



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp.Derg.  
2022; 36 (3): 188 - 192  
http://www.fusabil.org

Nuray BOSTANCIERİ<sup>1, a</sup>  
Hülya ELBE<sup>2, b</sup>  
Aslı TAŞLIDERE<sup>3, c</sup>  
Elif TAŞLIDERE<sup>3, d</sup>  
Gonca OZAN  
KOCAMUFTUOĞLU<sup>4, e</sup>

<sup>1</sup> Gaziantep Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Ana  
Bilim Dalı,  
Gaziantep, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Muğla Sıtkı Koçman  
Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Ana  
Bilim Dalı,  
Muğla, TÜRKİYE

<sup>3</sup> İnönü Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Ana  
Bilim Dalı,  
Malatya, TÜRKİYE

<sup>4</sup> Mehmet Akif Ersoy  
Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Biyokimya Ana Bilim Dalı,  
Burdur, TÜRKİYE

<sup>a</sup> ORCID: 0000-0002-3765-8274

<sup>b</sup> ORCID: 0000-0002-1254-0683

<sup>c</sup> ORCID: 0000-0003-3902-3210

<sup>d</sup> ORCID: 0000-0003-1723-2556

<sup>e</sup> ORCID: 0000-0001-6874-3669

Geliş Tarihi : 26.01.2022  
Kabul Tarihi : 07.07.2022

### Yazışma Adresi Correspondence

Nuray BOSTANCIERİ  
Gaziantep Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Ana  
Bilim Dalı,  
Gaziantep- TÜRKİYE

nuraybostancieri@gantep.edu.tr

## Siklofosfamid ile İndüklenen Karaciğer Hasarında Resveratrolün İyileştirici Etkileri

**Amaç:** Kemoprolifaktik bir ajan olan siklofosfamid (CYP) ile hasar oluşturulmuş sıçan karaciğerindeki histopatolojik ve biyokimyasal değişimlerin üzerine güçlü bir antioksidan olan resveratrol'ün (RSV) koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** 28 adet Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar Grup 1 (Kontrol), Grup 2 (CYP), Grup 3 (RSV), Grup 4 (CYP+RSV) olarak gruplara ayrıldı. CYP 150 mg/kg/ip/tek doz, RSV 10 mg/kg/ip/7 gün uygulandı. Yedi günlük deney süresi sonunda sıçanlar sakrifiye edilerek karaciğer dokuları, histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle incelendi. Kesitlere Hematoksilen-Eozin ve Periyodik Asit Schiff boyamaları yapıldı. Kesitler histopatolojik bulgularına göre değerlendirildi. Hasar derecesine göre 0 (yok), 1 (hafif), 2 (orta), 3 (şiddetli) olarak skorlandı. Kesitler Leica Q Win Image Analiz Sistemi ve Leica 280 ışık mikroskobu ile incelendi. Ayrıca karaciğer dokusu Malondialdehit (MDA) düzeyleri ve Katalaz (CAT) aktiviteleri spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü.

**Bulgular:** Kontrol grubuna (Grup 1) ait karaciğer dokuları normal histolojik görünümde izlendi. CYP grubunun (Grup 2) karaciğer dokularında ise portal alanda daha belirgin olmak üzere mononükleer hücre infiltrasyonu ve konjesyon, santral ven çevresinde görülen yaygın fokal nekroz alanları, hepatositlerde diffüz şişme ve sinuzoidal aralıkta daralma izlendi. PAS boyama yöntemi ile hepatositlerde glikojen kaybı ile perivasküler fibrozis tespit edildi. Grup 3 bulguları kontrol grubuna benzerdi. 4. grupta ise resveratrolün hücre infiltrasyonunu, konjesyonu, nekrozu ve sinuzoidal daralmayı anlamlı derecede iyileştirdiği gözlemlendi. Kontrol grubuna göre CYP grubunda karaciğer MDA düzeylerinin arttığı ve katalaz aktivitesinin azaldığı belirlendi. CYP+RSV grubunda, CYP grubuna göre karaciğer MDA düzeylerin azaldığı ve Katalaz aktivitesinin arttığı belirlendi.

**Sonuç:** CYP ile indüklenen sıçan karaciğer hasarında RSV'ün 10 mg/kg dozunda ve 7 gün süreyle uygulanmasında histopatolojik ve biyokimyasal olarak koruyucu etkileri olduğu gözlemlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Karaciğer, Oksidatif Stres, Resveratrol, Sıçan, Siklofosfamid

### The Protective Effects of Resveratrol in Cyclophosphamide-Induced Liver Injury

**Objective:** The purpose of the present study was to determine the histopathological and biochemical changes in rat liver injury induced with cyclophosphamide (CYP), a chemoprophylactic agent, and to investigate the protective effects of RSV.

**Materials and Methods:** A total of 28 Wistar albino male rats were used. The rats were divided into study groups as Group 1 (control), Group 2 (cyclophosphamide), Group 3 (resveratrol), Group 4 (CYP+RSV). Cyclophosphamide 150 mg/kg/ip/single dose, resveratrol 10 mg/kg/ip/7 days were administered. At the end of the seven-day experiment period, the rats were sacrificed and their liver tissues were examined by histological and biochemical methods. Hematoxylin-Eosin and Periodic Acid Schiff staining were performed on the sections. Sections were evaluated according to histopathological findings. It was scored as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate), 3 (severe) according to the degree of damage. Sections were examined with the Leica Q Win Image Analysis System and a Leica 280 light microscope. In addition, liver tissue Malondialdehyde (MDA) levels and Catalase (CAT) activities were measured by spectrophotometric methods.

**Results:** The liver tissues of the Control (Group 1) were monitored in normal histological appearance. There were mononuclear cell infiltration, congestion and common focal necrosis areas around the central vein, diffuse swelling in hepatocytes, and narrowing in the sinusoidal range, more pronounced in the portal area in the liver tissues of the CYP (Group 2). Perivascular fibrosis was detected with glycogen loss in hepatocytes the with PAS staining method. Group 3 findings were similar to the control group. It was observed that in Group 4 RSV improved cell infiltration, congestion, necrosis, and sinusoidal contraction at significant levels ( $p < 0.001$ ). RSV treatment decreased high malondialdehyde levels in liver tissue samples at significant levels, and increased the decreased catalase enzyme activity in liver tissue samples.

**Conclusion:** It was observed that RSV had histopathological and biochemical protective effects in CYP-induced rat liver damage.

**Key Words:** Liver, Oxidative Stress, Resveratrol, Rat, Cyclophosphamide

## Giriş

Karaciğer, fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları nedeniyle toksik maddelere en fazla maruz kalan organlardan biridir. Günümüzde karaciğer tahribatına neden olan birçok kimyasal maddeye maruziyet, karaciğerde çeşitli patolojik değişikliklere yol açmaktadır. CYP [N, N-bis (2-chloroethyl) tetrahydro-2H1,3,2-oxazophosphorin-2-amine 2-oxide; CYP] kanser tedavisinde klasik alkilleyici bir ajan olarak kullanılmaktadır. Bu ilaç ayrıca otoimmün hastalıkların, böbrek ve kemik iliği nakli tedavisinde önemli immünoşüpresif aktiviteye sahiptir (1). Buna karşın, nefrotoksisite, hepatotoksisite, kardiyotoksisite, immünotoksisite mutajenite gibi yan etkileri ve toksisite nedenleriyle CYP kullanımını kısıtlamaktadır (2).

Kanser kemoterapisinde bir ön ilaç olan CYP, karaciğerde sitokrom P450 enzim ailesiyle metabolize edilmektedir. Metabolizasyon işleminin sonunda akrolein ve fosfamid hardalı olan sitotoksik metabolitler oluşmaktadır (3). Karaciğerde oluşan bu metabolitler sistemik dolaşım ile farklı dokulara dağılarak serbest oksijen radikalleriyle (ROS) doku hasarına neden olmaktadır.

RSV (3, 4', 5 trihidroksilben), yaralanmaya yanıt olarak bazı spermatofitler tarafından üretilen ve doğal olarak oluşan bir fitoaleksindir (4). Çalışmalar resveratrolün nörolojik, hepatik ve kardiyovasküler sistemler üzerindeki yararlı etkilerini göstermektedir. Resveratrol, asetaminofen, etanol ve karbon tetraklorür gibi hepatotoksinlerden kaynaklanan karaciğer hasarlarına karşı koruma sağlamaktadır (5, 6).

Bu çalışmada, antikanserojen ilaç olarak sık kullanılan CYP'nin, karaciğerde oluşturduğu yan etkilere karşı, antioksidan bir ajan olarak bilinen resveratrolün karaciğer dokusundaki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

**Araştırma ve Yayın Etiği:** Çalışmaya İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulunun onayı (2012/A-104) ile başlandı.

**Hayvanlar ve Çalışma Düzeni:** Çalışmada İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları laboratuvarından temin edilen 28 adet üç aylık 250-300g ağırlıkta Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart laboratuvar koşullarında, oda sıcaklığında barındırıldı, standart rat yemi ve musluk suyu ile ad libitum olarak beslendiler. Grup 1: Kontrol (4% etanol/ip/7gün), Grup 2: CYP (150 mg/kg/ip/tek doz), Grup 3: RSV (10 mg/kg/ip/7gün), Grup 4: CYP (150 mg/kg/ip/tek doz) + RSV (10 mg/kg/ip/7gün) olmak üzere her gruba yedi adet sıçan ayrıldı (RSV 4% etanol içinde çözdürüldü) (5, 6). Deney sırasında cerrahi bir işlem uygulanmadığı için sham grubu oluşturulmadı ve deneyin sonunda sıçanlar ketamin/ksilazin 90/10 mg/kg/ip anestezisi ile sakrifiye edilerek karaciğer dokuları çıkarıldı (7).

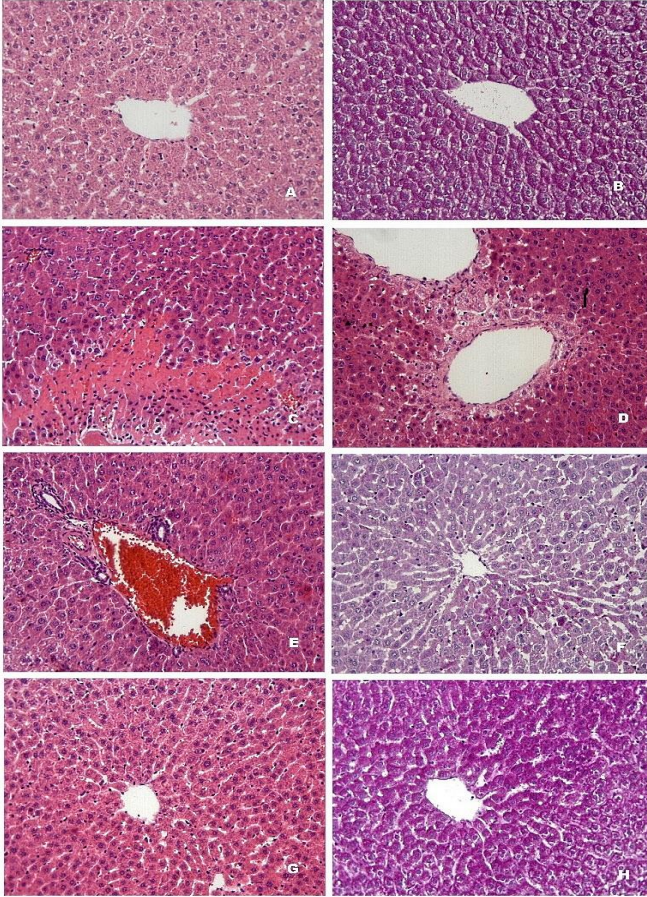
**Histopatolojik Analizler:** Işık mikroskopik çalışmalar için karaciğer dokuları %10'luk formalin ile fikse edildi ve doku takibine alındı. Doku takibinde Leica TP 1010 otomatik doku takip cihazı kullanıldı. Daha sonra dokular bloklara konularak parafine gömüldü. Parafin bloklardan, Leica RM 2245 (Almanya) mikrotomda 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Lam üzerindeki kesitler, 1 gece etüvde bırakıldıktan sonra ışık mikroskobu incelemeleri için H-E (Hematoksilen Eosin) ve PAS (Periyodik Asit Schiff) boyamaları uygulandı. Kesitler Leica Q Win Image Analiz Sistemi ve Leica 280 ışık mikroskobu ile incelendi. Kesitlere histopatolojik hasar skorlaması yapıldı. Mononükleer hücre infiltrasyonu, konjesyon, nekroz ve sinuzoidal dilatasyon bulguları hasar olarak değerlendirildi. Hasar derecesine göre 0 (yok), 1 (hafif), 2 (orta), 3 (şiddetli) olarak skorlandı.

**Biyokimyasal Analizler:** Biyokimyasal analizler için alınan karaciğer dokuları çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı. Doku örnekleri 0,15 mol KCl solüsyonu ile 1:10 oranında homojenize edildi. Homojenatlar 3500 rpm'de 10dk santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantta MDA düzeyleri ve katalaz aktivitesi spektrofotometrik yöntemlerle belirlendi. Doku örneklerinde MDA düzeyleri, lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden olan MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyonu temelinde dayanan, Placer ve ark.'dan modifiye edilmiş olan yöntemle göre ölçüldü (8). Doku katalaz aktivitesi ölçümü H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in katalaz enzimi tarafından yıkım hızının belirlendiği Aebi metoduna göre yapıldı (9). CAT enzim aktivitesi, karaciğer dokularında k/g protein olarak ifade edildi. Doku protein düzeyi tayininde Lowry metodu kullanıldı (10).

**İstatistiksel Analiz:** Analizler için SPSS 22.0 windows versiyonu kullanıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shaphiro wilk testi ile test edildi. Normal dağılım değişkenler için dört bağımsız grup karşılaştırmasında ANOVA testi kullanıldı. Veriler aritmetik ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. P<0.05 anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

Kontrol grubuna ait karaciğer dokuları H-E boyamada normal histolojik görünümde (Şekil 1A), PAS boyamada ise glikojenle dolu sağlıklı hepatositler izlendi (Şekil 1B). CYP grubunun karaciğer dokularında ise portal alanda daha belirgin olmak üzere mononükleer hücre infiltrasyonu (Şekil 1C, E), damarsal yapılarda konjesyon ve eritrosit birikimi (Şekil 1E), santral ven çevresinde görülen yaygın fokal nekroz alanları ve hafif perivasküler fibrozis (Şekil 1C, D), hepatositlerde diffüz şişme (Şekil 1C-E), sinuzoidal aralıkta genişleme izlendi (Şekil 1B, F). PAS boyama yöntemi ile hepatositlerde glikojen kaybı (Şekil 1F) tespit edildi. CYP+RSV grubunda ise RSV'nün hücre infiltrasyonunu, konjesyonu, nekrozu ve sinuzoidal dilatasyonu anlamlı derecede iyileştirdiği, PAS boyamada hepatositlerin glikojenle dolu normal histolojik yapısını aldığı izlendi (p<0.001), (Şekil 1G, H), (Şekil 2).



Şekil 1. Histopatolojik bulgular

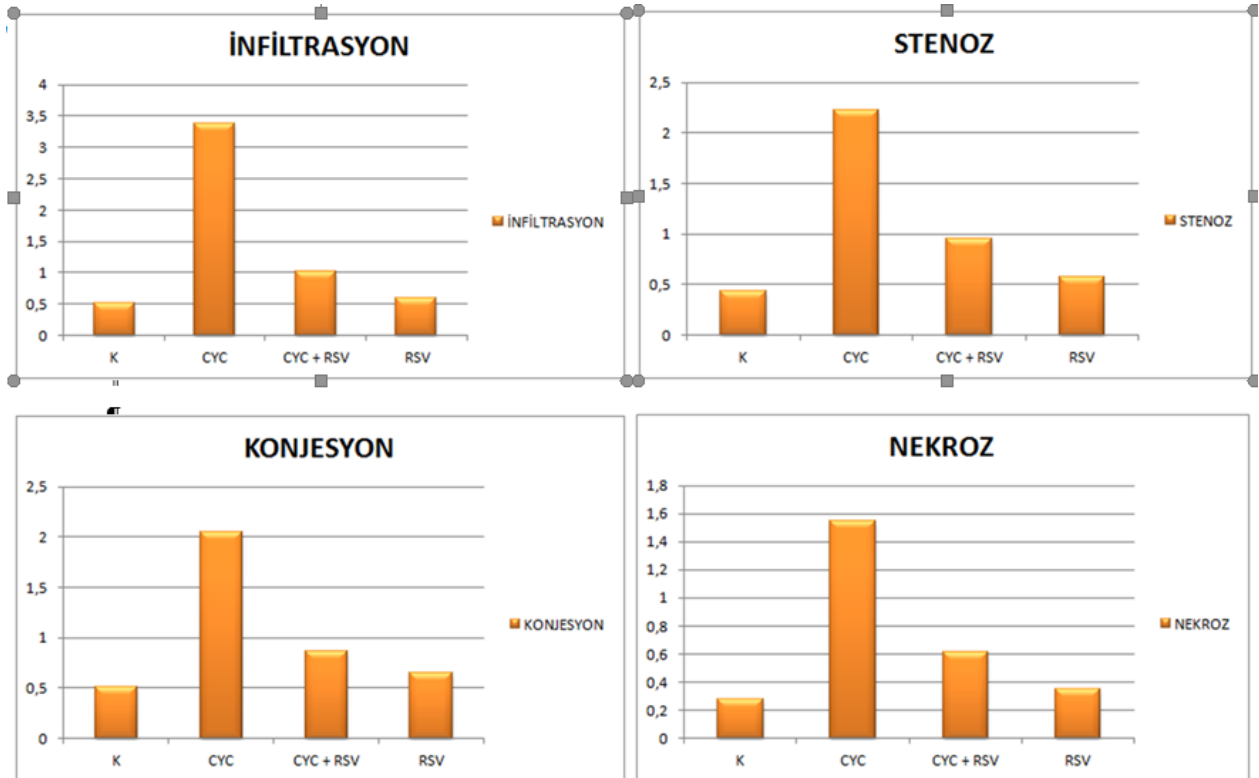
Karaciğer MDA düzeyleri, CYP uygulanan grupta kontrol grubuna ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi ( $p<0.001$ ). CYP + RSV grubunda ise CYP grubuna göre MDA düzeylerinde bir düşüş belirlendi ( $p<0.001$ ). RSV grubu MDA düzeylerinin diğer gruplardan en düşük değerde olduğu bulundu. En yüksek katalaz aktivitesi kontrol grubunda tespit edildi. CYP grubu katalaz aktivitesi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulundu ( $p<0.001$ ). CYP + RSV grubu katalaz aktivitesi ise CYP grubuna göre yüksek ölçüldü. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri ve CAT aktiviteleri Tablo1'de verilmiştir.

Tablo1. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri ve Katalaz aktiviteleri

	Kontrol (n=7)	CYC (n=7)	CYC+RSV (n=7)	RSV (n=7)	P
MDA (nmol/g doku)	16.22±1.70 <sup>c</sup>	29.40±4.45 <sup>a</sup>	23.55±1.67 <sup>b</sup>	12.56±1.15 <sup>c</sup>	0.001
Katalaz (k/mg protein)	205.71±7.72 <sup>a</sup>	87.57±3.97 <sup>c</sup>	98.02±3.43 <sup>c</sup>	177.21±6.98 <sup>b</sup>	0.001

Verilerin karşılaştırılması ortalama ve standart hata olarak verilmiştir.

<sup>a,b,c</sup>: Satırlarda farklı harfler bulunan değerler gruplar arası istatistiksel olarak farklılığı gösterir ( $P<0.05$ ).



Şekil 2. Gruplararası histopatolojik hasar skorlaması

## Tartışma

CYP, lösemi ve lenfoma ve meme, akciğer, prostat ve yumurtalık kanserleri gibi geniş bir malignite spektrumuna karşı etkilidir (11). Ancak kullanıldığı dozlarda birçok organ ve sistem üzerinde yan etkiler oluşturmaktadır. Normal veya hastalıklı dokuda ortaya çıkan bu çok sayıda yan etki CYP kullanımının en büyük sınırlayıcısıdır. CYP tedavisi hayati organlarda peroksidatif hasara neden olan ROS üretimiyle sonuçlanır (12). İlaça veya toksine bağlı karaciğer hasarının patogenezi genellikle bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkaran veya hücrenin biyokimyasını doğrudan etkileyen toksik metabolitlerin katılımını içerir. CYP'nin, antioksidan alımının kemoterapi reaksiyonlarını kontrol etmeye yardımcı olduğu ve antineoplastik ilaçların olumsuz yan etkilerini en aza indirdiğini bildirmiştir (13). İlaç metabolitleri, kovalent bağlanma, azaltılmış glutatyonun tükenmesi veya oksidatif stres dahil olmak üzere proteinler, lipitler ve DNA üzerinde etkileri olan çeşitli kimyasal reaksiyonlara maruz kalabilmekte veya bunları teşvik edebilmektedir (14).

RSV, etanol ve karbontetraklorür (CCl<sub>4</sub>) gibi iyi bilinen hepatotoksinler için karaciğer hasarına karşı koruma sağlar (15, 16). RSV 'ün karaciğeri koruyucu olası mekanizmaları arasında; pro-enflamatuvar mediatörlerin salınımı ve sentezinin inhibisyonu ile enflamatuvar yanıtı baskılaması, eikosanoid sentezinin modifikasyonu, kupffer hücreleri ve adezyon moleküllerinin inhibisyonu, aktive olmuş immün hücrelerin baskılanması veya indüklenebilir nitroz oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz 2 (COX-2)'nin inhibisyonu sayılabilir (17). RSV'ün birçok kanser vakasında anti-kanserojen olarak kullanıldığı da bildirilmektedir (18). Toksik maddelere maruziyet ve ilaç kullanımının yan etkilerine bağlı olarak oluşan karaciğer hasarı oldukça önemlidir. Oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulması olarak tanımlanan oksidatif stres, birçok patolojik durumda ortaya çıkmaktadır (19). Bu süreçte özellikle serbest oksijen radikalleri ve artmış hidrojen peroksit gibi prooksidan yapılar hasarı artırmaktadır.

## Kaynaklar

- Habibi E, Shokrzadeh, M Chabra. A. et al., Protective effects of *Origanum vulgare* ethanol extract against cyclophosphamide-induced liver toxicity in mice. *Pharm Biol* 2015; 53: 10-15.
- Nafees S, Rashid S, Ali N. et al. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: Role of NFκB/MAPK pathway. *Chem Biol Interact* 2015; 231: 98-107.
- Abraham P, Sugumar E. Increased glutathione levels and activity of PON1 (phenyl acetate esterase) in the liver of rats after a single dose of cyclophosphamide: A defense mechanism? *Exp Toxicol Pathol* 2008; 59: 301-306.
- Walle T. Bioavailability of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1215: 9-15.
- Şener G, Toklu HZ, Şehirli AÖ. et al., Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Hepatol Res* 2006; 35: 62-68.
- Chávez E, Reyes-Gordillo K, Segoviaet J. et al., Resveratrol prevents fibrosis, NF-κB activation and TGF-β increases induced by chronic CCl<sub>4</sub> treatment in rats. *J Appl Toxicol* 2008; 28: 35-43.
- Rodrigues SF, Oliveira MA, Martins JO. et al., Differential effects of chloral hydrate-and ketamine/xylazine-induced anesthesia by the sc route. *Life Sci* 2006; 79: 1630-1637.
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1966; 16: 359-364.
- Aebi H. Catalase, in *Methods of enzymatic analysis.*, Elsevier 1974; 673-684.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, R. Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Khan TS, Sundin A, Juhlin C. et al. Vincristine, cisplatin, teniposide, and cyclophosphamide combination in the

- treatment of recurrent or metastatic adrenocortical cancer. *Med Oncol* 2004; 21: 167-177.
12. Patel J.M. Stimulation of cyclophosphamide-induced pulmonary microsomal lipid peroxidation by oxygen. *Toxicology* 1987; 45: 79-91.
  13. Weijl N, Cleton F, Osanto S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treat Rev* 1997; 23: 209-240.
  14. Kaplowitz, N., Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. in *Semin Liver Dis*, 2002. Copyright© 2002 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New
  15. Ajmo JM, Liang X, Rogers CO. Resveratrol alleviates alcoholic fatty liver in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G833-G842.
  16. Rivera H, Shibayama M, Tsutsumi V. et al. Resveratrol and trimethylated resveratrol protect from acute liver damage induced by CCl<sub>4</sub> in the rat. *J Appl Toxicol* 2008; 28: 147-155.
  17. Alarcon De La Lastra C, Villegas I. Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 405-430.
  18. Zhou Y, Jin Y, Yu H. et al. Resveratrol inhibits aflatoxin B<sub>1</sub>-induced oxidative stress and apoptosis in bovine mammary epithelial cells and is involved the Nrf2 signaling pathway. *Toxicon* 2019; 164: 10-15.
  19. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329: 23-38.