



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.  
2011; 25 (2): 73 - 76  
http://www.fusabil.org

### DeneySEL Karbon Tetraklorür Toksikitesi Sonucu Karaciğerdeki İŞP70 İmmunoreaksiyon Artışı Üzerine Melatonin Hormonunun Etkisi

Ömür KARACA<sup>1</sup>  
Hıdır PEKMEZ<sup>2</sup>  
Murat Abdülğani KUŞ<sup>3</sup>  
Nusret AKPOLAT<sup>4</sup>  
Murat ÖGETÜRK<sup>2</sup>  
İlter KUŞ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Balıkesir Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Anatomi Anabilim Dalı  
Balıkesir, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Anatomi Anabilim Dalı,  
Elazığ, TÜRKİYE

<sup>3</sup>Mehmet Akif Ersoy  
Üniversitesi,  
Sağlık Yüksekokulu,  
Burdur, TÜRKİYE

<sup>4</sup>İnönü Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Patoloji Anabilim Dalı,  
Malatya, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 26.05.2011  
Kabul Tarihi : 22.06.2011

#### Yazışma Adresi Correspondence

Ömür KARACA  
Balıkesir Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Anatomi Anabilim Dalı  
Balıkesir-Türkiye

insula1976@hotmail.com

**Amaç:** Karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) böbrek ve özellikle karaciğerde, doku hasarına yol açan uçucu organik bir kimyasal ajandır. Bu çalışma, sıçanlarda, CCl<sub>4</sub>'ün indüklediği akut karaciğer toksisitesine karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisinin araştırılması amacıyla yapıldı.

**Gereç ve Yöntem:** 24 adet Wistar-Albino cinsi yetişkin erkek sıçan, rastgele üç eşit gruba ayrıldı: Kontrol, CCl<sub>4</sub> ve CCl<sub>4</sub>+Melatonin. CCl<sub>4</sub> grubu sıçanlara, zeytinyağı içinde CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) subkutan yoldan enjekte edilirken, CCl<sub>4</sub>+Melatonin grubunda yer alan hayvanlara ise CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) ve Melatonin (25mg/kg) bir ay boyunca, günde bir, subkutan yoldan enjekte edildi. Kontrol grubu sıçanlara ise saf zeytinyağı enjekte edildi. Karaciğer dokuları, Isı Şok proteini 70'in (İŞP70) immunoreaksiyonunu tespit etmek için immunohistokimyasal olarak incelendi.

**Bulgular:** CCl<sub>4</sub> toksisitesi sonucu karaciğerde İŞP70 immunoreaksiyonunu gösteren yoğun bir boyanma görüldü. CCl<sub>4</sub> maruziyeti ile birlikte melatonin enjekte edilen sıçanlara ait karaciğer doku kesitlerinde ise minimal İŞP70 boyanması tespit edildi.

**Sonuç:** Immunohistokimyasal düzeyde elde ettiğimiz bu bulgular sonucunda; CCl<sub>4</sub> maruziyeti sonucu karaciğerde meydana gelen zararlı etkinin, melatonin hormonu tarafından önlediği tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Karbon tetraklorür, melatonin, karaciğer, İŞP70.

#### The Effects of Melatonin on The Increased HSP70 Immunoreaction in The Liver Induced by Experimental Carbon Tetrachloride Toxicity

**Objective:** Carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) is a volatile organic chemical, which causes tissue damage, especially to the liver and kidney. The potential for protective effects of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats was investigated in this work.

**Materials and Methods:** Twenty-four male Wistar-Albino rats were randomly divided into three equal groups: Control, CCl<sub>4</sub> and CCl<sub>4</sub> plus melatonin (CCl<sub>4</sub>+Melatonin). Rats in CCl<sub>4</sub> group were injected subcutaneously with CCl<sub>4</sub> 0.5 ml/kg in olive oil while rats in CCl<sub>4</sub>+Melatonin group were injected subcutaneously with CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg) plus melatonin (25 mg/kg) every other day for one month. Control rats were injected olive oil. Hepar tissues were examined immunohistochemically to detect heat shock protein 70 immunoreactivity.

**Results:** A dense staining indicating Hsp70 immunoreaction was observed in the liver depending on the toxicity of CCl<sub>4</sub>. The liver tissue sections of rats injected with melatonin and CCl<sub>4</sub>, the HSP70 staining was detected minimal.

**Conclusion:** As a result of these findings obtained from immunohistochemical study; it was detected that CCl<sub>4</sub> induced tissue damage in the liver were prevented by the hormone melatonin.

**Key Words:** Carbon tetrachloride, melatonin, liver, Hsp70.

#### Giriş

Karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) saydam, yanıcı olmayan ve kolayca buharlaşabilen renksiz bir sıvıdır (1). DeneySEL olarak yapılan çalışmalarda CCl<sub>4</sub>'ün karaciğerde, mitotik aktiviteyi artırdığı, hepatositlerde dejenerasyon, hepatik yağ dejenerasyonu, mononükleer hücre infiltrasyonu, fibrozis, siroza ve kansere neden olduğu gösterilmiştir (1-3). Oluşturduğu karaciğer dejenerasyonu, insandaki siroz gelişim sürecine benzerlik gösterdiği için CCl<sub>4</sub> kemirgenlerde deneySEL çalışmalarda en çok kullanılan kimyasal ajandır. CCl<sub>4</sub>'e bağlı karaciğer toksisitesinin oluşmasında oksidatif stres önemli rol oynar (4). Yapılan çalışmalarda, CCl<sub>4</sub>'ün toksik etkilerine karşı melatonin (5), Luffa acutangula (2) losartan (6), ginkgo biloba ekstresi (7), siyah çay ekstresi (8) gibi ajanların etkileri araştırılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), pineal bez tarafından sirkadiyan ritimde ve karanlıkta salgılanan bir hormondur. Vücutta endokrin sistemin düzenlenmesi, immun fonksiyonun artırılması, düz kas tonusunun ayarlanması ve gonadal fonksiyonların

baskılanması gibi birçok fizyolojik işlevlerde görev alır. Melatonin hormonu indolamine ailesinin bir üyesidir ve onun elektron-donor özelliğinden dolayı güçlü bir antioksidan özelliğine sahiptir (5, 9, 10). Melatonin hormonu, hem yağda hem de suda çözünabilir özelliğe sahip olduğu için, nükleus dahil hücrenin her organeline ulaşabilir. Bu özellik, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, melatonine bir üstünlük sağlamaktadır (9, 11). Isı şok proteinleri (İŞP) çeşitli fonksiyonları olan bir protein ailesi olup, ortak özellikleri hücrelerin ani sıcaklık değişiklikleri, anoksi, reaktif oksijen metabolitleri ve glukoz düzeylerinde değişiklik gibi çevresel faktörlere maruz kaldıkları zaman üretilmeleridir (12). İŞP'leri çeşitli stres uyarılarına cevap olarak bütün canlıların hücreleri tarafından üretilen bir grup proteindir. İlk olarak hücrelerde ısı şokuyla tespit edildikleri için İŞP adıyla anılırlar (13). Bu protein ailesinden olan İŞP70 (HSP70), sitoplazma, çekirdek, endoplazmik retikulum ve mitokondride protein taşınmasına katılır. Stres altında proteinleri korur. Katlanmamış proteinlerin kümeleşmesini önler. Katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinler arasındaki dengeyi sağlar. Polipeptitleri birbirine bağlar. ATP'ye bağlanır ve ATPaz aktivitesi gösterir (14). 70 kDa'lık İŞP (İŞP70) stressiz hücrelerde çok düşük miktarlardayken, stresi takiben hızlı bir yükselme gösterdiği için en sık çalışılan İŞP'dir. Dokularda İŞP70'in immunoreaktivitesinin artması, herhangi bir nedenle oluşan toksik etkinin İŞP sentezini indüklediğinin bir göstergesidir. İŞP70'in dokudaki ve hücredeki immunolokalizasyonu immunohistokimyasal yöntem ile gösterilmektedir.

Bu çalışmada, sıçanlarda, CCl<sub>4</sub>'ün hepatotoksik etkisine karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisinin, immunohistokimyasal yöntemle, karaciğerde İŞP70 protein sentezi analiziyle ortaya konulması amaçlandı.

## Gereç ve Yöntem

**Hayvanlar ve Tedavi:** Çalışmamızda, ağırlıkları 170-220 gram arasında değişen toplam 24 adet yetişkin erkek Wistar-Albino cinsi sıçan kullanıldı. Rastgele üç eşit gruba ayrılan sıçanlar, özel hazırlanmış kafeslerde, ısı ayarlanmış (22±1 °C), 12 saat güneş ışığı alan ve özel havalandırma tertibatı olan ortamda, yeterli miktarda su ve sıçan yemi ile beslendi. Kontrol grubu sıçanlara deney boyunca 30 gün, güneşirü subkutan (sc) saf zeytinyağı (1 ml/kg) enjekte edildi. CCl<sub>4</sub> grubu sıçanlara 30 gün, güneşirü olarak zeytinyağı içinde CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg, sc) uygulandı. CCl<sub>4</sub>+melatonin grubunda yer alan hayvanlara ise aynı süre ve dozda CCl<sub>4</sub> yanı sıra 25 mg/kg Melatonin (0.1 ml. alkol içinde çözüldü) subkutan yoldan enjekte edildi. Çalışmamız Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

**İmmünohistokimyasal Analiz:** 30 günlük deney süresi sonunda tüm sıçanlar dekapitasyon yöntemiyle öldürüldü. Alınan karaciğer dokuları Bouin solüsyonunda tespit edildi. Doku örnekleri rutin histolojik doku takip işlemlerinden geçirilerek, parafine gömüldü. Parafin bloklardan 5µm. kalınlıkta kesitler alındı. Kesitler poly-L-lysine ile kaplanan lamlar üzerine alındı. Daha sonra

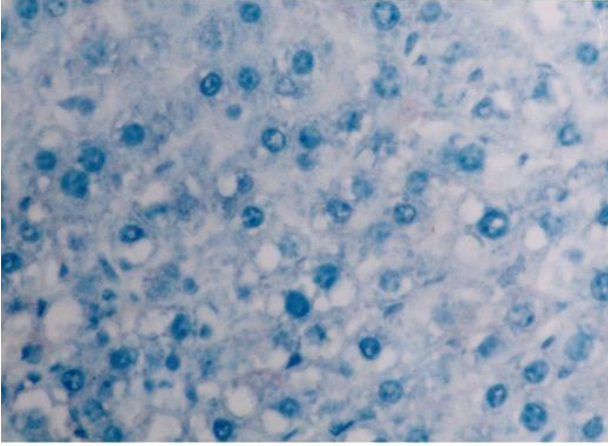
lamlar immünohistokimyasal olarak boyandı. Boyamada ABC Metodu kullanıldı. Bu yöntemde preparatlar deparafinizasyondan sonra, sırasıyla distile suda 5 dakika, pH'ı 7.6 olan fosfat tamponlu tuzlu su (PBS)'de 5 dakika yıkandı. "Antijen retrieval" işlemi 750 W dalga boyuna ayarlanmış mikrodalga fırında Citrate Buffer (pH=6.0) içinde 5 dakika uygulandı. Daha sonra, %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'de (Sigma) 5 dakika, tekrar PBS'de 5 dakika (pH = 7.6) yıkandı. Daha sonra İŞP70 primer antikoruyla (Biogenex San Ramon, CA) oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. PBS'de 5 dakika (pH = 7.6) bekletildi ve ardından 30 dakika sekonder antikor (Biogenex San Ramon, CA) uygulandı. Streptavidin peroksidaz, AEC kromojen (Sigma) uygulamasından sonra, Mayer's hematoksilin ile zıt boyama yapıldı ve dehidratasyon işleminden sonra özel kapatma maddesi (CC/MOUNT, DBS, Pleasanton, CA, USA) ile kapatıldı (15-17). İmmünohistokimyasal boyamada primer antikor olarak Biogenex firmasının kullanıma hazır, rabbit, monoklonal İŞP70 kullanıldı. Kesitler ışık mikroskopik olarak Olympus BX50 mikroskopuyla patoloji uzmanı tarafından değerlendirildi. İmmünohistokimyasal boyamanın değerlendirilmesi boyanma yoğunluğuna göre yapıldı. Böylece dokularda veya hücrelerde İŞP70'in fazla immunoreaksiyonu, koyu boyanma ile kendini göstermektedir. İmmünohistokimyasal olarak İŞP70 boyanma reaksiyon şiddeti, 0'dan +5'e kadar semikantitatif olarak derecelendirildi (Tablo 1).

**Tablo 1.** İmmünohistokimyasal boyanma yoğunluğunun derecelendirilmesi.

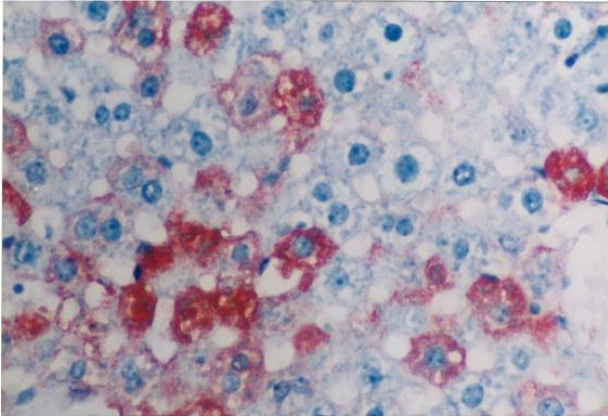
Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Minimal
+2	Az
+3	Orta
+4	Çok
+5	Şiddetli

## Bulgular

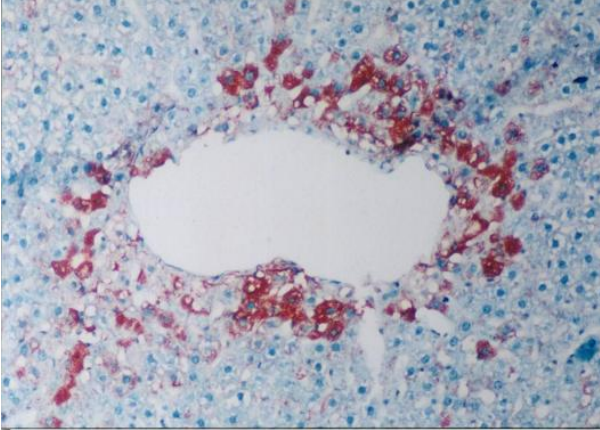
CCl<sub>4</sub>'ün indüklediği İŞP70 boyanması ile melatonin hormonunun etkisi Şekil 1-4'te gösterilmiştir. Kontrol grubuna ait karaciğer dokularında İŞP70 boyanmasına rastlanmadı (0) (Şekil 1). CCl<sub>4</sub> grubunda İŞP70 immunoreaksiyonunu gösteren yoğun bir boyanma görüldü (+5) (Şekil 2-3). CCl<sub>4</sub>+melatonin grubunda ise minimal İŞP70 boyanması görüldü (+1) (Şekil 4).



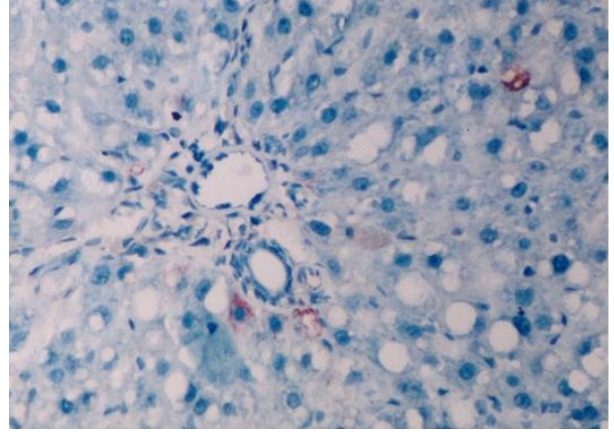
**Şekil 1.** Kontrol grubuna ait sıçanların karaciğer dokusunun görünümü X40.



**Şekil 2.** CCl<sub>4</sub> toksisitesi sonucu karaciğer dokusunda şiddetli IŞP70 boyanması X40



**Şekil 3.** CCl<sub>4</sub> toksisitesi sonucu karaciğer dokusunda yoğun IŞP70 immunoreaksiyonu X40.



**Şekil 4.** CCl<sub>4</sub> maruziyetiyle birlikte melatonin uygulanan sıçanların karaciğer dokusunda minimal düzeyde IŞP70 boyanması X40

### Tartışma

Oksidatif stres sonucu açığa çıkan serbest oksijen radikallerine bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyonunun; kanser, aterosklerotik kalp hastalıkları, karaciğer hastalıkları ve toksik hücre hasarlarında oluşan patogeneze sorumlu olduğu bilinmektedir (18, 19). CCl<sub>4</sub>'ün dokularda hasar oluşturma mekanizması, CCl<sub>4</sub>'ün sitokrom P450 enzimi aracılığıyla oldukça toksik triklorometil (CCl<sub>3</sub>) ve triklorometil peroksil (CCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) serbest radikallerine dönüşümü sonrası başlayan lipid peroksidasyonu ile ortaya çıkan oksidatif hasar olarak açıklanmıştır (20). Yapılan çalışmalarda CCl<sub>4</sub> uygulanmış sıçanlarda oksidatif stres ve karaciğer kupfer hücrelerinin inaktivasyonunun, karaciğer fibrozisinde önemli bir rol oynadığı görülmüştür (1, 18). Deneysel çalışmalarda, CCl<sub>4</sub>'ün karaciğer ve böbrek başta olmak üzere birçok organda doku hasarına yol açtığı ve özellikle karaciğer dokusunda koagülatif nekroz, ağır fibroz, mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji, yağ dejenerasyonu ve dejeneratif nodüler şekillenme gibi klasik siroz histolojik bulgularına neden olduğu ayrıca serum AST ve ALT değerlerini de artırdığı gözlenmiştir (1, 4, 20). Lee ve ark. (21), yaptıkları çalışmada, CCl<sub>4</sub> ile oluşturulan karaciğer hasarında IŞP70 proteinlerinde aşırı bir uyarılma olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızın immunohistokimyasal analiz sonuçlarında; CCl<sub>4</sub> toksisitesi sonucu karaciğerde şiddetli IŞP70 boyanmasının olduğu tespit edildi. Bu nedenle CCl<sub>4</sub>'e bağlı olarak karaciğerde oluşan toksik etki yönüyle çalışmamız daha önce yapılmış olan araştırmalarla uyum göstermektedir.

CCl<sub>4</sub>'ün oluşturduğu hasarı önlemeye veya ortadan kaldırmaya yönelik çalışmalar incelendiğinde, kullanılan antioksidik ajanların, antioksidan veya serbest radikal giderici özelliklerinden yararlandığı görülür. Bunlardan biri olan melatoninin, CCl<sub>4</sub>'ün oluşturduğu intoksikasyon sonrasında böbrek ve karaciğerde oluşan hasarı azalttığı rapor edilmiştir (1, 20). Vücutta birçok fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde görev alan melatonin hormonunun güçlü bir antioksidan olduğu ve dokularda

lipid peroksidasyon sonucu oluşan oksidatif hasarı önlediği bildirilmiştir (22, 23). Zavodnik ve ark. (5), melatonin tedavisi sonrasında, CCl<sub>4</sub>'ün indüklediği hepatotoksitite sonucu oluşan hidropik distrofi özelliği taşıyan hepatositlerin sayısının anlamlı bir şekilde azaldığını belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada, melatoninin karaciğer hasarını ve yağ peroksidasyonunu azalttığı ve antioksidan enzimleri (SOD) artırarak oluşan toksik etkiye karşı karaciğeri koruduğu belirtilmiştir (24). Bu çalışmada da CCl<sub>4</sub>'ün indüklediği toksisitete karşı

melatoninin hepatoprotektif etkisi immunohistokimyasal analiz ile ortaya konuldu. Melatonin enjekte edilen sıçanların karaciğerlerinde IşP70 boyamasının minimal düzeyde olduğu gösterildi.

İmmunohistokimyasal düzeyde yapmış olduğumuz bu çalışma sonucunda, CCl<sub>4</sub> maruziyeti sonucu karaciğerde meydana gelen toksik etkinin melatonin uygulamasıyla önlendiği tespit edildi.

## Kaynaklar

1. Kus I, Ogeturk M, Oner H, et al. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: a light microscopic and biochemical study. *Cell Biochem Funct* 2005; 23: 169-174.
2. Jadhav VB, Thakare VN, Suralkar AA, et al. Hepatoprotective activity of *Luffa acutangula* against CCl<sub>4</sub> and rifampicin induced liver toxicity in rats: a biochemical and histopathological evaluation. *Indian J Exp Biol* 2010; 48: 822-829.
3. Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2007; 25: 185-209.
4. Hong RT, Xu JM, Mei Q. Melatonin ameliorates experimental hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1452-1458.
5. Zavodnik LB, Zavodnik IB, Lapshina EA, et al. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride hepatotoxicity in rats. *Cell Biochem Funct* 2005; 23: 353-359.
6. Croquet V, Moal F, Veal N, et al. Hemodynamic and antifibrotic effects of Losartan in rats with liver fibrosis and/or portal hypertension. *Hepatology* 2002; 37: 773-780.
7. Bahcecioglu IH, Ustundag B, Ozercan I, et al. Protective effect of Ginkgo biloba extract on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage. *Hepatology Res* 1999; 15: 215-224.
8. Fadhel ZA, Amran S. Effects of black tea extract on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in liver, kidneys, and testes of rats. *Phytother Res* 2002; 16: 28-32.
9. Kuş İ, Sarsılmaz M. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. *T Klin J Med Sci* 2002; 22: 221-226.
10. Guerrero JM, Reiter RJ. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr Res* 1992; 18: 91-113.
11. Arendt J. Melatonin. *Clin Endocrinol* 1988; 29: 205-209.
12. Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 1999; 61: 243-282.
13. Subjeck JR, Sciandra JJ, Johnson RJ. Heat shock proteins and thermotolerance a comparison of induction kinetics. *Br J Radiol* 1982; 55: 579-584.
14. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 670-684.
15. Eddy EM. Role of heat shock protein HSP70 in spermatogenesis. *Rev Reprod* 1999; 4: 23-30.
16. Özen OA, Akpolat N, Songur A, et al. Effect of formaldehyde inhalation on Hsp70 in seminiferous tubules of rat testes: an immunohistochemical study. *Toxicol Ind Health* 2005; 6: 249-254.
17. Dix DJ, Allen JW, Collins BW et al. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Developmental Biol*, 1996; 93: 3264-3268.
18. Muriel P, Escobar Y. Kupffer cells are responsible for liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride. *J Appl Toxicol* 2003; 23: 103-108.
19. Luckey SW, Peterson DR. Activation of Kupffer cells during the course of carbon tetrachloride induced liver injury and fibrosis in rats. *Exp Mol Pathol* 2001; 71: 226-240.
20. Aranda M, Albendea CD, Lostale F, et al. In vivo hepatic oxidative stress because of carbon tetrachloride toxicity: protection by melatonin and pinoline. *J Pineal Res* 2010; 49: 78-85.
21. Lee KJ, Terada K, Oyadomari S, et al. Induction of molecular chaperones in carbon tetrachloride-treated rat liver: implications in protection against liver damage. *Cell Stress & Chaperones* 2004; 9: 58-68.
22. Longoni B, Salgo MG, Pryor WA, Marchiafava PL. Effects of melatonin on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. *Life Sci* 1998; 62: 853-859.
23. Sewerynek E, Melchiorri DA, Chen L, Reiter RJ. Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 903-909.
24. Rosa Dp, Bona S, Simonetto D, et al. Melatonin protects the liver and erythrocytes against oxidative stress in cirrhoticrats. *Arq Gastroenterol* 2010; 47: 71-77.