



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.  
2009; 23 (3): 151-154  
http://www.fusabil.org

Ufuk TAŞ<sup>1</sup>  
Murat ÖGETÜRK<sup>2</sup>  
Sedat MEYDAN<sup>3</sup>  
Hilal IRMAK SAPMAZ<sup>2</sup>  
Dürrin Özlem DABAK<sup>4</sup>  
Tuncay KULOĞLU<sup>4</sup>  
Mustafa SARSILMAZ<sup>2</sup>

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

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

<sup>3</sup>Mustafa Kemal Üniversitesi  
Tayfur Ata Sökmen  
Tıp Fakültesi,  
Anatomi Anabilim Dalı,  
Hatay, TÜRKİYE

<sup>4</sup>Fırat Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Histoloji-Embriyoloji  
Anabilim Dalı, Elazığ,  
TÜRKİYE

**Geliş Tarihi** : 16.09.2009  
**Kabul Tarihi** : 23.11.2009

### Yazışma Adresi Correspondence

Ufuk TAŞ  
Gaziosmanpaşa  
Üniversitesi,  
Tıp Fakültesi,  
Anatomi Anabilim Dalı,  
Tokat – TÜRKİYE

dr\_ufuktas@yahoo.com

## Tolüen Solutulan Sıçanların Karaciğerinde Ghrelin Ekspresyonu\*

Tolüen endüstride çok sık kullanılan, bağımlılık yapıcı ve toksik etkileri olan aromatik bir hidrokarbondur. Ghrelin ise yakın zamanda keşfedilen birçok doku gibi karaciğer dokusunda da bulunan çok fonksiyonlu bir hormondur. Bu çalışmada, karaciğer üzerine toksik etkileri olduğu bilinen tolüenin deneysel olarak sıçanlara uygulanması sonucunda karaciğer dokusunda ghrelin ekspresyonunun immünohistokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, 14 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan iki eşit gruba ayrıldı. Grup I'deki sıçanlar kontrol olarak düzenlendi. Grup II'deki sıçanlar, dört hafta boyunca solunum yoluyla tolüen'e (3000 ppm/1saat/gün) maruz bırakıldı. 30. günün sonunda tüm ratlar dekapite edilerek karaciğer dokuları ışık mikroskobu takibi için %10'luk nötral formalin ile fikse edilip, rutin histolojik takip serilerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Ghrelin dağılımını belirlemek amacıyla parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler polilizinli lamplara alındı. Avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile ghrelin immünreaktivitesi belirlendi.

Karaciğer dokusunda ghrelin immünreaktivitesi Grup I'de şiddetli (+3), Grup II'de bazı hepatositlerde hafif (+1) olarak izlenirken, bazı hepatositlerde ise immünreaksiyon gözlenmedi. Negatif kontrol için yapılan boyamalarda, hepatositlerde herhangi bir immünreaktivite görülmedi. Pozitif kontrol olarak ise, mide dokusunda ghrelin immünreaktivitesi belirlendi.

Bu çalışmanın sonucunda, tolüen maruziyetinin karaciğer dokusunda ghrelin ekspresyonunu azalttığı belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Tolüen, ghrelin, karaciğer, sıçan.

### Ghrelin Expression in Liver of the Toluene Inhaled Rats

Toluene is an aromatic hydrocarbon has addictive and toxic effect that is used widely in the industry. Ghrelin was a recently identified multifunctional hormone that is found in many organs, including the liver. This study aimed to determine ghrelin expression via immunohistochemical methods in rats that were experimentally administered toluene, a toxic agent for liver.

For this purpose, 14 adult male Wistar-albino rats were divided into two equal groups. Animals in group I were used as control group. The rats in group II were exposed toluene (3000 ppm/1hour/day) for four-weeks. Rats from both groups were decapitated 30 days after the operation. The liver tissues were removed and fixed in % 10 neutral formalin solution. Then tissue specimens were embedded in paraffin and sectioned (thickness, 5 µm). The sections were immunohistochemically stained using avidin-biotin-peroxidase method for determination ghrelin immunoreactivity.

Ghrelin immunoreactivity in the hepatocytes was determined as strong (+3) in the control group and low (+1) or no staining in the toluene inhaled group. No immunoreactivity was observed in negative control specimens. Ghrelin immunoreactivity was detected in sections of rat stomach used as a positive control,.

The results obtained in our study indicate that toluene inhalation causes a decrease in ghrelin expression in the liver.

**Key Words:** Toluene, ghrelin, liver, rat.

### Giriş

Tolüen; berrak, renksiz, keskin ve hoş kokusu olan uçucu bir sıvı hidrokarbondur. Ham petrolden benzin ve diğer yakıtların ayrıştırılması sırasında ortaya çıkar (1, 2). Endüstride oldukça sık kullanılan tolüen başlıca; boyalar, boya incelticiler, vernik, pas önleyiciler, yapıştırıcılar, solvent tabanlı temizleyicilerde ve ayrıca kozmetik ürünlerde kullanılır (3, 4). Çok yaygın bir kullanıma sahip olan tolüen; ayakkabı iççileri, benzin istasyonu, rafineri ve deri sanayisi çalışanları, boyacılar, matbaacılar, kaportacılar, oto sanayi çalışanları vb. meslek gruplarında çalışan kişileri etkiler (1).

\* 2nd International Liver Symposium, May 20-22, 2009 Isparta, Turkey.

Tolüenin en çok alınma şekli havada bulunan tolüen buharının solunum yoluyla inhale edilmesidir. Bunun dışında sindirim ve deri yoluyla da vücuda alınabilir (2, 5). Absorbsiyonu takiben, tolüenin başlıca yağ ve yağdan zengin dokular ile iyi kanlanan dokular olmak üzere, tüm vücutta dağıldığı görülür. Tutkal soluyarak ölen kişilerin karaciğer ve beyinde yüksek oranda tolüene rastlanır (1, 3). Yaklaşık % 80'i karaciğerde metabolize edilen tolüenin büyük kısmı sitokrom P-450 oksidaz (CYTP-450 oksidaz) enzim sistemi yardımıyla hippürik asit ve orto krezole dönüştürülerek başlıca iki ana metabolit halinde idrarla atılır (6). Tolüenin özellikle santral sinir sistemi ve karaciğer başta olmak üzere birçok dokuya toksik etkileri bulunmaktadır (2, 4, 7). Tolüenin bu olumsuz etkileri oksidatif strese yol açıp antioksidan enzim sistemini etkileyerek yaptığı gösterilmiştir (8).

Ghrelin, büyüme hormonu salgılatıcı etkisi olan, enerji dengesi ve besin alınımının düzenlenmesinde rol oynayan 28 aminoasitli bir hormondur. Başlıca midenin oksintik bezlerinde bulunan özelleşmiş A-benzeri hücreleri tarafından salgınır, bununla birlikte vücudun diğer birçok bölgesinde az oranda da olsa salındığı bildirilmiştir (9). Karaciğer dokusunda da bulunan ghrelin çok fonksiyonlu bir peptid hormondur (10). Ghrelin büyüme geriliği, kalp yetmezliği, kemik erimesi ve immün sistem baskılanması gibi birçok rahatsızlık durumlarında tedavi amacıyla kullanılabilmektedir (11). Bu etkilerinin yanında ghrelinin antioksidan etkiye sahip olduğunu böylelikle dokularda oluşabilecek oksidatif stresi ve apoptozisi önlediği gösterilmiştir (12, 13).

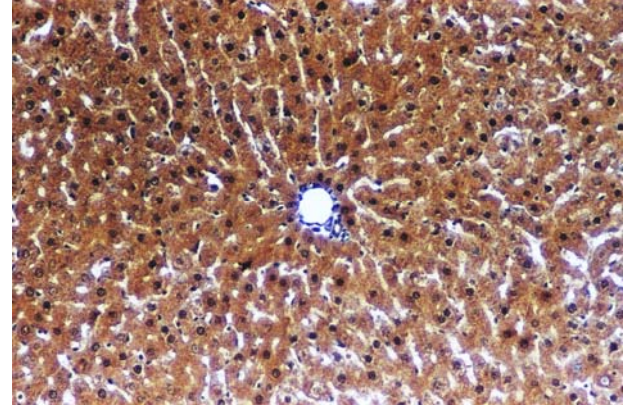
Ghrelinin oksidatif stresi azalttığına dair çok sayıda çalışma olmasına rağmen, oksidatif strese yol açarak doku hasarına yol açan aynı zamanda bir aromatik hidrokarbon olan tolüenin karşısında nasıl bir etki gösterdiğine dair herhangi bir çalışmaya rastlayamadık. Bu yönüyle bir ilk olan çalışmamızda, karaciğer üzerine toksik etkileri olduğu bilinen tolüenin deneysel olarak sıçanlara uygulanması sonucunda karaciğer dokusunda ghrelin ekspresyonunun immünohistokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlandı.

### Gereç ve Yöntem

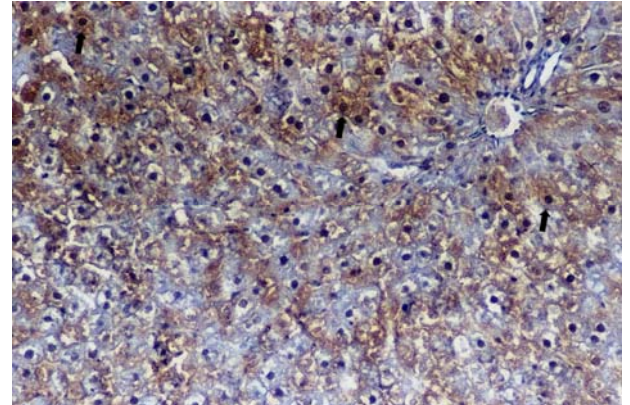
Bu çalışmada, 14 adet Wistar-albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Grup I (n=7)'deki sıçanlar kontrol olarak düzenlendi. Grup II (n=7)'deki sıçanlar, 4 hafta boyunca solunum yoluyla tolüen'e maruz bırakıldı. Tolüen konsantrasyonu Baydaş ve arkadaşlarının (14) kullandığı metoda göre (3000 ppm/l saat) göre ayarlandı. Tolüen konsantrasyonu gaz kromatografisi cihazı kullanılarak (UNICAM, Cambridge, UK) ölçüldü. 30. günün sonunda tüm ratlar dekapite edilerek karaciğer dokuları ışık mikroskobu takibi için %10'luk nötral formalin ile fikse edilip, rutin histolojik takip serilerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Ghrelin dağılımını belirlemek amacıyla parafin bloklardan 5 um kalınlığında kesitler polilizinli lamlara alındı. Avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile ghrelin immünreaktivitesi belirlendi. Kesitler, Olympus BH2 fotomikroskobunda incelenip fotoğraflandı.

### Bulgular

Işık mikroskobu düzeyinde yapılan çalışmada, karaciğer dokusunda ghrelin immünreaktivitesi Grup I'de şiddetli (+3) (Şekil 1), Grup II'de bazı hepatositlerde hafif (+1) olarak izlenirken bazı hepatositlerde ise immünreaksiyon gözlenmedi (Şekil 2). Negatif kontrol için yapılan boyamalarda hepatositlerde herhangi bir immünreaktivite görülmedi (Şekil 3). Pozitif kontrol olarak ise mide dokusunda ghrelin immünreaktivitesi belirlendi (Şekil 4).



Şekil 1. Kontrol grubuna ait karaciğer dokusunda şiddetli (+3) ghrelin immünreaktivitesi x10.

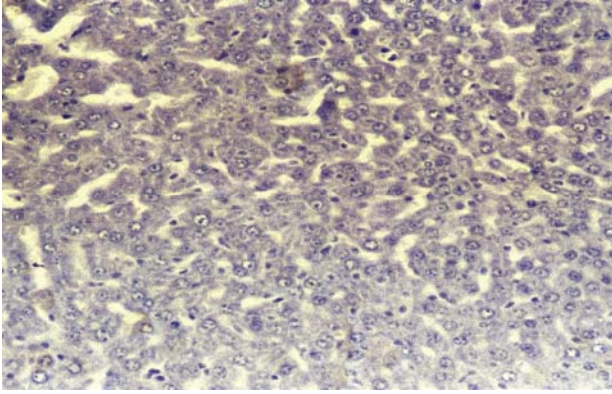


Şekil 2. Tolüen solutulan gruba ait karaciğer dokusunda bazı hepatositlerde hafif (+1) ghrelin immünreaktivitesi (ok) x10.

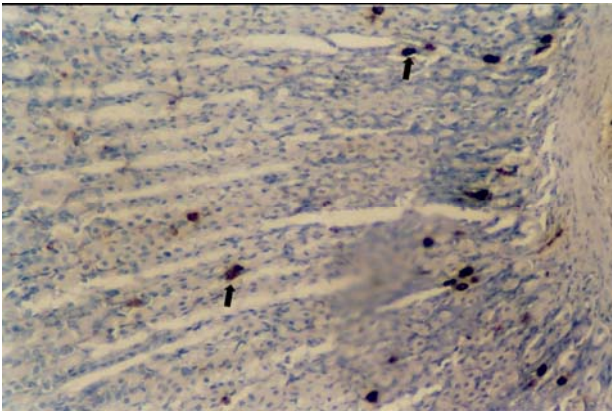
### Tartışma

Karaciğer, ilaçların ve diğer maddelerin metabolizmasında ve detoksifikasyonunda önemli bir rol oynayan aynı zamanda kendisinde toksik etkilere karşı risk altında olan bir dokudur (15, 16). Tolüen ve metabolitlerinin oksidatif hasar yoluyla hepatositler üzerine sitotoksik etki yaparak karaciğer hasarı oluşturup karaciğer enzimlerinin seviyelerini artırdığı görülmüştür (17).





**Şekil 3.** Negatif kontrol. (0) ghrelin immünreaktivitesi. x10.



**Şekil 4.** Pozitif kontrol. Mide dokusunda ghrelin immünreaktif hücreler (ok) x10.

Mattia ve ark. (8) intraperitoneal olarak tolüen uyguladıkları ratlarda, tolüenin aldehit dehidrojenaz tarafından parçalanması sırasında, süperoksit anyonunun artışına bağlı olarak, karaciğer ve beyin dokusunda reaktif oksijen radikalleri oluşumunun hızlandığını göstermişlerdir. Karaciğer hasarının araştırıldığı başka bir çalışmada tolüenin, oksidatif stres etkisiyle dokudaki

anti oksidanların düzeylerini ve etkinliklerini azaltarak lipit peroksidasyon ürünlerini artırdığı tespit edilmiştir (7).

Ghrelin çok fonksiyonlu bir peptid hormonu olup, karaciğer dokusunda da bulunur (10). Son yıllarda, ghrelinin anti-apoptotik etkileri bildirilmiş ve ghrelinin sitotoksik ajanların toksik etkilerini azaltabileceği ileri sürülmüştür (13, 18). Takeda ve arkadaşları (12), ghrelinin IGF-1 aracılı yolla iskemi sonucu meydana gelen akut böbrek yetmezliğinde, böbrek fonksiyonlarında düzelleme sağladığını göstermişlerdir. Chung ve arkadaşları (13) ise, ghrelinin iskemi sırasında sitokrom c ve caspaz 3 salınımını inhibe ederek, apoptotik yolağı inhibe ettiğini ve dolayısıyla da apoptozisi durdurarak beyin dokusunu hasardan koruduğunu tespit etmişlerdir. Bunlara ek olarak ghrelinin iskemi reperfüzyon sonrası meydana gelen hasardan mideyi ve kalbi koruduğunu gösterir çalışmalarda bulunmaktadır (19, 20). Bu çalışmaların çok büyük bir kısmı iskemi sonrasında meydana gelen oksidatif stres sonrasında çeşitli dokularda hasar meydana geldiğini, antioksidan etkinliğe sahip olan ghrelinin bu durumu tersine çevirdiğini göstermektedir.

Bu çalışmada, aromatik bir hidrokarbon olan ve çevrede oldukça fazla miktarda bulunan tolüenin solunum yoluyla alındıktan sonra karaciğerde de bulunan ve antioksidan etkinliğe sahip olan ghrelinin ekspresyonunda azalmaya yol açtığı belirlendi. Tolüen maruziyeti sonrasında SOD, GSH-Px gibi antioksidan enzim düzeylerinin azaldığı bildirilmiş ancak ghrelin yoğunluğundaki değişikliğe dair immünohistokimyasal düzeyde herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Toksik madde maruziyeti sonucu ghrelin yoğunluğunun azalması oldukça önem arz eden bir bulgudur. Bu bulgu tolüen ve benzeri toksik maddelere maruz kalarak ölen kişilerin ölüm nedenlerinin araştırılması sırasında kullanılabilirliği gibi bu maddelere maruz kalan kişilerin tedavilerinde ghrelinin kullanılabilirliği sonucunu da akıllara getirmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları ışığında tolüenin karaciğerde ghrelin ekspresyonunu azalttığı kanısına varılabilir.

### Kaynaklar

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). "Case studies in environmental medicine; toluene toxicity". <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/toluene/> 10.09.2009.
2. Taş U. Tolüen Soluyan Sıçanlarda Oluşabilecek Karaciğer Hasarı ve Melatoninin Koruyucu Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, 2008.
3. Faust RA. Toxicity Summary for Toluene. Chemical Hazard Evaluation Group, Biomedical and Environmental Information Analysis Section, Health Sciences Research Division, Tennessee: Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program, 1994: 1.
4. Jones HE. Neurobehavioral consequences of intermittent prenatal exposure to high concentrations of toluene. *Neurotoxicol Teratol* 1997; 4: 305-313.
5. Uzun N, Karaali SF, Kızıltan ME. Kronik toluen ve n-heksan intoksikasyonunda periferik sinir sistemi hasarı: elektrofizyolojik inceleme. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2001; 32: 142-150.
6. Dossing M, Aelum JB, Hansen SH, Lundqvist GR, Andersen NT. Urinary hippuric acid and orthocresol excretion in man during experimental exposure to toluene. *Br J Ind Med* 1983; 40: 470-473.
7. Bae SW, Yoon IS. The beneficial effects of melatonin for toluene hepatotoxicity in rats. *J Biomed Lab Sci* 2001; 7: 99-102.

8. Mattia CJ, Adams JD, Bondy SC. Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 103-110.
9. Bilgin HM. Ghrelin; gündemdeki hormon. *Dicle Tıp Dergisi* 2006; 33: 4: 268-272.
10. Cummings DE, Shannon MH. Roles for ghrelin in the regulation of appetite and body weight. *Arch Surg* 2003; 138: 389-396.
11. Aydın S. Ghrelin hormonunun keşfi: araştırmaları ve klinik uygulamaları. *Turk J Biochem* 2007; 32; 76-89.
12. Takeda R, Nishimatsu H, Suzuki E, *et al.* Ghrelin improves renal function in mice with ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 113-121.
13. Chung H, Kim E, Lee DH, *et al.* Ghrelin inhibits apoptosis in hypothalamic neuronal cells during oxygen-glucose deprivation. *Endocrinology* 2007; 148: 148-159.
14. Baydas G, Reiter RJ, Viktor S, *et al.* Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol Lett* 2003; 137: 169-174.
15. Kumar V, Cotran SR, Robbins SL. *Temel Patoloji*. Çevikbaş U (Çev. Ed.), İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2000: 713-744.
16. Yazıcı H, Hamuryudan V, Sonsuz A. *İç Hastalıkları*. 1. Baskı, İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık, 2007: 856-880.
17. Guzelian P, Mills S, Fallon HJ. Liver structure and function in print workers exposed to toluene. *J Occup Med* 1988; 30: 791-796.
18. Li WG, Gavrila D, Liu X, *et al.* Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells. *Circulation* 2004; 109: 2221-2226.
19. Chang L, Ren Y, Liu X, *et al.* Protective effects of ghrelin on ischemia/reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 43: 165-170.
20. Brzozowski T, Konturek PC, Sliwowski Z, *et al.* Prostaglandin/cyclooxygenase pathway in ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury. *JPET* 2006; 319: 477-487.