Davis DS. Mechanisms of cell deaths. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10: 275-280

51. Kanbur M, Eraslan G, Beyaz L, Silici S, Liman BC, Altinordulu S, Atasever A. The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice. *Exp Toxicol Pathol* 2009; 61(2): 123-132
52. Olaleye MT, Adegboye OO, Akindahunsi AA. Alchornea cordifolia extract protects wistar albino rats against acetaminophen-induced liver damage. *African Journal of Biotechnology* 2006; 5: 2439-2445
53. Sun J, Chu Y-F, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 7449–7454
54. Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am J Clin Nutr*; 78(Suppl): 2003; 517-520
55. Yazdanparast R, Alavi M. Antihyperlipidaemic and antihypercholesterolaemic effects of *anethum graveolens* leaves after the removal of furocoumarins. 2001; 105(410):185-191
56. Jana S, Shekhawat G. *Anethum graveolens*: an Indian traditional medicinal herb and spice. *Pharmacogn Rev* 2010; 4: 179–184
57. Khare CP. Indian herbal remedies: rational western therapy, ayurvedic and other traditional usages, Botany; Berlin, New York: Springer 2004; 60–61
58. Ravindran P, Balachandran I. Under utilized medicinal spices II, spice India: Publisher V K Krishnan Nair 2005; 17: 32–36
59. Fleming T. PDR for herbal medicines; New Jersey: Medical economics company 2000; 252
60. Sharafi S, Rasooli I, Owlia P, Taghizadeh M, Astaneh SD. Protective effects of bioactive phytochemicals from mentha piperita with multiple health potentials. *Pharmacogn Mag*; 2010; 6: 147–153
61. Ramadan MM, Abd Algader NN, El-kamali HH, Ghanem KZ, Farrag ARH. Volatile compounds and antioxidant activity of the aromatic herb *Anethum graveolens* 2013; 8(2): 79-88
62. Kurkcuoglu M, Sargin N, Baser KHC. Composition of volatiles obtained from spices by microdistillation. *Chem Nat Comp* 2003; 39: 355–357
63. Raghuv eer C, Tandon RV. Consumption of functional food and our health concerns *Pak J Physiol*, 2009; (5): 76–83
64. Priccina L, Karklina D. Natural antioxidant changes in fresh and dried spices and vegetables *World Acad Sci Eng Technol*, 2014; (8): 979–981

65. Oshaghi EA, Tavilani H, Khodadadi I, Goodarzi MT. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 5 (9), 720-727
66. Presnell J, Schreibma MP. Animal tissue techniques. 5th Ed, The John Hopkins University Press Ltd, London 1997; 269-271
67. Kaya, S. Narkotik olmayan ağrı kesiciler. İçinde: *Veteriner Uygulamalı Farmakoloji*. Editörler: S. Kaya. Cilt 1. 4. Baskı. Medisan, Ankara,: 2006; 295-320
68. Hawkins N, Golding J. A survey of the administration of drugs to young infants. The als pac survey team. Avon longitudinal study of pregnancy and childhood. British journal of clinical pharmacology 1995; 40: 79-82
69. Gunnell D, Murray V, Hawton K. Use of paracetamol (acetaminophen) for suicide and nonfatal poisoning: worldwide patterns of use and misuse. Suicide & life-threatening behavior 2000; 30: 313-326
70. Nelson SD. Mechanisms of the formation and disposition of reactive metabolites that can cause acute liver injury. Drug metabolism reviews 1995; 27(1-2): 147-177
71. Sies H, Sharov VS, Klotz LO, Briviba K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. J Biol Chem 1997; 31: 272(44): 27812-27817
72. Kannan R., Kuhlenkamp JF, Jeandidier E, et al. Evidence for carrier-mediated transport of glutathione across the blood-brain-barrier in the rat. J Clin Invest 1990; 85(6), 2009-2013
73. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. Clinical chemistry 1997; 43: 1209-1214
74. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials 1993; 15(4): 353-363
75. Bessems JG, Vermeulen NP. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches. Critical reviews in toxicology 2001; 31: 55-138
76. Mugford CA, Tarloff JB. The contribution of oxidation and deacetylation to acetaminophen nephrotoxicity in female Sprague-Dawley rats. Toxicology letters 1997; 93: 15-22

77. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal* 1984; 219: 1-14
78. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1982; 47: 412-426
79. Flanagan RJ, Meredith TJ. Use of N-acetylcysteine in clinical toxicology. *The American journal of medicine* 1991; 91: 131-139
80. Cekmen M, Ilbey YO, Ozbek E, et al. Curcumin prevents oxidative renal damage induced by acetaminophen in rats. *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 2009; 47: 1480-1484
81. Sener G, Sehirli AO, Ayanoglu-Dulger G. Protective effects of melatonin, vitamin E and n-acetylcysteine against acetaminophen toxicity in mice: a comparative study. *Journal of pineal research* 2003; 35: 61-68
82. Cengiz G, Aksoy N, Aktay G, Soylemezoğlu T. Effects of paracetamol and aspirin on lipid peroxidation in plasma and liver. *Ankara Ecz Fak Derg* 1999; 28: 47-60
83. Oak S, Choi BH. The effects of glutathione glycoside in acetaminofen-induced liver cell necrosis. *Exp Mol Pathol* 1998; 65: 15-24
84. Abdul Hamid Z, Budin SB, Wen Jie N, et al. Nephroprotective effects of Zingiber zerumbet Smith ethyl acetate extract against paracetamol-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Journal of Zhejiang University. Science B* 2012; 13: 176-185
85. Ghosh A, Sil PC. Anti-oxidative effect of a protein from *Cajanus indicus* L against acetaminophen-induced hepato-nephro toxicity. *Journal of biochemistry and molecular biology* 2007; 40: 1039-1049
86. Curhan GC, Knight EL, Rosner B, Hankinson SE, Stampfer MJ. Lifetime nonnarcotic analgesic use and decline in renal function in women. *Archives of internal medicine* 2004; 164: 1519-1524
87. Atkuri KR, Mantovani JJ, Herzenberg LA. N-Acetylcysteine--a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. *Current opinion in pharmacology* 2007; 7: 355-359
88. Abdel-Zaher AO, Abdel-Rahman MM, Hafez MM, Omran FM. Role of nitric oxide and reduced glutathione in the protective effects of aminoguanidine, gadolinium

- chloride and oleanolic acid against acetaminophen-induced hepatic and renal damage. *Toxicology* 2007; 234: 124-134
89. Fedekar F, Madkour and M, Abdel-Daim M. Hepatoprotective and Antioxidant Activity of *Dunaliella salina* in Paracetamol-induced Acute Toxicity in Rats *Indian J Pharm Sci.* 2013; 75(6): 642–648
 90. Slater TF, Cheeseman KH, Davies MJ, Proudfoot K, Xin W. Free radical mechanisms in relation to tissue injury. *The Proceedings of the Nutrition Society* 1987; 46: 1-12
 91. Larrey D, Pageaux GP. Drug induced acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2005; 17: 141-143
 92. Guo Q, Shen Z, Yu H, Zheng P. et al. Carnosic acid protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by potentiating Nrf2-mediated antioxidant capacity in mice. *Korean J Physiol Pharmacol* 2016; 20(1): 15-23
 93. Lei YC, Li W, Luo P, Liuweiwuling tablets attenuate acetaminophen-induced acute liver injury and promote liver regeneration in mice. *World J Gastroenterol* 2015; 14: 21(26) 8089-8095
 94. Zhang Y, Zhang F, Wang K, et al, Protective effect of allyl methyl disulfide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice *Chemico-Biological Interactions*, 2016; 249: 71-77
 95. Yi RK, Song JL, Lim YI, Kim YK, Park KY. Preventive effect of the Korean traditional health drink (Taemyeongcheong) on acetaminophen-induced hepatic damage in ICR mice. *Prev Nutr Food Sci* 2015; 20(1): 52-59
 96. Jing Y, Wu K, Liu J, et al. Aminotriazole alleviates acetaminophen poisoning via downregulating P450 2E1 and suppressing inflammation. *PLoS ONE* 10:2015; (4): e0122781. doi:10.1371/journal.pone.0122781
 97. Naeem MR, Alaa OA. Hepatoprotective effect of diil (*Anethum graveolens* L.) and fennel (*Foeniculum vulgare*) oil on hepatotoxic rats. *Pakistan journal of nutrition* 2014; 13(6): 303-309
 98. Karthivashan G, Kura AU, Arulselvan P, Isa NM, Fakurazi S, The modulatory effect of *Moringa oleifera* leaf extract on endogenous antioxidant systems and inflammatory markers in an acetaminophen-induced nephrotoxic mice model. Doi: 2016; 10.7717/peerj.2127

99. Saravi SSS, Hasanvand A, Shahkarami K, Dehpour AR. The protective potential of metformin against acetaminophen-induced hepatotoxicity in BALB/C mice, *Pharmaceutical Biology*, doi: 2016; 10.1080/13880209.2016.1185633
 100. Jadeja RN, Urrunaga NH, Dash S, Khurana S, Saxena NK. Withaferin-A reduces acetaminophen-induced liver injury in mice. *Biochem Pharmacol.* 2015; 97(1): 122-132
 101. Zheng Z, Sheng Y, Lu B, Ji L. The therapeutic detoxification of chlorogenic acid against acetaminophen-induced liver injury by ameliorating hepatic Inflammation. *Chemico-Biological Interactions* 2015; 238: 93–101
 102. Ding Y, Li Q, Xu Y, et al. Attenuating oxidative stress by paeonol protected against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *PLoS ONE* 2016; 11(5): e0154375
 103. Setorki M, Rafieian-Kopaei M, Merikhi A, et al. Suppressive impact of anethum graveolens consumption on biochemical risk factors of atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Int J Prev Med* 2013; 4(8): 889-895.
- 



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)



Tarih: 14.10.2015

Toplantı Sayısı: 09

Karar No:15/128

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 14.10.2015 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	KATILMADI
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Çağrı ŞAKALAR	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Nükhet KÜTÜK	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	KATILMADI
Serpil SARIÖZKAN	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Hamiyet ÜNAL	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	KATILMADI
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	
Asiye GÖKBELEN	Yardım Sevenler Derneği Başkanı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji A.D.'dan Doç. Dr. Feride KOÇ tarafından sunulan "Parasetamol ile Oluşturulan Akut Karaciğer Toksikasyonunda Anethum Graveolens (Dere Otu)'in Koruyucu Etkilerinin Belirlenmesi." başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 14.10.2015

Etik kurul Başkan Vekili : Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA

İmza :

:

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Serap KORKMAZ

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 24 Nisan 1985, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

Tel: +90 507 655 55 38

Email: seraoprak1985@hotmail.com

Yazışma Adresi: Halefhoca Cad. Mevlana Mah. Kınaş Yağmur Sitesi 4/12 Talas
KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	OMÜ Veteriner Fakültesi	2013
Önlisans	ERÜ Safiye Çıkrıkçıoğlu MYO	2006
Lise	TED Kayseri Koleji	2003

YABANCI DİL

İngilizce ve Almanca