



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.  
2009; 23 (2): 57 - 61  
http://www.fusabil.org

**Murat ÖGETÜRK<sup>1</sup>**  
**Neriman ÇOLAKOĞLU<sup>2</sup>**  
**Murat Abdulgani KUŞ<sup>1</sup>**  
**İlter KUŞ<sup>1</sup>**  
**Mustafa SARSILMAZ<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup>Fırat Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Histoloji-Embriyoloji  
Anabilim Dalı,  
Elazığ, TÜRKİYE

### Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Deneysel Akciğer Hasarında Kafeik Asit Fenetil Esterin Koruyucu Etkinliği

Işık mikroskopik düzeyde yapılan bu çalışmada, akciğer dokusu üzerindeki karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) toksisitesinin incelenmesi amaçlandı. Bu toksisiteye karşı kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in muhtemel koruyucu etkileri de değerlendirildi.

Çalışmamızda kullanılan toplam 24 adet Wistar-albino cinsi erkek sıçanlar üç eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubu sıçanlara saf zeytinyağı derialtı olarak uygulanırken, grup II'deki hayvanlara gün aşırı olarak CCl<sub>4</sub> derialtı yolla enjekte edildi. Grup III'deki sıçanlara ise CCl<sub>4</sub> enjeksiyonu ile birlikte yine gün aşırı olarak ve de intraperitoneal yolla CAPE verildi. Dört haftalık deney süresi sonunda bütün sıçanlar dekapite edilerek akciğerleri çıkartıldı. Mikroskopik incelemeler için, doku örnekleri rutin histolojik prosedürlerden geçirilerek parafine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan alınan kesitler hematoxilen-eozin ile boyanarak araştırma mikroskopunda incelendi.

Kontrol grubu sıçanlarına ait akciğer doku yapısının normal olduğu görüldü. CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda ise bronş ve bronşiol epitellerinde dökülme, pulmoner interstisyumda hemoraji, polimorf çekirdekli lökosit ve makrofaj infiltrasyonunun olduğu belirlendi. CCl<sub>4</sub> toksisitesi ile birlikte CAPE verilen grupta ise, küçük hemorajik alanlar dışında bu histopatolojik değişikliklerin kaybolduğu gözlemlendi.

Mikroskopik düzeyde gerçekleştirilen bu çalışma bulgularına göre, deneysel CCl<sub>4</sub> toksisitesi sonucu akciğer dokusunda oluşan histopatolojik değişikliklerin CAPE uygulaması ile önlenildiği tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Kafeik asit fenetil ester, karbon tetraklorür, akciğer, sıçan.

#### Protective Efficiency of Caffeic Acid Phenethyl Ester in Carbon Tetrachloride-Induced Experimental Lung Injury

In this study, it was aimed to investigate the toxic effects of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) on the lung tissue using light microscopy. Furthermore, potential protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against this toxicity were evaluated.

A total of 24 adult male Wistar-albino rats used in our study were divided into three equal groups. The control rats received pure olive oil subcutaneously (sc), rats in the second group were injected with CCl<sub>4</sub> (sc) and rats in the third group were injected with CCl<sub>4</sub> plus CAPE (intraperitoneally, ip) every other day. At the end of four weeks of experimental period, all animals were killed by decapitation and their lungs were removed. For light microscopic examination, tissue specimens were embedded in paraffin blocks following routine histological procedures. Sections obtained from paraffin blocks were stained with hematoxylin-eosin and examined under a light microscope.

The evaluation of the lung sections of control rats showed normal structural integrity. Epithelial desquamation in the bronchi and bronchioli, interstitial pulmonary hemorrhage, leucocytes with polymorphic nuclei and macrophage infiltration were observed in the lung specimens of rats exposed to CCl<sub>4</sub> alone. With exception of small hemorrhagic areas, these histopathological changes were disappeared in rats treated with CCl<sub>4</sub> plus CAPE.

In view of the findings of the present microscopic study, it was determined that histopathological changes in the lung tissue resulting from experimental CCl<sub>4</sub> toxicity could be prevented by CAPE administration.

**Key Words:** Caffeic acid phenethyl ester, carbon tetrachloride, lung, rat.

#### Giriş

Karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) renksiz, berrak, uçucu bir sıvıdır (1). Önceleri kuru temizleme, yangın söndürme, tahıl dezenfeksiyonu ve böceklerle mücadelede yararlanılan bu kimyasal bileşik; günümüzde petrol ürünleri, çeşitli yağlar, vernik, cila, reçine çözücüsü ve organik bileşiklerin imalatında kullanılmaktadır (1-3). Çevreden insan vücuduna günlük ortalama 0.1 µg CCl<sub>4</sub> girişi olduğu tahmin edilmektedir (1). Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi (EPA) hayvan deneylerinden elde edilen

**Geliş Tarihi :** 10.04.2009  
**Kabul Tarihi :** 17.04.2009

#### Yazışma Adresi Correspondence

**Murat ÖGETÜRK**  
Fırat Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Anatomi Anabilim Dalı,  
Elazığ-TÜRKİYE

mogeturk@firat.edu.tr

sonuçlara dayanarak, CCl<sub>4</sub>'ü insan için olası kanserojen (grup B2) sınıfına dahil etmiştir (1-3).

CCl<sub>4</sub> solunan hava, su, gıda alımı ve deriden temas yoluyla vücuda girer. Karaciğer, beyin, böbrek, kaslar, yağ dokusu ve kanda daha yüksek konsantrasyonlarda olmak üzere tüm vücuda dağılır (1). CCl<sub>4</sub>'ün sitokrom P450 enzimi aracılığıyla serbest radikallere yıkılımı hücre hasarını başlatır (2-5). Vücuttan atılımı başta solunum yoluyla ve çok az miktarlarda dışkı ve idrar yoluyla (1). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda, CCl<sub>4</sub> uygulamasına bağlı olarak akciğer dokusunda da oksidatif hasar ve histopatolojik değişikliklerin meydana geldiği bildirilmiştir (6-13). CCl<sub>4</sub>'ün toksik etkilerine karşı melatonin (4), klofibrat (14), kolşisin (15), putresin (16), losartan (17), ginkgo biloba ekstresi (18), siyah çay ekstresi (19), nigella sativa (20), somatostatin ve oktreotid (21) gibi ajanların etkileri araştırılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Kafeik asit fenetil ester (CAPE), arıların bitkilerden topladığı özütün içerisinde bulunan keskin ve güzel kokulu propolis maddesinin aktif bir bileşenidir. Propolis'in antimikrobik, antienflamatuar, immunmodülatör, antitumör ve antioksidan etkileri çeşitli çalışmalarla ortaya konmuş, bu etkilerin çoğunun propolis'in etkin maddelerinden biri olan CAPE'ye bağlı olduğu gösterilmiştir (22-25). Az sayıdaki deneysel çalışma ile CAPE'nin CCl<sub>4</sub> hasarına karşı etkinliği tespit edilmiştir (26, 27).

Bu çalışmada, CCl<sub>4</sub>'ün akciğer dokusu üzerindeki toksisitesi ve bu toksisiteye karşı CAPE'nin muhtemel koruyucu etkileri araştırıldı.

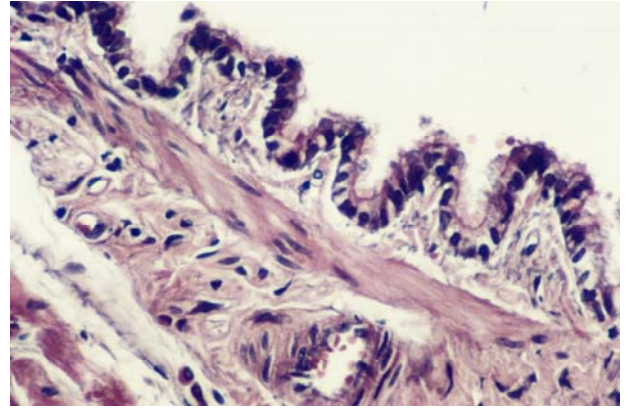
## Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda, ağırlıkları 170-220 gram arasında değişen toplam 24 adet erkek Wistar-albino cinsi sıçan kullanıldı. Üç eşit gruba ayrılan sıçanlar, özel hazırlanmış kafeslerde, ısısı ayarlanmış (22±1°C), 12 saat ışık alan ve özel havalandırma tertibatı olan ortamda, yeterli miktarda su ve Elazığ Yem Fabrikasından temin edilen sıçan yemi ile beslendi. Kontrol grubu sıçanlara deney boyunca günde subkutan (sc) saf zeytinyağı (1 ml/kg) tatbik edildi. CCl<sub>4</sub> grubu sıçanlara dört hafta süresince günde zeytinyağı içinde CCl<sub>4</sub> (0.5 ml/kg, sc) uygulandı. CCl<sub>4</sub>+CAPE grubunda yer alan hayvanlara ise aynı süre ve dozda CCl<sub>4</sub> yanı sıra CAPE (10 µmol/kg) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Çalışmada kullanılan CAPE, Grunberger ve arkadaşlarının (28) tekniğine göre kimya laboratuvarında sentezlendi.

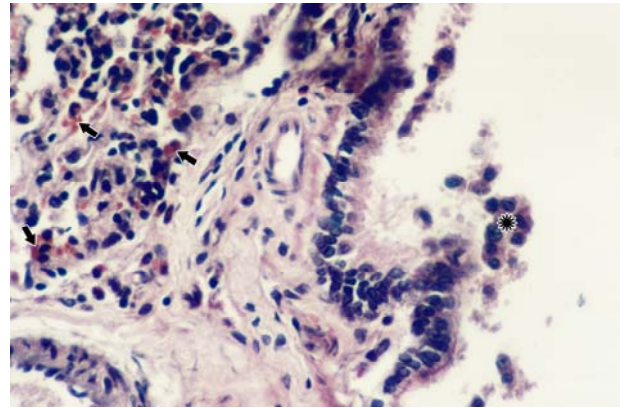
Deney sonunda tüm sıçanlar dekapitasyon yöntemiyle öldürüldü. Hayvanlardan alınan akciğer doku örnekleri % 10'luk formaldehit ile fikse edildi. Daha sonra doku örnekleri rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan kesitler hematoksil-eozin (H.E.) ile boyandı ve preparatlar Olympus BH-2 araştırma mikroskobunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

## Bulgular

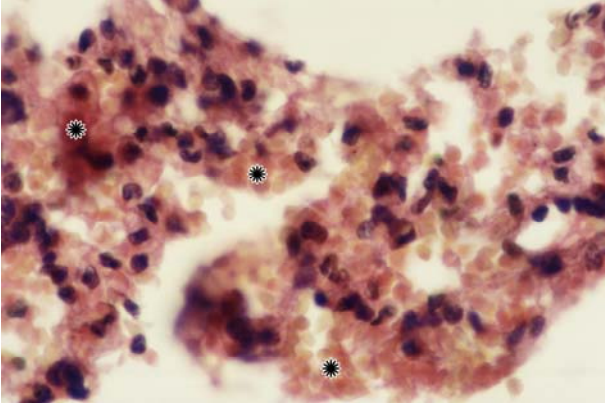
Kontrol grubuna ait akciğer doku kesitleri incelendiğinde, bronş, bronşiol, alveol ve pulmoner interstisyum yapılarının normal olduğu görüldü (Şekil 1). CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda ise bronş ve bronşiolun epitellerinde dökülme (Şekil 2), pulmoner interstisyumda hemoraji tespit edildi (Şekil 3). Ayrıca, yine bu grupta polimorf çekirdekli lökosit ve makrofaj infiltrasyonunun olduğu gözlemlendi (Şekil 4 ve 5). CCl<sub>4</sub> toksisitesi ile birlikte CAPE verilen sıçanlarda ise hafif hemorajik alanlar dışında akciğer doku yapısının normal bir görünüme sahip olduğu ve kontrol grubuna benzediği belirlendi (Şekil 6 ve 7).



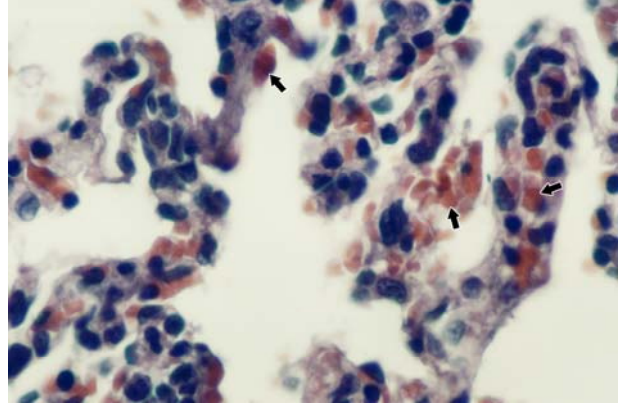
**Şekil 1.** Kontrol grubuna ait akciğer dokusunun görünümü. Bronşiol lumeni, epiteli ve duvarı normal yapıda görülmekte. H.E. X240.



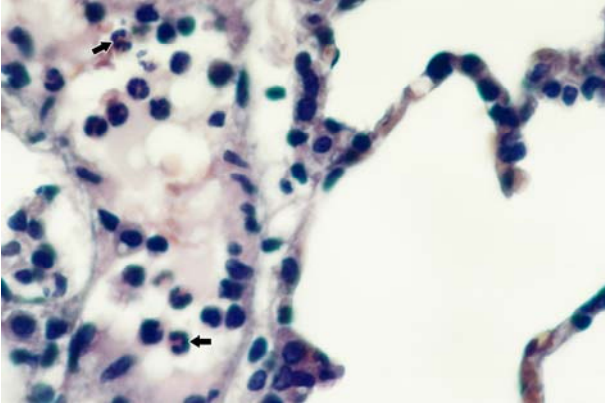
**Şekil 2.** CCl<sub>4</sub> uygulanan gruba ait akciğer kesitlerinde, bronşiol lumeninde epitelyal hücre dökülmesi (yıldız), peribronşial alanda hemorajik odaklar (ok) göze çarpmakta. H.E. X240.



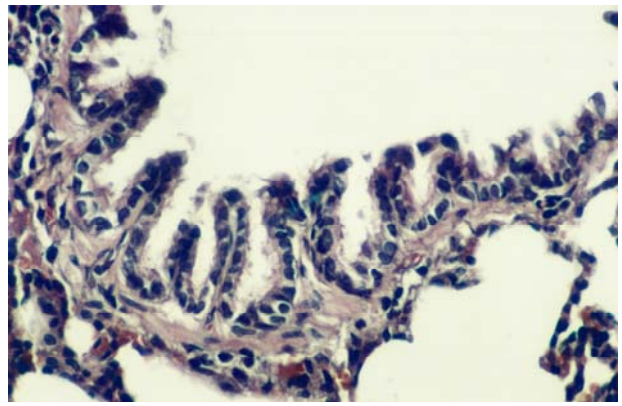
**Şekil 3.** CCl<sub>4</sub> toksisitesi sonucu pulmoner interstisyumda belirgin bir hemoraji (yıldız) gözlenmekte. H.E. X480.



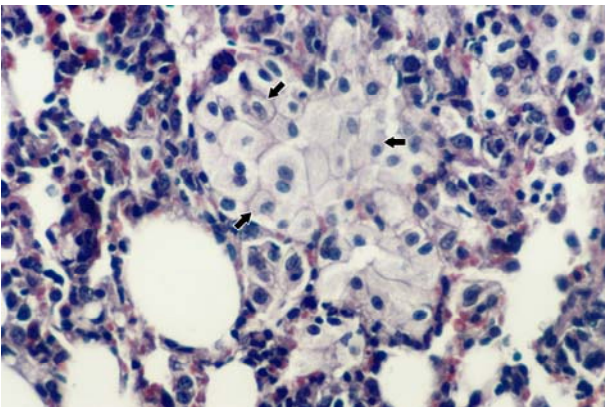
**Şekil 6.** CCl<sub>4</sub> ve CAPE grubuna ait bir kesit. Pulmoner interstisyumda küçük hemorajik alanların olduğu (ok) görülmekte. H.E. X480.



**Şekil 4.** CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanlarda, pulmoner interstisyumda polimorf çekirdekli lökositler (ok) ayırt edilmekte. H.E. X480.



**Şekil 7.** CCl<sub>4</sub> uygulamasıyla birlikte CAPE verilen sıçanlarda, bronşiol lumeni, epiteli ve duvar yapısının normal olduğu gözlenmekte. H.E. X240.



**Şekil 5.** CCl<sub>4</sub> toksisitesine bağlı olarak pulmoner interstisyumda makrofaj infiltrasyonunun olduğu (ok) görülmekte. H.E. X240.

### Tartışma

Karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>), karaciğer ve böbrek başta olmak üzere birçok organda doku hasarına neden olmaktadır (2, 4, 5, 14, 16). 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 (2-5).

Daha önce yapılmış olan deneysel çalışmalarda, CCl<sub>4</sub> toksisitesine bağlı olarak akciğer dokusunda da histopatolojik değişikliklerin meydana geldiği ortaya konmuştur. Abraham ve ark. (6), 12 hafta boyunca CCl<sub>4</sub> soluyan sıçanların akciğerlerinde oksidatif doku hasarının ve lipid peroksidasyonunun oluştuğunu ifade etmişlerdir. Paakko ve ark. (7, 8) sıçanlar üzerinde yapmış oldukları benzer çalışmalarda, intraperitoneal yolla uygulanan CCl<sub>4</sub>'ün, akciğerde interstisyel fibrozis, alveolar dejenerasyon, hemoraji ve ödeme yol açtığını

göstermişlerdir. Miyamoto (9) CCl<sub>4</sub> toksisitesi sonucu akciğerde fibroze bağlı olarak ağırlık artışının ve pneumoninin meydana geldiğini bildirmiştir. Frukawa ve ark. (10) ise sıçanlarda derialtı yolla verilen CCl<sub>4</sub>'ün akciğerde lenfosit infiltrasyonuna neden olduğunu tespit etmişlerdir. Chen ve ark. (11) da, sıçanlar üzerinde gerçekleştirmiş oldukları çalışmalarında, CCl<sub>4</sub> uygulamasının akciğer tip II pneumositlerinde hasara yol açtığını bildirmişlerdir. Elde edilen bu histopatolojik bulgular daha sonra yine deneysel olarak yapılmış olan diğer araştırmalarla desteklenmiştir (12, 13).

Yapmış olduğumuz bu çalışmada da, deneysel CCl<sub>4</sub> uygulamasının akciğerlerde önemli ölçüde doku hasarına yol açtığı ve belirgin histopatolojik değişiklikler sergilediği belirlendi. CCl<sub>4</sub> uygulanan sıçanların akciğer doku örneklerinde; bronş ve bronşiol epitellerinde dökülme, pulmoner interstisyumda hemoraji, polimorf çekirdekli lökosit ve makrofaj infiltrasyonu göze çarpan bulguları. CCl<sub>4</sub>'ün akciğerlerde oluşturduğu toksisite yönüyle, yapmış olduğumuz bu çalışmanın bulguları daha önce yapılmış olan araştırmaların sonuçları ile uyum göstermektedir.

Propolisin aktif bileşenlerinden olan CAPE'nin, hidroksil ve serbest oksijen radikallerinin yanı sıra büyük olasılıkla da peroksil radikali ve süperoksit anyonunun

toksik etkilerini önleme yeteneğine sahip serbest radikal giderici bir ajan olduğu bildirilmiştir. Antioksidan aktivite sergileyen CAPE, çekirdek DNA'sı, membran lipitleri ve sitosolik proteinleri oksidatif hasara karşı korumada oldukça etkilidir (22). CCl<sub>4</sub>'ün oluşturduğu doku hasarına karşı antioksidan tedavilerin olumlu etkilerini gösteren sayısız çalışmaya karşın, CAPE'nin CCl<sub>4</sub> toksisitesine karşı etkinliğini inceleyen çalışma sayısı çok azdır. Bu çalışmalarda, CCl<sub>4</sub> toksisitesi sonucu karaciğer ve böbreklerde meydana gelen oksidatif doku hasarının CAPE tarafından önlediği hem biyokimyasal hem de histolojik olarak gösterilmiştir (26, 27). Bu çalışmanın bulguları ile de, CCl<sub>4</sub> uygulamasına bağlı olarak akciğerlerde meydana gelen histopatolojik değişikliklerin önemli ölçüde düzeldiği ortaya kondu. Bir başka ifadeyle, CCl<sub>4</sub> toksisitesi ile birlikte CAPE verilen sıçanlardan alınan akciğer doku kesitlerinin hafif kanama odakları haricinde görünüm özelliklerinin kontrol grubuna benzediği belirlendi.

Işık mikroskopik düzeyde gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışma sonucunda, CCl<sub>4</sub> toksisitesine bağlı olarak akciğerlerde histopatolojik değişikliklerin meydana geldiği, meydana gelen bu mikroskopik değişikliklerin ise CAPE tarafından önlediği belirlenmiştir.

## Kaynaklar

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Carbon Tetrachloride. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2005.
2. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 2003; 33: 105-136.
3. Thrall KD, Vucelick ME, Gies RA, *et al.* Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. *J Toxicol Environ Health A* 2000; 60: 531-548.
4. Ogeturk M, Kus I, Pekmez H, *et al.* Inhibition of carbon tetrachloride-mediated apoptosis and oxidative stress by melatonin in experimental liver fibrosis. *Toxicol Ind Health* 2008; 24: 201-208.
5. Rao PS, Mangipudy RS, Mehendale HM. Tissue injury and repair as parallel and opposing responses to CCl<sub>4</sub> hepatotoxicity: a novel dose-response. *Toxicology* 1997; 118: 181-193.
6. Abraham P, Wilfred G, Cathrine SP. Oxidative damage to the lipids and proteins of the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. *Clin Chim Acta* 1999; 289: 177-179.
7. Paakko P, Ala-Kokko L, Ryhanen L. A light microscopic and biochemical study of carbon tetrachloride-induced pulmonary fibrosis in rats: the preventive effect of malotilate. *Eur J Clin Invest* 1987; 17: 340-346.
8. Paakko P, Anttila S, Sormunen R, *et al.* Biochemical and morphological characterization of carbon tetrachloride-induced lung fibrosis in rats. *Arch Toxicol* 1996; 70: 540-552.
9. Miyamoto K. Experimental study on changes of the pulmonary vessels in the cirrhotic rats. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1995; 96: 44-53.
10. Furukawa T, Yasumoto K, Inokuchi K. Pulmonary interstitial edema in experimental cirrhosis of the liver in rats. *Eur Surg Res* 1984; 16: 366-371.
11. Chen WJ, Chi EY, Smuckler EA. Carbon tetrachloride-induced changes in mixed function oxidases and microsomal cytochromes in the rat lung. *Lab Invest.* 1977; 36: 388-394.
12. Zhang HQ, Yau YF, Szeto KY, *et al.* Therapeutic effect of Chinese medicine formula DSQR on experimental pulmonary fibrosis. *J Ethnopharmacol* 2007; 109: 543-546.
13. Nagano K, Sasaki T, Umeda Y, *et al.* Inhalation carcinogenicity and chronic toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *Inhal Toxicol* 2007; 19: 1089-1103.
14. Manautou JE, Silva VM, Hennig GE, Whiteley HE. Repeated dosing with the peroxisome proliferator clofibrate decreases the toxicity of model hepatotoxic agents in male mice. *Toxicology* 1998; 127: 1-10.
15. Das D, Pemberton PW, Burrows PC, *et al.* Antioxidant properties of colchicine in acute carbon tetrachloride induced rat liver injury and its role in the resolution of established cirrhosis. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1502: 351-362.
16. Mbonifor JN, Chigbo FE, Mehendale HM. Polyamine protection against chemically induced hepatotoxicity. *Int J Toxicol* 2000; 19: 391-400.
17. 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.

18. Bahcecioglu IH, Ustundag B, Ozercan I, *et al.* Protective effect of ginkgo biloba extract on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage. *Hepato Res* 1999; 15: 215-224.
19. 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.
20. İlhan N, Seçkin D. Protective effect of Nigella sativa seeds on CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2005; 19: 175-179.
21. Chao TC, Chao HH, Lin JD, Chen MF. Somatostatin and octreotide modulate the function of Kupffer cells in liver cirrhosis. *Regul Pept* 1999; 79: 117-124.
22. Ates B, Dogru MI, Gul M, *et al.* Protective role of caffeic acid phenethyl ester in the liver of rats exposed to cold stress. *Fundam Clin Pharmacol* 2006; 20: 283-289.
23. Banskota, AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 2001; 15: 561-571.
24. Özdem Türkoğlu A, Sarsılmaz M, Kuş İ, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents formaldehyde-induced neuronal damage in hippocampus of rats. *Neuroanatomy* 2007; 6: 66-71.
25. Pekmez H, Kuş İ, Çolakoğlu N, ve ark. Sıçanlarda sigara inhalasyonu sonucu prefrontal kortekste oluşan yapısal değişiklikler üzerine kafeik asit fenetil ester (CAPE)'in etkisi. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2004; 13: 18-25.
26. Kus I, Colakoglu N, Pekmez H, *et al.* Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Acta Histochem* 2004; 106: 289-297.
27. Ogeturk M, Kus I, Colakoglu N, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *J Ethnopharmacol* 2005; 97: 273-280.
28. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, *et al.* Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 1988; 44: 230-232.