



Ratlarda Karbon Tetraklorür ile İndüklenen Karaciğer Toksikasyonu Üzerine Resveratrol'ün Koruyucu Etkisinin Histopatolojik ve TUNEL Metodu ile Araştırılması

Serkan YILDIRIM¹✉

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received
13.02.2017

Kabul Tarihi/Accepted
03.04.2017

Yayın Tarihi/Published
30.10.2017

Öz: Bu çalışmada, deneysel olarak karbon tetraklorür ile hepatotoksite oluşturulan ratların karaciğer dokuları üzerine güçlü antioksidan etkisine sahip olan Resveratrol'ün, histopatoloji ve TUNEL metodu ile koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, 32 adet erkek Wistar cinsi Albino rat kullanıldı. Denekler rastgele seçilerek, 1. grup kontrol, 2. Grup CCl₄, 3. grup Resveratrol. 4. grup ise CCl₄+ Resveratrol olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Deneme sonunda hayvanlar anestezi altında sakrifiye edilerek histopatolojik analizler için karaciğer örnekleri %10 formalin solüsyonuna alındı. Yapılan histopatolojik incelemede kontrol ve Resveratrol grubunda ratların karaciğerleri normal histolojik yapıda olduğu tespit edildi. CCl₄ grubunda ise karaciğerin periasiner bölgelerindeki hepatositlerde şiddetli hidropik dejenerasyon, steatozis ve kogulasyon nekrozu tesbit edildi. CCl₄+ Resveratrol grubunda ratların karaciğerlerinde periasiner bölgede hepatositlerde hafif hidropik dejenerasyona rastlanırken nekrotik hepatositlere hiç rastlanmadı. Apoptozisi belirlemek amacıyla TUNEL metodu kullanıldı. TUNEL sonuçlarına göre kontrol ve Resveratrol grubunda karaciğerlerde birkaç hücrede pozitiflik tespit edildi. CCl₄ grubunda karaciğerlerin periasiner bölgelerindeki hepatositlerde çok sayıda pozitif hücre belirlendi. CCl₄+Resveratrol grubunda ratların karaciğerlerinde periasiner bölgede çok az sayıda pozitif hücreye rastlandı. İstatiski olarak gruplar arasındaki fark önemli (P<0.05) bulundu. Sonuç olarak, histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgulara göre CCl₄ neden olduğu oksidatif strese ve lipidperoksidasyonu sonucu oluşturulan karaciğer hasarına karşı Resveratrolün bu hasarı önemli düzeyde inhibe edici etkisinin olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Histopatoloji, Karbontetraklorür, Resveratrol, TUNEL metod.

Investigation by Histopathological and TUNEL Method of the Protective Effect of Resveratrol on Carbon Tetrachloride Induced Liver Toxicity in Rats

Abstract: In this study, it was aimed to investigate the protective effect of Resveratrol, which has a strong antioxidant effect on liver tissues, by histopathology and TUNEL method in experimental rats hepatotoxic with carbon tetrachloride. For this reason 32 male Wistar rats were used. Rats were randomly chosen and separated into 4 groups. First control, rats in second group CCl₄, 3rd group Resveratrol 4th group CCl₄+Resveratrol. At the end of the experiment, rats were euthanased under anaesthesia and liver samples were taken in formalin solution 10%. According to histopathological examination, livers were in normal histopathological structure in the control and Resveratrol groups. In CCl₄ group, severe hydropic degeneration in hepatocytes localised in the center regions of the liver, steatosis and coagulation necrosis were detected. In CCl₄+Resveratrol group; while slight hydropic degeneration were detected in the central regions of livers, necrotic hepatocytes were not detected. TUNEL method were used in order to detect apoptosis. According to TUNEL results, positivity was detected in certain liver cells in control and Resveratrol group. Numerous positive cells were detected in central regions of livers in CCl₄ group. Few positive cells were detected in central region of rat livers in CCl₄+Resveratrol group. Differences in groups were statistically significant (P<0.05). As a result of histopathological and immunohistochemical examination, inhibitor effect of resvetratrol were determined against liver damage resulting from oxidative stress and lipiperoxidation caused by CCl₄.

Keywords: Apoptosis, Carbon tetrachloride, Histopathology, Resveratrol, TUNEL method.

GİRİŞ

Karaciğer karın boşluğunda, diaframın altında yer alan vücudun en önemli organlarından birisidir. Karaciğer çeşitli fizyolojik olayların düzenlenmesinde hayati rol oynar. Depolama, sekresyon, ekskresyon, fagositoz, konjugasyon, metabolizma ve hemopoez gibi önemli fonksiyonları yerine getirmektedir (1,2). Endojen ve ekzojen toksik maddelerin detoksifikasyonunda ve faydalı ajanların sentezlenmesinde görev alır (1). Karaciğerin bu önemli fonksiyonlarından dolayı da günümüze kadar karaciğerle ilgili pek çok bilimsel araştırma yapılmıştır (3-7). Bu bağlamda karaciğer üzerinde hasar oluşturmak ve farklı fonksiyonlarını araştırabilmek amacıyla da karbontetraklorür (CCl₄) gibi pek çok ksenobiyotik ajanlar kullanılmıştır (8,9).

CCl₄ hepatotoksik etkisi bilinen ve üzerinde pek çok bilimsel çalışma yapılmış olan bir kimyasaldır. CCl₄ ile deneysel olarak oluşturulan intoksikasyondan esas etkilenen karaciğer olsa da bu toksikasyon sonucunda oluşan sirozdan böbrek, dalak, pankreas, timus, lenf düğümleri, akciğerler, kalp gibi pek çok organ ve dahil olduğu sistem doğrudan veya dolaylı olarak etkilenmektedir (3,10,11). CCl₄'ün düşük dozlarda uzun süre uygulandığında karaciğer hücrelerinde yağ dejenerasyonuna, yüksek dozlarda ise karaciğer hücrelerinin nekrozuna, hidropik dejenerasyona ve paraneşimde kanamalara neden olduğu bildirilmektedir. (9,12-14). CCl₄ ile oluşturulan toksikasyonda hücre hasarı, lipid peroksidasyonundaki artışa bağlıdır ve CCl₄'ün toksik etkisinin, serbest radikale dönüşümü ile başladığı belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda karaciğer hastalıklarında oksidatif stressin arttığını ve artan oksidatif stress ile karaciğer hasarı ve fibrozis arasında ilişki olduğunu bildirmişlerdir (13-15).

Bazı bitkilerin kullanımı ve farklı meyvelerin tüketimi insan sağlığı bakımında önemlilik arz etmektedir. Bu bağlamda fitokimyasallar olarak isimlendirilen, bitki ve meyvelerden elde edilen kimyasal bileşikler sağlıklı yaşam için elzemdir (16,17). Bu bağlamda son yıllarda tıp ve eczacılık

sektöründe çok dikkat çeken yaşlılık karşıtı özelliği ile bilinen Resveratrol önemli bir fenoldür (18). Resveratrol başlıca üzüm olmak üzere, dut, erik, limon, kiraz, yer fıstığı, fındık, zambak, ladin, yaban mersini ve akasya gibi pek çok bitkilerde bulunmaktadır (8). Resveratrol, güçlü antioksidan özelliği sayesinde serbest radikallerin yol açtığı hücre hasarını engellemeye yardımcı olduğu bildirilmiştir (16,19). Ayrıca yağların yükseltgenmesi sonucu bozulmasını ve buna bağlı hücre ölümünü engellediği bilinmektedir (8,16,20). Resveratrol yaşlanmayı geciktirdiği, kalp ve sinir hasarını engellediği, koroner kalp yetmezliği riskini azalttığı bildirilmiştir (11,21).

Yapılan literatür taramalarında karbon tetraklorür intoksikasyonun karaciğerin histopatolojisi üzerine etkilerini inceleyen yeterli sayıda araştırmaya rastlanılmamıştır. Bundan dolayı bu çalışmada; Karbontetraklorür ile indüklenen karaciğer toksitesinde meydana gelebilecek değişiklikler ve bu toksikasyona karşı Resveratrol'un olası protektif etkileri histopatolojik ve TUNEL metodu ile incelenerek elde edilen bulgularla literatüre katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Etik izin

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AÜHADYEK) tarafından 75296309-050.01.04-E.1700068324 sayı ve 11 nolu izin kararı ile etik kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Deneme prosedürü

Çalışmanın hayvan materyali, Yaklaşık 7-8 haftalık 32 adet erkek Wistar Albino rat kullanıldı. Ratların başlangıçtaki vücut ağırlıkları yaklaşık 250-300 g. olarak belirlendi. Denekler her grup 8 rat olacak şekilde rasgele seçilerek 4 gruba ayrılacaktır.

1. grup kontrol grubu (8 rat): 14 gün süreyle içme suyu verildi.

2. grup CCl₄ grubu (8 rat): Bu grupta ratlara 1.gün tek doz CCl₄ 2 ml/kg (Sigma, St. Louis, MO, USA) intraperitoneal olarak (1:1 oranında zeytinyağı ile süspanse) uygulandı.

3. grup Resveretrol grubu (8 rat): Bu grupta ratlara Resveratrol (Solgar, Inc. USA) oral yolla 30 mg/kg/gün 14 gün süreyle uygulandı.

4. grup CCl₄+ Resveretrol grubu (8 rat): Bu grupta ratlara 1. gün tek doz CCl₄ 2 ml/kg/gün intraperitoneal (1:1 oranında zeytinyağı ile süspanse) ve Resveratrol oral yolla 30 mg/kg/gün 14 gün süreyle uygulandı.

Ratlara 14 günlük deneme süresince 12 saat karanlık/aydınlatma uygulandı, sıcaklığı 22±2°C olarak ayarlanan odalarda, adlibitum olarak yem ve taze su bulunan kafeslerde barındırıldı. Deneme sonunda hayvanlar anestezi altında sakrifiye edilerek histopatolojik analizler için doku örnekleri %10 formalin solüsyonuna alındı.

Histopatolojik İnceleme

Deneme sonunda tüm ratların ötenazi sonrası nekropsileri yapılarak, özellikle karaciğer olmak üzere organlarda gözlenen makroskopik bulgular kaydedildi. Alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formol'de tespit edildikten sonra, parafinde bloklandı. Her blokta 4 µm kalınlığında alınan kesitler, hematoksilin-eozin ve TUNEL metodu ile boyanıp ışık mikroskopunda incelendi. Işık mikroskopunda incelenen kesitler yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirilip resimler çekildi.

TUNEL Boyama Protokolü

Nöron ve glialardaki DNA fragmentasyonunu göstermek için Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated-dUTP nick end labeling (TUNEL) metodu (In Situ Cell Death Detection Kit Roche Diagnostics; Cat. No. 11 684 817 910, Verison 13.0) seçildi. Hazırlanan preparatlar 37°C'de gece boyu deparafinizasyon işleminden sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrasyon işlemi uygulandı. Rehidrasyonun son aşaması olan distile

sudan çıkarılan preparatlar 2 kere 5'er dakika (2x5) PBS'de yıkandı. Daha sonra PBS'de yıkanan preparatlara %0.1'lik Proteinaz K damlatılarak 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Preparatlar PBS'de 2x5 dk yıkandı ve metanolde hazırlanan %3'lük H₂O₂ ile oda ısısında 15 dk inkübe edildiler. Tekrar PBS'de 2x5 dk yıkandıktan sonra preparatlar buharlı kabin içerisine yerleştirildi ve üzerlerine işaretleme tepkimesi için Terminal Deoksi Transferaz (TdT) reaksiyon karışımı damlatılarak 37°C'de, 60 dk inkübe edildi. Negatif kontrollere ise TdT enzim içermeyen solüsyondan damlatıldı. Preparatlar yine PBS'de 2x5 dk yıkandıktan sonra ilk aşama olan floresan mikroskopta ön değerlendirilmeleri yapıldı ardından her bir preparata 37°C'de 30 dk inkübe etmek üzere converter-POD solüsyonu eklendi. Preparatlar yine PBS'de 2x5 dk yıkandıktan sonra renk reaksiyonu için aminoethyl carbasole (AEC) kromojeni ile (Zymed, Lot: 60682605, USA) 5 dk inkübe edildi. Son olarak da preparatlar 3x3 dk PBS'de yıkandıktan sonra su bazlı yapıştırıcı ile yapıştırılarak ışık mikroskopunda (Olympus BX51) incelemeye alındı. Işık mikroskopunda incelenen kesitler pozitif hücre sayısına göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

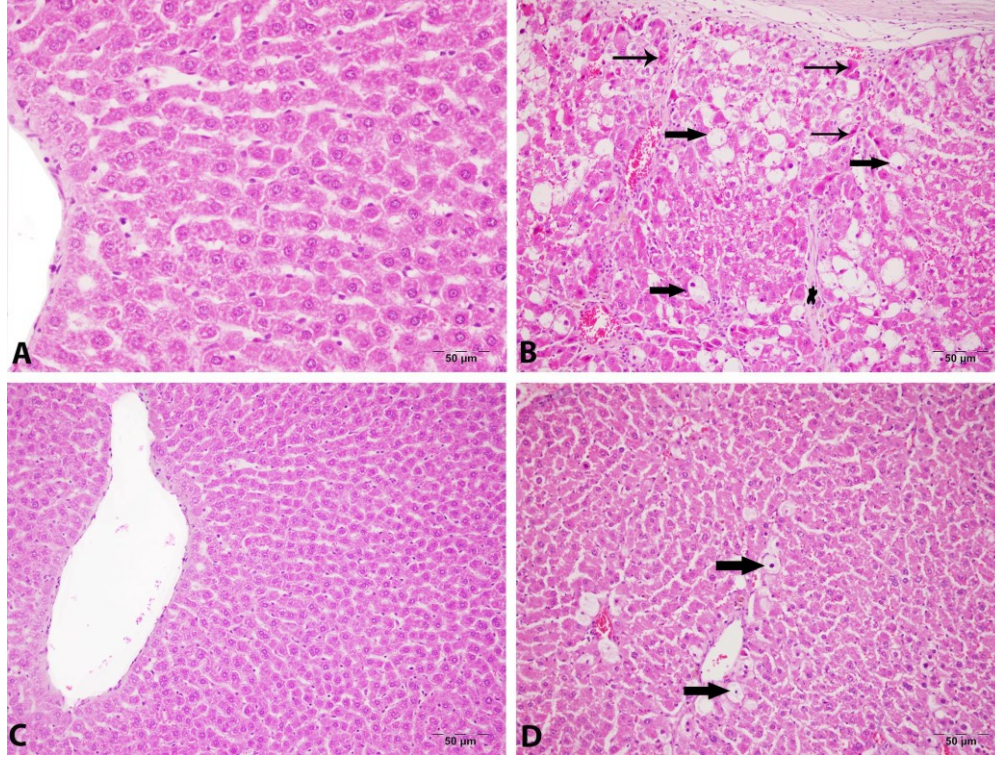
Histopatolojik incelemede semikantitatif olarak elde edilen verilerin gruplar arasındaki farklılıkların analizi için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi, ikili grupların mukayesesi için Mann Whitney U testi kullanıldı. Bu istatistik analizleri için SPSS 13.0 paket programı kullanıldı.

BULGULAR

Birinci (kontrol), gruptaki ratların karaciğerleri incelendiğinde normal histolojik yapıda olduğu tesbit edildi (Şekil 1). İkinci grup (CCl₄) olan CCl₄ grubunda ratların karaciğerlerinde bütün paransim dokusunda dejeneratif nekrotik bulgular görülsede özellikle periasiner bölgede şiddetli hidropik dejenerasyon (%37), yağlı dejenerasyon (%37), koagülasyon nekrozu (%25), intrahepatik kolestazis, kupffer

hücrelerinde hiperplazi, portal bölgeden vena sentralisin çevresinde kadar ilerleyen mononükleer hücre infiltrasyonuna rastlandı (%37) (Şekil 2). Üçüncü Grup olan Resveratrol grubunda ki ratların karaciğerleri incelendiğinde hepatositlerin diziliminin, sünizoidal boşlukların, periasiner ve portal bölgenin normal histolojik yapıda olduğu

görüldü (Şekil 3). Dördüncü grup olan CCl₄+ Resveratrol grupta portal bölgede çok az hepatositte hidropik dejenerasyona (%12.5) ve mononükleer hücelere (%12.5) rastlanırken steatozise ve nekroza hiç rastlanmadı (Şekil 4). Histopatolojik bulgular Tablo 1 de özetlendi.



Şekil 1: Kontrol grup, karaciğerin normal histolojik yapısı (A), CCl₄ grup, karaciğer periasiner bölgede koagülasyon nekrozu (ince oklar), hidropik dejenerasyon (kalın oklar), mononükleer hücre infiltrasyonu (asterisk) (B), Resveratrol grup, karaciğerin normal histolojik yapısı (C), CCl₄+ Resveratrol grup, karaciğer periasiner bölgede hidropik dejenerasyon (oklar), H&E, Bar: 50µm.

Figure 1: Control group, normal histological structure of liver (A), CCl₄ group, in liver periacinar region, coagulation necrosis (thin arrows), hydropic degeneration (thick arrows), mononuclear cell infiltration (asterisk) (B), Resveratrol group, normal histological structure of liver (C), CCl₄ + Resveratrol group, hydropic degeneration in the central region of the liver (arrows), H&E, Bar: 50µm.

Tablo 1: Histopatoloji değerlendirme tablosu.

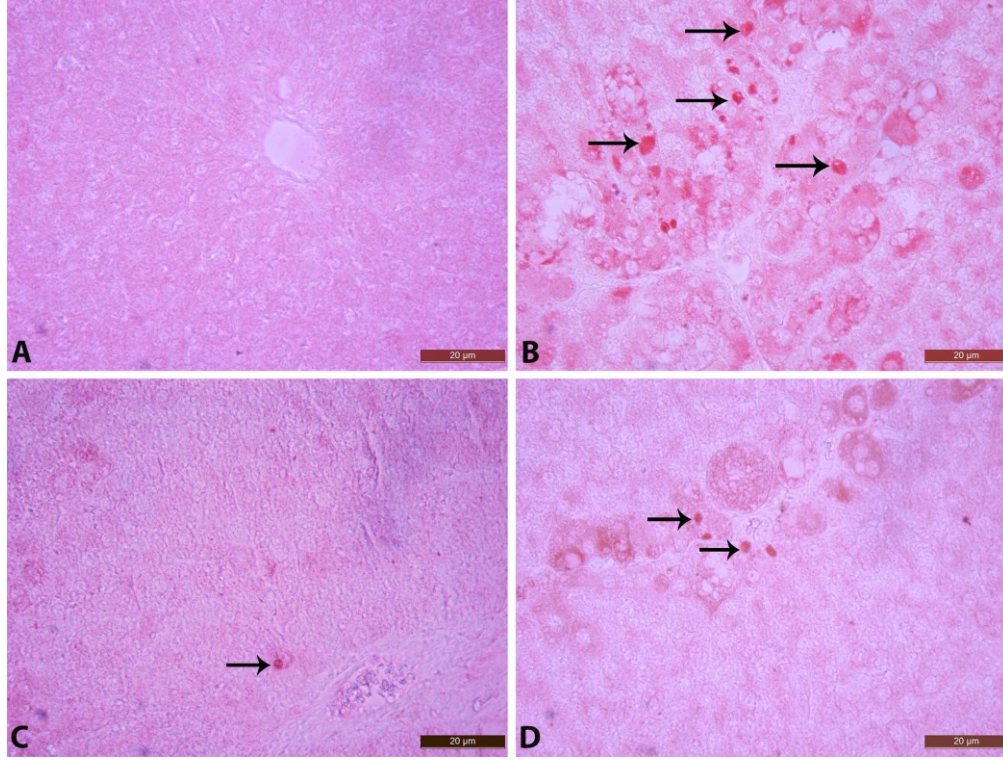
Table 1: Histopathology evaluation table

Gruplar	Hidropik degenerasyon	Steatozis	Koagülasyon nekrozu	Mononükleer hücre infiltrasyonu
Kontrol	-	-	-	-
CCL ₄	+++	+++	++	+++
Resveratrol	-	-	-	-
CCL ₄ +Resveratrol	+	-	-	+

İmmunohistokimya Bulguları

Apoptozisi tesbit etmek için yapılan TUNEL boyamada, birinci grup olan kontrol grubunda bir-iki hepatostin pozitif olduğu belirlendi. İkinci grup olan CCL₄ grubunda ise özellikle periasiner bölgede çok sayıda pozitif hücreye rastlandı. Üçüncü grup olan Resveratrol grubunda bazı ratların karaciğerinde çok

az sayıda pozitif hücreye rastlanırken bazılarında ise hiç pozitif hücreye rastlanmadı. Dördüncü grup olan Res+ CCL₄ grubunda ise ikinci gruba kıyasla daha az hücrede pozitif boyanmalara rastlandı (Tablo 2). CCL₄ grubunda karaciğerde TUNEL pozitif hücrelerin sayısı Res+ CCL₄ grubundan istatistiki açıdan ($P<0.05$) anlamlı bir fark tesbit edildi (Tablo 3-4, Şekil 3-4).



Şekil 2: Kontrol grup, normal karaciğer görünümü (A), CCl₄ grup, karaciğer periasiner bölgede apoptotic hücreler (oklar) (B), Resveratrol grup, normal karaciğer görünümü, apoptotic hücre (ok) (C), CCl₄+ Resveratrol grup, karaciğer periasiner bölgede az sayıda apoptotic hücre (oklar), TUNEL boyama, Bar: 20 µm.

Figure 2: Control group, normal histological structure of liver (A), CCl₄ group, apoptotic cells in the periacinar region of the liver (arrows) (B), Resveratrol grup, normal histological structure of liver, apoptotic cell (arrow) (C), CCl₄ + Resveratrol group, small number of apoptotic cells (arrows) in liver central region, TUNEL method, Bar: 20µm.

Table 2: Karaciğerde TUNEL pozitif boyalı hepatositler (%).

Table 2: TUNEL positive stained hepatocytes in liver (%).

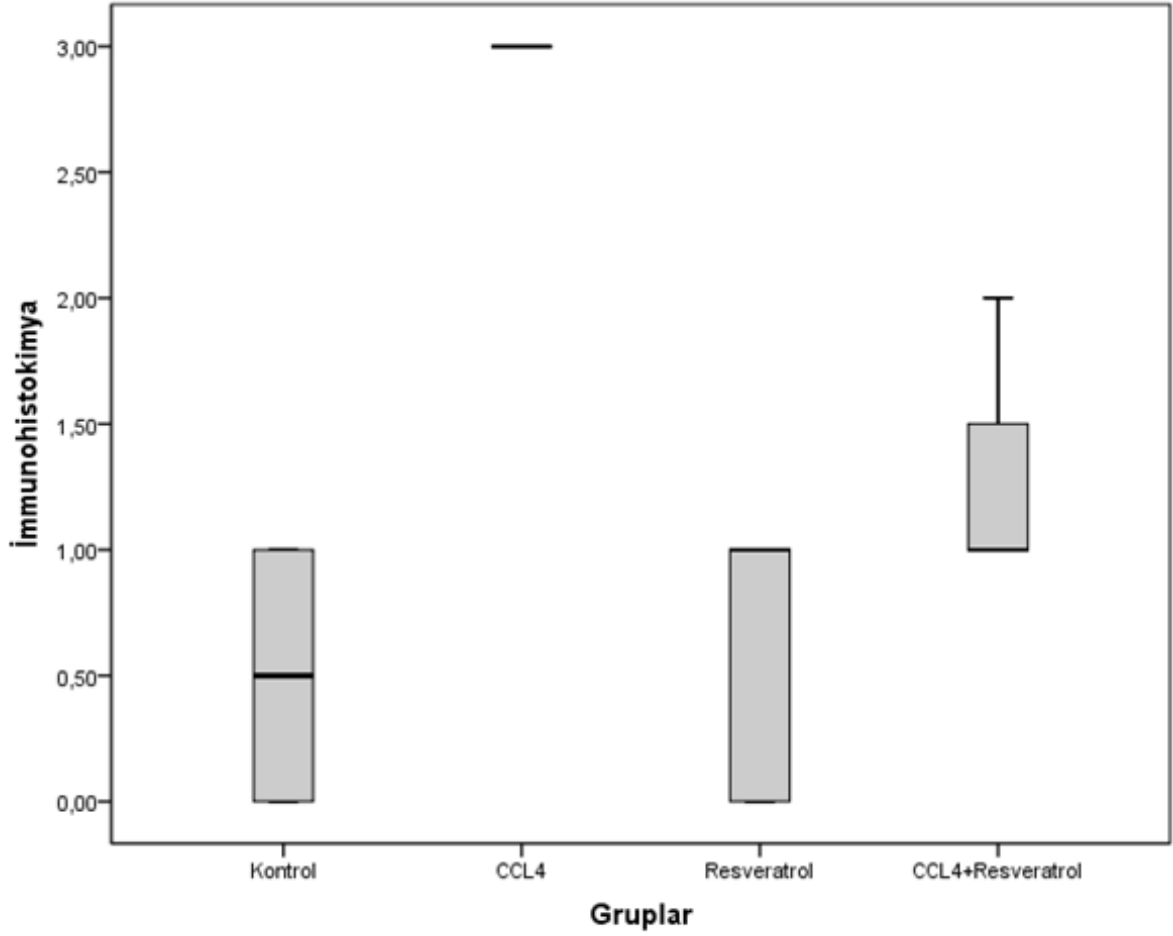
Gruplar	1.Rat	2.Rat	3.Rat	4.Rat	5.Rat	6.Rat	7.Rat	8.Rat
Kontrol	-	+	-	-	+	-	+	+
CCL ₄	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Resveratrol	+	+	+	-	-	-	+	+
CCL ₄ +Resveratrol	+	+	++	++	+	+	+	+

Tablo 3: Kruskal-Wallis testi İstatistik sonuçları**Table 3:** Kruskal-Wallis test Statistical results

Gruplar	Ortalama	Standart hata	Medial P
Kontrol	0.500	0.189	0.500*
CCl ₄	3.000	0	3.00*
Resveratrol	0.625	1.83	1.00*
CCl ₄ +Resveratrol	1.250	1.64	1.00*

P< 0.05 Kruskal-Wallis test sonuçlarına göre gruplar arasında fark önemlidir.

Gruplar arası farklılıklar için yapılan Kruskal-Wallis testi sonuçlarına göre Gruplar arasındaki fark önemli olduğu bulundu.



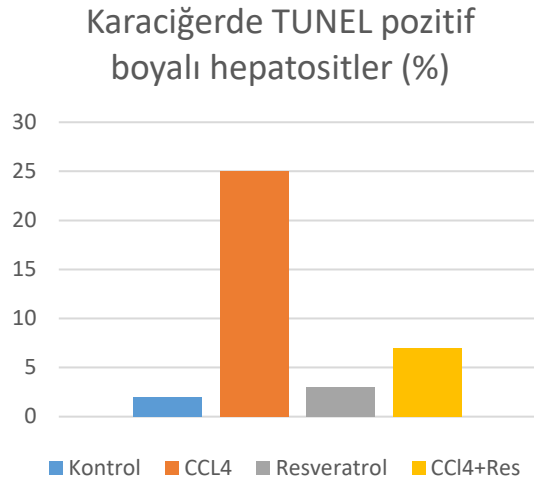
Şekil 3: Kruskal-Wallis testi, İstatistik sonuçları grafiği, bu grafik tablo 3'den elde edilen quantitatif immunohistokimyasal verileri özetlemektedir. (P<0.05 Kruskal-Wallis test).

Figure 3: The Kruskal-Wallis test, the graph of the statistical results, summarizes the quantitative immunohistochemical data obtained from this graphical table 3. (P<0.05; 0.05 Kruskal-Wallis test).

Tablo 4: Mann-Whitney U testi istatistik sonuçları.**Table 4:** Mann-Whitney U test statistical results.

1.-2. Gruplar	1.-3. Gruplar	1.-4. Gruplar	2.-3. Gruplar	2.-4. Gruplar	3.-4. Gruplar
0.01	NS	0.05	0.01	0.01	0.05

İkili gruplar arası farklılıklar için yapılan Mann-Whitney U testi sonuçlarına göre 1. ve 3. gruplar arasındaki fark önemli değilken diğer grupların kendi aralarındaki fark önemli olduğu bulundu.



Şekil 4: TUNEL boyalı alanların tüm alana oranı (%).
Figure 4: Calculating the proportion (%) of TUNEL staining areas to total area (%).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Karaciğer fizyolojik fonksiyonları nedeniyle tüm canlılar için büyük önem arz etmekte ve günümüzde karaciğerle ilgili olarak pek çok araştırma yapılmaktadır (17,22,23). Bu bağlamda karaciğer üzerinde hasar oluşturmak ve farklı fonksiyonlarını araştırabilmek amacıyla da CCl₄ gibi pek çok ksenobiyotik ajanlar kullanılmıştır (3,22,24). CCl₄ kuru temizleme sanayide yaygın bir şekilde endüstriyel bir çözücü olarak kullanılmaktadır. Sanayide çalışan insanlar dikkat etmediği sürece CCl₄ intoksikasyonuna maruz kalabilmekte, akut veya kronik hepatotoksisite oluşabilmektedir (3). CCl₄ ile indüklenmiş hepatotoksisitenin en çarpıcı histopatolojik özelliği lipid peroksidasyonunu artırarak reaktif oksijen radikallerini artırması sonucunda karaciğerde nekroz, siroz ve hepatik steatozise neden olmasıdır (3,22,24). Deneysel olarak intraperitoneal yolla CCl₄ uygulanmasının karaciğerde özellikle periasiner bölgede bulunan hepatositlerde hidropik dejenerasyon, yağ dejenerasyonu, koagülasyon nekrozuna, hepatositlerin anormal dizilimine, periasiner ve sinüzoidal konjesyona ve iflamasyona neden olduğu bildirilmiştir (3,22,24,25). Yapılan bu çalışmada CCl₄ uygulanan grupta daha önceki yapılan çalışmalara benzer bulgulara rastlanmıştır.

Apoptozis; fizyolojik ve patolojik durumlarda hasarlanmış ya da neoplastik hücrelere dönüşme potansiyeline sahip olan hücrelerin uzaklaştırılmasında başvurulan bir hücre intihar mekanizmasıdır. Yani programlanmış hücre ölümüdür, hücre içi ve hücre dışı uyarımlar sonucu gerçekleşir (26). CCl₄ pek çok çalışmada oksidatif stresi artırarak apoptozisi uyardığı bildirilmiştir (22,24). TUNEL metodu ile apoptozisin belirlendiği çalışmalarda CCl₄ intoksikasyonunda karaciğerin periasiner bölgelerinde bulunan hepatositlerde belirgin düzeyde apoptotik hücre tesbit edilmiştir (25). Shi (23) tarafından yapılan bir çalışmada periasiner bölgede apoptozisin önemli markırlarından biri olan caspase 3 ün arttığı tesbit edilmiş, bu artan apoptozisin yangıyı ve oksidatif stresi artırmış olabileceği vurgulanmıştır. Yapılan bu çalışmada özellikle periasiner bölgede apoptozisin artması ile daha uzun süre CCl₄ uygulanan ratların karaciğerlerinde gözlenen daha şiddetli yangı ve oksidatif hasar markırlarının artması önceki çalışmaları destekler niteliktedir (27).

Wang ve ark (9), rifampicinle oluşturdukları karaciğer hasarında apoptozis değerlendirmesinde casase 3 ve TUNEL metodunu karşılaştırmalı olarak değerlendirmiş ve her ikisinde de benzer bulgulara rastladığını belirtmiştir. Chan ve ark (18), akut CCl₄ toksikasyonunda da TUNEL metodu ile yaptıkları değerlendirmede karaciğerin periasiner bölgelerinde yoğun olarak pozitif hücrelere rastladığını ifade etmiştir. Bizim çalışmamızda da yine kontrol ve Resveratrol gruplarında bir-iki pozitif hücreye rastlanırken CCl₄ grubunda özellikle periasiner bölgede pek çok hücrenin apoptozisi tesbit edildi. Resveratrol + CCl₄ ise çok az sayıda pozitif hücre belirlendi. Bu bulgular yapılan diğer çalışmalarla uyumluluk ve paralellik göstermektedir.

Resveratrol karaciğer hastalıklarının tedavisi ve önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Son çalışmalar Resveratrolün nörodejeneratif bozukluklar, kardiovasküler hastalıklar, iskemik kalp hasarı, nefrotoksisite viral ve bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ve hastalığın ilerlemesinin engellenmesinde önemli rol oynadığını

göstermektedir (10,11,18,28,29). Deneysel olarak Dimethylnitrosamine, CCl₄, etanol, aflatoksinler ve methotrexate gibi çeşitli ajanlarla karaciğer fibrozisi ve karaciğer hasarı oluşturulduğunu belirlenen pek çok çalışma mevcuttur (3-7,17). Bu hepatotoksik etkiyi koruyucu ve tedavi edici olarak çok geniş skalada bitki ve ilaç kullanılmaktadır (8). Daha önceki çalışmalarda Resveratrol uygulamasının oksidatif hasarı azaltarak ve lipid peroksidasyonunu inhibe ederek karaciğer hasarını ve sirozu engellediği bildirilmiştir (6,30). Yapılan bu çalışmada ise CCl₄ ile oluşturulan karaciğer toksikasyonunda Resveratrol uygulamasının karaciğerde anlamlı ölçüde karaciğer hasarını engellediği ve apoptotic hücre sayısını istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde azalttığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, histopatolojik ve immunohistokimyasal bulgulara göre Resveratrolün karaciğer hasarını önemli düzeyde inhibe edici etkisinin olduğu belirlenmiştir. Muhtemelen bu etki Resveratrolün antioksidan, anti-inflamatuar, antiapoptotik ve protektif etkilerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Çavusoglu H., 1996. Tibbi Fizyoloji, 9 ed., Yüce Yayınları, Alemdar Ofset, İstanbul.
2. Junqueira LC., Carneiro J., 2003. Basic Histology 10th ed., McGraw Hill Companies Incorporated, New York.
3. Çınar A., Yörük M., Meral İ., Kılıçalp D., Koç A., Ertekin A., 1999. The effects of carbon tetrachloride (CCl₄) induced experimental acute and chronic intoxication on histological structure of liver and some hematological values and electrocardiogram in Rabbits. Turk J Vet Anim Sci, 23, 235-242.
4. Hong SW., Jung KH., Zheng HM., Lee HS., Suh JK., Park IS., Hong SS., 2010. The protective effect of Resveratrol on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. Arch Pharm Res, 33, 601-609.
5. Kasdallah-Grissa A., Mornagui B., Aouani E., Hammami M., Gharbi N., Kamoun A., El-Fazaa S., 2006. Protective effect of Resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. Alcohol Alcohol, 41, 236-239.
6. Tunalı-Akbay T., Sehirli O., Ercan F., Sener G., 2010. Resveratrol protects against methotrexate-induced hepatic injury in rats. JPPS, 13, 303-310.
7. Tahan G., Tarcin O., Tahan V., Eren F., Gedik N., Sahan E., Yucel O., 2007. The effects of N-acetylcysteine on bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats. Dig Dis Sci., 52, 3348-3354.
8. Muriel P., Rivera-Espinoza Y., 2008. Beneficial drugs for liver diseases. Journal of Applied Toxicology, 28, 93-103.
9. Wang C., Fan RQ., Zhang YX., Nie H., Li K., 2016. Naringenin protects against isoniazid-and rifampicin-induced apoptosis in hepatic injury. World J Gastroenterol, 22, 9775-9783.
10. Karakuş A., Değer Y., Yıldırım S., 2016. Protective effect of Silybum marianum and Taraxacum officinale extracts against oxidative kidney injuries induced by carbon tetrachloride in rats. Ren Fail, 39, 1-6.
11. Mukhopadhyay P., Mukherjee S., Ahsan K., Bagchi A., Pacher P., Das DK., 2010. Restoration of altered microRNA expression in the ischemic heart with Resveratrol. PLoS One, 5, e15705.
12. Bhuvaneshwari R., Chidambaramathan N., Jegatheesan K., 2014. Hepatoprotective effect of embilica officinalis and its silver nanoparticles against ccl4 induced hepatotoxicity in wistar albino rats. DJNB, 9, 223-235.
13. MacDonald-Wickks LK., Garg ML., 2003. Vitamin E supplementation in the mitigation of carbon tetrachloride induced oxidative stress in rats. Nutr Biochem, 14, 211-218.
14. Sotelo-Feliz JL., Martinez-Fong D., Muriel P., Santillan RL., Castillo D., Yahuaca P., 2002. Evaluation of the effectiveness of Rosmarinus officinalis (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. J Ethnopharmacol, 81, 145-154.
15. Galicia-Moreno M., Rodriguez-Rivera A., Reyes-Gordillo K., Segovia J., Shibayama M., Tsutsumi V.,

- Muriel P., 2009. N-acetylcysteine prevents carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis: role of liver transforming growth factor-beta and oxidative stress. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 21, 908-914.
16. Marchal J., Pifferi F., Aujard F., 2013. Resveratrol in mammals: effects on aging biomarkers, age-related diseases, and life span. *Ann N Y Acad Sci*, 1290, 67-73.
17. Yıldırım S., Yener Z., 2016. Immunohistopathological and biochemical study of the effects of Dead Nettle (*Urtica Dioica*) extract on preventing liver lesions induced by experimental aflatoxicosis in Rats. *WIMJ*, DOI: 10.7727/wimj.2016.126.
18. Chan CC., Cheng LY., Lin CL., Huang YH., Lin HC., Lee FY., 2011. The protective role of natural phytoalexin Resveratrol on inflammation, fibrosis and regeneration in cholestatic liver injury. *Molecular nutrition & food research*, 55, 1841-1849.
19. Sinha K., Chaudhary G., Gupta YK., 2002. Protective effect of Resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Life sciences*, 71, 655-665.
20. Chan CC., Lee KC., Huang YH., Chou CK., Lin HC., Lee FY., 2014. Regulation by Resveratrol of the cellular factors mediating liver damage and regeneration after acute toxic liver injury. *JGH*, 29, 603-613.
21. Bradamante S., Barengi L., Villa A., 2004. Cardiovascular protective effects of Resveratrol. *Cardiovascular Therapeutics*, 22, 169-188.
22. Dinçel GÇ., Atasever A., Yaman D., 2016. Nitric oxide and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression in the liver parenchyma in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 22, 671-678.
23. Shi J., Aisaki K., Ikawa Y., Wake K., 1998. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *AJP*, 153, 515-525.
24. Suzek H., Celik I., Dogan A., Yıldırım S., 2016. Protective effect and antioxidant role of sweetgum (*Liquidambar orientalis*) oil against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Pharm Biol.*, 54, 451-457.
25. Kaneko M., Nagamine T., Nakazato K., Mori M., 2013. The anti-apoptotic effect of fucoxanthin on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *J Toxicol Sci*, 38, 115-126.
26. Öktem S., Özhan MH., Özol D., 2001. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2, 91-95.
27. Karaman M., Özen H., Dağ S., Atakisi O., Cıgsar G., Kaya O., 2017. Ameliorative effect of omega-3 in carbon tetrachloride toxicity. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 23(1), 77-85.
28. Khan RA., Khan MR., Sahreen S., Bokhari J., 2010. Prevention of CCl 4-induced nephrotoxicity with *Sonchus asper* in rat. *FCT*, 48, 2469-2476.
29. Paolillo R., Carratelli CR., Rizzo A., 2011. Effect of Resveratrol and quercetin in experimental infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *International immunopharmacology*, 11, 149-156.
30. Schmatz R., Perreira LB., Stefanello N., Mazzanti C., Spanevello R., Gutierrez J., Zanini D., 2012. Effects of Resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochimie*, 94, 374-383.