

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**SIÇAN BÖBREK DOKUSUNDA KARBON TETRAKLORÜR (CCl₄)
TOKSİSİTESİNE KARŞI MELATONİN VE D VİTAMİNİNİN KORUYUCU
ETKİSİ**

Safa Mohamed Elmustafa OSMAN ELMUBARAK

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2015**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Safa Mohamed Elmustafa OSMAN ELMUBARAK tarafından hazırlanan “**Sıçan Böbrek Dokusunda Karbon Tetraklorür (CCl₄) Toksisitesine Karşı Melatonin ve D Vitamininin Koruyucu Etkisi**” adlı tez çalışması **12/08/2015** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:

Baskan: Prof. Dr. Zekiye SULUDERE
Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Suna CEBESÖY
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Reyhan ÇOLAK
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Güldeniz SELMANOĞLU
Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

12/08/2015

Safa Mohamed Elmustafa OSMAN ELMUBARAK

ÖZET

Doktora Tezi

SIÇAN BÖBREK DOKUSUNDA KARBON TETRAKLORÜR (CCl₄) TOKSİSİTESİNE KARŞI MELATONİN VE D VİTAMİNİNİN KORUYUCU ETİSİ

Safa Mohamed Elmustafa OSMAN ELMUBARAK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

Bu çalışmada, sıçanlarda CCl₄ ile oluşturulan nefrotoksisiteye karşı biyokimyasal, histokimyasal ve immünohistokimyasal parametreler kullanılarak melatonin ve D vitamininin koruyucu ve iyileştirici etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada ağırlıkları 200-220 gr arasında değişen erişkin erkek Wistar albino sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar yedi gruba ayrılmıştır: Mısır yağı kontrol, PBS+etanol kontrol, 10 haftalık CCl₄ grubu, 10 haftalık CCl₄ + melatonin grubu, 12 haftalık CCl₄ + melatonin grubu, 10 haftalık CCl₄ + D vitamini grubu ve 12 haftalık CCl₄ + D vitamini grubu. Her deney grubu için 6 adet toplam 42 sıçan kullanılmıştır. CCl₄ 1.5 ml/kg dozunda haftada iki kez subkutan yolla, melatonin 10 mg/kg dozunda hergün subkutan olarak ve D vitamini 0.5 µg/kg dozunda intraperitoneal olarak hergün verilmiştir. Deneyin sonunda ketamin/rompun anestezisi altında sıçanların kan örnekleri alınmış ve böbrek dokuları çıkartılmıştır. Kan serum örneklerinde üre, kreatinin ve glukoz ölçümleri yapılmıştır. Böbrek doku homojenatlarında malondialdehit, nitrik oksit, glutatyon, süperoksit dismutaz ve katalaz düzeyleri ölçülmüştür. Doku kesitleri Hematoksilen Eosin, Periyodik Asit Schiff ve Masson trikrom ile boyanmıştır. Katalaz ve kaspaz-3 enzim aktiviteleri immünohistokimyasal olarak incelenmiş ve kesitler ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak CCl₄ grubunda serum üre, malondialdehit (MDA) düzeylerinin arttığı glutatyon (GSH) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeylerinin azaldığı saptanmıştır. Histopatolojik olarak CCl₄ verilen sıçanların böbrek doku kesitlerinin korteks bölgesinde belirgin glomerüler ve tübüler değişimler tespit edilmiştir. Tübüllerde dilatasyon, tübülo-interstisyel bölgelerde hemorajik alanlar, proksimal tübül hücrelerinde fırçamsı kenar kaybı, genel olarak proksimal ve distal tübül hücrelerinde şişme, vakuolizasyon ve ayrılma, glomerüler atrofi, belirgin glomerüler konjesyon, pariyetal tabakaya yapışma, Bowman kapsülü bazal membranında kalınlaşma ve kortiko-medüller bölgede interstisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kollajen lif artışı saptanmıştır. Kesitlerde doku organizasyonunun bozulduğu ve Bowman kapsüllerinin bir araya toplandığı da dikkati çekmiştir. İmmünohistokimyasal olarak CCl₄ uygulanan sıçanlarda yoğun kaspaz-3 immünreaktivitesi ve zayıf katalaz immünreaktivitesini saptanmıştır. Melatonin ve D vitamini uygulanan gruplarda dokudaki hasarının gerilediği ve doku bütünlüğünün kontrole yakın olduğu gözlenmiştir. Biyokimyasal analizlerin sonuçlarına göre CCl₄ grubunda yüksek olan serum üre düzeyinin D vitamini uygulanmış gruplarda düştüğü, melatonin uygulanmış gruplarda ise değişmediği gözlenmiştir. Melatonin ve D vitamini tedavili her iki grupta da (10 ve 12 haftalık) böbrek dokusunda MDA düzeylerinin azaldığı ve kontrol gruplarına yakın olduğu tesbit edilmiştir. GSH düzeylerinin arttığı bulunmuştur. SOD düzeylerinin ise 10 haftalık D vitamini tedavili grupta ve 12 haftalık melatonin tedavili grupta artış gösterdiği dikkati çekmiştir. Elde edilen biyokimyasal ve histopatolojik bulgulara göre melatonin ve D vitamininin CCl₄ ile oluşturulan oksidatif stres ve böbrek hasarını kısmen azaltabildiği ileri sürülebilir. İmmünohistokimyasal olarak da Kaspaz-3 immünreaktivitesi bakımından melatonin ve D vitamininin antiapoptotik etkiye sahip olduğu ifade edilebilir.

Ağustos 2015, 107 sayfa

Anahtar Kelimeler: Böbrek, Karbon tetraklorür, Nefrotoksisite, Melatonin, D Vitamini.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

THE PROTECTIVE EFFECT OF MELATONIN AND VITAMIN D ON CARBON TETRACHLORIDE (CCl₄) – INDUCED TOXICITY IN RAT KIDNEY

Safa Mohamed Elmustafa OSMAN ELMUBARAK

Ankara University
Graduated School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

The aim of this study was to evaluate the protective and curative effects of melatonin and vitamin D treatment on CCl₄-induced nephrotoxicity in rats using biochemical, histochemical and immunohistochemical parameters. In this study, adult male Wistar albino rats weighing 200-220 g were used. The rats were divided into 7 groups; corn oil control group, PBS+ethanol control group, 10 week CCl₄ group, 10 week CCl₄ + melatonin group, 12 week CCl₄ + melatonin group, 10 week CCl₄ + vitamin D group and 12 week CCl₄ + vitamin D group. There were 6 rats in each experimental group with a total of 42 rats. CCl₄ was injected subcutaneously, 1.5ml/kg, twice a week. Melatonin was administered subcutaneously, 10 mg/kg, every day. Vitamin D was administered intraperitoneally, 0.5 µg/kg, every day. At the end of the experiment, blood samples were taken and kidney tissues were removed under ketamine/rompun anesthesia. The urea, creatinine and glucose levels were determined in the blood tests. The level of malondialdehyde, nitric oxide, glutathione, superoxide dismutase and catalase were measured in kidney tissue homogenates. Sections were stained by Hematoxylin and Eosin, Periodic Acid Schiff and Masson's trichrome. Catalase and caspase-3 enzyme activities were assessed by immunohistochemical methods and sections were examined by light microscopy. There was an increase in the urea and malondialdehyde (MDA) levels and a decrease in the glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) levels in CCl₄ group. Histopathological analysis of CCl₄ group indicated pronounced glomerular and tubular changes in the cortex region of kidney tissue sections. There was tubular dilatation, hemorrhage in tubulo-interstitial area, loss of brush border of the proximal tubule cells, swelling of the proximal and distal tubule cells and vacuolization within the tubules. Glomerular atrophy, marked glomerular congestion and adhesion to parietal layer were observed. Bowman's capsule basement membrane thickening, interstitial inflammatory cell infiltration and increase in collagen fibers in cortico-medullary region were detected. In the sections, tissue disorganization and aggregation of Bowman's capsules were noted. The immunohistochemical analysis of caspase-3 and catalase activities indicated strong immunoreactivity of the caspase-3 and weak immunoreactivity of the catalase. In the melatonin and vitamin D treated groups, tissue damage was reduced and tissue integrity was similar to that of the control group. Biochemical results showed that the serum urine levels increased in the CCl₄ group, decreased in the vitamin D groups and were unchanged in the melatonin groups. MDA levels of the kidney tissue decreased in melatonin and vitamin D (both 10 and 12 weeks) groups and were similar to that of the control group. GSH levels had increased. It was noted that SOD levels increased in 10 weeks vitamin D group and 12 weeks melatonin group. Our results suggest that melatonin and vitamin D treatment could ameliorate CCl₄-induced oxidative stress and renal damage. Moreover, analysis of caspase-3 activity reveals possible antiapoptotic effects of melatonin and vitamin D.

August 2015, 107 pages

Key Words: Kidney, Carbon Tetrachloride, Nephrotoxicity, Melatonin, Vitamin D.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Araştırmalarımın her aşamasında bilgi veren, çalışmalarımı yönlendiren, bilimsel önerileriyle gelişmeye katkıda bulunan danışman sayın hocam Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ'a, (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) tez izleme komitesi (TİK) üyelerinden Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi sayın hocam Prof. Dr. Zekiye SULUDERE ve Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi sayın hocam Doç. Dr. Suna CEBESOY'a, bilimsel öneri ve katkılarından dolayı, çalışmalarım sırasında deneysel aşamalarda önemli katkıda bulunan ve yönlendiren Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden değerli hocalarım Prof. Dr. Gonca AKBULUT ve Doc. Dr. Şevin GÜNEY'e, araştırmalarım sırasında destek veren Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsünden sayın Dr. Yavuz ULUSOY'a, immunohistokimyasal çalışmalarım sırasında destek veren Yrd. Doç. Dr. Duygu KANKAYA (Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı) ve Dr. Haşım ERDAL (Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi)'e ışık mikroskopunda fotoğraf çekme konusunda yardım eden arkadaşım Arş. Gör. Aydan ACAR' a, laboratuvarında birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma, Dr. Dilşad ÖZERKAN, Irmak ŞAHİN ve Fevziye VURAL'a, çalışmalarım süresince beni sonsuz maddi ve manevi destekleyen eşim Ziya AHMETOĞLU'na, eğitim süresi boyunca hep yanımda olan sevgili annem, babam, ablam ve kardeşlerime en derin duygularla teşekkür ederim.

Safa Mohamed Elmustafa OSMAN ELMUBARAK

Ankara, Ağustos 2015

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1 Böbrek Yapısı, Histolojisi ve Fizyolojisi.....	5
2.1.1 İdrar oluşmu.....	6
2.2 Böbrek Fonksiyonları.....	6
2.2.1 Böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi.....	7
2.3 Böbrekte Oluşan Hasarlar.....	8
2.3.1 Üriner sistem enfeksiyonları.....	8
2.3.2 Böbrek taşları.....	8
2.3.3 Renal obstrüksiyon.....	8
2.3.4 Tübülointerstisyel fibrozis.....	9
2.3.5 Glomerüler hastalıklar.....	9
2.3.5.1 Primer glomerüler hastalıklar.....	9
2.3.5.2 Glomerüler hastalıklar.....	9
2.3.5.3 Herediter glomerüler hastalıklar.....	10
2.3.6 Tübüler ve interstisyel hastalıkları.....	10
2.3.7 Böbrek yetmezliği.....	10
2.3.8 Böbrek tümörleri.....	11
2.4 Apoptozis	11
2.4.1 Apoptozis mekanizması.....	11
2.4.3 Kaspaz.....	12
2.5 Nekroz.....	12
2.5.1 Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar	13
2.6 Karbon Tetraklorür	13

2.6.1 Karbon tetraklorür maruz kalma yolları.....	14
2.6.2 Karbon tetraklorür etki mekanizması.....	14
2.7 Oksidatif Stres ve Serbest Oksijen Radikalleri.....	15
2.8 Antioksidan Savunma Sistemi.....	16
2.8.1 Glutasyon.....	16
2.8.2 Süperoksit dismutaz (SOD).....	17
2.8.3 Katalaz.....	17
2.9 Melatonin.....	17
2.9.1 Tanımı ve biyosentezi.....	17
2.9.2 Melatonin salgılanması.....	18
2.9.3 Melatonin metabolizması.....	19
2.9.4 Melatonin temel fonksiyonları.....	19
2.9.5 Melatoninin antioksidan etkisi.....	19
2.9.6 Melatonin biyolojik alanlarda koruyucu etki mekanizmaları.....	20
2.10 D Vitamini	21
2.10.1 D vitamini kaynakları.....	21
2.10.2 D vitamininin fonksiyonları.....	22
2.10.3 D vitamini eksikliği ve toksisitesi.....	22
2.10.4 D vitamini koruyucu etkileri.....	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	24
3.1 Deney Hayvanları.....	24
3.2 Deney Grupları.....	24
3.3 Doku ve Kan Örneklerinin Alınması.....	25
3.3.1 Serum üre, kreatinin ve glukoz düzeylerinin belirlenmesi.....	25
3.3.2 Histopatolojik inceleme.....	26
3.3.3 Immunohistokimyasal inceleme.....	28
3.3.4 Dokuda oksidatif stres ve antioksidan enzim aktiviteleri.....	31
3.3.4.1 Dokuda malondialdehit (MDA) tayin yöntemi.....	31
3.3.4.2 Dokuda nitrik oksit (NO) tayin yöntemi.....	32
3.3.4.3 Dokuda glutasyon (GSH) tayin yöntemi.....	32
3.3.4.4 Dokuda süperoksit dismutaz (SOD) tayin yöntemi.....	33
3.3.4.5 Dokuda katalaz (CAT) yöntemi.....	34
3.3.4.6 BCA protein assay kit ile protein tayini.....	35
3.4 İstatistiksel Analiz.....	35

4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	36
4.1 Hayvanların Vücut Ağırlıkları.....	36
4.2 Kitle İndeksi.....	37
4.3 Böbrek Fonksiyon Testleri.....	38
4.4 Malondialdehit (MDA).....	40
4.5 Nitrik Oksit (NO).....	42
4.6 Glutasyon (GSH).....	43
4.7 Katalaz (CAT).....	44
4.8 Süperoksit Dismutaz (SOD).....	45
4.9 Histopatolojik Sonuçlar.....	46
4.9.1 Hematoksilen-Eosin.....	46
4.9.2 Periyodik asit-schiff (PAS).....	53
4.9.3 Masson trikrom.....	58
4.10 İmmunohistokimyasal Sonuçlar.....	64
4.10.1 Katalaz enzim aktivitesi.....	64
4.10.2 Kazpaz-3 enzim aktivitesi.....	73
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	78
KAYNAKLAR.....	92
ÖZGEÇMİŞ.....	105

SİMGELER DİZİNİ

CCl ₄	Karbon tetraklorür
gr	Gram
ml	Mililitre
Rpm	Dakikada Devir
cm	santimetre

Kısaltmalar

EPA	Çevre Koruma Bakanlığı
P450	Sitokrom p450
SOD	Süperoksit dismutaz
GSH	Glutatyon
NO	Nitrik oksit
MDA	Malondialdehit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasitik Asit
GFR	Glomerüler filtrasyon hızı
DNA	Deoksiribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
GN	Glomerülonefrit
i.p	İntraperitoneal
s.c	Subkutan
PBS	Fosfat tamponu
PAS	Periyodik asit Schiff
H-E	Hematoksilen-Eosin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Karbon tetraklorür biyotransformasyonu.....	15
Şekil 2.2 Melatonin biyosentezi.....	18
Şekil 2.3 D vitamini biyosentezi ve etki mekanizmaları.....	21
Şekil 4.1 Gruplar arasında ilk ve son vücut ağırlıklarının karşılaştırılması.....	36
Şekil 4.2 Sıçanlarda gruplar arası kitle indekslerinin karşılaştırılması.....	37
Şekil 4.3 Gruplar arasında üre değerlerinin karşılaştırılması.....	39
Şekil 4.4 Gruplar arasında kreatinin değerlerinin karşılaştırılması.....	39
Şekil 4.5 Gruplar arasında glukoz değerlerinin karşılaştırılması.....	39
Şekil 4.6 Böbrek dokusunda MDA aktivitesi.....	41
Şekil 4.7 Böbrek dokusunda NO aktivitesi.....	42
Şekil 4.8 Böbrek dokusunda GSH aktivitesi.....	43
Şekil 4.9 Böbrek dokusunda katalaz aktivitesi.....	44
Şekil 4.10 Böbrek SOD aktivitesi.....	45
Şekil 4.11 Mısır yağı kontrol grubu sıçanların böbrek dokusunda korteks bölgesi. Bowman kapsülü (kalın ok), proksimal tübül (ince ok), distal tübül (yıldız).....	46
Şekil 4.12 Kontrol grubu (mısır yağı) böbrek dokusunun medulla bölgesi.....	46
Şekil 4.13 (PBS+etanol) kontrol grubu sıçanlara ait böbrek dokusunun korteks bölgesi. Bowman kapsülü (kalın ok), proksimal tübül (ince ok), distal tübül (yıldız).....	47
Şekil 4.14 CCl ₄ ile muamele edilmiş sıçan böbrek dokusunda tübüller arasında hemorajik alanlar (oklar).....	48
Şekil 4.15 CCl ₄ uygulanmış sıçan böbrek dokusunda glomerüler atrofi (oklar) ve tübüler dejenerasyon (yıldız).....	48
Şekil 4.16 CCl ₄ grubu sıçanlara ait böbrek dokusu korteks bölgesinde Bowman kapsül agregasyonu izlenmekte.....	49
Şekil 4.17 CCl ₄ grubu sıçanların böbrek dokusunun tübülo-interstisyel bölgesinde bağ doku artışı (ok).....	49
Şekil 4.18 CCl ₄ grubunda kortiko-medüller bölgede iltihabi hücre infiltrasyonu (oklar) görülmekte.....	50

Şekil 4.19 CCl ₄ grubu sıçana ait böbrek dokusunda tübüller arasında hemoraji (ok) ve glomerüler konjesyon (yıldız) gözlenmekte.....	50
Şekil 4.20 10 hafta melatonin ile tedavi edilmiş CCl ₄ grubunda hafif hemorajik alanlar izlenmekte.....	51
Şekil 4.21 12 hafta melatonin uygulanmış CCl ₄ grubu sıçan böbrek dokusu glomerül ve tübüllerinin genel görüntüsü.....	51
Şekil 4.22 10 hafta D vitamini ile tedavi edilmiş CCl ₄ grubu sıçan böbrek dokusunda korteks bölgesinin kontrol grubuna yakın görüntüsü.....	52
Şekil 4.23 12 hafta D vitamini uygulanmış CCl ₄ grubunda glomerül ve tübüllerin genel görüntüsü.....	52
Şekil 4.24 Kontrol (mısır yağı) grubu sıçana ait böbrek dokusunda PAS pozitif reaksiyon gösteren Bowman kapsülü ve tübüler bazal membran izlenmekte.....	53
Şekil 4.25 Mısır yağı kontrol grubu böbrek dokusunun proksimal tübüllerinde PAS pozitif izlenen fırçamsı kenarlar (oklar).....	54
Şekil 4.26 Kontrol (PBS+etanol) grubu sıçanların böbrek dokusunda PAS pozitif tübüler bazal membran ve fırçamsı kenarları gözlenmekte.....	54
Şekil 4.27 CCl ₄ grubuna ait böbrek dokusunda zayıf PAS pozitif ve PAS negatif dejeneratif tübüller.....	55
Şekil 4.28 CCl ₄ grubu sıçanların böbrek dokusunda zayıf PAS pozitif atrofik glomerül gözlenmekte.....	55
Şekil 4.29 10 hafta melatonin ile tedavi edilen CCl ₄ grubuna ait sıçan böbrek dokusunda PAS pozitif Bowman kapsülü ve tübüler bazal membran izlenmekte.....	56
Şekil 4.30 12 hafta melatonin uygulanmış CCl ₄ grubuna ait böbrek dokusunda PAS pozitif tübüller izlenmekte.....	56
Şekil 4.31 10 hafta D vitamini ile tedavi edilen CCl ₄ grubu sıçan böbrek dokusunda zayıf PAS pozitif glomerül ve tübüller izlenmekte.....	57
Şekil 4.32 12 hafta D vitamini uygulanmış CCl ₄ grubu sıçan böbrek dokusunda PAS pozitif Bowman kapsülü ve tübüler bazal membran izlenmekte.....	57
Şekil 4.33 Kontrol (PBS) grubu sıçan böbrek dokusunun genel görüntüsü.....	58
Şekil 4.34 Kontrol (mısır yağı) grubu sıçanlarda arter çevresinde kollajen lif görüntüsü.....	58
Şekil 4.35 CCl ₄ uygulanmış grupların böbrek dokusunda kortiko-medüller bölgede kollajen birikimi izlenmekte.....	59
Şekil 4.36 CCl ₄ ile hasar oluşturulan sıçanlarda tübüller arasında kollajen lif artışı.....	59

Şekil 4.37 CCl ₄ ile hasar oluşturulan sıçanlarda böbrek korteksinin tübülointerstisyel bölgesinde kollajen lif artışı.....	60
Şekil 4.38 CCl ₄ grubu sıçan böbrek dokusunda Bowman kapsülü pariyetal tabakasına doğru kolajen lif birikmesi.....	60
Şekil 4.39 CCl ₄ uygulanmış sıçan böbrek dokusu kortiko-medüller bölgede kollajen artışı izlenmekte.....	61
Şekil 4.40 CCl ₄ uygulanan sıçan böbrek dokusunda tübülointerstisyel bölgede yoğun kollajen lif artışı gözlenmekte.....	61
Şekil 4.41 10 hafta melatonin uygulanmış CCl ₄ grubuna ait böbrek doku arter çevresinde kollajen lif dağılımı.....	62
Şekil 4.42 12 hafta melatonin ile tedavi edilen CCl ₄ grubu sıçanların böbrek dokusunda seyrek dağılım gösteren kollajen lifler izlenmekte.....	62
Şekil 4.43 10 hafta D vitamini uygulanmış CCl ₄ grubu böbrek dokusunun genel görüntüsü.....	63
Şekil 4.44 12 hafta D vitamini uygulanmış CCl ₄ grubu böbrek dokusunda arter çevresinde seyrek dağılım gösteren kollajen lifler (oklar).....	63
Şekil 4.45 Katalaz enzim aktivitesi, kontrol pozitif karaciğer dokusu.....	64
Şekil 4.46 Kontrol (PBS+Etanol) grubu sıçan böbrek dokusu korteks bölgesinde katalaz pozitif immünreaktivitesi.....	65
Şekil 4.47 (PBS+Etanol) kontrol grubu sıçan böbrek dokusu medulla bölgesinde katalaz pozitif immünreaktivitesi.....	65
Şekil 4.48 Kontrol (mısır yağı) grubu sıçan böbrek dokusu korteks bölgede katalaz pozitif immünreaktivitesi.....	66
Şekil 4.49 Kontrol grubu (mısır yağı) sıçan böbrek dokusu medulla bölgesinde katalaz pozitif immünreaktivitesi.....	66
Şekil 4.50 CCl ₄ uygulanmış grupta korteks bölgesi tübüllerinde zayıf katalaz pozitif immünreaktivitesi.....	67
Şekil 4.51 CCl ₄ grubunda orta derece katalaz pozitif immünreaktivite gösteren tübüller izlenmekte.....	67
Şekil 4.52 CCl ₄ grubunda medulla bölgesinde zayıf katalaz pozitif immünreaktivitesi.....	68
Şekil 4.53 10 hafta melatonin ile tedavi edilmiş CCl ₄ grubu böbrek korteksinde katalaz pozitif immünreaktivitesi.....	69
Şekil 4.54 10 hafta melatonin uygulanmış CCl ₄ grubu böbrek medulla bölgesinde katalaz pozitif immünreaktivitesi.....	69

Şekil 4.55 12 hafta melatonin ile tedavi edilmiş CCl ₄ grubunda korteksteki katalaz pozitif immünreaktivitesi.....	70
Şekil 4.56 12 hafta melatonin uygulanmış CCl ₄ grubu medulla bölgesinde katalaz pozitif immünreaktivitesi.....	70
Şekil 4.57 10 hafta D vitamini ile tedavi edilen CCl ₄ grubunda korteksteki katalaz pozitif immünreaktivitesi.....	71
Şekil 4.58 10 hafta D vitamini uygulanmış CCl ₄ grubu böbrek medulla bölgesinde katalaz pozitif immünreaktivitesi.....	71
Şekil 4.59 12 hafta D vitamini ile tedavi edilen CCl ₄ grubu böbrek korteksindeki katalaz pozitif immünreaktivitesi.....	72
Şekil 4.60 12 hafta D vitamini uygulanmış CCl ₄ grubu böbrek medulla bölgesinde katalaz pozitif immünreaktivitesi.....	72
Şekil 4.61 Kolon dokusunda kaspaz-3 pozitif immünreaktivitesi.....	73
Şekil 4.62 Kontrol (PBS+Etanol) grubu sıçan böbrek dokusu kaspaz-3 negatif immünreaktivitesi.....	74
Şekil 4.63 Kontrol (mısır yağı) grubu sıçan böbrek dokusu kaspaz-3 negatif immünreaktivitesi.....	74
Şekil 4.64 CCl ₄ uygulanmış gruba ait böbrek tübüllerinde orta derecede kaspaz-3 enzim reaksiyonu izlenmekte.....	75
Şekil 4.65 CCl ₄ grubunda şiddetli kaspaz-3 enzim aktivitesi gösteren boyanmış tübüller izlenmekte.....	75
Şekil 4.66 10 hafta Melatonin+CCl ₄ grubu böbrek dokusunda kaspaz-3 immünreaktivitesi.....	76
Şekil 4.67 12 hafta Melatonin+CCl ₄ grubunda böbrek dokusunda kaspaz-3 immünreaktivitesi.....	76
Şekil 4.68 10 hafta D vitamini+CCl ₄ grubu böbrek dokusunda kaspaz-3 immünreaktivitesi.....	77
Şekil 4.69 12 hafta D vitamini+CCl ₄ grubu böbrek dokusunda kaspaz-3 immünreaktivitesi.....	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Sıçanların ilk ve son vücut ağırlıklarının karşılaştırılması.....	36
Çizelge 4.2 Sıçanlarda son vücut ağırlığı, toplam böbrek ağırlığı ve kitle indeksinin karşılaştırılması.....	37
Çizelge 4.3 Üre, Glukoz ve Kreatinin Değerlerinin Karşılaştırılması.....	38
Çizelge 4.4 Böbrek dokusunda MDA aktivitesi.....	41
Çizelge 4.5 Böbrek dokusunda NO aktivitesi.....	42
Çizelge 4.6 Böbrek dokusunda GSH aktivitesi.....	43
Çizelge 4.7 Böbrek dokusunda katalaz aktivitesi.....	44
Çizelge 4.8 Böbrek SOD aktivitesi.....	45

1. GİRİŞ

Böbreğin temel görevleri kanı süzerek metabolizma artıklarından arındırma, su ve tuz konsantrasyonlarını, plazma hacmini, elektrolit dengesini ayarlama ve çeşitli hormonlar ile kan basıncını kontrol altında tutmaktır (Kuzey vd. 2007). Böbreğin yapısal olarak proksimal tübüleri toksik maddelere, iskemi ve reperfüzyon hasarına oldukça duyarlıdır (Isaka vd. 2011). Deneysel araştırmalarda toksinler ile böbrek hasarının oluşturulmasında en çok kullanılan kimyasal ajan karbon tetraklorür (CCl_4)'dür (El-Maddawy ve Gad 2012). Yapılan çalışmalarda karbon tetraklorür toksisitesine bağlı olarak insanlarda böbrek hasarlarının görüldüğü rapor edilmiştir. Böbreğin proksimal tübül hücreleri yüksek sitokrom P 450 içeriğinden dolayı CCl_4 toksisitesine karşı oldukça hasastır (Agency for toxic substances 2005).

Karbon tetraklorür (CCl_4) hepatotoksin ve nefrotoksin olarak bilinmektedir (Slater ve Sawyer 1971, Abraham vd. 1999). Doğal olarak oluşmayan, düşük seviyelerde tespit edilebilen ve tatlı bir kokuya sahip olan berrak bir sıvıdır (Doherty 2000, Adewole vd. 2007). İçme suyunda bulunduğu, çözücü ve temizlik maddesi olarakda sıklıkla kullanıldığı dikkati çekmiştir (Gültekin ve Hiçyılmaz 2007). Olumsuz etkilerine rağmen, hala iş alanlarında kullanılan ve vücuda deri, solunum, ve sindirim yoluyla girebilen CCl_4 , metalleri yağdan arındırmada, kuru temizleme ve araç tamirinde kullanılmaktadır (Çetin ve Çetin 2011). Zararlı etkileri nedeniyle, bu tür kullanımları yasaklanmış ve sadece bazı endüstriyel uygulamalarda kullanılmasına izin verilmiştir (Adewole vd. 2007). ABD Çevre Koruma Bakanlığı (EPA) CCl_4 'ün insan karsinojeni olarak sınıflandırmıştır (Ögetürk vd. 2005a). Karbon tetraklorürün karaciğer ve böbrek başta olmak üzere, kalp, beyin, akciğer ve testis gibi pek çok organda hasara sebep olduğu tespit edilmiştir (Ruprah vd. 1985, Abraham vd. 1999, Lesiuk vd. 2003, Tirkey vd. 2005, Karadeniz vd. 2007, 2009, Çetin ve Çetin 2011).

CCl_4 patogeneze bağlı böbrek hasarı tam olarak açıklanamamıştır (Adewole vd. 2007). Böbrek hasarının ya karaciğerin işlevsel durumuna bağlı olarak, ya da hepatik olaylardan bağımsız olarak gelişebildiği ileri sürülmüştür (Rincon vd. 1999). CCl_4 'ün endoplazmik retikulumdaki enzimler tarafından aktive edilerek serbest radikal

üretiminde yer aldığı ortaya konmuştur (El-kholy vd. 2013). Bu madde sitokrom P450 tarafından metabolize edildikten sonra, oluşan triklorometil ve triklorometil peroksil serbest radikalleri hücre hasarına yol açmaktadır (Ögetürk vd. 2005a). Karbon tetraklorür amino pirin desmetilaz, sitokrom P450 ve mikrozomal glukoz-6-fosfataz faaliyetlerini azaltarak enzimatik sistemlerin bozulmasında önemli rol oynamaktadır (Daniels vd. 1995, Gültekin ve Hiçyılmaz 2007).

Ögetürk vd. (2005a) çalışmalarında CCl_4 'e maruz kalındığında, oksidatif stres sonucunda oluşan serbest radikallerin böbrek hasarına sebep olduğunu göstermişlerdir. CCl_4 'ün böbrek dokularında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon (GSH) ve katalaz (CAT) aktivitelerini önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (Lesiuk vd. 2003, Tirkey vd. 2005, Karadeniz vd. 2009). Eşlenmemiş tek elektron içeren nitrik oksit endotel hücrelerindeki nitrik oksit sentaz enzimi tarafından yapılmaktadır. Nitrik oksitin süperoksit anyon radikali ile reaksiyona girerek oluşturduğu peroksinitrit dokular için son derece zararlı olup hücre hasarına yol açmaktadır (Tamer vd. 2000). CCl_4 uygulamasından sonra farelerin böbrek dokularında nitrik oksit (NO) düzeyinde artma gözlenmiştir (Karadeniz vd. 2009). Ayrıca CCl_4 'ün farelerin böbrek dokularında malondialdehit (MDA) ve lipid hidroperoksit düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir (Weyers vd. 2001, Ogeturk vd. 2005b).

CCl_4 'ün toksik etkisine bağlı olarak böbrek dokusunda histopatolojik değişikliklerin meydana geldiği ortaya konmuştur (Ögetürk vd. 2005a, Adewolel vd. 2007). Düşük CCl_4 dozu uygulandığında böbrek glomerüllerinde ve proksimal tübül yapılarındaki hasarın minimal düzeyde olduğu bildirilmiştir (Fırat vd. 2009). Düşük CCl_4 dozu uzun süre uyguladığında böbrekte interstitiyel fibrozis ve inflamasyon görüldüğü (Doğukan vd. 2003), yüksek doz uygulandığında ise böbrek korteksinde glomüler ve tübüler hasar olduğu tespit edilmiştir (Öztürk vd. 2003). CCl_4 uygulanan sıçanların böbreğinde glomerüler bazal membran kalınlaşması, interstisyel inflamasyon, tübüler hücre şişmesi, piknotik çekirdek, medüller vasküler konjesyon, orta ve şiddetli derecede nekroz şeklinde histopatolojik bulgular gösterilmiştir (Adewolel vd. 2007). Diğer taraftan, CCl_4 ile oluşturulan renal toksisitesinin cinsiyet farklılığına bağlı olarak da değişebildiği bildirilmiştir. Erkek farelerin renal hasara dişilere göre daha hassas olduğu bulunmuştur.

Bu durum, erkek farelerde böbreğin sitokrom P izoenzimlerinin uyarılması sonucu daha fazla oksidatif hasara maruz kalmasıyla açıklanmıştır (Kim vd. 2007).

Toksisite araştırmalarında kullanılan toksin ve ilaçlara karşı koruyucu mekanizmalar tanımlandıktan sonra antioksidan aktiviteye sahip olan ve oksidatif strese karşı koruyan biyolojik bileşiklerinin araştırılması önem kazanmıştır (Mejia vd. 2002). Pineal bezden salgılanan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) antioksidan enzimleri uyararak (Reiter vd. 1995), diğer antioksidanların aktivitelerini artırarak (Gitto vd. 2001), serbest radikalleri kaldırarak (Reiter vd. 2003, Tan vd. 1999), glutatyon sentezini uyararak (Urata vd. 1999) ve mitokondrilerde elektron taşıma zincirinin etkinliğini artırarak (Gültekin ve Hiçyılmaz 2007) antioksidan sistemin güçlendirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Melatoninin antioksidan etkisinin antiapoptotik etkisinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (Sainz vd. 2003). Hücre zarlarını ve kan-beyin bariyerini kolayca geçebilen melatonin diğer antioksidanların aksine, redoks döngüsüne uğramaz (Adewole vd. 2007). Melatonin, ilave olarak immunmodülator bir ajandır (Vijayalaxmi vd. 2002). Kalsiyum ile birlikte alındığında, T hücresi yanıtının kuvvetli bir immün uyarıcısıdır. Çeşitli deneysel çalışmalarda, melatoninin kaspaz-3 aktivitesini inhibe ederek apoptozu azalttığı gösterilmiştir (Kunduzova vd. 2003, Kim ve Lee 2008, Sinanoğlu vd. 2012). Ekzojen melatoninin, lipid peroksidasyonunu azalttığı, glutatyon düzeylerini arttırdığı ve nitrit düzeylerindeki artışı engellediği ve böylece böbrek fonksiyonunu koruduğu ortaya konmuştur (Ögetürk vd. 2005a, Adewole vd. 2007, Gültekin ve Hiçyılmaz 2007). CCl₄ ile oluşturulan böbrek nefrotoksisitesinde melatoninin belirgin antioksidan aktivitesini bildirilmiştir (Adewole vd. 2007).

D vitamini kemik ve mineral metabolizmasında önemli bir role sahiptir (Weinreich vd. 1996). Vücutta pek çok doku ve hücrelerde D vitamini reseptörünün keşfedilmesinden sonra, bu vitaminin işlevine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır (Khan vd. 2011). D vitamini eksikliği tübülointerstitiyal fibrozis gelişmesi ile sonuçlanmaktadır (Iturbe ve Garcia 2010). Bu vitamin ile tedavi edildikten sonra tübüler hücre nekrozu, glomerüller proliferasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunun azaldığı ve renal hasar ilerlemesinin gerilediği gözlenmiştir (Panichi vd. 2001, Kim vd. 2005, Sinanoğlu vd. 2012). D vitamininin beta-katenin sinyal iletimini baskılayarak epitel mezankimal geçişi

azalttığı bildirilmiştir (Iturbe ve Garcia, 2010). Bu etkilerin tümör nekroz faktör ekspresyonunu baskılaması, T lenfosit ve makrofajların renal infiltrasyonunun inhibe edilmesi, fibronektin, Tip I ve Tip III kollajen birikiminin azaltılması ve düz kaslarda aktin, vimentin ekspresyonunun iyileştirilmesi ile olduğu tespit edilmiştir (Tan vd 2009, Iturbe ve Garcia, 2010). D vitamini böbrek hasarının oluşumunda önemli rol oynayan renin-anjiyotensin sistem genlerini de regüle etmektedir (Freundlich vd. 2008). Çalışmalarda İskemi-Reperfüzyon (İ/R) hasarına karşı D vitamininin potansiyel olarak koruyucu bir etki gösterdiği rapor edilmiştir (Kim vd. 2005, Sinanoğlu vd. 2012). D vitamininin renal iskemi reperfüzyon hasarının neden olduğu böbrek apoptozu üzerinde önemli bir etkisinin olduğunu düşünülmektedir (Sinanoğlu vd.2012).

Bu çalışmada sıçanlarda CCl₄ ile oluşturulan nefrotoksisiteye karşı, ekzojen uygulanan melatonin ve D vitamininin koruyucu ve iyileştirici etkileri araştırılmıştır. Melatonin ve D Vitamini gibi biyolojik ajanların böbrek hasarını geriye dönüştürüp dönüştüremediği değerlendirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ ve KURAMSAL TEMELLER

2.1 Böbrek Yapısı, Histolojisi ve Fizyolojisi

Boşaltım sistemi iki böbrek, iki üreter, bir mesane ve bir üretradan oluşur. Böbrekler karın arka duvarında retroperitoneal bölgede yerleşmiş fasulye şeklinde ve her biri yaklaşık 120-150 gram ağırlığında olan bir çift organdır. İnsan böbreği 10- 12 cm uzunluğunda, 5- 6 cm genişliğinde ve 3-4 cm kalınlığındadır. Böbrek dıştan ince ve dayanıklı bağ dokusu kapsülü ile sarılmıştır. Böbrek dışta kapsül içte korteks ve medulla bölgelerinden oluşmuştur. Bir medullada 10-18 piramit bulunur. Bu piramitler koni şeklinde yapılardır. Her bir medullar piramitten kortekse uzanan medullar ışınlar çıkar. Her bir insan böbreğinde 1 ile 4 milyon arasında nefron bulunur. Nefron böbreğin yapısal ve işlevsel birimidir. Nefron genişlemiş bir bölüm olan böbrek cisimciği, proksimal kıvrımlı tübül, Henle kangalının ince ve kalın uzantıları, distal kıvrımlı tübül ve toplayıcı kanallardan oluşmuştur. Nefronlarda üretilen idrar toplayıcı tübüller ve kanallar ile böbrek pelvisini iletilir. Böbrek cisimciği ile proksimal ve distal tübüller sadece korteks bölgesinde bulunur. Henle kulpu ise medullada ve medulla uzantılarında bulunur. Böbrek cisimciği 200 mikrometre çapında ve kapiller bir yumak olan glomerülünden oluşmuştur. Glomerül iki tabakalı epitelden oluşan Bowman kapsülü ile sarılmıştır. Bowman kapsülünün dış tabakası olan pariyetal tabaka tek katlı yassı epitel hücrelerinden oluşmuştur. Bu epitel ince bir bazal lamina üzerine oturur. İç tabakasını oluşturan viseral tabaka podositlerden oluşup glomerülün kapillerini dıştan sarar. Proksimal tübüller böbrek cisimciğinin idrar kutbundan başlar. Proksimal tübül hücreleri kübik epitelden oluşur. Memeli nefronunun en uzun bölgesidir. Proksimal tübül hücrelerinin apikalinde fırçası kenar oluşturan çok sayıda mikrovillus bulunur. Sitoplazması asidofiliktir. Henle kangalı yassı epitel hücrelerinde oluşan U-şeklinde bir yapıdır. Distal tübüller tek katlı kübik epitelle döşenmiştir. Hücreler daha kısadır ve daha soluk boyanır. Lümenleri daha geniş ve düzgündür. Fırçası kenarları yoktur. Toplayıcı tübül ve kanallar medüller piramidlerin ucuna yaklaşan ve genişleyen kübik epitel hücrelerinden oluşur. (Akpolat ve Utaş 1996, Tekelioğlu 2002, Junqueira ve Carneiro 2009).

2.1.1 İdrar oluşmu

Nefronlarda idrar oluşmasında üç aşama vardır:

Filtrasyon

Filtrasyon idrar oluşumunun ilk aşamasıdır. Afferent arteriyol ile glomerüle ulaşan kanın proteinleri ve hücreleri dışındaki tüm elemanları Bowman kapsülü içine süzülür. Glomerül kapillerlerindeki filtrasyon hızı (GFR), birim zamanda süzülen plazma miktarı olarak tanımlanır. Dakikada 125 ml olan filtrasyon miktarı günde 180 litreye eşdeğerdir. Böbreklerin filtre edilen plazma miktarına göre günde çıkarılan idrar miktarı ortalama 1-1,5 litredir. GFR, glomerül kapilleri içindeki kanın hidrostatik basıncı, glomerul kapillerindeki geçirgenlik ve Bowman kapsülü içindeki sıvının basıncı gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilir.

Geri Emilim

Filtre edilen sıvı içindeki su ve suda erimiş maddelerin % 90'ı basit difüzyon ve aktif taşıma yolu ile proksimal tübül epitel hücreleri tarafından kana geri emilir.

Salgılama

İdrar oluşması sırasında bazı maddeler doğrudan tübül epitel hücreleri tarafından tübüller içine salgılanmaktadır. Bazı maddeler ise hem glomerül filtrasyonu yolu ile hem de ekskresyon ile idrara geçmektedir.

2.2 Böbrek Fonksiyonları

İdrar üretilmesi ve atılması. Oluşan idrar üreterler aracılığı ile mesanede toplanır ve üretra ile dışarıya atılır.

Vücut sıvı ve elektrolit dengesinin korunması.

Kan basıncının düzenlenmesi.

Metabolik artık ürünlerin atılımı.

İlaçlar, toksinler ve metabolitlerinin atılımı.

Ekstrasellüler sıvı hacmi ve kan basıncının hormonal düzenlenmesi.

Hormon üretimi ve metabolizmasına katkı.

Peptit hormonların yıkımı.

Küçük molekül ağırlıklı proteinlerin yıkımı.

Metabolik etki (Akpolat vd. 1996, Junqueira ve Carneiro 2009).

2.2.1 Böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi

Böbrek fonksiyonlarının belirlenmesi için idrar ve kan analizleri yapılır. Kan testleri serum Na, K, Cl, HCO₃, kreatinin ve üre azot düzeyleri böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek sıklıkla kullanılır. İdrar analizi üriner sistemdeki bir hastalığın belirlenmesi için kullanılan basit ve önemli bir testtir (Set ve Şahin 2003).

Glomerüler fonksiyon testleri

Glomerüler filtrasyon hızının belirlenmesi tüm böbrek fonksiyonları içinde en önemlisidir. GFR ölçümü ile glomerüllerde hasar olup olmadığı, varsa hasar derecesinin belirlenmesi ve böbrek hastalığının seyrinin değerlendirilmesi mümkündür. Total GFR, fonksiyon gören bütün nefronların filtrasyon hızlarının toplamına eşittir. GFR hızının ölçülmesinde en sık kullanılan yöntem kreatinin klirensidir. Kreatinin klirensini ölçmek için kan ve idrar örneği kullanılmaktadır (Set ve Şahin 2003).

Tübüler fonksiyon testleri

Böbrekler tübüler fonksiyon yoluyla oluşturulacak olan idrarın konsantrasyonunu belirler. Dilüsyon testi, idrar asitleştirme testi (amonyum klorür testi) ve idrarda aminoasit incelemesi gibi testler de tübüler fonksiyon bozukluklarının değerlendirilmesinde kullanılan parametrelerdir (Set ve Şahin 2003).

2.3 Böbrekte Oluşan Hasarlar

Böbreğin hastalıkları da yapısı gibi çok karmaşıktır. Bu yüzden hastalıkları etkiledikleri dört ana yapıya (glomerüller, tübüller, interstisyum ve kan damarları) göre incelemek kolaylık sağlamaktadır.

2.3.1 Üriner sistem enfeksiyonları

Üriner sistem enfeksiyonları bakteriyel hastalıklar 20-40 yaşlar arasında en sık görülen hastalıktır. Ayrıca çocuklarda adenovirus hemorajik sistite neden olmaktadır. İdrar yolu enfeksiyonları; üst ve alt üriner sistem enfeksiyonları, semptomatik ve asemptomatik olarak sınıflandırılmaktadır (Saltoğlu 2008).

2.3.2 Böbrek taşları

Üriner sistem taşlarının bulunduğu bölgelere göre belirtileri olur. Böbrek taşlarının lomber ağrı ve hematüri gibi belirtileri bulunmaktadır. Sempatik tonus artışına bağlı olarak soğuk terleme, bulantı, kusma gibi şikayetler ortaya çıkabilir (Öner 2009).

2.3.3 Renal obstrüksiyon

Renal obstrüksiyon üroloji pratiğinde önemli bir yere sahiptir ve organ kaybına yol açabilmektedir. Üriner sistem taşları, üreteropelvik bileşke veya üreterovezikal bileşke darlığı, tümörler ve iyatrojenik faktörlere bağlı olarak üst üriner sistem obstrüksiyonu geliştirebilir. Eğer üriner sisteminde idrar akımını engelleyen bir yapı oluşturuyorsa obstrüktif üropati ortaya çıkabilir. Bu durum böbrek fonksiyon kaybına neden olabilir (Bülbül 2006).

2.3.4 Tübülointerstisyel fibrozis

Tübülointerstisyel renal fibrozis parankimal dokuların geri dönüşümsüz hasarı ve böbrekte ileri derecede bağ dokusu birikimini olarak tanımlanmaktadır. İnterstisyel fibrozis myofibroblastların uyarımı ile karakterize edilmektedir ve böbrek fonksiyonlarının bozulmasına yol açmaktadır. (Efstratiadis vd. 2009).

2.3.5 Glomerüler hastalıklar

2.3.5.1 Primer glomerüler hastalıklar

Lipoid nefroz.

Membranoz glomerülonefrit (GN).

Membranoproliferatif GN.

Diffüz proliferatif GN.

Hızla ilerliyen GN.

Kronik GN.

IgA neropatisi

Fokal segmental glomeruloskleroz (İnan ve Karataş 2007).

2.3.5.2 Glomerüler hastalıklar

Sistemik lupus eritematoz.

Diabetes mellitus.

Amiloidoz.

Goodpasture sendromu.

Poliarteritis Nodoza.

Wegener Granülomatozu.

Henoch-Schönlein Purpura.

Bakteriyel endokardit (İnan ve Karataş 2007).

2.3.5.3 Herediter glomerüler hastalıklar

Alport sendromu.

Fabry hastalığı (İnan ve Karataş 2007).

2.3.6 Tübüler ve interstisyel hastalıklar

Bu hastalıklar iki gruba ayrılır;

1. Tübül ve interstisyumun iltihapla tutulumu (interstisyel nefrit). Akut ve kronik olarak ikiye ayrılır
2. İskemik veya toksik tübüler zedelenme zonucu oluşan akut tübüler nekroz ve akut böbrek yetmezliği (İnan ve Karataş 2007).

2.3.7 Böbrek yetmezliği

Akut böbrek yetmezliği

Glomerüler filtrasyon hızının azalması sonucunda vücutta biriktirilen kan üre azotu, kreatinin ve diğer üremik toksinler akut böbrek yetmezliğine yol açmaktadır. Akut böbrek yetmezliği günler ile haftalar içerisinde hızlı bir şekilde gelişir. Çoğunlukla yaşlı insanlarda görülür ve ölümlerin %75'inden sorumludur. Akut böbrek yetmezliği prerenal, intrinsik renal ve postrenal olarak 3 grupta sınıflandırılmaktadır (Horoz ve Özgür 2004).

Kronik böbrek yetmezliği

Kronik böbrek yetmezliği glomerüler filtrasyon değerinin azalmasından, sıvı dengesini ayarlama ve metabolik-endokrin fonksiyonlarının bozulmasından kaynaklanan bir hastalıktır.

Ortaya çıkış sebepleri arasında diabetes mellitus, hipertansiyon, primer glomerülonefrit, böbreğin kistik, herediter, konjenital hastalıkları, interstisyel nefrit, sekonder glomerülonefrit, renal arter darlığı, AIDS nefropatisi ve amiloidoz gösterilebilir (Akpolat vd. 1996).

2.3.8 Böbrek tümörleri

1980 yılından itibaren böbrek tümörlerinin 40-75 yaş grupları arasında arttığı gösterilmiştir. Afrika ve Asya ülkelerinde böbrek kanseri daha az gözlenmiştir. Genel olarak böbrek kanserleri böbrek tübüllerini oluşturan epitel hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Sigara, içme suyunda bulunan arsenik, asbest, kadmiyum, organik çözücüler, pestisidler ve mantar toksinleri böbrek hücre kanserinden sorumlu tutulan en önemli faktörlerdir. Ayrıca böbrek hücreli karsinom ile aşırı şişmanlık, östrojen hormonları ve hipertansiyon arasında ilişki bulunduğu da düşünülmüştür (Yörükoğlu 2005).

2.4 Apoptozis

Apoptozis ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Programlı hücre ölümünün gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde önemli bir rolü vardır. Apoptozis, hücrenin yaşam boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlamaktadır. Genel olarak hücre ölümü apoptoz ve nekroz olarak iki farklı mekanizma ile gerçekleştirilir (Akşit ve Bildik 2008).

2.4.1 Apoptozis mekanizması

Apoptozis hücrenin kendi genlerinin aktivasyonu veya gelen sinyallerle başlatılmaktadır. Apoptozis primer veya sekonder olarak gelişebilir. Oluşan DNA hasarına genlerin cevabı, ölüm sinyallerinin hücreye alınması ve hücreye doğrudan granzim girişi ile başlayabilir. Apoptozun işleyişinde Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) proteinleri görev yapar. Bunların

biyokimyasal aktivasyonu ile mitokondriyal hasar, çekirdek zarında yer yer erime, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişiklikler ortaya çıkar (Akşit ve Bildik 2008).

2.4.3 Kaspaz

Kaspazlar apoptotik süreçte rol oynayan önemli bir protein ailesidir. İnsanlarda 11 kaspaz enzimi mevcuttur. Genel olarak inaktif proenzimler halinde bulunurlar. İnaktif olan prokaspazlar hücrede sentez edilerek depolanır. Apoptozisin indüklenmesi genellikle kaspaz 8 veya kaspaz 10 aktivasyonu ile başlar ve bunlar diğer kaspazları aktive eder. Bu süreç kaspaz 3 ve kaspaz 6 gibi efektör kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanır ve hücre içindeki proteinler hızla yıkıma gider. Hücre apoptotik cisimcikler oluşturacak şekilde kendi kendini parçalar. Apoptotik cisimcikler fagositik hücreler tarafından sindirilir. (Çavuşoğlu ve Yeğen 2007, Barrett vd. 2011).

Kaspaz enzimlerin fonksiyonları

Kaspaz enzimleri proteolitik aktivite ile çekirdek ve hücre iskelet proteinlerini sindirirler. Endonükleaz aktivasyonu ile DNA'da çift iplik kırılmalarında rol oynarlar. Transglutaminaz aktivasyonu ile de sitoplazmik proteinler kovalent bağlarla çapraz bağlanır ve apoptotik cisimlerin yapısına katılırlar (İnan ve Karataş 2007).

2.5 Nekroz

Nekroz enzimlerin geri dönüşümsüz ve ilerleyici parçalama etkisiyle oluşur. En sık görülen hücre ölüm tiplerinden biridir. Nekrozda değişiklikleri başlatan otoliz ve heteroliz olmak üzere iki farklı enzimatik sindirim söz konusudur (İnan ve Karataş 2007). Tek hücre, hücre grubu, doku veya organların nekrozu olabilir. Hücre ölümünden sonra hücre ve organellerin enzimatik yıkımı ile morfolojik değişiklikler meydana gelir (Kuzey vd. 2007).

2.5.1 Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar

Apoptoz hem fizyolojik hem de patolojik şartlarda oluşurken nekroz sadece patolojik durumlarda meydana gelir.

Nekrotik hücre şişerken apoptotik hücre küçülür.

Nekrozda hücre kromatini normal olup apoptotik hücrede kromatin yoğunlaşması görülmektedir.

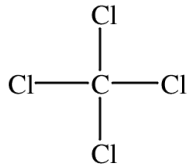
Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder, apoptotik hücre membranı ise sağlamdır.

Nekrotik hücre ezimlerin ilerleyici parçalama etkisi ile ölüme giderken apoptik hücre apoptotik cisimcik oluşturulacak şekilde yıkımı uğrar.

Nekrozda inflamasyon uyarılır. Apoptozda ise inflamasyon oluşmaz (Akşit ve Bildik 2008).

Apoptoz nekrozdan farklı olarak aktif ve mutlak enerji kullanılan bir süreçtir (İnan ve Karataş 2007).

2.6 Karbon Tetraklorür



Apolar bir molekül olan karbon tetraklorür, genellikle organik bir çözücüdür. Bir karbon molekülüne bağlı dört Cl atomu tetrahedral bir şekilde bağlıdır. Karbon

tetraklorür (CCl_4) çok kolay buharlaşabilen berrak bir sıvıdır. Genel olarak çevrede gaz olarak bulunur ve uzun bir yarılanma ömrü vardır. Karbon tetraklorür az miktarlarda su yüzeyinde ve içme suyu kaynaklarında bulunur. Karbon tetraklorür yanıcı olmayan tatlı bir kokuya sahiptir. Karbon tetraklorür doğal olarak oluşmayan üretilen bir kimyasal bileşiktir. Geçmişte karbon tetraklorür yaygın bir şekilde temizleme sıvısı, yangın söndürücü ve pestisitlerin üretiminde kullanılmıştır (Agency for toxic substances 2005).

2.6.1 Karbon tetraklorüre maruz kalma yolları

Vücuda CCl_4 büyük oranda soluma yoluyla alınmasının yanında yutma ve deri yoluyla da alınabilir. Çevreden insan vücuduna günlük ortalama $0,1 \mu\text{g}$ CCl_4 girişi olduğu tahmin edilmektedir. İnsanlarda esas olarak yağ dokusuna yerleşir. Ayrıca böbrek, karaciğer, beyin, akciğerler ve iskelet kası dokularına da girebilir. Karbon tetraklorürün çoğu değişmeden vücuttan atılabilir. Ancak bazı durumlarda kloroform ve hexakloroetan gibi zararlı kimyasal maddelere dönüşebilmektedir (Şekil 2.1) (Agency for toxic substances 2005).

2.6.2 Karbon Tetraklorür Etki Mekanizması

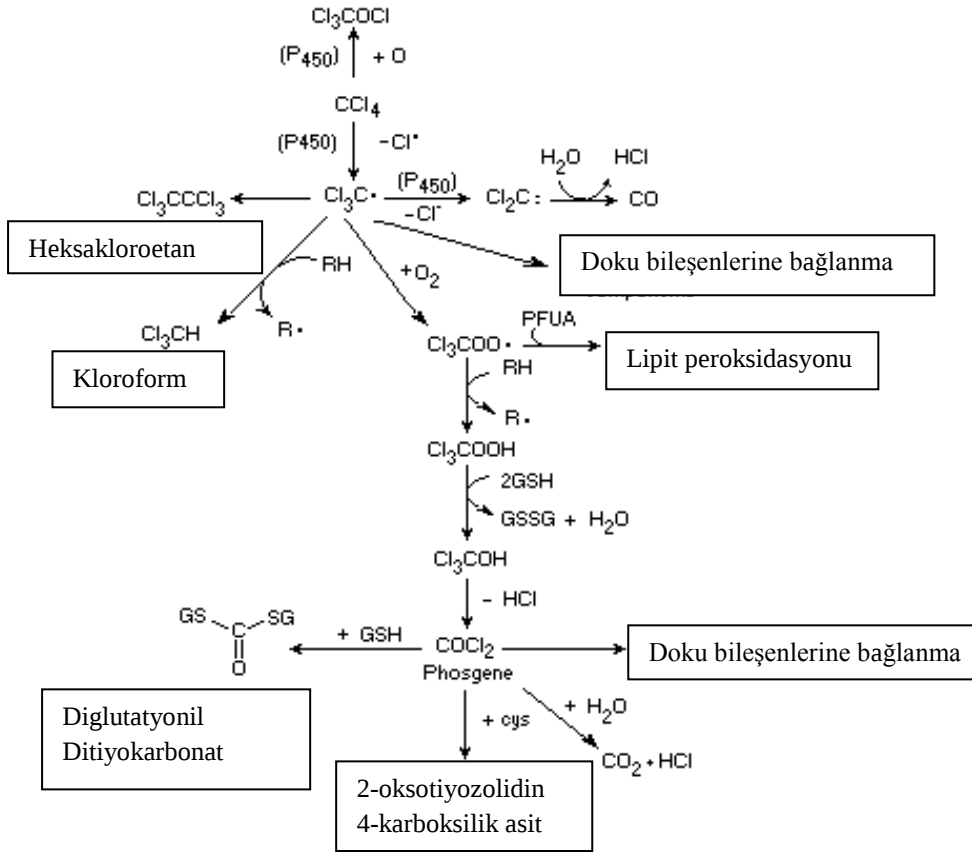
CCl_4 'ün etki mekanizmasında ilaç ve kimyasal maddeleri metabolize eden ve mikrozomal enzimler olarak tanımlanan enzimler rol oynar.

İlaç Metabolize eden enzimler

Faz I enzimleri: Oksidasyon, redüksiyon, hidroksilasyon ve demetilasyon işlemlerini yaparlar. Faz I metabolizması "heme" içeren ve karaciğerde bulunan P450 enzimleri ile gerçekleşir. P450 dışarıdan alınan ilaçları ve kimyasal maddeleri metabolize eden bir enzim sistemidir. Bu enzimler yüksek konsantrasyonlarda hepatositlerin düz endoplazmik retikulumunda bulunurlar. Ayrıca bağırsak, böbrek, akciğer ve beyinde de yer alırlar.

Faz II enzimleri: Glukronat veya sulfat ile konjugasyon ve asetilasyon işlemlerini yaparlar (Yüksel 2001).

Karbon tetraklorürün insan sağlığına zararlı etkileri maruz kalınan süreye ve yüksek doza bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Karaciğer ve böbrek dokularında sitokrom enzimi yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu için bu dokular karbon tetraklorür toksisitesine karşı oldukça hassastır. Karbon tetraklorürün biyotransformasyonu gerçekleştirildikten sonra triklorometil (CCl_3) radikali oluşur. Triklorometil (CCl_3) radikali oksijen ile birleşerek triklorometil peroksil (CCl_3O_2) radikalini oluşturur. Oluşan Peroksil radikali, hücrenin zar yapısının bozulmasına, lipid peroksidasyonun başlamasına ve dolayısıyla oksidatif hasara sebep olmaktadır (Şekil 2.1). Bu hasar hücreyi ölüme kadar götürebilmektedir (Agency for toxic substances 2005, Çetin ve Çetin 2011).



Şekil 2.1 Karbon tetraklorür biyotransformasyonu. <http://www.inchem.org>

2.7 Oksidatif Stres ve Serbest Oksijen Radikalleri

Atomik orbitali üzerinde eşlenmemiş elektron (e) taşıyan moleküller serbest radikaller olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikal oluşumunun artması, oksidatif stresi

tetiklemektedir. Oksidatif stres biyolojik sistemde prooksidanlarla antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması olarak bilinmektedir. Hücreler hafif oksidatif strese maruz kaldıklarında bu durumu tek başlarına tolere edebilseler de genellikle antioksidan enzim sistemlerini aktive ederler. Ancak, hücre içi savunma sistemlerinin yeterli çalışmadığı durumlarda reaktif oksijen türleri (ROS) ile antioksidanlar arasındaki denge bozulur ve hücredeki makromoleküller zarar görür (Tamer vd. 2000, Yoshikawa ve Naito 2002, Sabuncuoğlu ve Özgüneş 2011). Serbest radikaller membranda lipid peroksidasyonu, protein çapraz bağlanmaları, polipeptid fragmentasyonu ve çekirdekte özellikle timin ile reaksiyona girip DNA hasarı oluşturarak hücreye dört yoldan zarar verir (İnan ve Karataş 2007).

2.8 Antioksidan Savunma Sistemi

Oksidatif stresin olumsuz etkilerine karşı kullanılan antioksidan maddeler enzim ve enzim olmayan antioksidan olmak üzere iki farklı grupta incelenebilir. Antioksidan enzimlere örnek olarak süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz, enzim olmayan antioksidanlara örnek olarak da C vitamini, E vitamini, beta karoten ve glutatyon vereilebilir (Bibren vd. 2012).

2.8.1 Glutatyon

Organizmanın bütün hücrelerinde bulunan glutatyon (GSH), zararlı bileşiklerin nötralize edilmesinde önemli rollere sahiptir. GSH radikal kaynaklı hasara karşı koyarken antioksidan enzimlere substrat olarak görev yapar ve bir radikal süpürücüsü gibi davranır. Glutatyon disülfat (GSSG) de indirgenmiş glutatyonun (GSH) yükseltgenmesiyle oluşur. Oksidatif stres sürecinde, GSH düzeyi azalırken, GSSG düzeyi artar (Bibren vd. 2012).

2.8.2 Süperoksit dismutaz (SOD)

Bu enzim süperoksit radikallerini nötralize ederek hücreleri korur. Dokularda oksijen basıncının (PO_2) yükselmesi ile SOD aktivitesi artar. Enzim fagosite edilmiş bakterilerin öldürülmesinde rol oynar ve granülosit fonksiyonu için önemlidir. İçeriğindeki metal iyonuna göre sitozolik dimerik CuZn-SOD, ekstrasellüler EC-SOD ve mitokondriyal tetramerik Mn-SOD olarak adlandırılır (Bibren vd. 2012).

2.8.3 Katalaz

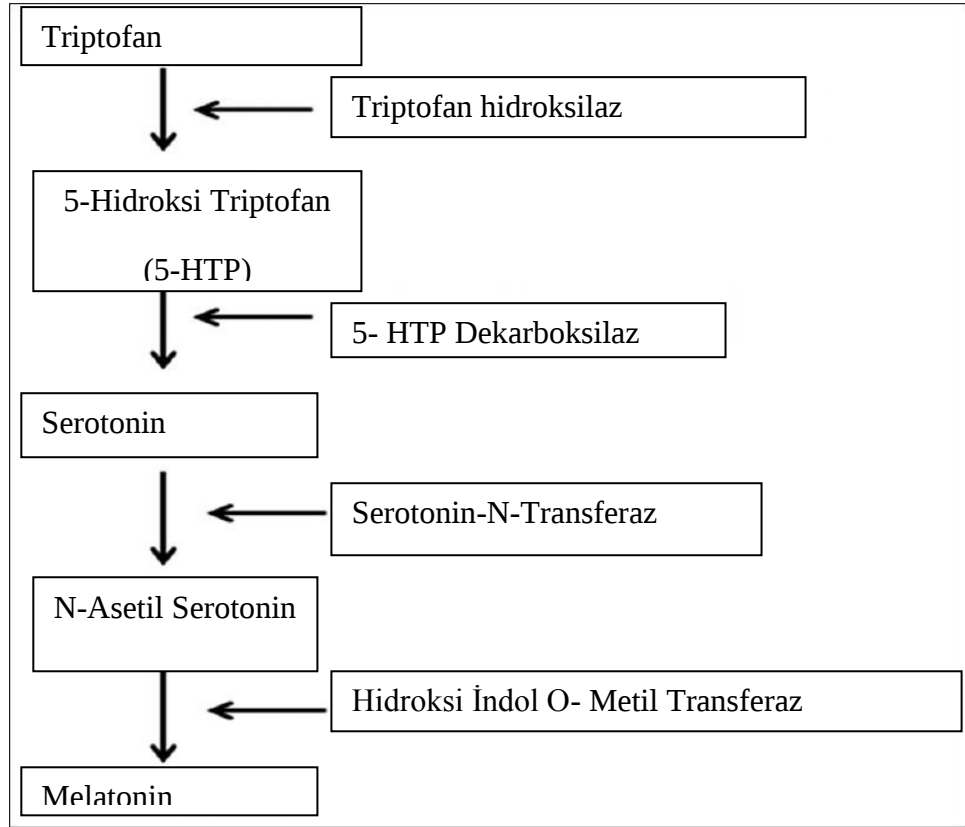
Katalaz (CAT) protein yapısında, bol miktarda bulunan ve en yaygın karakteristik bir antioksidan enzimdir. Katalaz enzimi hücrelerde oluşan toksik hidrojen peroksidin uzaklaştırmasında önemli bir rol oynar. İlk olarak 1937 yılında sığır karaciğer dokusundan Sumner ve Dounce tarafından izole edilmiştir. Bu enzimin hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunduğu gösterilmiştir. Hayvan hücrelerinde özellikle peroksizomlarda yoğun olarak mevcuttur. Ayrıca karaciğer, böbrek, kemik iliği gibi çeşitli dokularda ve eritrositlerde de bulunmaktadır. Farklı dokularda bu enzimin aktivitesi birçok deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Karaciğer ve böbrek dokularında katalaz aktivitesinin çok yüksek olduğu bulunmuştur. (Çimen vd. 2005, Bingöl ve Kocamış 2010).

2.9 Melatonin

2.9.1 Tanımı ve biyosentezi

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) ilk kez 1958 dermatolog Aaron Lerner tarafından pineal bezinden izole edilmiştir. Melatonin serotonin sentezlenen bir indol bileşiğidir ve retina, bağırsak, deri, trombosit ve kemik iliğinde bulunmaktadır. Melatonin sentezinde öncü madde triptofandır. Triptofan serotonine dönüştürülür. Serotonin daha sonra N-asetil transferaz (NAT) enzimi aracılığı ile asetillenerek N-asetilserotonin'e dönüşür. N-asetilserotonin ise hidroksiindol-O-metil transferaz

(HIOMT) ile melatonine dönüşür (Şekil. 2). Gece saatlerinde serotonin miktarının azalması melatonin sentezinin artmasından yani serotoninin melatonine dönüştürülmesinden kaynaklanmaktadır (Claustrat vd. 2005).



Şekil 2.2 Melatoninin biyosentezi (Kumar vd. 2013)

2.9.2 Melatonin salgılanması

Melatoninin salgılanması karanlıkta gerçekleşir. Lipit ve suda çözündüğü için hücre zarından kolaylıkla geçer. Melatonin salgılanması gece saat 03:00-04:00 arasında maksimum düzeye ulaşır. Dolaşıma salındıktan sonra çeşitli sıvılar, dokular ve hücrelere alınır. Pineal bezde melatonin depolanmadığı için ölçülen plazma hormon seviyesi bezin aktivitesini ifade etmektedir. Melatonin salgılanması renal veya hepatik anormallik olmamasında ideal bir şekilde değerlendirilir (Claustrat vd. 2005).

2.9.3 Melatonin metabolizması

Karaciğer melatonin metabolizması için temel bir organdır. Dolaşan melatoninin %90'ı karaciğer tarafından temizlenir. Melatonin hidroksillendikten sonra sülfat ve glukuronid konjugatları oluşmaktadır. Bu bileşikler idrara salgılanır ve vücuttan atılır. Ancak melatoninin %1'i idrarda değişmeden kalır. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda gündüz melatoninin arttığı gösterilmiştir (Claustrat vd. 2005).

2.9.4 Melatonin temel fonksiyonları

Karanlık sinyalleri melatonin vasıtasıyla elde edilir. Melatonin vücudun biyolojik saatini koruyup ritmini ayarlar. Ayrıca melatonin kemik metabolizması, üreme fonksiyonları ve yaşa bağlı visseral yağlanmanın engellemesinde de kritik rol oynar (Yonei vd. 2009).

2.9.5 Melatoninin antioksidan etkisi

Melatoninin karaciğer (Sener vd. 2003), böbrek ve diğer dokularda çok önemli bir antioksidan rolü vardır. Direkt olarak oksijen kaynaklı serbest radikalleri detoksifiye eder. Güçlü bir oksijen radikal toplayıcısı olarak dokuların hasara uğramasını geciktirebilir. Ayrıca kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçmesi onun üstün bir antioksidan olarak görülmesine neden olmuştur. Melatonin doğrudan serbest radikalleri temizleyerek, dolaylı yoldan antioksidan enzimleri aktive ederek koruyucu özellik gösterir. Melatonin, en zararlı radikallerden biri olan $\text{OH}^\cdot$ ve HOCl radikalini nötralize ederek ortadan kaldırır. Melatonin $\text{OH}^\cdot$ radikaliyle reaksiyona girerek indolil katyon radikaline dönüşür. Bu bileşik ortamda bulunan süperoksit ($\text{O}_2^\cdot$) radikalini tutarak etki gösterir. Melatoninin süper oksit dismutazın (SOD) aktivitesini arttırarak da süperoksit radikalini engeller. Sonuç olarak melatoninin antioksidan enzimleri uyardığı, lipid peroksidasyonunu engellediği, mitokondri elektron taşıma zincirinin etkinliğini artırdığı ve hücreleri oksijen ve nitrojen kaynaklı serbest radikallerden koruduğu saptanmıştır (

Marshall vd. 1996, Reiter vd. 2000, Tan vd. 2000, Acuna vd. 2002, Tan vd. 2002, , Reiter vd. 2003, Yonei vd. 2009).

2.9.6 Melatonin biyolojik alanlarda koruyucu etki mekanizmaları

Melatonin ve kanser

Bir çok vücut hücresinde reseptörü bulunan melatonin çok fonksiyonel olmasından dolayı son yıllarda kanser ile ilişkilendirilmek için araştırılmıştır. Anti-kanser etkisi yanında kronobiyolojik düzenleyici, antioksidan ve immün destekleyici özellikleri de kanser süreciyle ilişkilidir (Topal vd. 2009).

Melatonin ve apoptozis

Melatonin ile tedavi edilen sıçan böbrek dokularında kaspaz-3-bağımlı hücre apoptozunu önlediğini bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Kunduzova vd. 2003, Sinanoğlu vd. 2012).

Melatonin ve nörolojik bozukluklar

Nörolojik hastalıklardaki melatonin düzeyi, depresyon ve uyku döngüsü ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Depresyon hastalarında gece melatonin düzeyinin düşük olduğu saptanmıştır. Tedavi için kullanılan melatoninin depresyon hastalarında uykuyu düzenlediği ve depresyon belirtilerinin gerilemesine neden olduğu gösterilmiştir (Özçelik vd. 2013).

Melatonin ve üreme sistemi

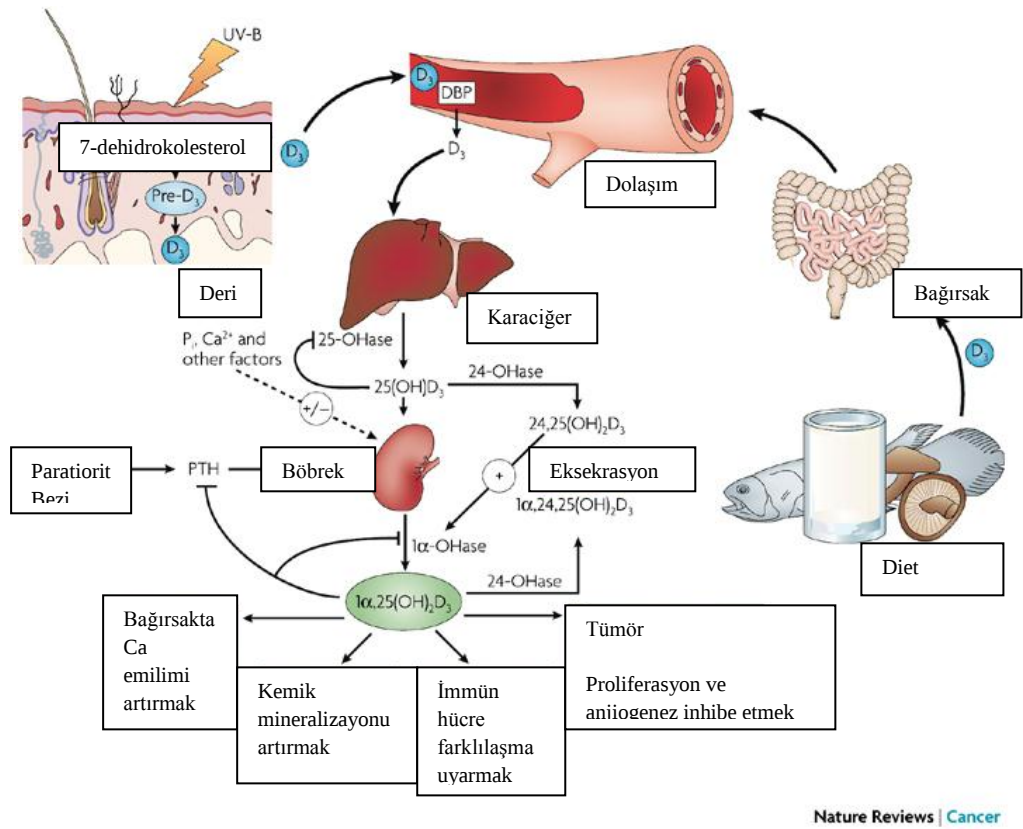
Melatonin reproduksiyonda rolü vardır (Namıduru vd. 2001).

Melatonin ve kardiyovaskular hastalıkları

Yapılan çalışmalarda koroner kalp hastalarında plazma melatonin seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Melatonin miyokard iskemi-reperfüzyon hasarında koruyucu etkiye sahiptir (Claustrat vd. 2005).

2.10 D Vitamini

D vitamini yağda çözünen bir prohormondur. Ergokalsiferol (D_2) ve Kolekalsiferol (D_3) olmak üzere iki öncü formu mevcuttur ve biyolojik olarak aktif değildir. Dolaşımdaki D vitamini, karaciğere taşınmakta ve karaciğerde 25 hidroksi D vitaminine [$25(OH)D$] dönüştürülmektedir. Ancak D vitaminin aktif formuna geçebilmesi için böbreklerde 1 alfa hidroksilaz ile 1,25 dihidroksi D vitaminine ($1,25(OH)_2D$) dönüştürülmesi gerekmektedir (Şekil. 3) (Zhang ve Naughton 2010).



Şekil 2.3 D vitamininin biyosentezi ve etki mekanizmaları. (Deeb vd. 2007)

2.10.1 D vitamini kaynakları

D vitamini diyetle alınabilir veya güneş ışığına maruz kalıp endojen olarak yapılabilir. Diyetle D vitamini en fazla balık, karaciğer ve yumurta sarısında bulunmaktadır. Endojen olarak 7-dehidrokolesterolden sentezlenmektedir. 7-

dehidrokolesterolden güneş ışığının etkisiyle kolekalsiferol (D3) oluşmaktadır (Zhang ve Naughton 2010).

2.10.2 D vitamininin fonksiyonları

D vitamininin genel fonksiyonu kalsiyum ve fosforun normal plazma düzeylerini sürdürmektir. Kemiklerin oluşumunda ve korunmasında önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda D vitamini reseptörlerinin çeşitli hücrelerde mevcut olduğu tespit edilmiştir ve bu nedenle de D vitamini mineral metabolizmasından daha fazla bir biyolojik etkiye sahiptir (Glenn vd. 1997, İnan 2006, Zhang ve Naughton 2010). D vitamini bağırsaktan kalsiyum absorpsiyonu sağlamaktadır. Ayrıca kemiğin remodellenmesi, hücre döngüsü ve renin-anjiyotensin sisteminin düzenlenmesi, pankreas beta hücrelerinden insülin salgılanması ve kas-iskelet sisteminin gelişiminde rol oynamaktadır (Yıldırım vd. 2013). D vitamini birçok dejeneratif hastalıkların önleminde ve antikanser ajan olarak da rol oynayabilir (Deluca 2004).

2.10.3 D vitamini eksikliği ve toksisitesi

D vitamininin eksikliği 25(OH)D düzeyinin 20 ng/ml'den az olması durumunda ortaya çıkmaktadır. D vitamini eksikliği insanların UVB ışınlarına yeterince maruz kalamamaları veya D vitamini bakımından yetersiz diyet sonucunda gelişebilmektedir. Yapılan birçok çalışmalarda kronik D vitamini eksikliğinin hipertansiyon, skleroz, romatoid artrit, enfeksiyon, kanser ve oto-immün hastalıklar gibi ciddi hasarlara sebep olabileceği gösterilmiştir. D vitamini toksisitesinin gelişme ihtimali çok zayıftır. Günlük 150 ng/ml (50.000 IU)'ın üzerinde alınması durumunda hiperkalsemi ve hiperfosfatemi görülebilmektedir (Zhang ve Naughton 2010, Yıldırım vd. 2013).

2.10.4 D vitamini koruyucu etkileri

D vitamini bağışıklık sisteminde hem uyarıcı hem de anti inflamatuvar etkileri sahiptir (Yıldırım vd. 2013).

D vitamini hücre farklılaşması, neoplastik dönüşümün önlenmesi ve hücre büyümesinin inhibisyonu gibi biyolojik fonksiyonlara sahiptir (Kochupillai 2008).

D vitamininin kanser, otoimmün hastalıklar, bulaşıcı hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok kronik hastalıkların riskinin azaltılmasında rolü vardır (Khan vd. 2011).

D vitamini böbrek hasarının oluşumunda önemli rol oynayan renin-anjiyotensin sistem genlerini de negatif olarak regüle etmektedir (Li 2007, Freundlich vd. 2008, Koroshi ve Idrizi 2011).

D vitamini fibronektin, Tip I ve Tip III kollajeninin birikiminin azaltılması ve düz kaslarda aktin, vimentin ekspresyonunun baskılanması sonucunda glomerüler ve tübüler interstisyel fibrozisi engellemektedir (Li vd. 2005, Tian 2007, Tan vd. 2009).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Deney Hayvanları

Hayvan deneyleri için Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığından 21.02.2013 izin alındı (Kod: G.Ü.ET.12.010/663320476004.01.02/27-3959). Hayvan deneyleri Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde (GÜDAM) gerçekleştirildi. Ağırlıkları 200-220 gr arasında değişen erişkin erkek Wistar Albino sıçanlar GÜDAM'dan alındı. Hayvanlara standart pellet yem ve su verildi ve ortalama 22 °C sabit sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık periyodlu odalarda tutuldu. Sıçanlar 7 gruba ayrılıp her deney grubu için 6 adet toplam 42 sıçan kullanıldı. Deneyler 10-12 hafta devam etti.

3.2 Deney Grupları

- 1) 1.Kontrol grubu= mısır yağı.
 - 2) 2.Kontrol grubu= etanol+PBS.
 - 3) 3.grup= CCl₄.
 - 4) 4.grup= 10 haftalık CCl₄+melatonin.
 - 5) 5.grup= 12 haftalık CCl₄+melatonin.
 - 6) 6.grup= 10 haftalık CCl₄+D vitamini.
 - 7) 7.grup= 12 haftalık CCl₄+D vitamini.
- 1.1. kontrol grubu hayvanlara mısır yağı (karbon tetraklorür ve D vitamininin çözücüsü) 1.5 ml/kg 10 hafta boyunca deri altı (subkutan, s.c) olarak hergün uygulandı.
- 2.2. kontrol grubu sıçanlara %1 oranında etanol+PBS (melatonin çözücüsü) 10 hafta boyunca her gün deri altı olarak uygulandı.

3.3. grup hayvanlara nefrotoksisite oluşturmak için, 10 hafta boyunca haftada 2 kez 1:1 oranında mısır yağında çözünen steril CCl₄, 1.5 ml/kg vücut ağırlığı olacak şekilde deri altı olarak verildi.

4.4. grup sıçanlara 10 hafta boyunca CCl₄ (haftada iki kez) enjeksiyonunun başlangıcından itibaren 10 mg/kg dozunda melatonin deri altı olarak hergün verildi.

5.5. grup hayvanlara 10 hafta boyunca CCl₄ (haftada iki kez) enjeksiyonunun başlangıcından itibaren 10 mg/kg dozunda melatonin deri altı olarak hergün verildi. Sonraki 2 hafta CCl₄ enjeksiyonu kesilip sadece melatonin verilmesini devam edildi.

6.6. grup sıçanlara 10 hafta boyunca 0.5 µg/kg dozunda D₃Vitamini (VD₃) intraperitoneal (i.p) yoldan enjekte edildi, CCl₄ haftada iki kez verildi.

7.7. grup hayvanlara 10 hafta boyunca 0.5 µg/kg dozunda D₃Vitamini (VD₃) intraperitoneal (i.p) olarak enjekte edildi, CCl₄ haftada iki kez verildi. Sonraki iki hafta CCl₄ uygulamasını kesilip D vitamini verilmesini devam edildi.

3.3 Doku ve Kan Örneklerinin Alınması

Bütün gruplardan son enjeksiyonu takiben 24 saat sonra ketamin/rompun anestezisi altında intrakardiyak kan örnekleri alındı ve böbrek dokuları çıkarıldı. Çıkarılan sağ ve sol böbrek dokuları hassas terazi kullanılarak tartıldı. Sağ böbrek histolojik ve immünhistolojik incelemelerde kullanılmak üzere %10'luk formalin solüsyonunda tespit edildi. Sol böbrek sıvı azota alınıp antioksidan aktivite ölçmek amacıyla -80 °C'de saklandı. Alınan kan örneklerinden serum ayrılıp biyokimyasal analizleri yapıldı.

3.3.1 Serum üre, kreatinin ve glukoz düzeylerinin belirlenmesi

Kan örnekleri rutin biyokimyasal test tüplerinde toplandıktan sonra 10 dakika 3000 devirde santrifüj edilerek serum ayrıldı. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany markaya ait Cobas C 501 kodlu oto analiz cihazı ve ticari kitleri kullanılarak bütün serum örneklerinde üre, kreatinin ve glukoz düzeyleri ölçüldü. Serum üre

enzimatik metot (Tabacoo vd. 1979), serum kreatinin Jaffe's metot (Owen vd. 1954) ve serum glukoz düzeyi glukoz oksidaz peroksidaz metoduna göre ölçüldü (Trinder 1969).

3.3.2 Histopatolojik inceleme

Böbrek dokuları alındıktan sonra %10'luk formalin solusyonunda tespit edildi. Böbrek doku örnekleri Shandon Citadel 1000 doku takip cihazı kullanılarak histolojik işlemlerden geçirilip parafine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan Shandon Finesse marka mikrotom ile 5-6 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Histopatolojik incelemeler için kesitler Hematoksilen Eosin (HE), Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Masson Trikrom ile boyandı. Leica DM1000 marka ışık mikroskobu ve DFC320 marka fotoğraf makinası ile kesitlerin fotoğrafları çekildi. Kesitler tübüler ve glomerüler hasar, damar tıkanıklığı, kanama, interstisyel mononükleer hücre infiltrasyonu ve fibrozis yönünden değerlendirildi.

H&E boyama protokolü

1. Kesitler deparafinize (ksilen) edilip alkol serilerinden geçirildi.
2. Distile su ile yıkandı.
2. Lamlar hematoksilin boya kabına daldırılıp 10 dakika bekletildi.
3. Lamlar akan çeşme suyu altında 2 dakika bekletildi.
4. Lamlar asit alkol solüsyonuna daldırılıp çıkarılarak dokular diferansiye edildi. Hızlı bir şekilde çeşme suyuna sokularak diferansiyasyon durduruldu.
5. Lamlar, dilue amonyaklı suda bekletilerek dokuların mavileşmesi sağlandı. Akan su altında doku rengi berrak mavi renk kazanıncaya kadar bekletildi.
6. Hemotoksilenle boyanan lamlar eozin boyasına daldırılır, 1-3 dakika bekletildi.
7. Lamlar çeşme suyunda yıkanarak boya işlemi tamamlandı.
8. Boyanan lamlar alkol serilerinden geçirildi

9. Ksilen ile şeffaflaştırıldı ve kapatıldı.

Periyodik asit schiff (PAS) boyama

1. Kesitler deparafinize edildi ve dehidrasyon işlemleri gerçekleştirildi.
2. Distile su ile yıkandı.
3. Periyodik asit solüsyonunda 5 dakika bekletildi.
4. Çeşme suyundan 3 dakika geçirildi.
5. Distile su ile yıkandı.
6. Schiff solüsyonunda 15 dk tutuldu.
7. Çeşme suyundan 3 dakika geçirildi.
8. Distile su ile yıkandı.
9. Hematoksilen solüsyonunda 2 dk bekletildi.
10. Çeşme suyundan 3 dakika geçirildi.
11. %95'lik alkol, saf alkol ikişer defa geçirilip, ksilolde şeffaflaştırıldı ve entellan ile kapatıldı.

Masson trikrom boyama yöntemi

1. Kesitler deparafinizasyon için ksilolden geçirildi (3 dakika iki kez), dehidrasyon için alkol serilerinden (saf, %95, %70) geçirildi ve distile su ile yıkandı.
2. 56⁰C de 15 dakika Bouin solüsyonunda tutuldu.
3. İlk önce kesitler soğutulup sonra 5 dakika akan suda bekletildi.
4. Distile sudan geçirildi.
5. Weigert'in Demirli Hematoksilen solüsyonu ile 5 dakika boyandı.
6. Çeşme suyunda 10 dakika yıkandı.

7. Deiyonize sudan geçirildi.
8. Biebrich asit fuksin solusyonunda 5 dakika bekletilerek diferensiye edildi.
9. Deiyonize sudan geçirildi.
10. Şeffaflastirmak için fosfomolibdik- fosfotungstik asit solusyonunda 5dakika tutuldu.
11. Anilin mavisi solusyonu ile 5 dakika boyandı.
12. Distile sudan geçirildi.
13. Asetik asitte 2 dakika bekletildi.
14. Kesitler alkol serilerinden (iki kez 5 dakika) geçirildi ve ksilolde şeffaflastırıldı.
15. Entellan ile kapatıldı.

3.3.3 Immunohistokimyasal inceleme

Ventana marka BenchMark XT IHC/ISH immunohistokimyasal cihazı ve kitleri ile boyama yapıldı.

Katalaz lokalizasyonu

Böbrek dokusundaki katalazın (CAT) lokalizasyonunu incelemek için, Abcam marka anti-katalaz antikor (EPR1928Y ab 76110) kullanıldı. Katalaz enzim aktivitesi için karaciğer doku kesiti pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

1. Paraffin bloklardan böbrek kesitleri poli-lizin kaplı lamlara alındı.
2. Deparafinizasyon için kesitler etüvde 1 saat bekletildi.
3. Ksilolde 20 dakika bekletildi.
4. Seri alkollardan geçirilip (3 kez) dehidrasyon işlemleri gerçekleştirildi.
5. Distile su ile yıkandı.

6. Pan pen kullanılarak kesitlerde dokunun arasına hidrofobik bariyer oluşturuldu.
7. Kesitler EDTA solüsyonunda 20 dakika kaynatıldı.
8. Hidrojen peroksit solüsyonunda 15 dakika tutuldu.
9. Distile su ile yıkandı.
10. P.B.S ile 5 daika muamele edildi.
11. Distile su ile yıkandı.
12. Kesitler bloklama solüsyonunda 10 dakika tutuldu.
13. Distile su ile yıkandı.
14. P.B.S ile anti-katalaz antikor 1:100 sulandırıldı.
15. Primer anti-katalaz antikorları damlatıldı ve sıcak su buharı altında nem kabini içinde 1saat inkübe edildi.
16. Distile su ile yıkandı.
17. Streptavidin HRP ile 20 dakika inkübe edildi (Hsu vd. 1981).
18. Distile su ile yıkandı.
19. DAB kromojen solüsyonunda 5 dakika tutuldu.
20. Distile su ile yıkandı.
21. Hematoksilen ile 5 dakika zıt boyama yapıldı.
22. Distile su ile yıkandı.
23. Dereceli alkol serilerinden ve ksilolden geçirilerek şeffaflaştırıldı.
24. Entellan ile kapatıldı.

Kaspaz-3 immünreaksiyonu

Böbrek doku kesitlerinde kaspaz-3 immün reaktivitesinin belirlenmesi için, Cell Signaling Technology (USA) firmasının 9662 katalog numaralı kaspaz-3 antikoru kullanılmıştır. Kaspaz enzim aktivitesi için kolon kanseri doku kesiti pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

1. Paraffin bloklardan böbrek kesitleri poli-lizin kaplı lamlara alındı.
2. Deparafinizasyon için kesitler etüvde 1 saat bekletildi.
3. Ksilolde 20 dakika tutuldu.
4. Alkol serilerinden geçirilip (3 kez) dehidrasyon işlemleri gerçekleştirildi.
5. Distile su ile yıkandı.
6. Pan pen kullanılarak kesitlerde dokunun arasına hidrofobik bariyer oluşturuldu.
7. Kesitler sitrat solüsyonunda 20 dakika kaynatıldı.
8. Hidrojen peroksit solüsyonunda 15 dakika inkübe edildi.
9. Distile su ile yıkandı.
10. P.B.S ile 5 dakika muamele edildi.
11. Distile su ile yıkandı.
12. Kesitler bloklama solüsyonunda 10 dakika bekletildi.
13. Distile su ile yıkandı.
14. P.B.S ile anti-kaspaz 3 antikor 1:50 oranında dilue edildi.
15. Primer anti-katalaz antikorları damlatıldı ve sıcak su buharı altında nem kabini içinde 1saat inkübe edildi.
16. Distile su ile yıkandı.
17. Streptavidin HRP ile 20 dakika bekletildi (Hsu vd. 1981).

18. Distile su ile yıkandı.
19. DAB kromojen solüsyonunda 5 dakika inkübe edildi.
20. Distile su ile yıkandı.
21. Hematoksilen ile 5 dakika zıt boyama yapıldı.
22. Distile su ile yıkandı.
23. Alkol serileri ve ksilolden geçirilerek şeffaflaştırıldı.
24. Entellan ile kapatıldı.

3.3.4 Dokuda oksidatif stres ve antioksidan enzim aktiviteleri

3.3.4.1 Dokuda malondialdehit (MDA) tayin yöntemi

Bu yöntemin referans noktası barbitüat MDA konjugatının pembe renginin spektrofotometrik olarak ölçülmesidir (Casini vd. 1986).

1. -80 °C'de saklanan böbrek dokusundan 0,3 gram tartıldı.
2. Doku ağırlığına göre 9 kat soğuk trikloraasetik asit (TCA) konuldu.
3. Doku buzlu ortamda homojenize edildi.
4. 15 dakika 4000 rpm 4°C'de santrifüj edildi.
5. 1,5 ml süpernatant alınarak mikrosantrifüj tüplerine konuldu.
6. Süpernatant 8 dakika daha 4000 rpm 4°C'de santrifüj edildi.
7. 750 mikrolitre örneğe 10 mikrolitre BHT konuldu.
8. 750 mikrolitre tiobarbitrik asit (TBA) eklendi.
9. Örnekler 100°C'de kaynayan su banyosunda 15 dakika bekletildi.
10. Daha sonra 4000 rpm 4°C'de santrifüj edildi.
11. Örneklerin absorbasları 535 nm'de okundu.

12. $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak hesaplandı.

3.3.4.2 Dokuda Nitrik Oksit (NO) tayin yöntemi

Griess reaksiyonu ile nitrik oksit direkt olarak ölçülebilmektedir. Hızlı ve basit bir yöntem olarak çoğu örnekte NO metabolizmasının dayanıklı son ürünleri olan nitrit (NO_2) ve nitrat (NO_3) miktarlarının ölçülmesi de sıklıkla kullanılmaktadır.

1. 0,3-0,35 gr doku tartıldı.
2. 5 katı hacimde fosfat tamponu (pH 7,4) ile sulandırıldı. Homojenize edildi.
3. 2000 RCF de $+4^\circ\text{C}$ de 5 dakika santrifüj edildi.
4. 500 μl süpernatant alındı.
5. Üzerine 250 μl 0,3 M NaOH eklendi ve oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.
6. 250 μl %5' lik ZnSO_4 konuldu.
7. Vortekslendi.
8. 3000 RCF'de $+4^\circ\text{C}$ 'de 20 dakika santrifüj edildi.
9. 500 μl 'si 14 000 RPM'de $+4^\circ\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj edildi.
10. NO için; 1 birim süpernatant, 1 birim VaCl_2 , 0,5 birim sülfanilamid, 0,5 birim NEDD karışımı 37°C de yarım saat bekletildi. 540-550 dalga boyunda ölçüldü.
11. Elde edilen sonuçlar protein miktarlarına bölünerek U/mg protein olarak verildi.

3.3.4.3 Dokuda glutatyon (GSH) tayin yöntemi

Bu spektrofotometrik yöntemin temeli, Ellman reaktifi olarak da bilinen 5-50-dithiobis-2-nitrobenzoik asitin (DTNB), ortamda var olan gruplar ile redüklenerek sarı renkli bir ürün oluşturulmaktadır (Aykaç vd. 1985).

1. -80°C 'de saklanan böbrek dokusundan 0,3 gram tartıldı.
2. Doku ağırlığına göre 9 kat soğuk trikloroasetik asit (TCA) konuldu.
3. Doku buzlu ortamda homojenize edildi.
4. 15 dakika 4000 rpm 4°C 'de santrifüj edildi.
5. 1,5 ml süpernatant alınarak mikrosantrifüj tüplerine konuldu.

6. Süpernatant 8 dakika daha 4000 rpm 4°C'de santrifüj edildi.
7. 1000 mikrolitre 0.3M Na₂HPO₄·2H₂O ve 125 mikrolitre ditiyobisnitrobenzoat (DNTB) ve son olarak 250 mikrolitre süpernatana eklendi.
8. Oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi.
9. 412 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü.
10. 13.600 M⁻¹ cm⁻¹ katsayısı kullanılarak hesaplandı.

3.3.4.4 Dokuda süperoksit dismutaz (SOD) tayin yöntemi

Bu yöntemin temeli ksantin- ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan süperoksit radikalinin SOD enzimi ile ortadan kaldırılamadığında reaksiyon ortamında bulunan nitroblue tetrazolium (NBT) bileşiğinin indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Böbrek dokularındaki SOD enzim aktivitesi ölçülmek amacıyla Cayman kiti kullanıldı.

1. 100 gr doku 1/10 (w/v) soğuk tampon (20 mM HEPES, pH: 7.2) ile homojenize edildi.
2. 1500 xg'de +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi.
3. Süpernatant alındı ve buz içinde muhafaza edildi.
4. SOD standartları hazırlandı ve standart kuyucuklara 10 µl eklendi.
5. Süpernatantlardan 10 µl alındı ve örnek kuyucuklara eklendi.
6. Tüm kuyucuklara 200 µl dilue radikal detektör ve 20 µl dilue xanthine oksidaz eklendi.

7. 20 dakika oda ısısında inkübe edildi.

8. 460 nm dalga boyunda ölçüldü.

10. Elde edilen sonuçlar protein miktarlarına bölünerek U/mg protein olarak verildi.

3.3.4.5 Dokuda katalaz (CAT) yöntemi

Böbrek dokusundaki CAT aktivitesi ölçümü katalaz cellbiocem marka kiti kullanılarak yapıldı. Bu metodun ölçüm prensibi, doku homojenizatında bulunan CAT enziminin dışarıdan eklenen H_2O_2 'yi parçalaması ile H_2O_2 absorbandsının ölçülmesi esasına dayanır.

1. 100 mg doku 1/10 oranında (w/v) soğuk tampon (50 mM potasyum fosfat pH: 7.0), buzlu su banyosu içinde homojenizatör ile homojenize edildi.

2. 10,000 xg'de +4 °C de 15 dakika santrifüj edildi.

3. Süpernatant alındı ve buz içinde muhafaza edildi.

4. Formaldehit standartları hazırlandı ve standart kuyucuklara 20 µl alındı.

5. Hazır olan pozitif kontrollerden katalaz kuyucuklara 20 µl alındı.

6. Örnek süpernatantlardan örnek kuyucuklara 20 µl alındı.

7. Tüm kuyucuklara (100 µl tampon + 30 µl metanol) eklendi.

8. 20 µl dilue H_2O_2 eklendi ve 20 dakika oda ısısında inkübe edildi.

9. 30 µl KOH + 30 µl purpald eklendi ve 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.

10. 10 µl potasyum periyodat eklendi ve 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.

11. 540 nm dalga boyunda (bioelisa) cihazı kullanılarak ölçüldü.

12. Sonuçlar hesapladıktan sonra standard eğrisi çizildi.

13. Elde edilen sonuçlar protein miktarlarına bölünerek U/mg protein olarak verildi.

3.4.4.6 BCA protein assay kit ile protein tayini

Tüm gruplara ait böbreklerdeki protein miktarları Novagen BCA protein kiti ile yapılmıştır.

1. BSA (Bovin Serum Albumin) standartları hazırlandı ve 50 µl standart kuyucuklara eklendi.
2. 50 µl süpernatantlardan alındı ve örnek kuyucuklara eklendi.
3. Tüm kuyucuklara 1 ml BCA (Bikinkoninik Asit) eklendi ve 30 dakika 37⁰C de inkübe edildi.
4. 562 nm dalga boyunda ölçüldü.

3.4 İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS 20.0 programı kullanıldı. Gruplar arasındaki fark Kruskal-Wallis ve bunu takiben Post-hoc testleri ile incelendi. Sonuçlar ortalama ve standard sapma (minimum-maksimum) olarak verildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Hayvanların Vücut Ağırlıkları

Sıçanların ilk vücut ağırlıkları ile son vücut ağırlıklarının ortalama ve standart sapmaları çizelge 4.1’de gösterildi. Gruplar arası ilk vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında $0.062 > 0.05$ olduğu için aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Son vücut ağırlıkları incelendiğinde $0.496 > 0.05$ olduğu için Kruskal-Wallis test sonucuna göre ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (Şekil 4.1).

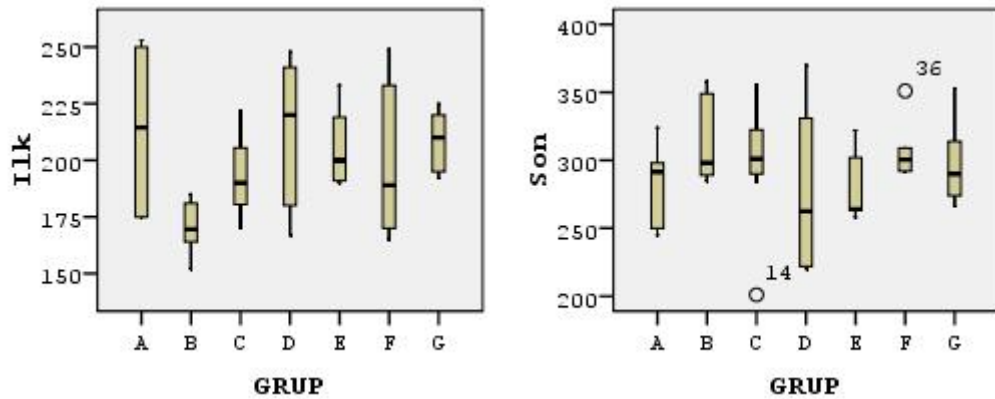
Çizelge 4.1 Sıçanların ilk ve son vücut ağırlıklarının karşılaştırılması

	Mısır yağı kontrol grubu (A)	P.B.S kontrol grubu (B)	CCl ₄ (C)	CCl ₄ + Mel 10 hafta (D)	CCl ₄ + Mel 12 hafta (E)	CCl ₄ + D vit 10 hafta (F)	CCl ₄ + D vit 12 hafta (G)	Gruplar arası farklılık (p)*
İlk vücut ağırlığı (gr)	213.67±36.60	200.17±11.89	203.43±18.72	212.67±34.52	205.50±17.76	200.17±34.40	208.67±13.67	0.062
Son vücut ağırlığı (gr)	283.33±30.27	312.83±32.43	297.57±49.54	278.00±60.66	278.83±26.55	307.33±22.49	297.83±32.70	0.496

CCl₄: Karbon tetraklorür.

Bütün değerler her gruptaki altı hayvan için ortalama ± SD olarak verilmiştir.

*p<0.05: Anlamlı.



Şekil 4.1 Gruplar arasında ilk ve son vücut ağırlıklarının karşılaştırılması

4.2 Kitle İndeksi

Böbreklerin toplam ağırlıkları gruplar arası incelendiğinde CCl_4 ile iki kontrol ve iki melatonin grupların arasında anlamlılık değeri $0.030 < 0.05$ olarak bulundu (Çizelge 4.2). Gruplardaki toplam böbrek ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu. Böbreklerin toplam ağırlıklarının son vücut ağırlıklarına olan oranlarına bakıldığında kitle indeksinin anlamlılık değeri $0.155 > 0.05$ olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi (Şekik 4.2).

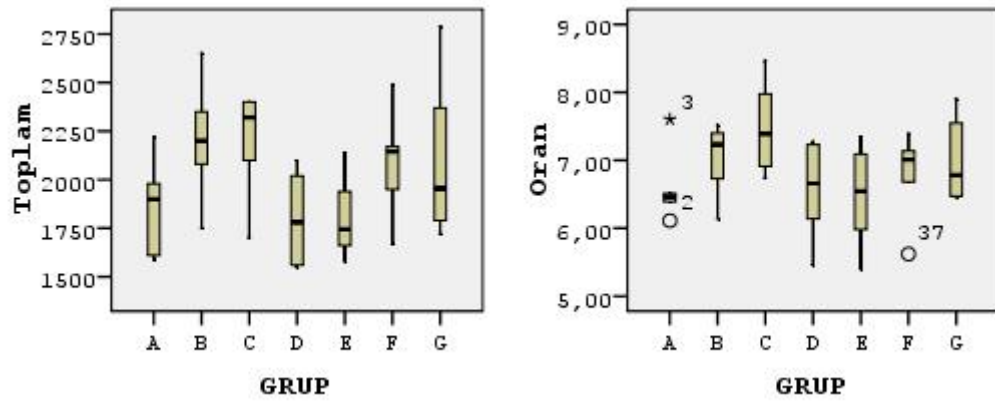
Çizelge 4.2 Sıçanlarda son vücut ağırlığı, toplam böbrek ağırlığı ve kitle indeksinin karşılaştırılması

	Mısır yağı kontrol grubu (A)	P.B.S kontrol grubu (B)	CCl_4 (C)	CCl_4 + Mel 10 hafta (D)	CCl_4 + Mel 12 hafta (E)	CCl_4 + D vit 10 hafta (F)	CCl_4 + D vit 12 hafta (G)	Gruplar arası farklılık (p)*
Son vücut ağırlığı (gr)	283.33±30.27	312.83±32.43	297.57±49.54	278.00±60.66	278.83±26.55	307.33±22.49	297.83±32.70	0.496
Toplam böbrek ağırlığı (gr)	1.86±0.23	1.75±0.29	2.20±0.25	1.79±0.25	1.80±0.20	2.09±0.27	2.09±0.41	0.030*
Toplam böbrek ağırlığı/Son vücut ağırlığı (kitle indeksi)	6.59±0.51	7.04±0.51	7.48±0.66	6.57±0.71	6.48±0.72	6.80±0.62	6.98±0.59	0.155

CCl_4 : Karbon tetraklorür.

Bütün değerler her gruptaki altı hayvan için ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

* $p < 0.05$: Anlamlı. Anlamlı farklılık CCl_4 grubu ile kontrol grupları ve melatonin grupları arasındadır.



Şekil 4.2 Sıçanlarda gruplar arası kitle indekslerinin karşılaştırılması

4.3 Böbrek Fonksiyon Testleri

Üre düzeyleri, CCl₄ grubunda kontrol grupları sıçanlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı (p=0.00) derecede yüksek bulundu. D Vitamini uygulanmış tedavili gruplarda bu oranın düştüğü ve kontrol gruplarına yakın olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.3). Glukoz ve kreatinin değerlerinin gruplara göre ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Gruplar arası farklılığı anlamak için parametrik olmayan testlerden Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Glukoz için anlamlılık değeri $0.237 > 0.05$ olduğu için gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlılık göstermedi. Aynı şekilde kreatinin için anlamlılık değeri $0.185 > 0.05$ olarak bulundu. Kreatinin bakımından da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı (Şekil 4.3).

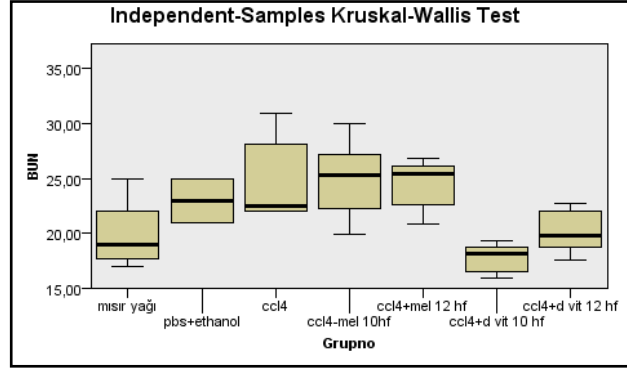
Çizelge 4.3 Üre, glukoz ve kreatinin değerlerinin karşılaştırılması

	Mısır yağı kontrol grubu (A)	P.B.S kontrol grubu (B)	CCl ₄ (C)	CCl ₄ + Mel 10 hafta (D)	CCl ₄ + Mel 12 hafta (E)	CCl ₄ + D vit 10 hafta (F)	CCl ₄ + D vit 12 hafta (G)	Gruplar arası farklılık (p)*
Glukoz (mg/dL)	205.33±33.89	204.67±33.44	204.00±39.03	172.33±26.44	189.33±28.57	208.50±36.04	221.00±21.06	0.237
Kreatinin (mg/dL)	0.39±0.05	0.38±0.03	0.36±0.05	0.39±0.08	0.46±0.17	0.32±0.01	0.33±0.05	0.185
Üre (mg/dL)	19,83±1,2	19,33±0,7	28,52±1,5	27,97±1,4	26,7±0,9	17,83±0,5	20,13±0,8	0,00*

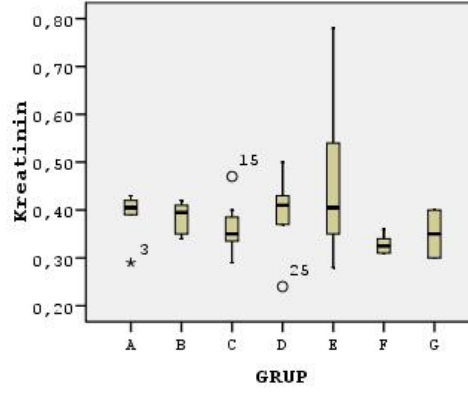
CCl₄: Karbon tetraklorür.

Bütün değerler her gruptaki altı hayvan için ortalama ± SD olarak verilmiştir.

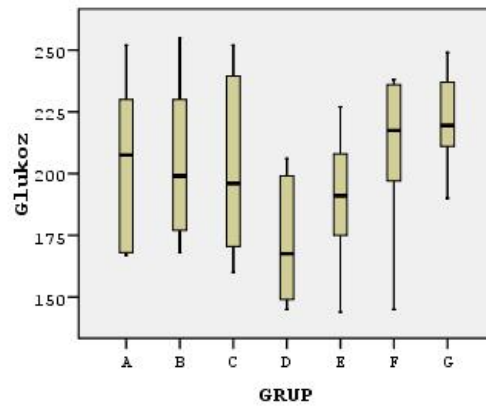
*p<0.05: Anlamlı. Anlamlı farklılık CCl₄ grubu ile kontrol grupları ve D vitamini grupları arasındadır.



Şekil 4.3 Gruplar arasında üre değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.4 Gruplar arasında kreatinin değerlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.5 Gruplar arasında glukoz değerlerinin karşılaştırılması

4.4 Malondialdehit (MDA)

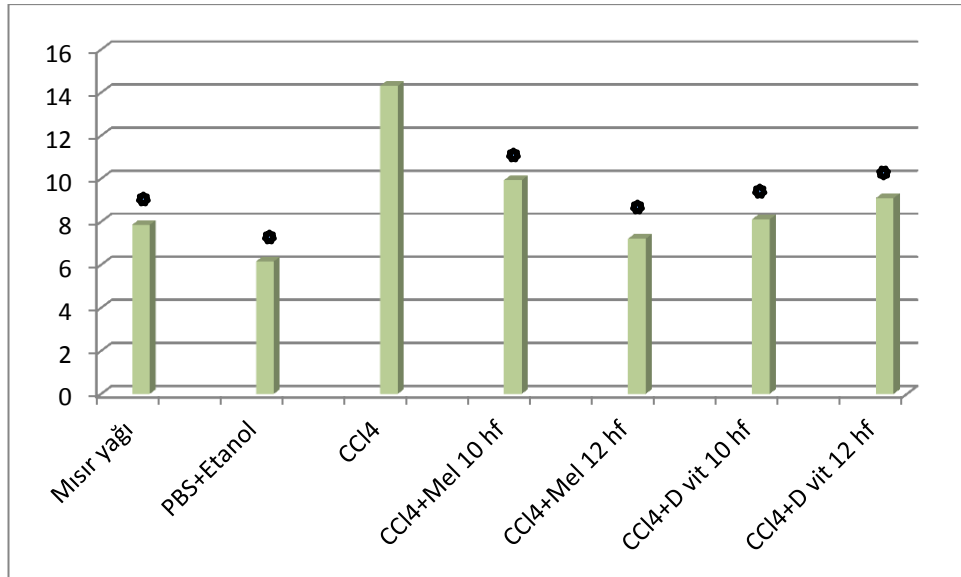
Böbrek dokusunda gruptaki MDA değerleri ve standart sapmaları çizelge 4.4’de gösterildi. Gruplar arasında MDA düzeylerinin karşılaştırılması için parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi kullanıldı. CCl₄ verilen grupta MDA aktivitesinin artmış olduğunu gözlemlendi. Melatonin ve D vitamini verilen gruplarda MDA düzeyleri kontrol gruplarına yakın bulundu (Şekil 4.6). CCl₄ ve diğer gruplar arasında MDA aktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı ($0.023 < 0.05$).

Çizelge 4.4 Böbrek dokusunda MDA aktivitesi

GRUPLAR	Ortalama (min-max) (nmol/mg protein)	Standart sapma
Kontrol grubu (mısır yağı)	7,86 (5,01-11,50)	±2,57
Kontrol grubu (PBS)	6,16 (4,5-9,70)	±1,99
CCl₄	14,31 (6,6-22,40)	±5,70
CCl₄+ mel (10hf)	9,93 (5,7-14,60)	±3,92
CCl₄+ mel (12hf)	7,21 (4,4-10,10)	±2,51
CCl₄+D vit (10hf)	8,11 (5,4-10,20)	±1,91
CCl₄+D vit (12hf)	9,10 (6,4-13,70)	±4,00

CCl₄: Karbon tetraklörür.

Bütün değerler her gruptaki altı hayvan için ortalama ± SD olarak verilmiştir.



Şekil 4.6 Böbrek dokusunda MDA aktivitesi

p* <0.05 . Anlamlı farklılık CCl₄ grubu ile diğer grupları arasındadır.

4.5 Nitrik oksit (NO)

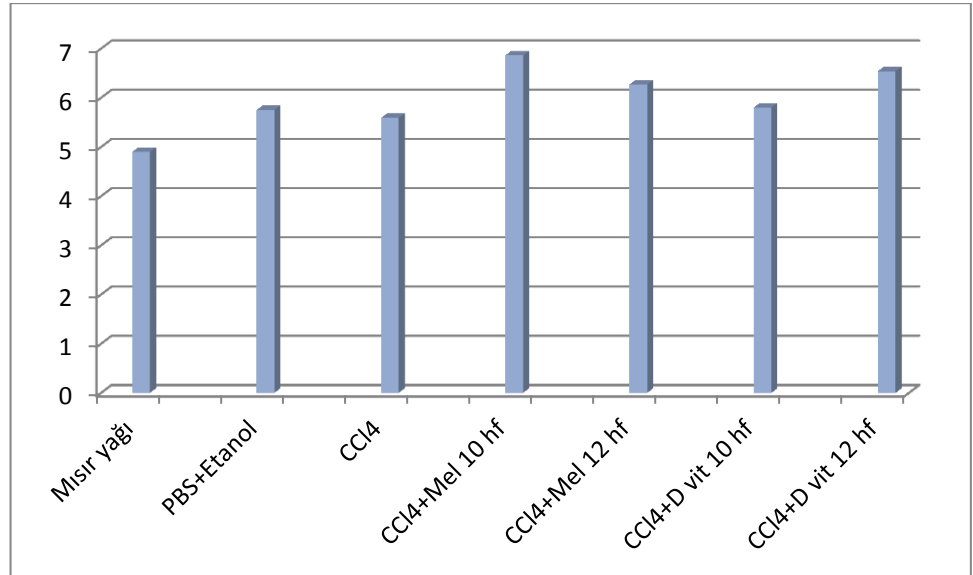
Böbrek dokusunda NO düzeyleri değerlendirildiğinde gruplar arasında (Çizelge 4.5) istatistiksel olarak anlamlı fark (0.563) bulunmadı (Şekil 4.7).

Çizelge 4.5 Böbrek dokusunda NO aktivitesi

GRUPLAR	Ortalama (min-max) ($\mu\text{mol/mg protein}$)	Standart sapma
Kontrol grubu (mısır yağı)	4,90 (4,37-6,04)	$\pm 0,71$
Kontrol grubu (PBS)	5,75 (4,11-8,79)	$\pm 1,92$
CCl ₄	5,59 (4,20-8,64)	$\pm 1,11$
CCl ₄ + mel (10hf)	6,86 (5,72-9,23)	$\pm 1,27$
CCl ₄ + mel (12hf)	6,27 (6,26-9,61)	$\pm 1,46$
CCl ₄ +D vit (10hf)	5,80 (4,56-6,90)	$\pm 1,00$
CCl ₄ +D vit (12hf)	6,54 (4,67-8,15)	$\pm 1,71$

CCl₄: Karbon tetraklorür.

Bütün değerler her gruptaki altı hayvan için ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.



Şekil 4.7 Böbrek dokusunda NO aktivitesi

4.6 Glutasyon (GSH)

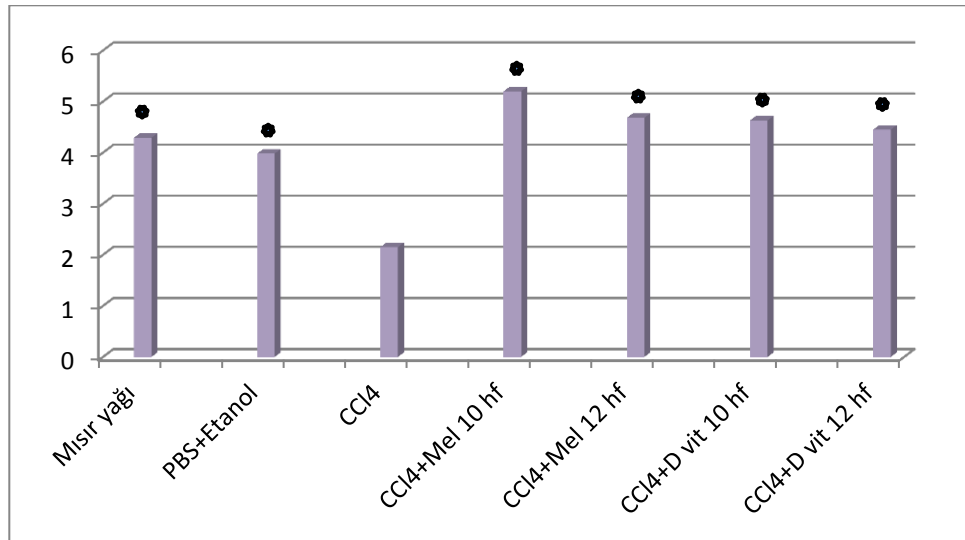
Grupların böbrek dokularında yapılan GSH tayini sonucuna göre CCl₄ grubunda GSH düzeyleri düşük seviyede saptandı (Çizelge 4.6). Ancak kontrol grupları ile melatonin ve D vitamini tedavili grupların GSH değerleri yüksek bulundu. CCl₄ grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık ($0.024 < 0.05$) bulundu (Şekil 4.8).

Çizelge 4.6 Böbrek dokusunda GSH aktivitesi

GRUPLAR	Ortalama (mim-max) (µg/mg protein)	Standart sapma
Kontrol grubu (mısır yağı)	4,29 (3,36-5,06)	±0,82
Kontrol grubu (PBS)	3,98 (3,06-5,13)	±0,90
CCl₄	2,15 (1,36-4,39)	±0,10
CCl₄+ mel (10hf)	5,20 (4,49-6,25)	±0,62
CCl₄+ mel (12hf)	4,68 (4,21-5,54)	±0,47
CCl₄+D vit (10hf)	4,63 (3,82-5,70)	±0,74
CCl₄+D vit (12hf)	4,45 (4,23-4,81)	±0,22

CCl₄: Karbon tetraklörür.

Bütün değerler her gruptaki altı hayvan için ortalama ± SD olarak verilmiştir.



Şekil 4.8 Böbrek dokusunda GSH aktivitesi

$p < 0.05$. Anlamlı farklılık CCl₄ grubu ile diğer grupları arasındadır.

4.7 Katalaz (CAT)

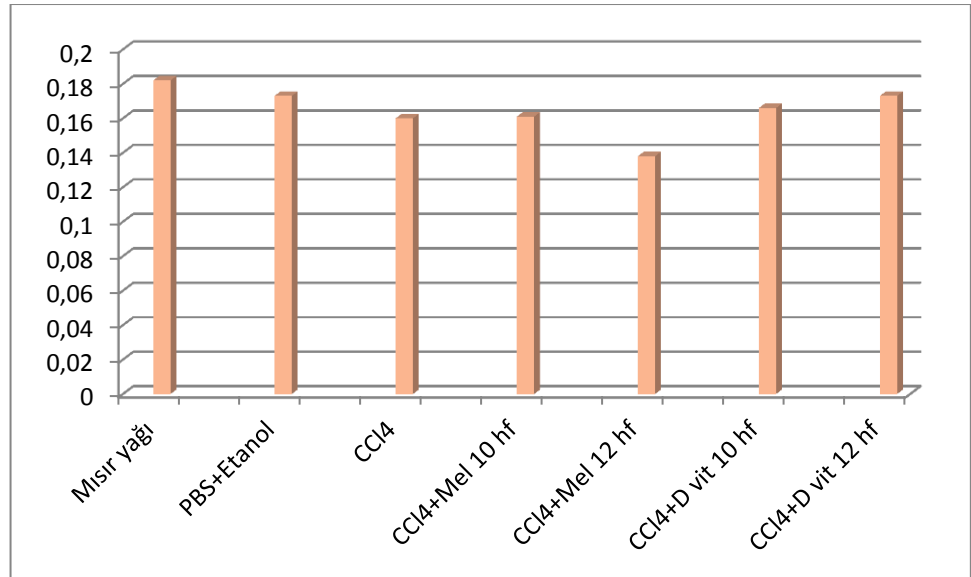
Böbrek dokusunda grupların katalaz aktivitesinin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı (Çizelge 4.7). Gruplar arası farklılığı anlamak için parametrik olmayan Kruskal-Wallis testi kullanıldı. CAT anlamlılık değeri $0.153 > 0.05$ olduğu için gruplar arası istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi.

Çizelge 4.7 Böbrek dokusunda katalaz aktivitesi

GRUPLAR	Ortalama (min-max) ($\mu\text{mol/mg protein}$)	Standart sapma
Kontrol grubu (mısır yağı)	0,182 (0,11-0,28)	$\pm 0,07$
Kontrol grubu (PBS)	0,173 (0,13-0,23)	$\pm 0,04$
CCl_4	0,160 (0,10-0,21)	$\pm 0,04$
CCl_4 + mel (10hf)	0,161 (0,10-0,22)	$\pm 0,04$
CCl_4 + mel (12hf)	0,138 (0,08-0,22)	$\pm 0,05$
CCl_4 +D vit (10hf)	0,166 (0,10-0,21)	$\pm 0,05$
CCl_4 +D vit (12hf)	0,173 (0,11-0,24)	$\pm 0,05$

CCl_4 : Karbon tetraklorür.

Bütün değerler her gruptaki altı hayvan için ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.



Şekil 4.9 Böbrek dokusunda katalaz aktivitesi

4.8 Süperoksit Dismutaz (SOD)

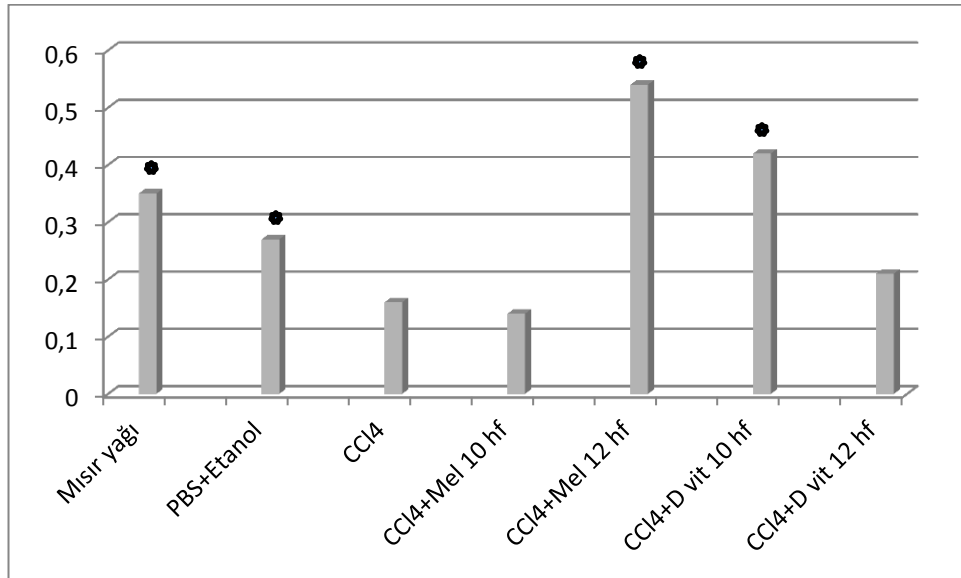
Böbrek dokusunun SOD düzeyleri CCl₄ grubunda kontrol grupları ile kıyaslandığında düşük bulundu. 12 haftalık melatonin ve 10 haftalık D Vitamini uygulanmış tedavili gruplarda bu oranın arttırdığı gözlemlendi (Çizelge 4.8). Böbrek dokuları SOD değerleri bakımından karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu (0.027) (Şekil 4.10).

Çizelge 4.8 Böbrek dokusunda SOD aktivitesi

GRUPLAR	Ortalama (min-max) (U/mg protein)	Standart sapma
Kontrol grubu (mısır yağı)	0,35 (0,25-0,43)	±0,06
Kontrol grubu (PBS)	0,27 (0,16-0,36)	±0,09
CCl₄	0,16 (0,05-0,29)	±0,09
CCl₄+ mel (10hf)	0,14 (0,03-0,34)	±0,11
CCl₄+ mel (12hf)	0,54 (0,23-1,00)	±0,27
CCl₄+D vit (10hf)	0,42 (0,29-0,58)	±0,11
CCl₄+D vit (12hf)	0,21 (0,13-0,39)	±0,10

CCl₄: Karbon tetraklorür.

Bütün değerler her gruptaki altı hayvan için ortalama ± SD olarak verilmiştir.



Şekil 4.10 Böbrek SOD aktivitesi

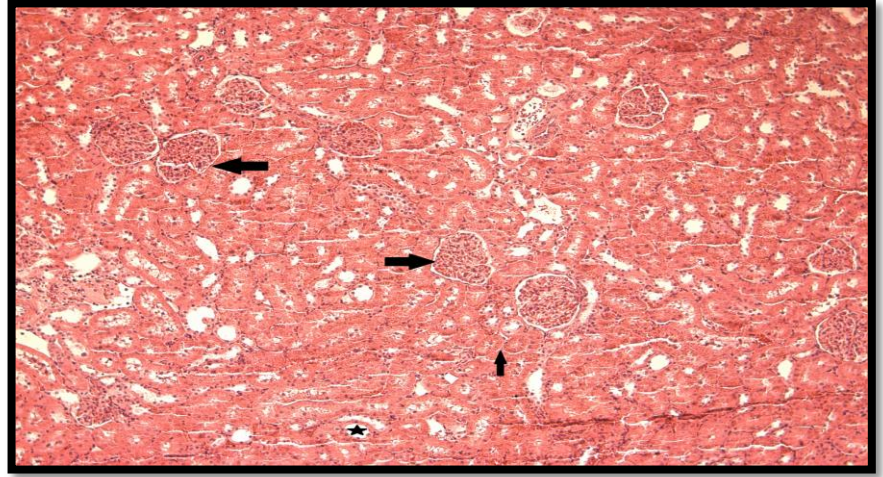
p* < 0.05. Anlamlı farklılık CCl₄ grubu ile kontrol grupları, 12 haftalık melatonin ve 10 haftalık D vitamini grupları arasındadır.

4.9 Histopatolojik Sonuçlar

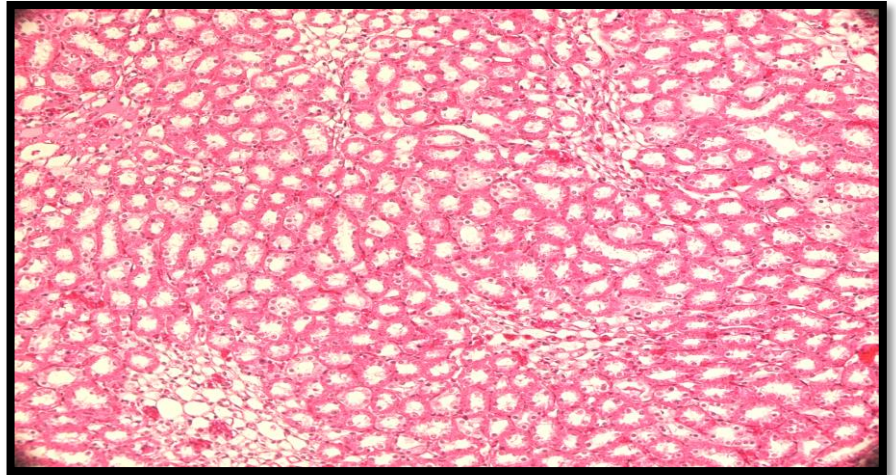
4.9.1 Hematoksilen-Eosin

Kontrol grubu

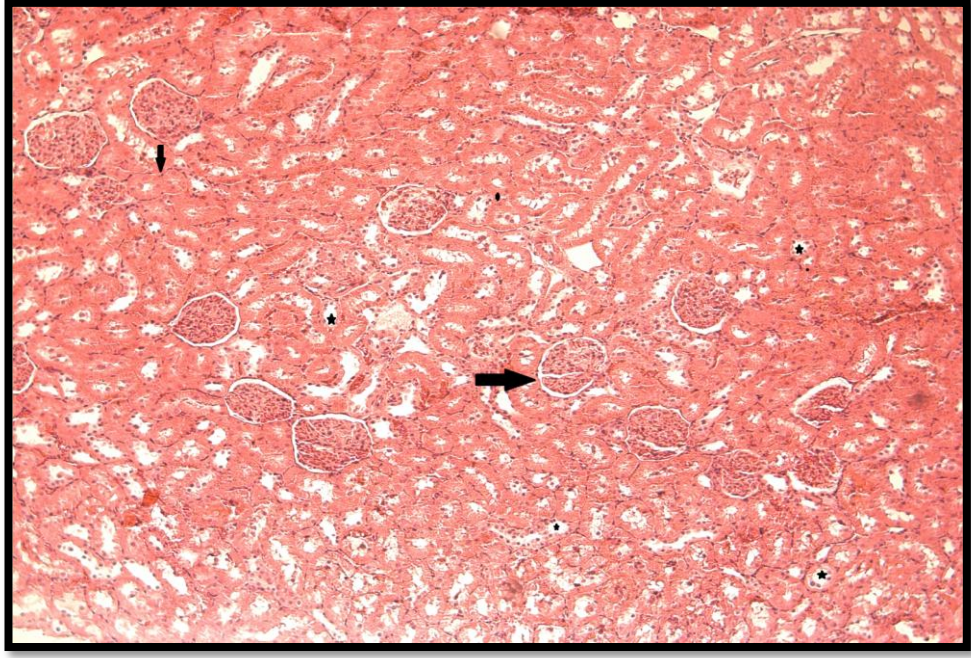
Kontrol grupları (mısır yağı, PBS+etanol) sıçanların böbrek doku kesitleri ışık mikroskobu ile incelendiğinde korteks ve medulla bölgesinin normal yapının korunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.11-13).



Şekil 4.11 Mısır yağı kontrol grubu sıçanların böbrek dokusunda korteks bölgesi. H&E. X100. Bowman kapsülü (kalın ok), proksimal tübüller (ince ok), distal tübül (yıldız)



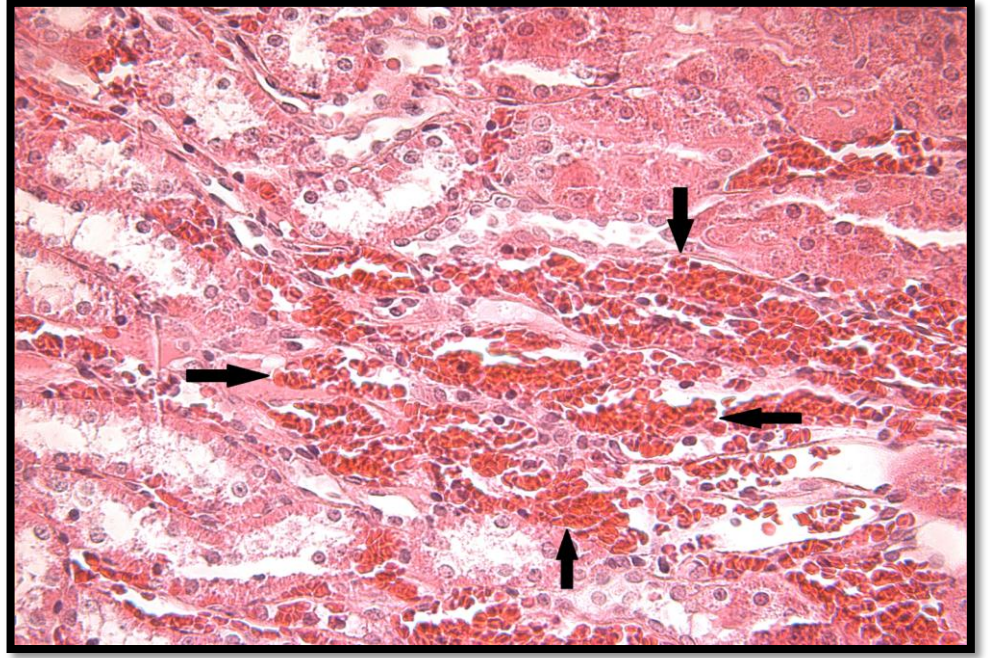
Şekil 4.12 Kontrol grubu (mısır yağı) böbrek dokusunun medulla bölgesi. H&E. X100



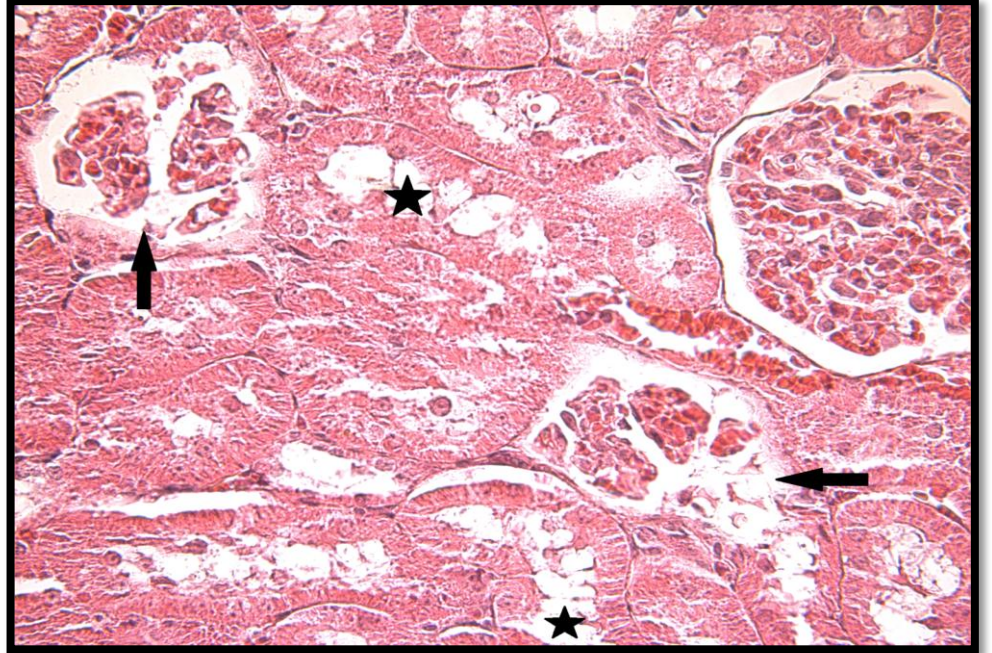
Şekil 4.13 (PBS+etanol) kontrol grubu sıçanlara ait böbrek dokusunun korteks bölgesi H&E. X100. Bowman kapsülü (kalın ok), proksimal tübül (ince ok), distal tübül (yıldız)

CCl₄ grubu

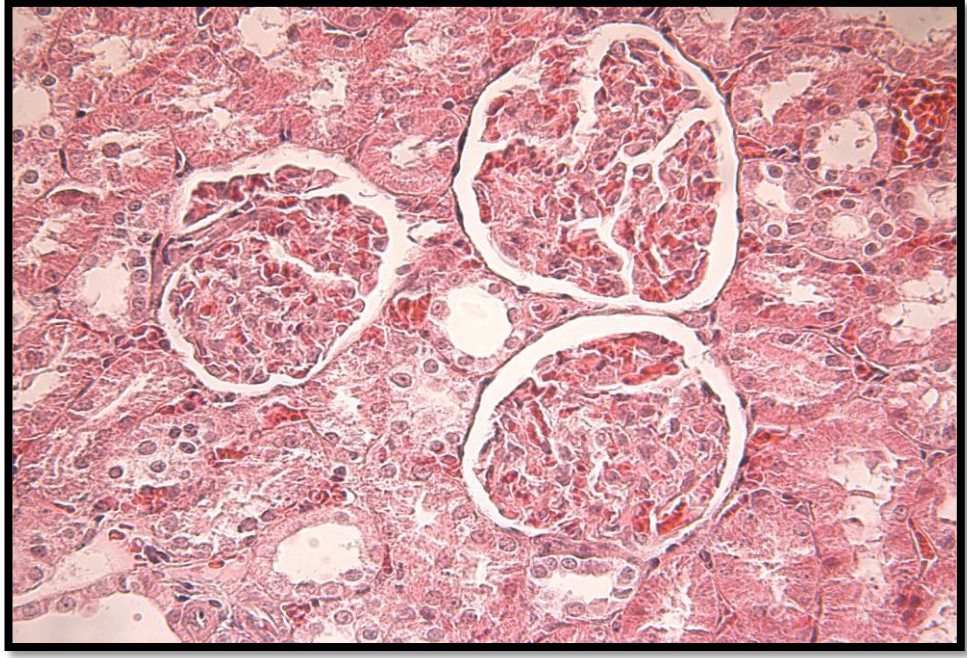
CCl₄ grubu sıçanların böbrek doku kesitleri incelendiğinde tübüllerin arasında hemorajik alanlar tespit edilmiştir (Şekil 4.14). Glomerüler atrofi ve tübüler dejenerasyon saptanmıştır (Şekil 4.15). Bazı bölgelerde glomerul agregasyonu dikkati çekmiştir (Şekil 4.16). Tübülo-interstisyel alanda bağ doku artışı izlenmiştir (Şekil 4.17). Tübüller arasında seyrek oranda iltihabi hücre infiltrasyonu ve tübüler dilatasyon saptanmıştır (Şekil 4.18). Ayrıca bazı kesitlerde belirgin glomerüler konjesyon ve tübüllerin çevresinde hemorajik alanlar gözlenmiştir (Şekil 4.19).



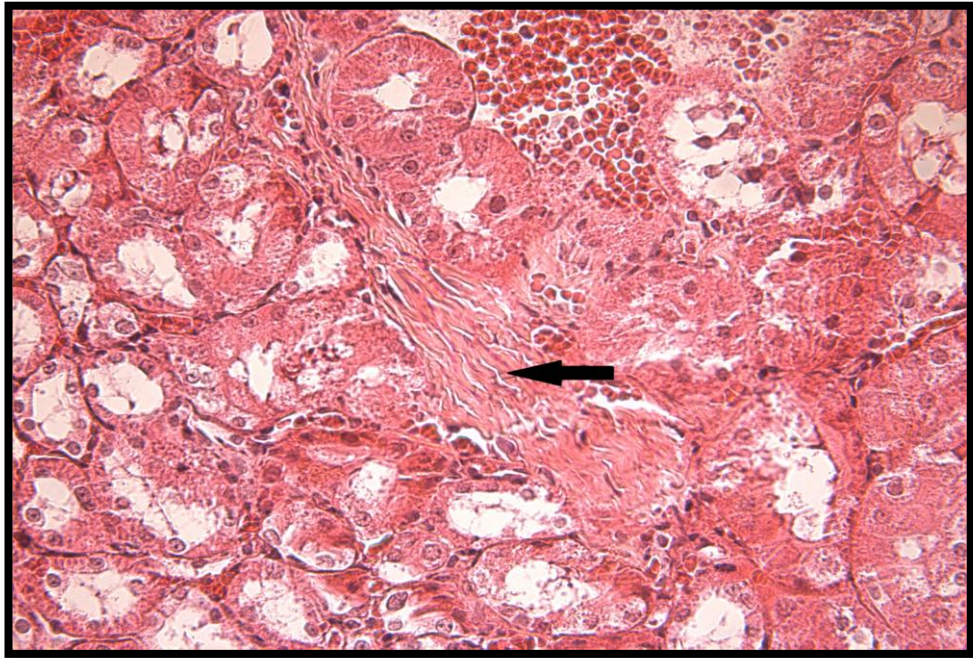
Şekil 4.14 CCl_4 ile muamele edilmiş sıçan böbrek dokusunda tübüller arasında hemorajik alanlar (oklar). H&E. X400



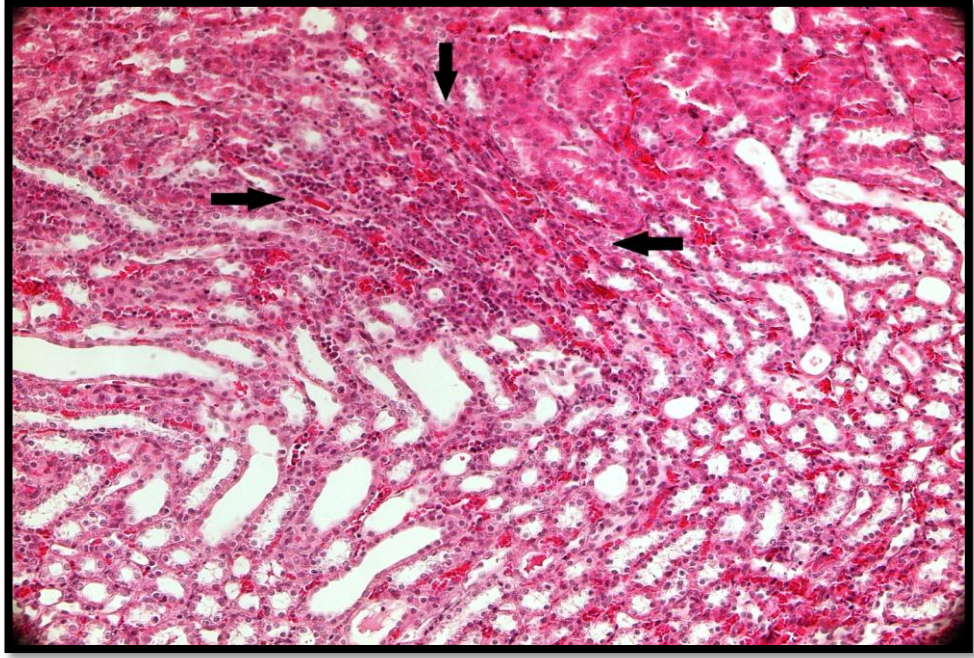
Şekil 4.15 CCl_4 uygulanmış sıçan böbrek dokusunda glomerüler atrofi (oklar) ve tübüller dejenerasyon (yıldız). H&E. X400



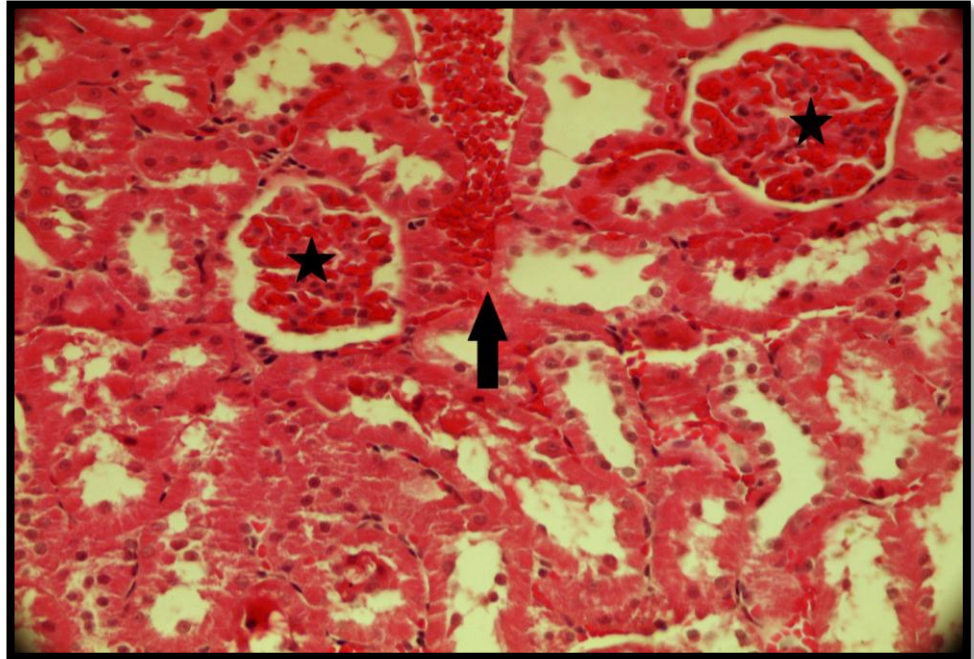
Şekil 4.16 CCl₄ grubu sıçanlara ait böbrek dokusu korteks bölgesinde Bowman kapsülü agregasyonu izlenmekte. H&E. X400



Şekil 4.17 CCl₄ grubu sıçanların böbrek dokusunun tübülo-interstisyel bölgesinde bağ doku artışı (ok). H&E. X400



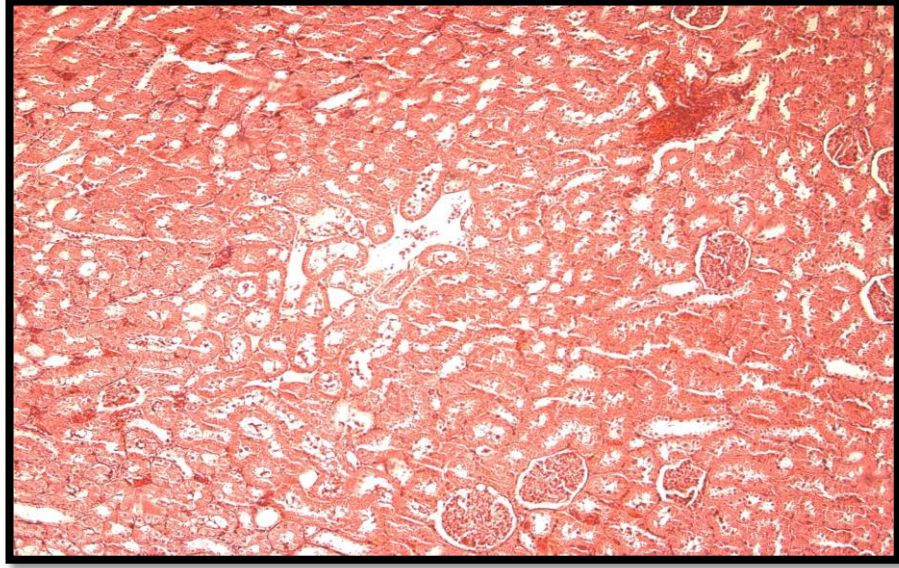
Şekil 4.18 CCl₄ grubunda kortiko-medüller bölgede iltihabi hücre infiltrasyonu (oklar) görülmekte. H&E. X200



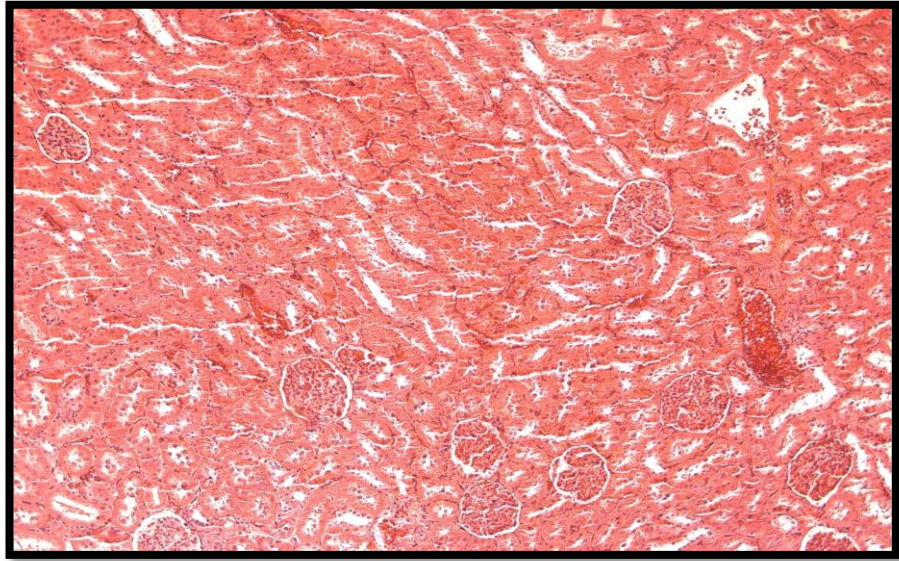
Şekil 4.19 CCl₄ grubu sıçana ait böbrek dokusunda tübüller arasında hemoraji (ok) ve glomerüler konjesyon (yıldız) gözlenmekte. H&E. X 400

Melatonin grupları

Melatonin (10 ve 12 hafta) ile tedavi edilmiş CCl_4 grubu böbrek doku kesitleri incelendiğinde CCl_4 grubuna göre hafif hemorajik alanlar tespit edilmiştir. Glomerül ve tübüllerin kontrol gruplarına yakın yapıda olduğu gözlenmiştir. Genel olarak iki grup arasında doku bütünlüğünün korunması bakımından belirgin bir fark saptanmamıştır (Şekil 4.20, 4.21).



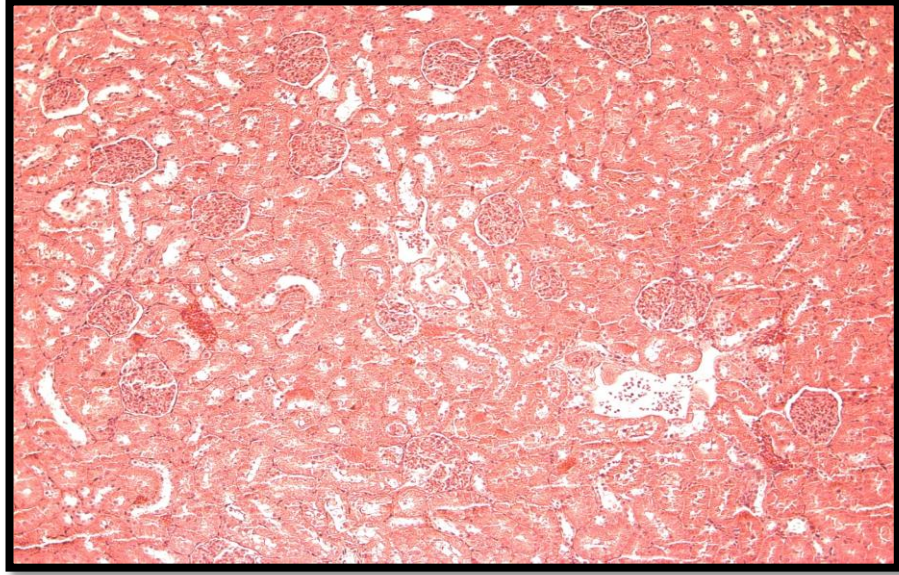
Şekil 4.20 10 hafta melatonin ile tedavi edilmiş CCl_4 grubunda hafif hemorajik alanlar izlenmekte. H&E. X100



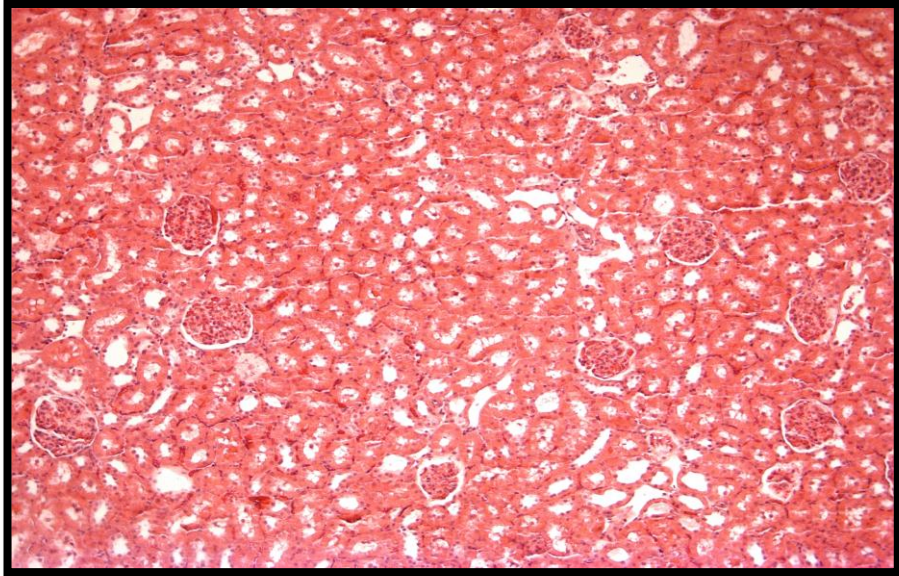
Şekil 4.21 12 hafta melatonin uygulanmış CCl_4 grubu sıçan böbrek dokusu glomerül ve tübüllerinin genel görüntüsü. H&E. X100

D vitamini grupları

10 hafta D vitamini uygulanmış CCl₄ grubu böbrek doku kesitleri incelendiğinde, doku bütünlüğünün korunduğu gözlenmiştir (Şekil 4.22). Ancak 12 hafta D vitamini ile muamele edilen CCl₄ grubunda daha iyi histolojik görüntü elde edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.22 10 hafta D vitamini ile tedavi edilmiş CCl₄ grubu sıçan böbrek dokusunda korteks bölgesinin kontrol grubuna yakın görüntüsü. H&E. X100

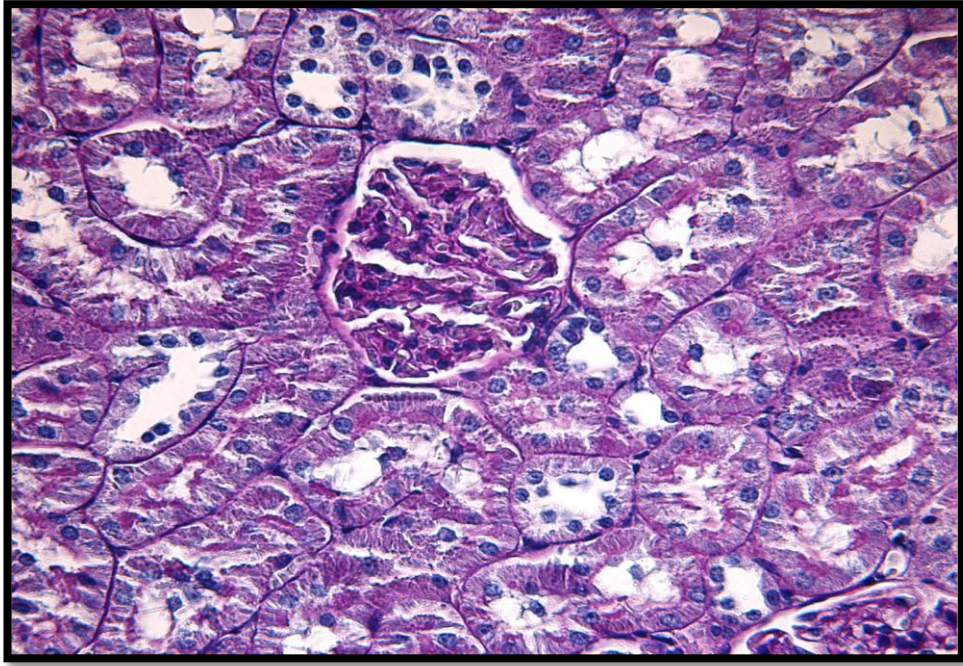


Şekil 4.23 12 hafta D vitamini uygulanmış CCl₄ grubunda glomerül ve tübüllerin genel görüntüsü. H&E. X100

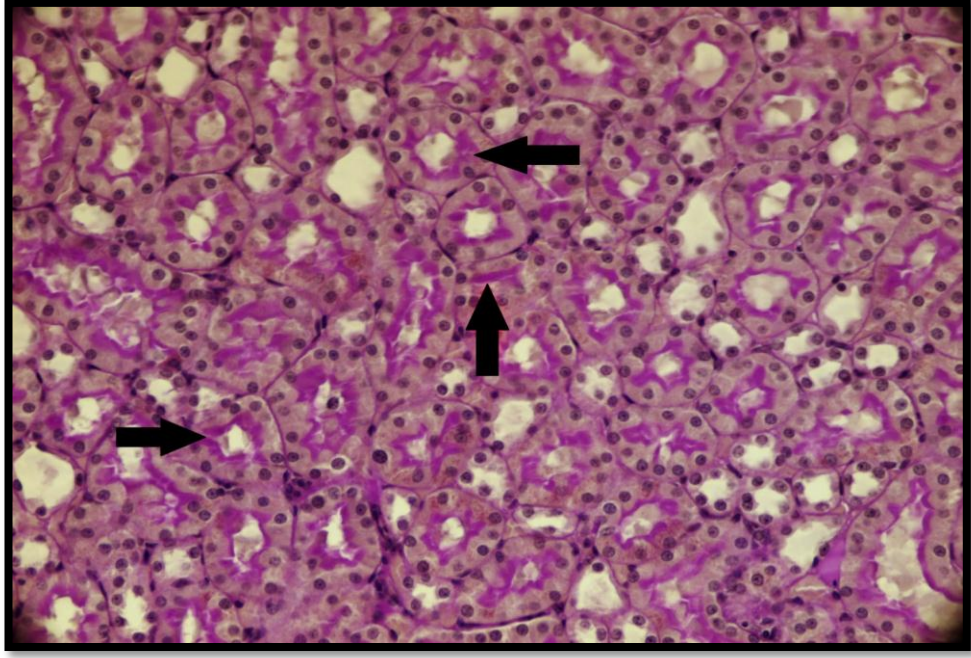
4.9.2 Periyodik Asit-Schiff (PAS)

Kontrol grupları

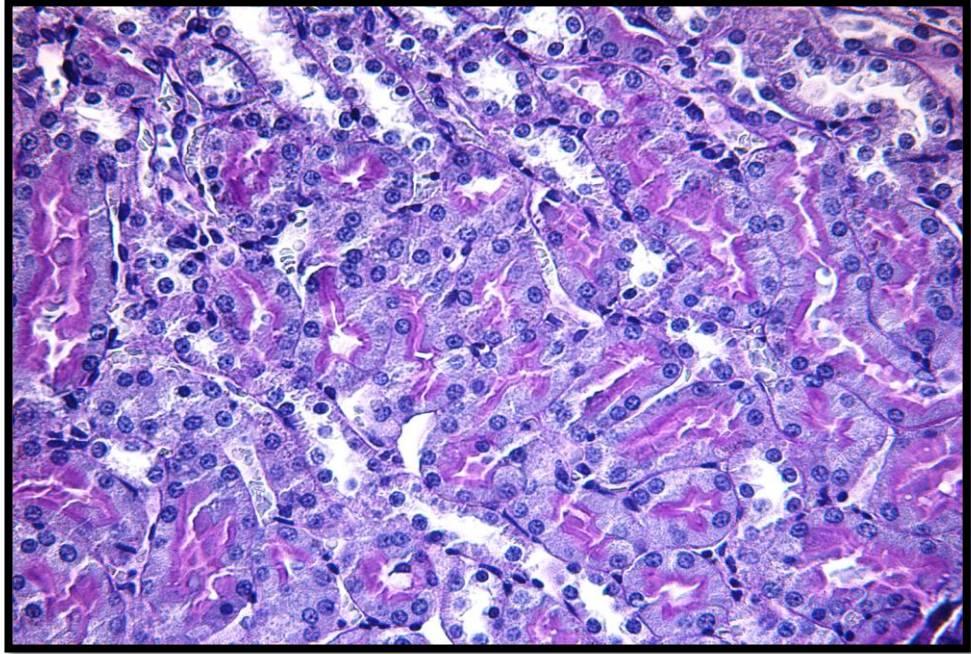
Kontrol gruplarına (mısır yağı, PBS+etanol) ait sıçan böbrek dokuları değerlendirildiğinde Bowman kapsülü ve tübüler bazal membranının PAS pozitif reaksiyon gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.24-26).



Şekil 4.24 Kontrol (mısır yağı) grubu sıçana ait böbrek dokusunda PAS pozitif reaksiyon gösteren Bowman kapsülü ve tübüler bazal membran izlenmekte. PAS. X400



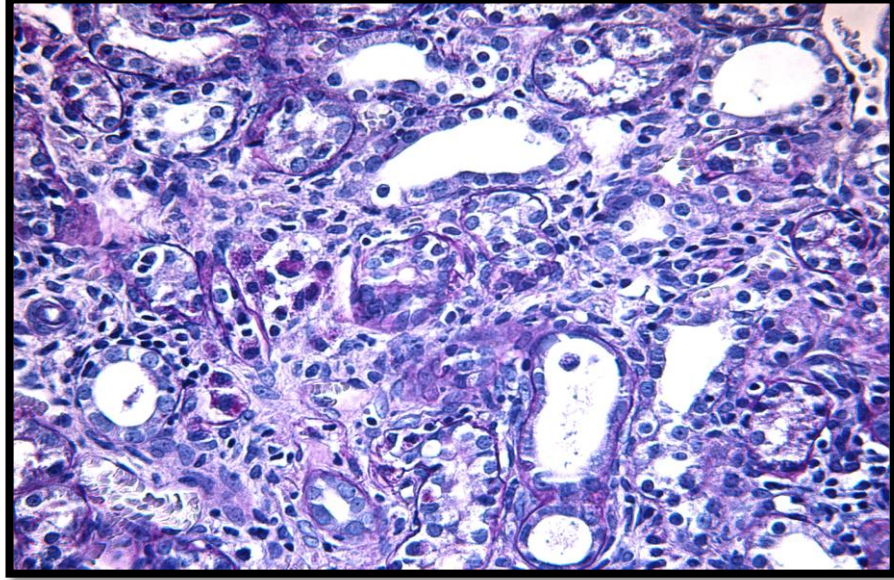
Şekil 4.25 Mısır yağı kontrol grubu böbrek dokusunun proksimal tübüllerinde PAS pozitif izlenen fırçası kenarlar (oklar). PAS. X400



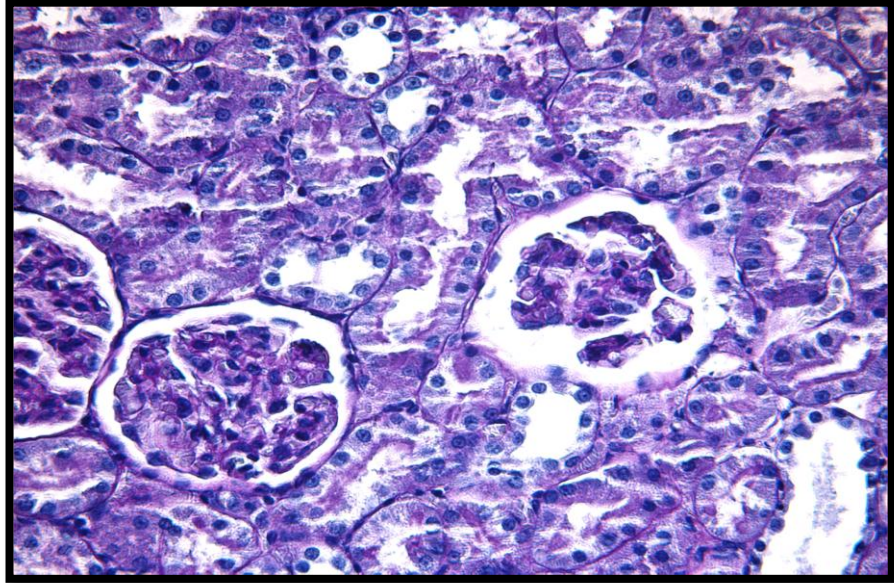
Şekil 4.26 Kontrol (PBS+etanol) grubu sıçanların böbrek dokusunda PAS pozitif tübüler bazal membran ve fırçası kenarları gözlenmekte. PAS. X400

CCl₄ grubu

PAS ile boyanan CCl₄ grubu böbrek doku kesitleri incelendiğinde, zayıf PAS pozitif veya PAS negatif gösteren dejeneratif tübüller ve PAS pozitif atrofik glomerül izlenmiştir (Şekil 4.27- 4.28).



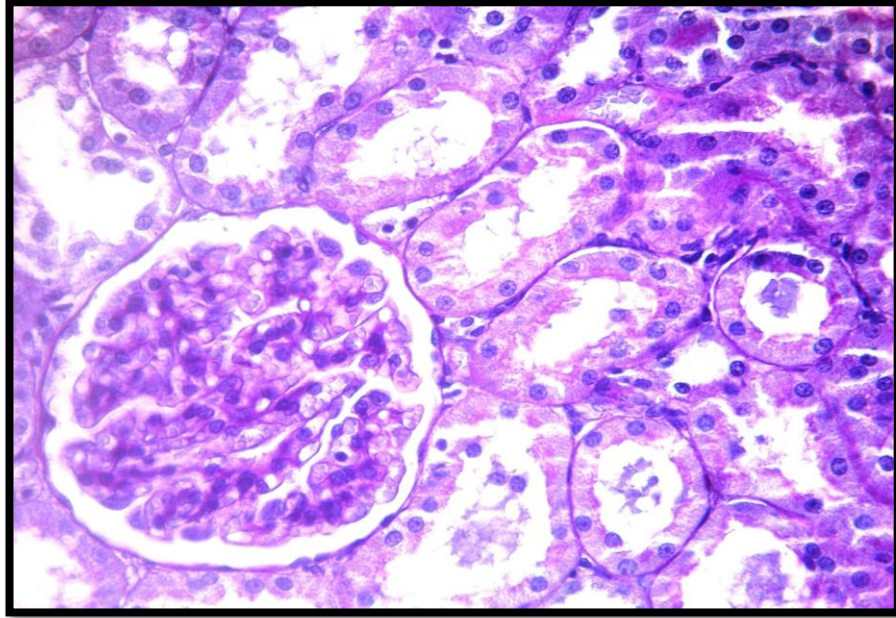
Şekil 4.27 CCl₄ grubuna ait böbrek dokusunda zayıf PAS pozitif ve PAS negatif dejeneratif tübüller. PAS. X400



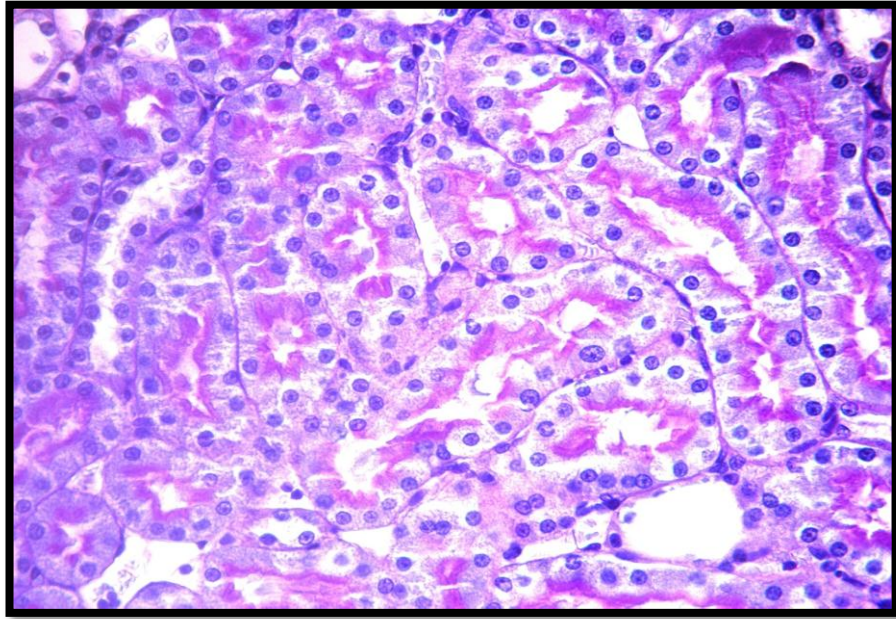
Şekil 4.28 CCl₄ grubu sıçanların böbrek dokusunda zayıf PAS pozitif atrofik glomerül gözlenmekte. PAS. X400

Melatonin grupları

10 ve 12 hafta melatonin uygulanmış CCl_4 grupların böbrek doku kesitlerinde PAS pozitif reaksiyon gösteren Bowman kapsülü ve tübüller izlenmiştir (Şekil 4.29-4.30).



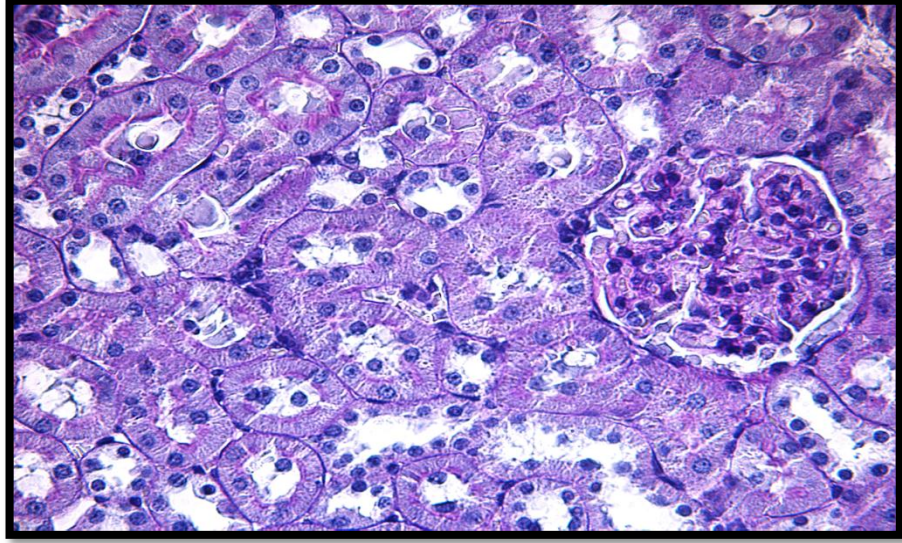
Şekil 4.29 10 hafta melatonin ile tedavi edilen CCl_4 grubuna ait sıçan böbrek dokusunda PAS pozitif Bowman kapsülü ve tübüller bazal membran izlenmekte. PAS. X400



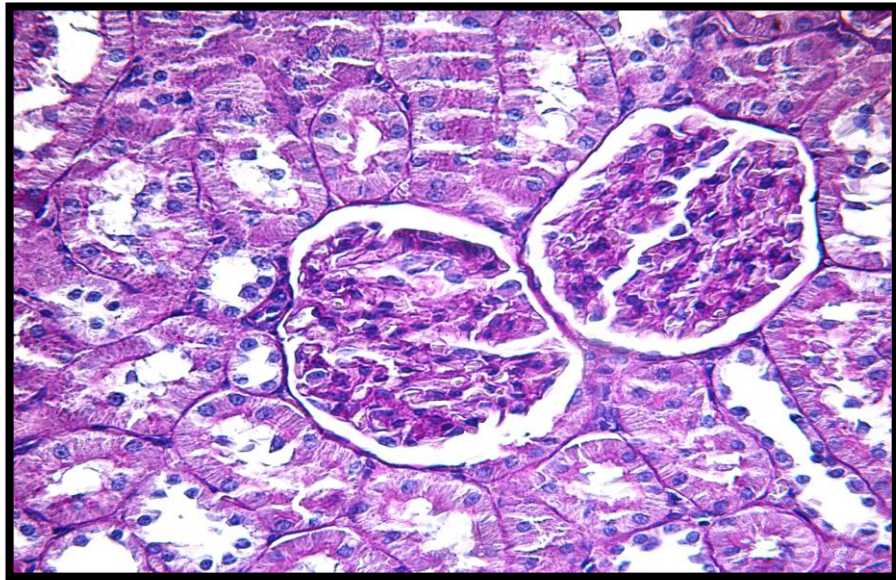
Şekil 4.30 12 hafta melatonin uygulanmış CCl_4 grubuna ait böbrek dokusunda PAS pozitif tübüller izlenmekte. PAS. X400

D vitamini grupları

D vitamini ile tedavi edilen CCl_4 gruplarına ait böbrek doku kesitleri değerlendirildiğinde, 10 haftalık gruplarda zayıf PAS pozitif reaksiyon gözlenirken 12 haftalık gruplarda kontrol gruplarına yakın PAS pozitif reaksiyon veren görüntü tespit edilmiştir (Şekil 4.31- 4.32).



Şekil 4.31 10 hafta D vitamini ile tedavi edilen CCl_4 grubu sıçan böbrek dokusunda zayıf PAS pozitif glomerül ve tübüller izlenmekte. PAS. X400

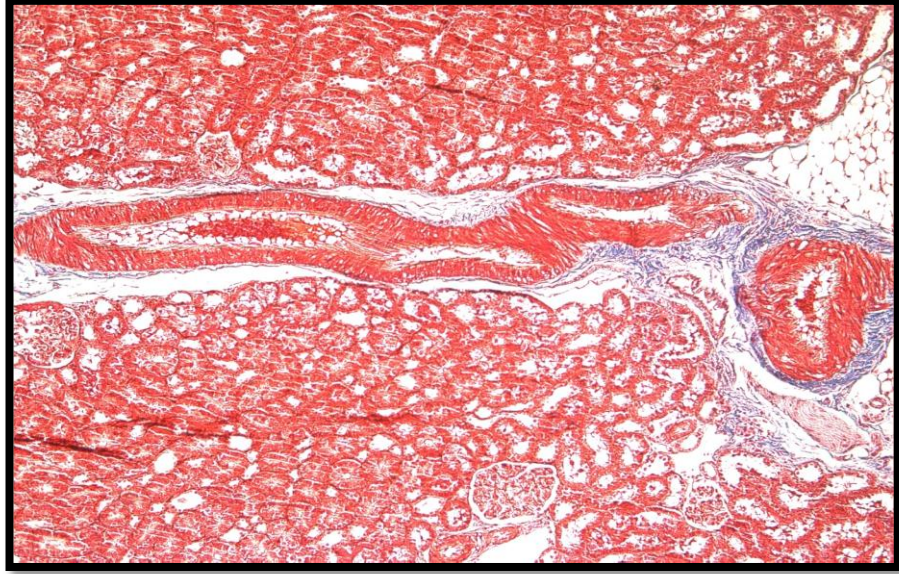


Şekil 4.32 12 hafta D vitamini uygulanmış CCl_4 grubu sıçan böbrek dokusunda kontrole yakın PAS pozitif Bowman kapsülü ve tübüler bazal membran izlenmekte. PAS. X400

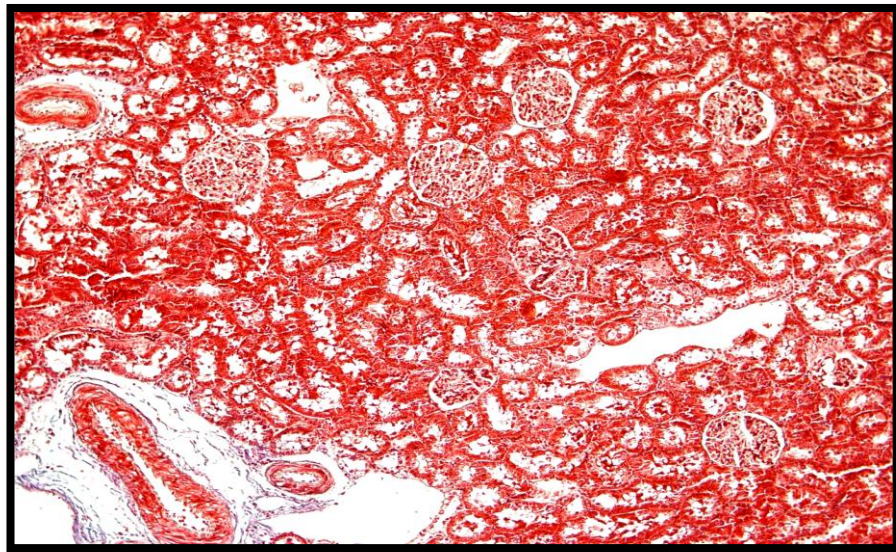
4.9.3 Masson Trikrom

Kontrol grupları

Masson trikrom ile boyanmış böbrek doku kesitleri incelendiğinde, sitoplazma kırmızı, çekirdek siyah ve kollajen lifler mavi renkte boyanmıştır. Kontrol gruplarında (mısır yağı, PBS+etanol) kollajen lifler normal histoloji göstermiştir (Şekil 4.33-4.34).



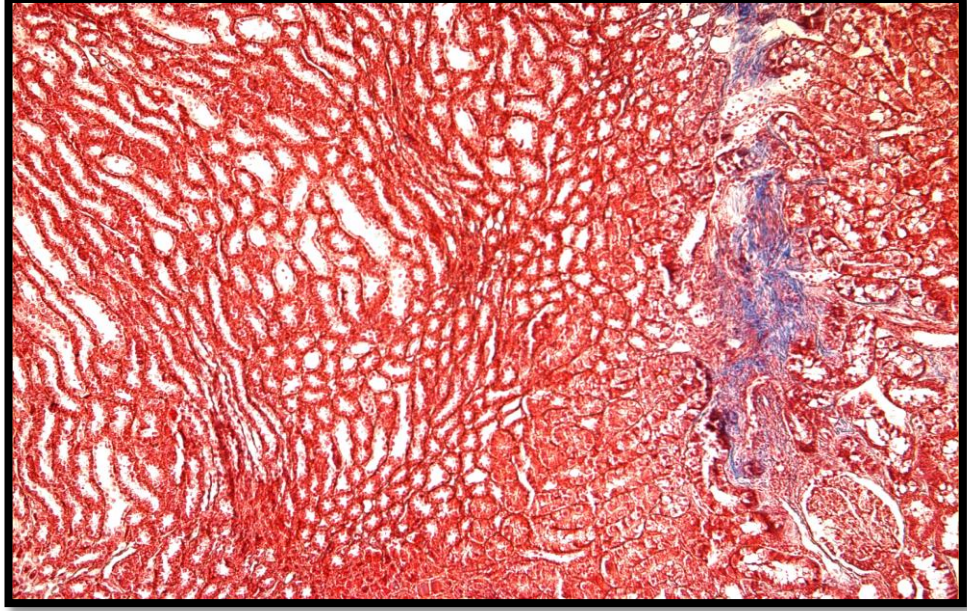
Şekil 4.33 Kontrol (PBS) grubu sıçan böbrek dokusunun genel görüntüsü. Masson Trikrom. X100



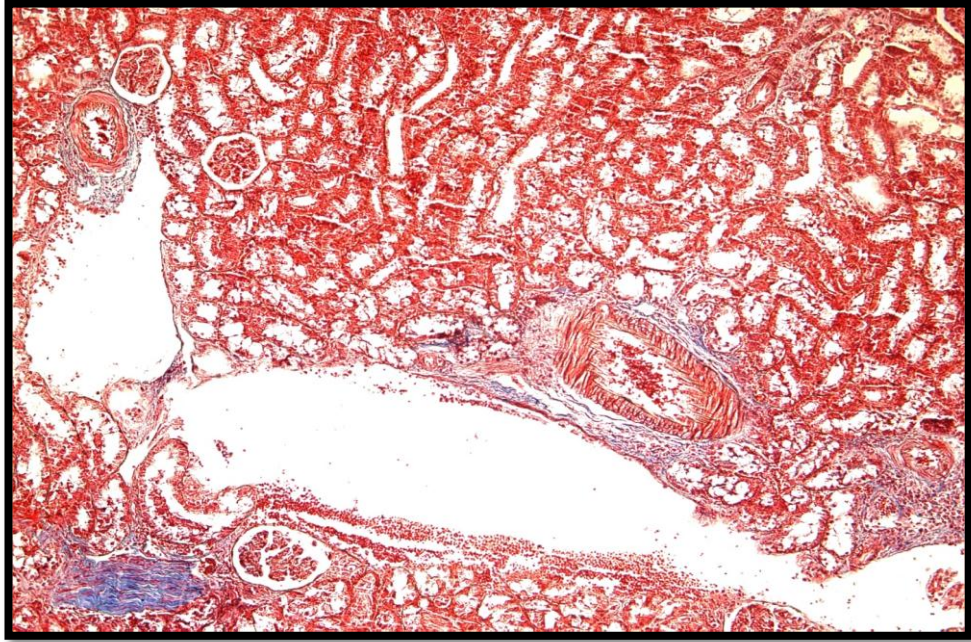
Şekil 4.34 Kontrol (mısır yağı) grubu sıçanlarda arter çevresinde kollajen lif görüntüsü. Masson Trikrom. X100

CCl₄ grubu

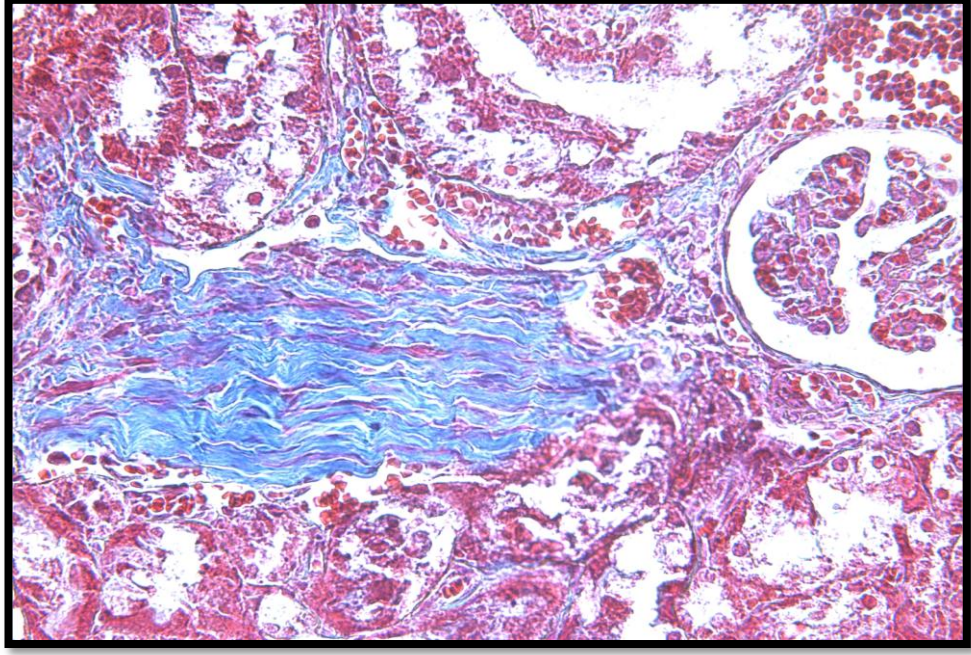
CCl₄ grubu böbrek doku kesitlerinde kollajen lif artışı tespit edilmiştir (Şekil 4.35-40).



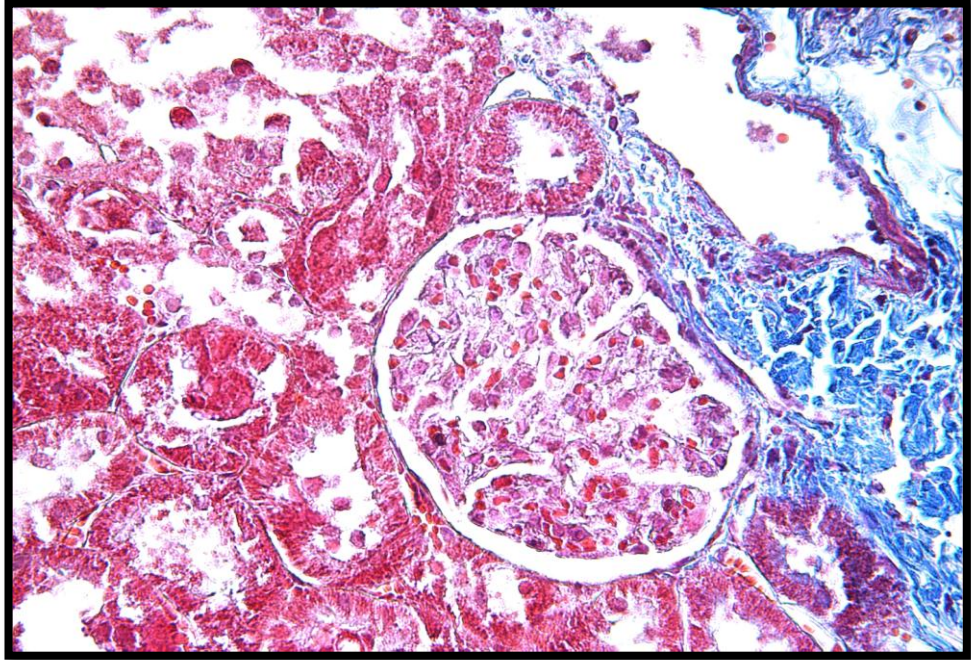
Şekil 4.35 CCl₄ uygulanmış grupların böbrek dokusunda kortiko-medüller bölgede kollajen birikimi izlenmekte. Masson Trikrom. X 100



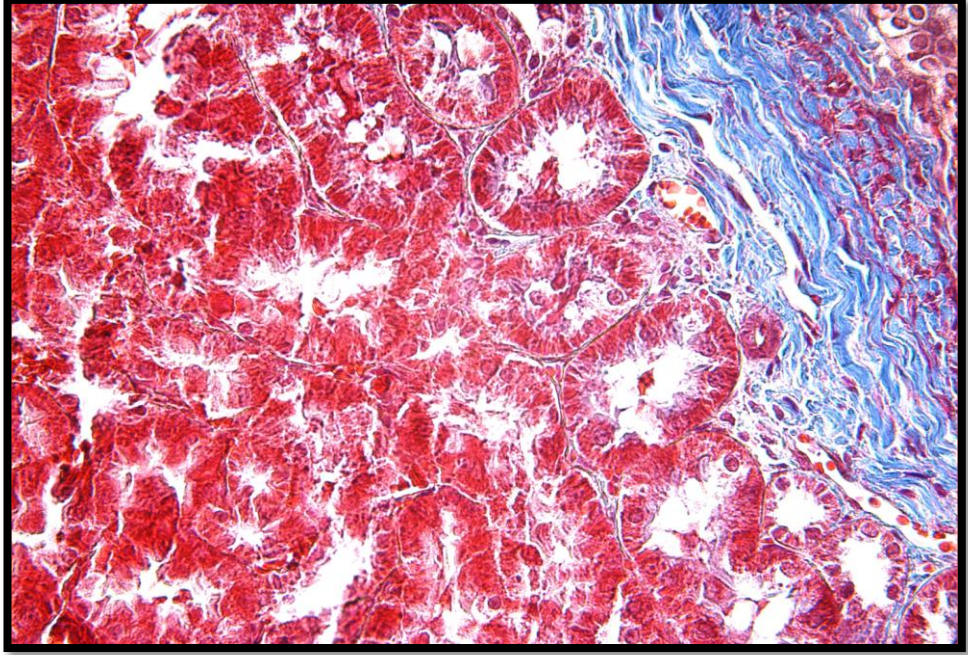
Şekil 4.36 CCl₄ ile hasar oluşturulan sıçanlarda tübüller arasında kollajen lif artışı. Masson Trikrom. X 100



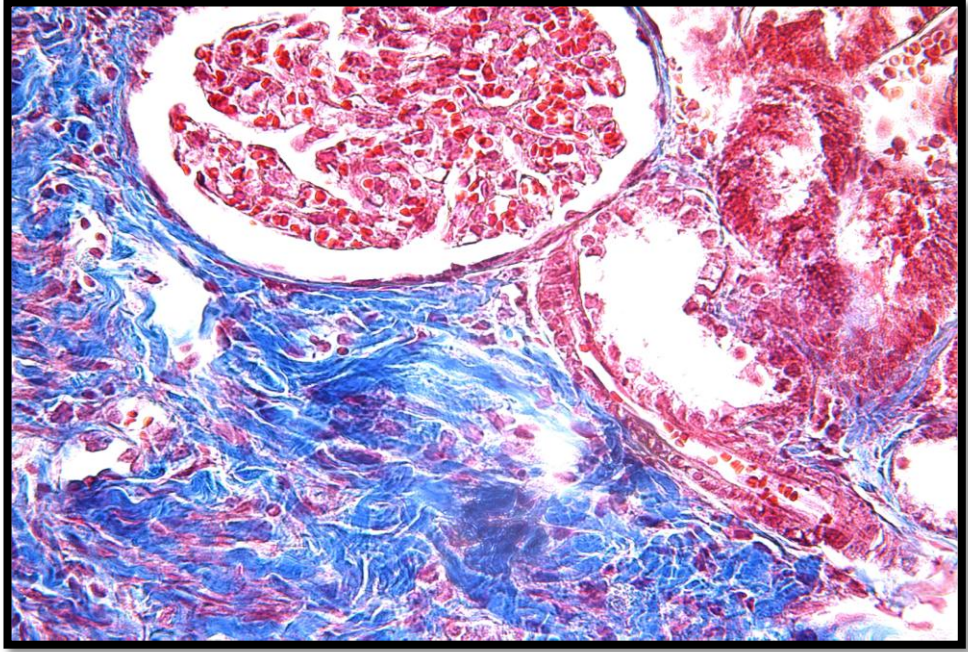
Şekil 4.37 CCl_4 ile hasar oluşturulan sıçanlarda böbrek korteksinin tübülointerstisyel bölgesinde kollajen lif artışı. Masson Trikrom. X 400



Şekil 4.38 CCl_4 grubu sıçan böbrek dokusunda Bowman kapsülü pariyetal tabakasına doğru kolajen lif birikmesi. Masson Trikrom. X 400



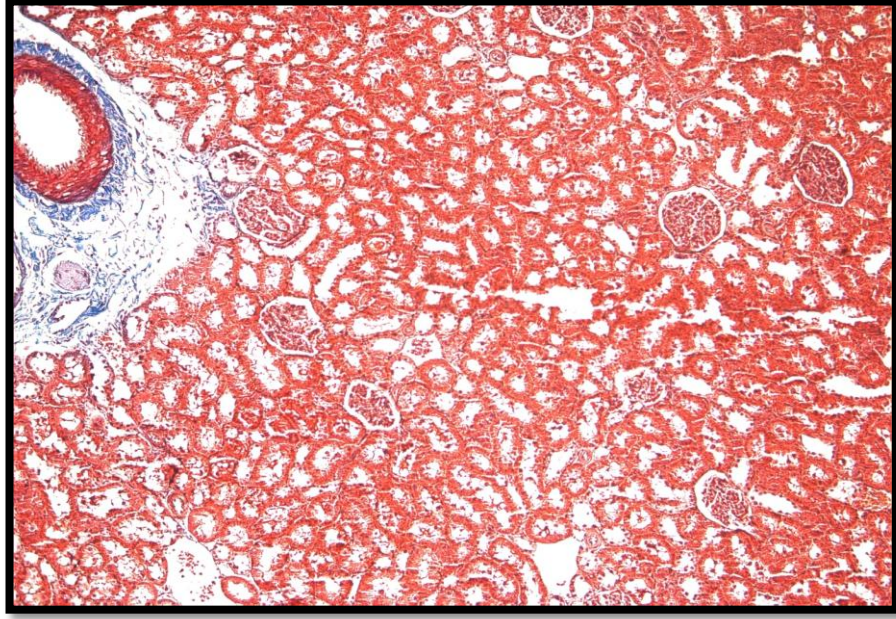
Şekil 4.39 CCl₄ uygulanmış sıçan böbrek dokusu kortiko-medüller bölgede kollajen artışı izlenmekte. Masson Trikrom. X 400



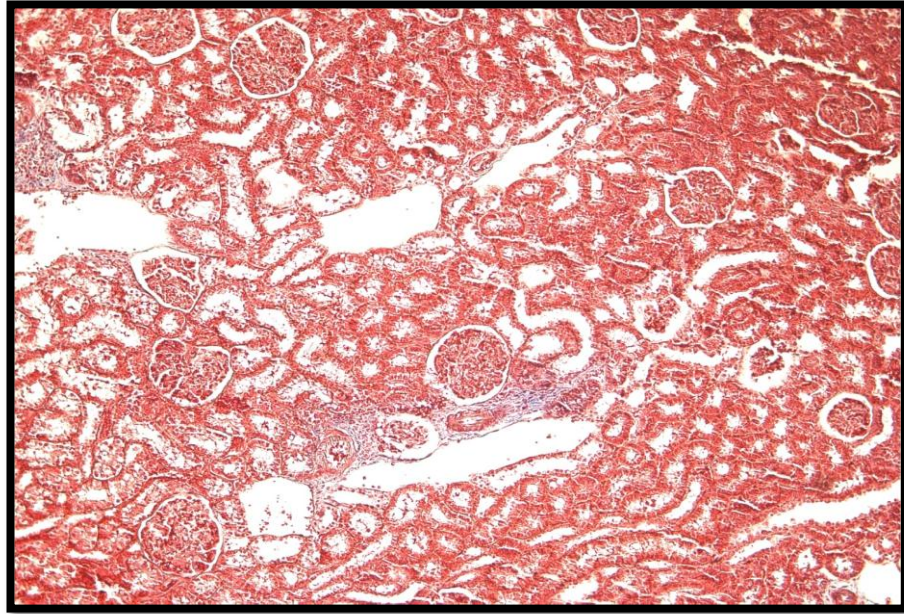
Şekil 4.40 CCl₄ uygulanan sıçan böbrek dokusunda tübülointerstisyel bölgede yoğun kollajen lif artışı gözlenmekte. Masson trikrom. X400

Melatonin grupları

Melatonin ile tedavi edilen (10, 12 hafta) CCl₄ gruplarına ait sıçanların böbrek doku kesitleri incelendiğinde kollajen liflerinin kontrol gruplarına yakın dağılım gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.41- 4.42).



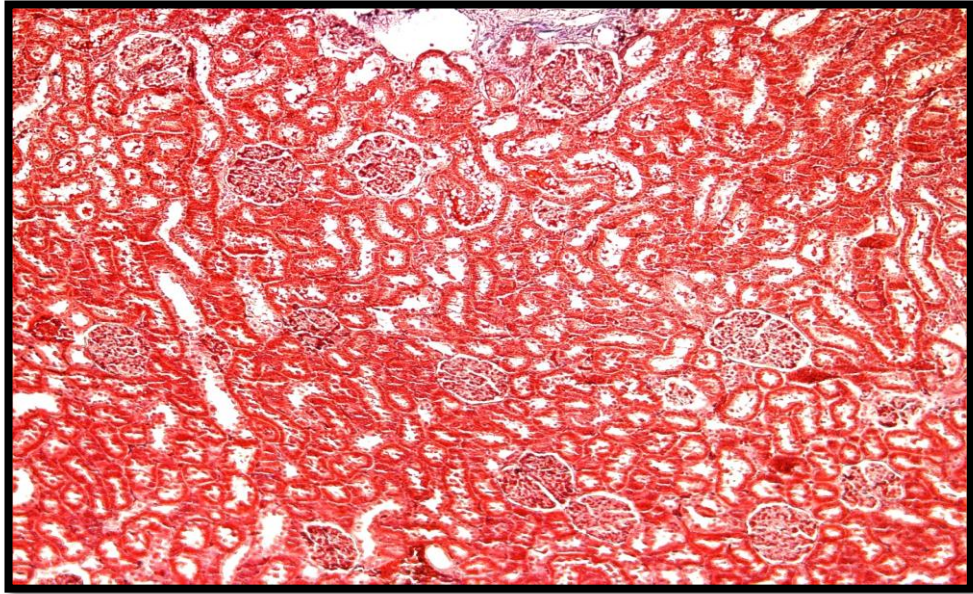
Şekil 4.41 10 hafta melatonin uygulanmış CCl₄ grubuna ait böbrek doku arter çevresinde kollajen lif dağılımı. Masson Trikrom. X100



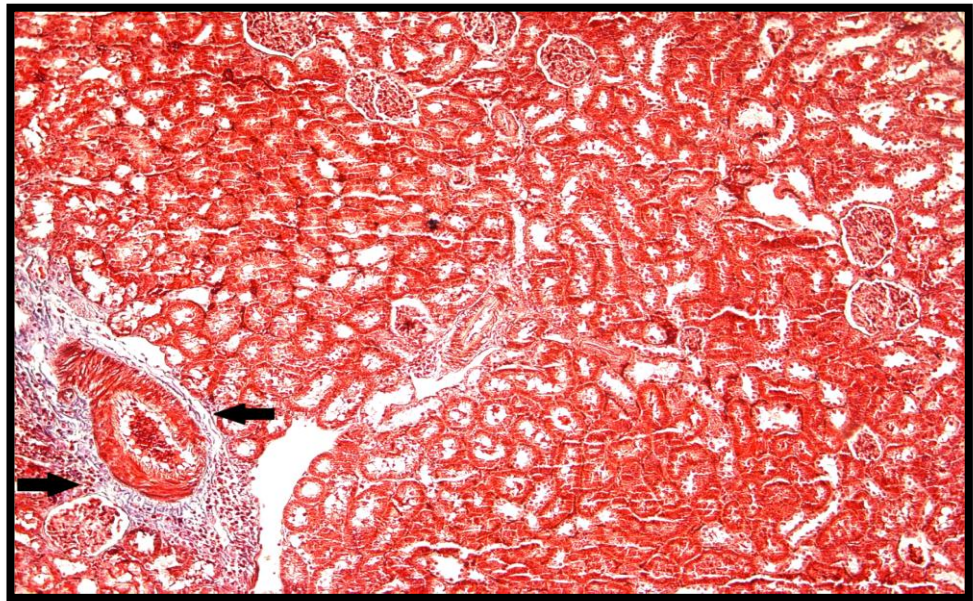
Şekil 4.42 12 hafta melatonin ile tedavi edilen CCl₄ grubu sıçanların böbrek dokusunda seyrek dağılım gösteren kollajen lifler izlenmekte. Masson Trikrom. X100

D vitamini grupları

D vitamini uygulanan (10, 12 hafta) CCl₄ grupları böbrek doku kesitleri incelendiğinde kollajen liflerin kontrol gruplarına benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.43-4.44).



Şekil 4.43 10 hafta D vitamini uygulanmış CCl₄ grubu böbrek dokusunun genel görüntüsü. Masson trikrom. X100



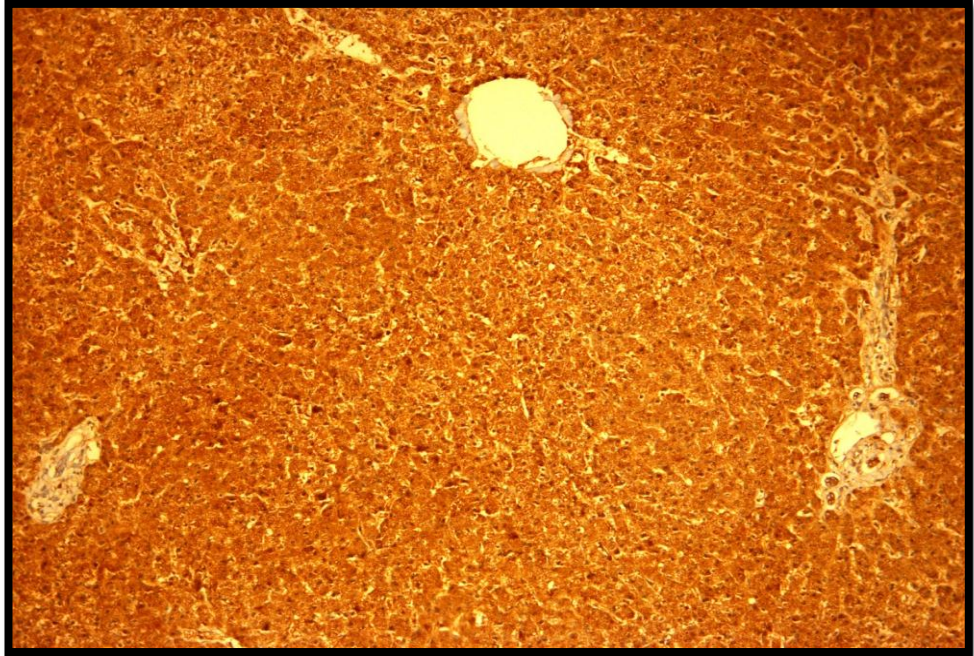
Şekil 4.44 12 hafta D vitamini uygulanmış CCl₄ grubu böbrek dokusunda arter çevresinde seyrek dağılım gösteren kollajen lifler (oklar). Masson trikrom. X100

4.10 İmmunohistokimyasal Sonuçlar

4.10.1 Katalaz enzim aktivitesi

Yapılan mikroskopik incelemede kontrol, CCl₄, melatonin ve D vitamini gruplarında spesifik katalaz immunohistokimyasal reaksiyon görülmüştür. CCl₄ dışındaki grupların böbrek korteksinde güçlü katalaz immunohistokimyasal reaktivitesi tespit edilmiştir. Tüm grupların korteks bölgesinde katalaz immünreaktivitesi yönünden farklılıklar gözlenmiştir. Medulla bölgesinde ise katalaz immünreaktivitesinin eşit olduğu saptanmıştır. CCl₄ grubuna ait böbrek dokusunda tübüllerde zayıf katalaz immünreaktivitesine rağmen glomerüllerde katalaz immünreaktivitesinin görülmediği dikkati çekmiştir. Kontrol, melatonin ve D vitamini gruplarında ise böbrek doku tübüllerinde ve glomerüllerinde yoğun katalaz immünreaktivite tespit edilmiştir.

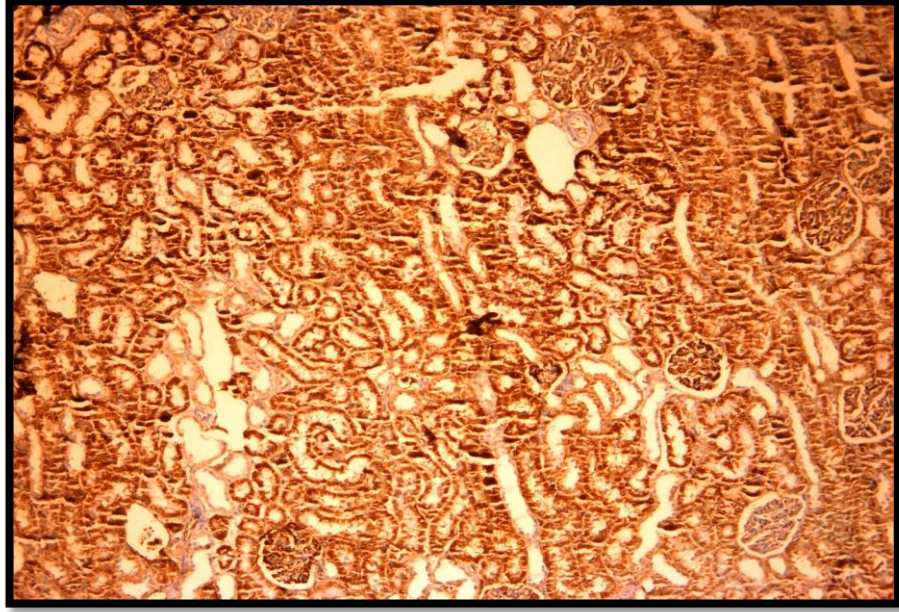
Pozitif kontrol olarak kullanılan karaciğer dokusunda katalaz pozitif immünreaktivitesi tespit edilmiştir (Şekil 4.45).



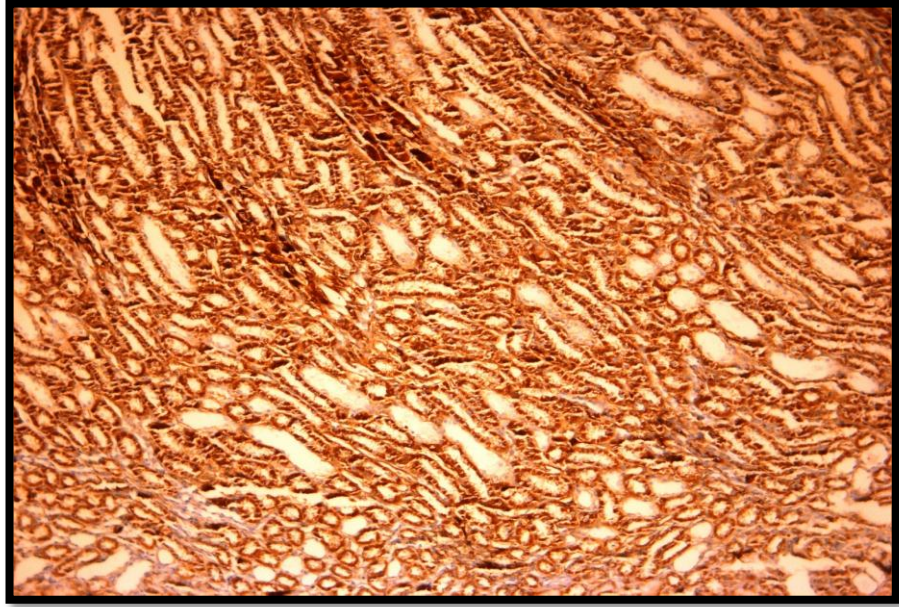
Şekil 4.45 Katalaz enzim aktivitesi, kontrol pozitif karaciğer dokusu. Katalaz immünreaktivite. X100

Kontrol grupları

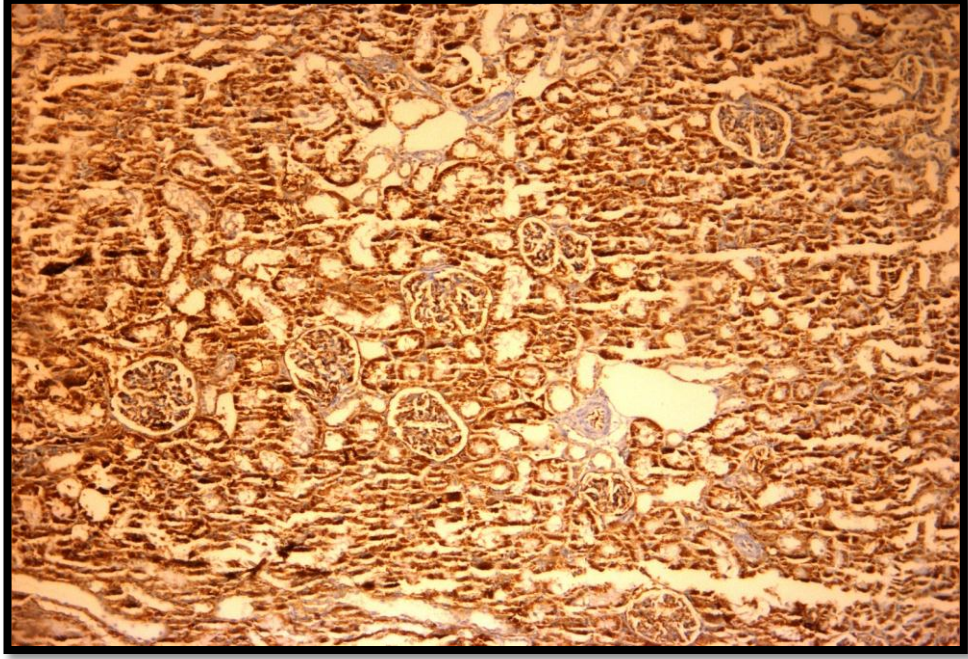
Tüm kontrol gruplarına ait sıçanların böbrek dokuları katalaz enzim aktivitesi bakımından incelendiğinde hem korteks hem de medulla bölgelerinde güçlü katalaz pozitif immünreaktivite tespit edilmiştir (Şekil 4.46-4.49).



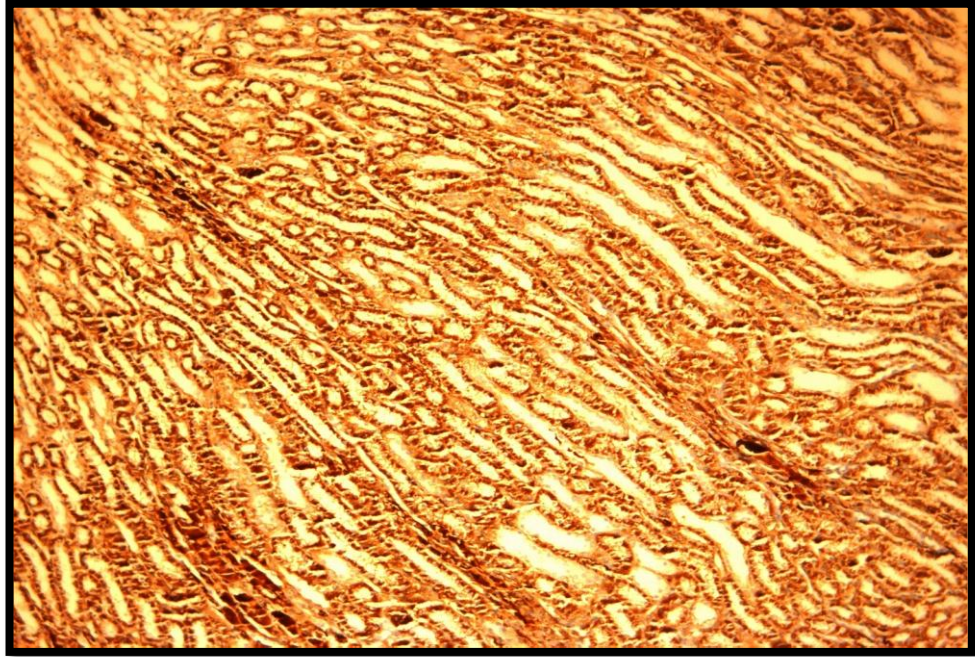
Şekil 4.46 Kontrol (PBS+Etanol) grubu sıçan böbrek dokusu korteks bölgesinde katalaz pozitif immünreaktivitesi. X100



Şekil 4.47 (PBS+Etanol) kontrol grubu sıçan böbrek dokusu medulla bölgesinde katalaz pozitif immünreaktivitesi. X100



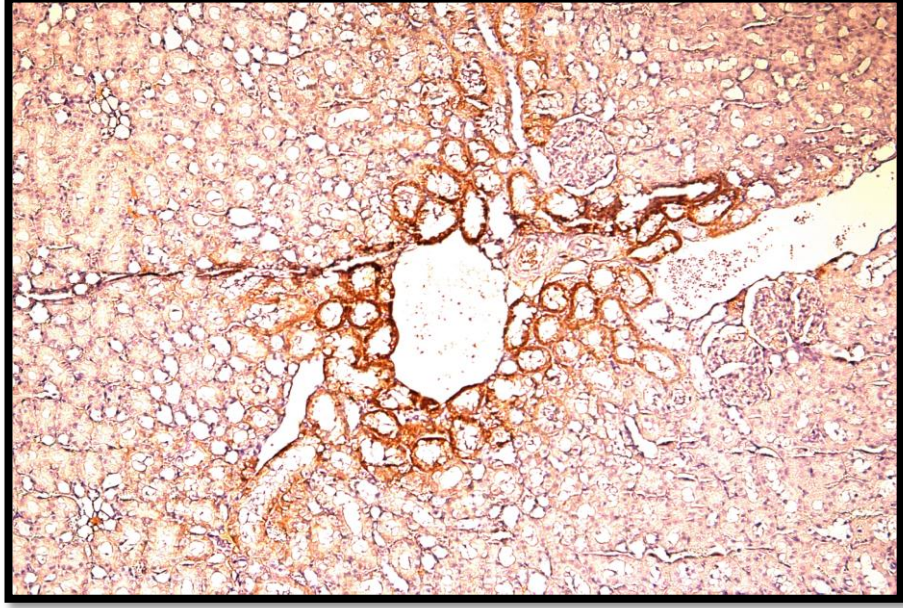
Şekil 4.48 Kontrol (mısır yağı) grubu sıçan böbrek dokusu korteks bölgede katalaz pozitif immünreaktivitesi. X100



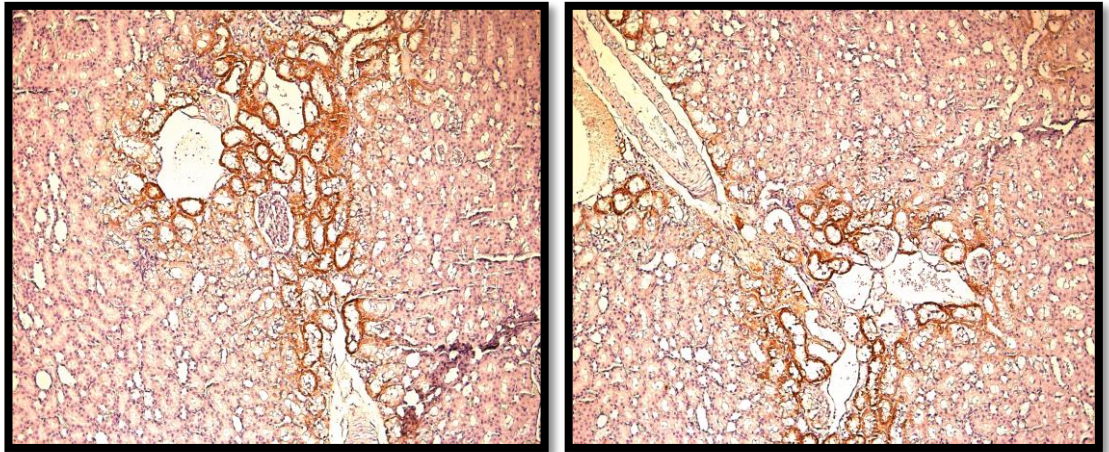
Şekil 4.49 Kontrol grubu (mısır yağı) sıçan böbrek dokusu medulla bölgesinde katalaz pozitif immünreaktivitesi. X100

CCl₄ grubu

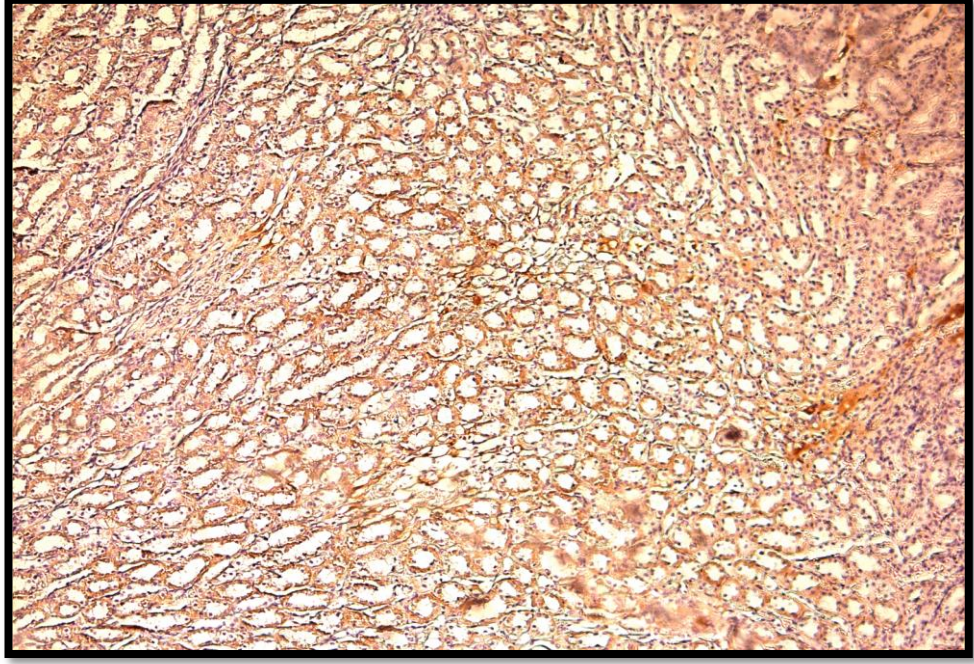
CCl₄ sıçanların böbrek dokuları katalaz enzim aktivitesi bakımından değerlendirildiğinde korteks bölgesinde tübüllerin orta ve zayıf katalaz pozitif immünreaktivite göstermesine karşın glomerüllerin negatif reaksiyon gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.50-4.51).



Şekil 4.50 CCl₄ uygulanmış grupta korteks bölgesi tübüllerinde zayıf katalaz pozitif immünreaktivitesi. X100



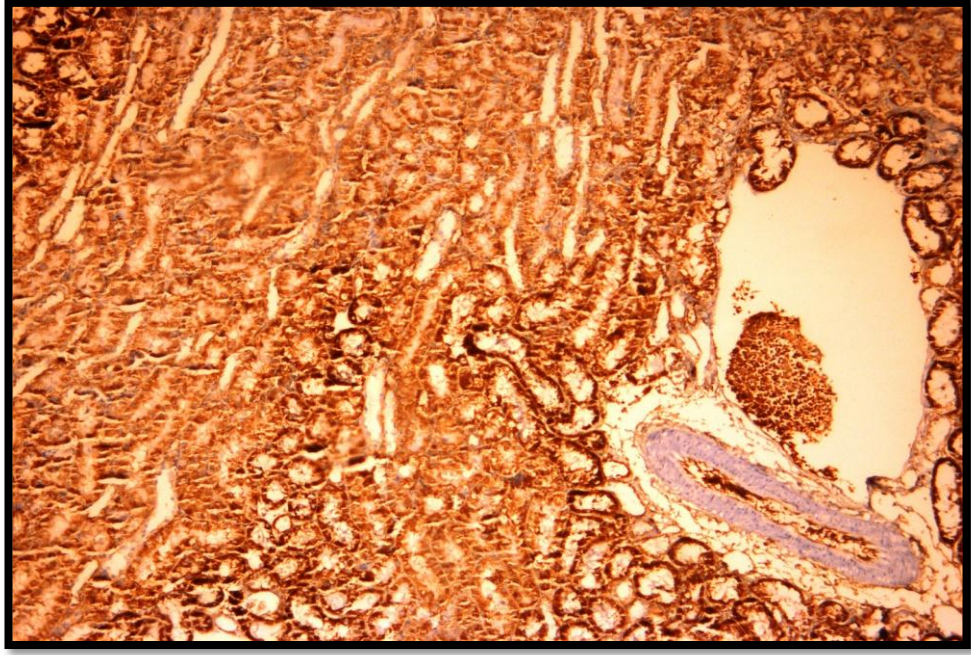
Şekil 4.51 CCl₄ grubunda orta derece katalaz pozitif immünreaktivite gösteren tübüller izlenmekte. X100



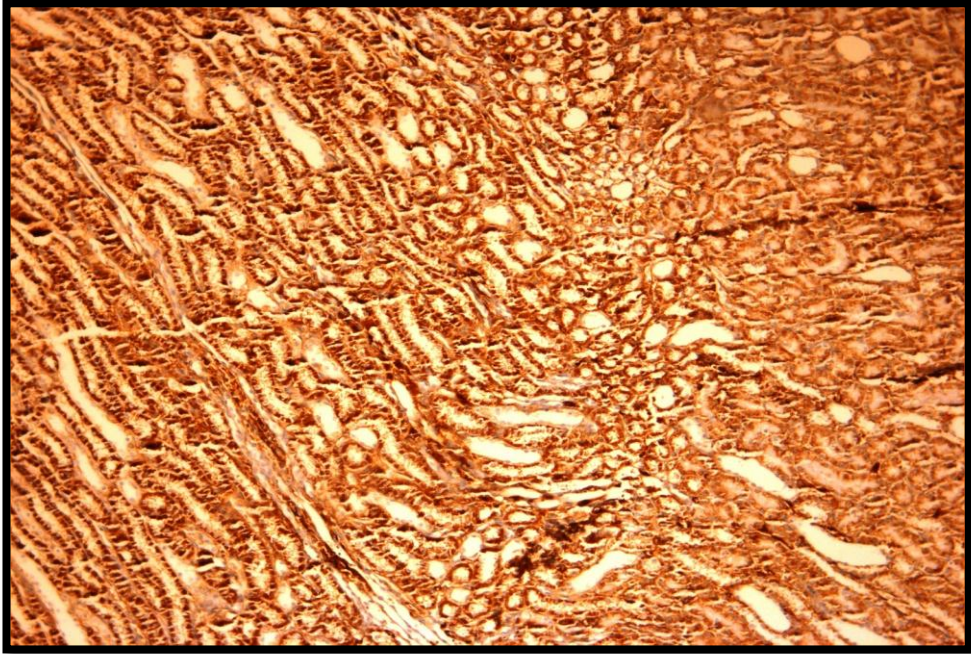
Şekil 4.52 CCl₄ grubunda medulla bölgesinde zayıf katalaz pozitif immünreaktivitesi.
X100

Melatonin grupları

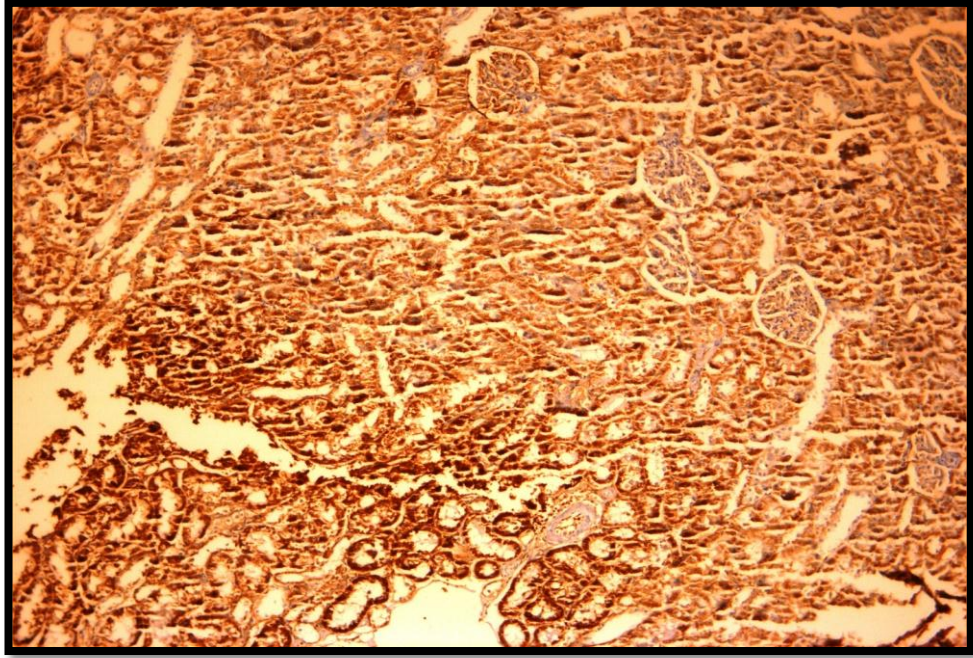
Melatonin uygulanmış CCl₄ grupların böbrek korteksi katalaz enzim aktivitesi yönünden incelendiğinde yer yer yoğun katalaz pozitif tübüller tespit edilmiştir (Şekil 4.53-4.55). Medulla bölgesi ise kontrol gruplarına benzer şekilde katalaz pozitif reaksiyon göstermiştir (Şekil 4.54-4.56).



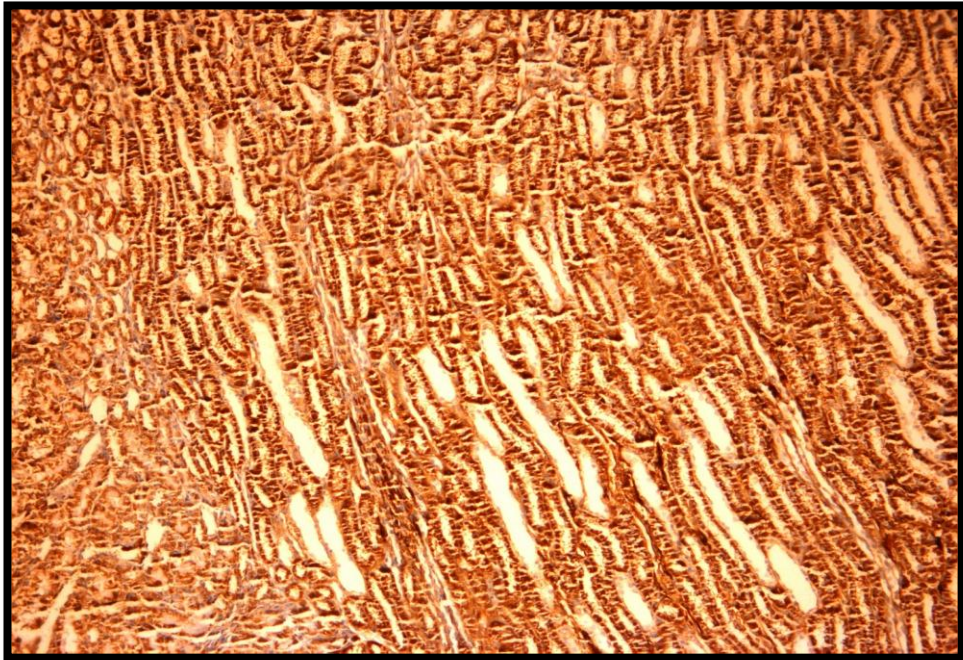
Şekil 4.53 10 hafta melatonin ile tedavi edilmiş CCl_4 grubu böbrek korteksinde katalaz pozitif immünreaktivitesi. X100



Şekil 4.54 10 hafta melatonin uygulanmış CCl_4 grubu böbrek medulla bölgesinde katalaz pozitif immünreaktivitesi. X100



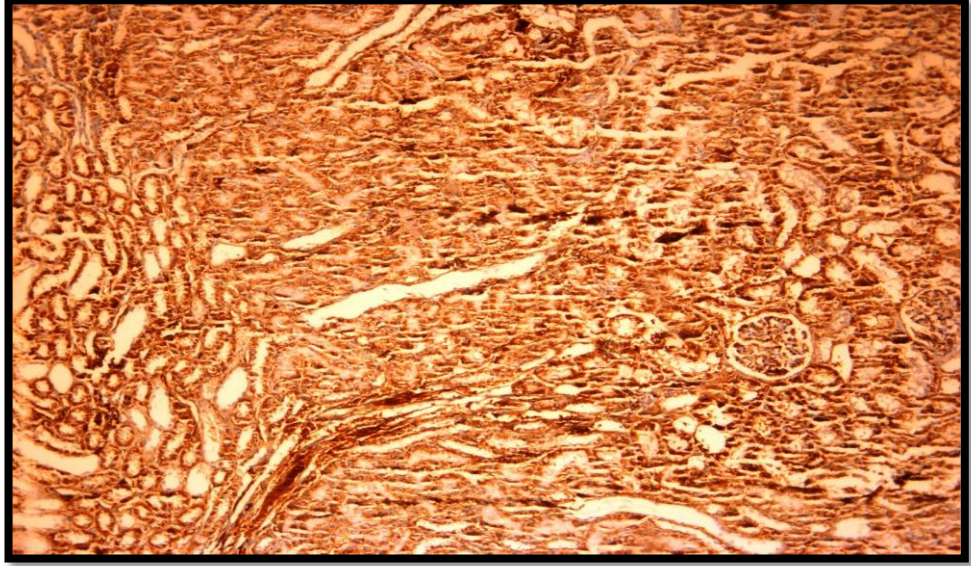
Şekil 4.55 12 hafta melatonin ile tedavi edilmiş CCl_4 grubunda kortekste ki katalaz pozitif immünreaktivitesi. X100



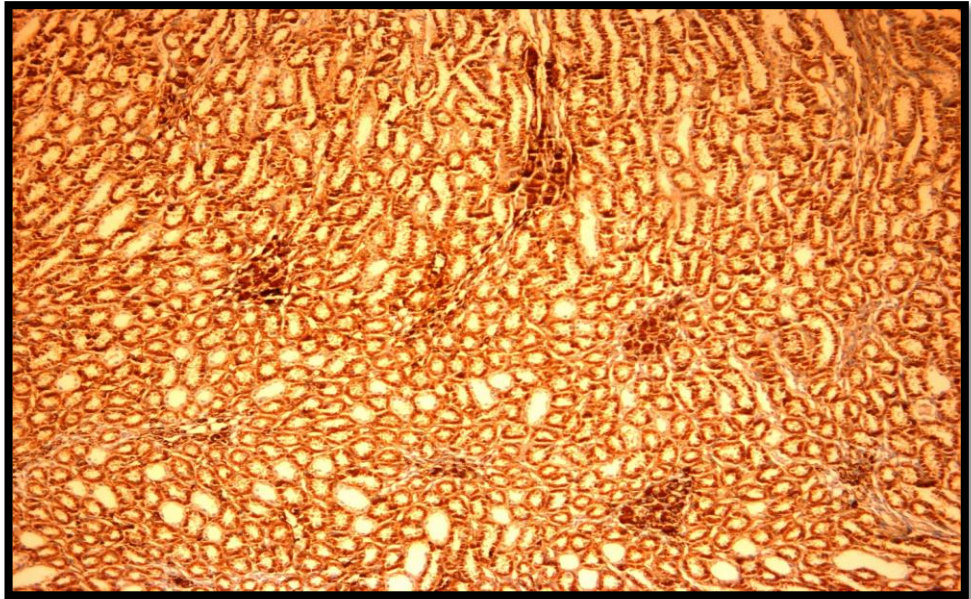
Şekil 4.56 12 hafta melatonin uygulanmış CCl_4 grubu medulla bölgesinde katalaz pozitif immünreaktivitesi. X100

D vitamini grupları

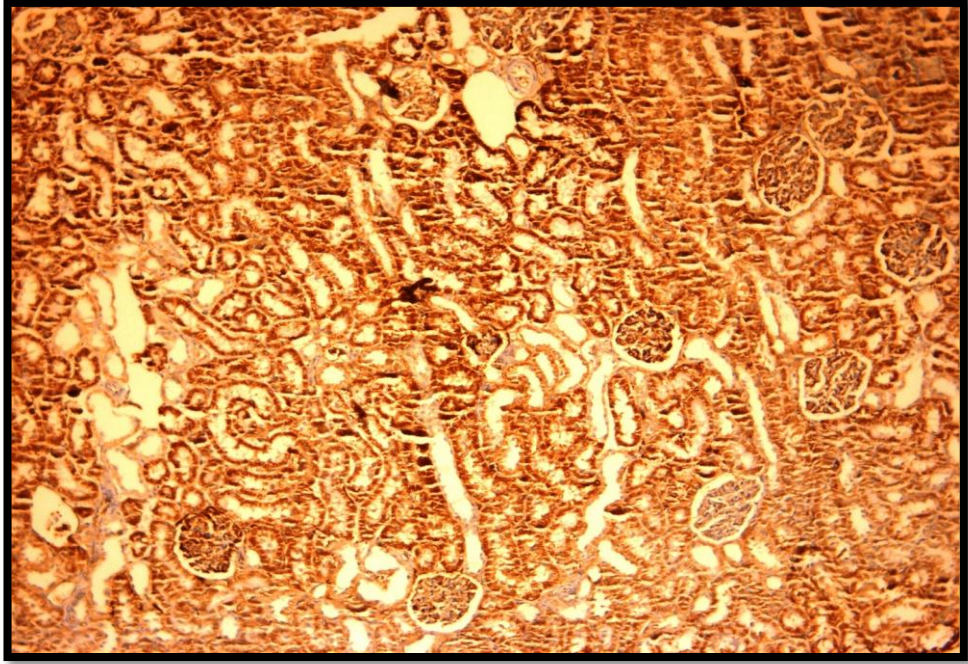
D vitamini uygulanmış grupların böbrek dokuları katalaz enzim aktivitesi bakımından incelendiğinde katalaz pozitif reaksiyon gösteren glomerüller ve tübüller tespit edilmiştir (Şekil 4.57-60).



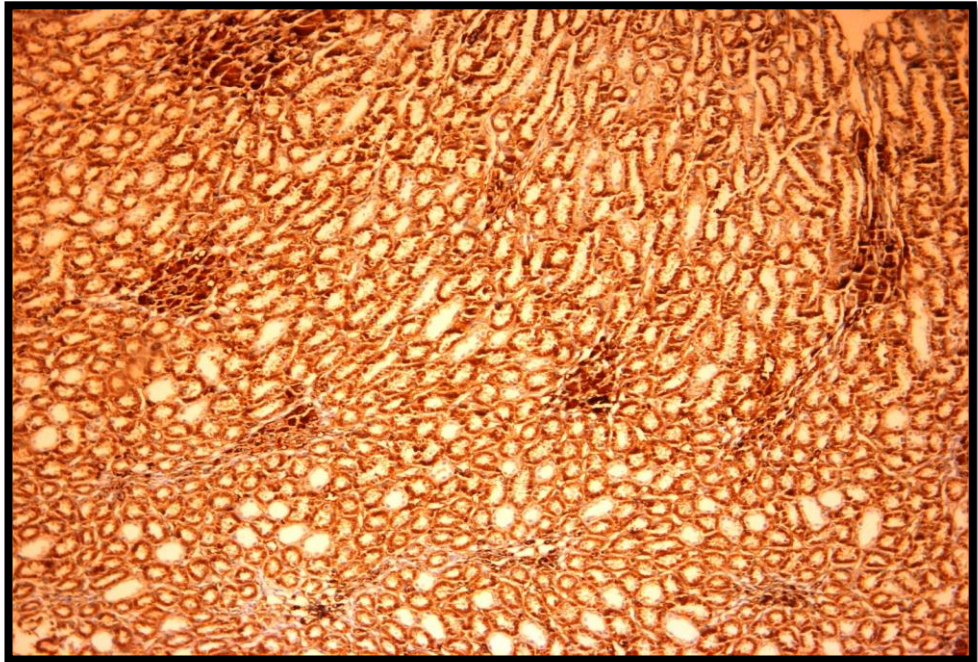
Şekil 4.57 10 hafta D vitamini ile tedavi edilen CCl_4 grubunda kortekste ki katalaz pozitif immünreaktivitesi. X100



Şekil 4.58 10 hafta D vitamini uygulanmış CCl_4 grubu böbrek medulla bölgesinde katalaz pozitif immünreaktivitesi. X100



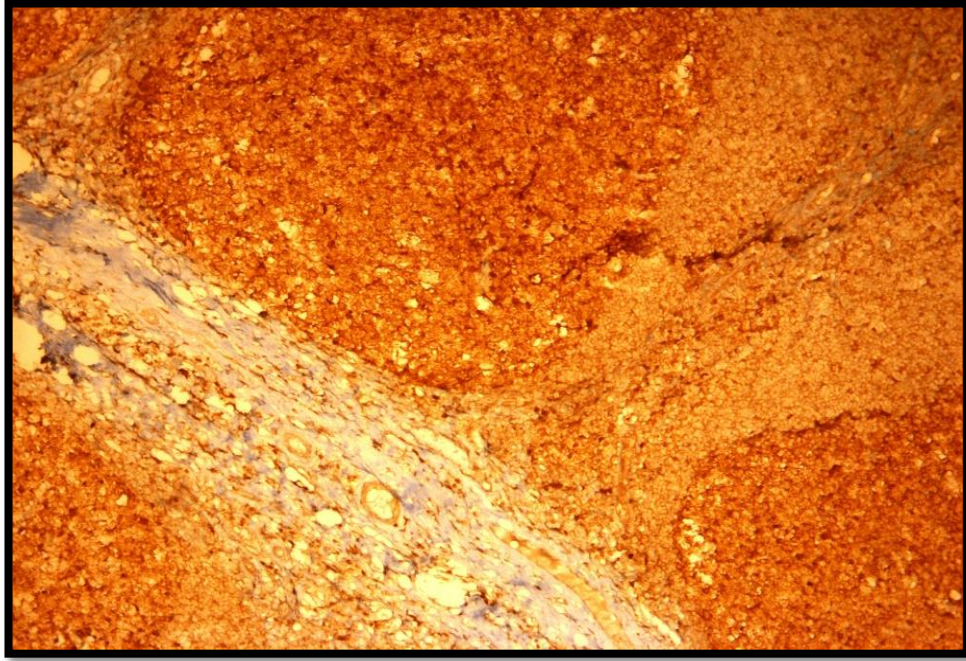
Şekil 4.59 12 hafta D vitamini ile tedavi edilen CCl_4 grubu böbrek korteksindeki katalaz pozitif immünreaktivitesi. X100



Şekil 4.60 12 hafta D vitamini uygulanmış CCl_4 grubu böbrek medulla bölgesinde katalaz pozitif immünreaktivitesi. X100

4.10.2 Kazpaz-3 enzim aktivitesi

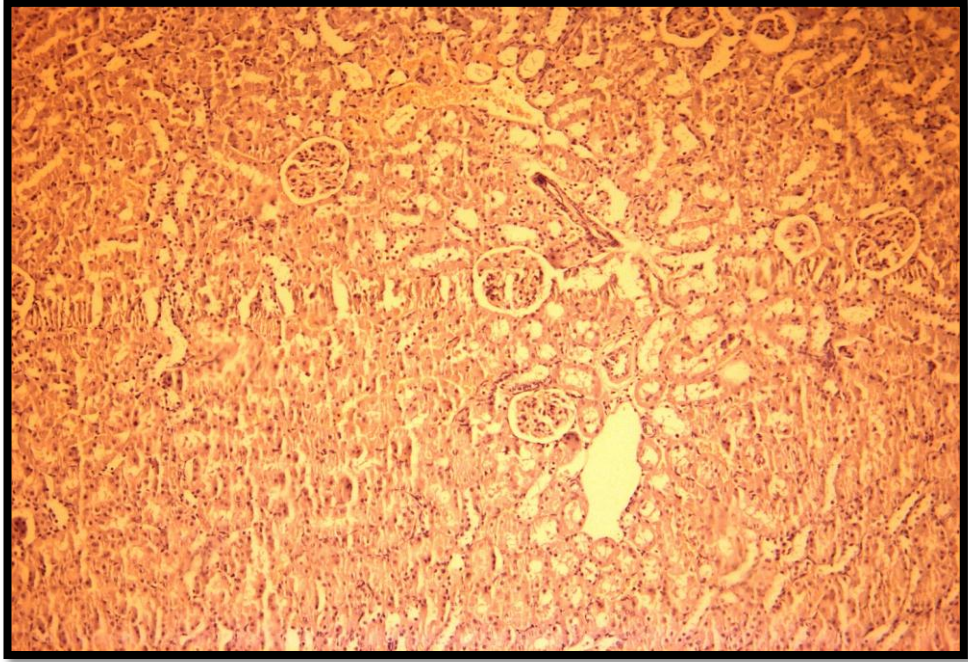
Pozitif kontrol olarak kullanılan kolon dokusunda kaspaz-3 pozitif immünreaktivitesi tespit edilmiştir (şekil 4.61).



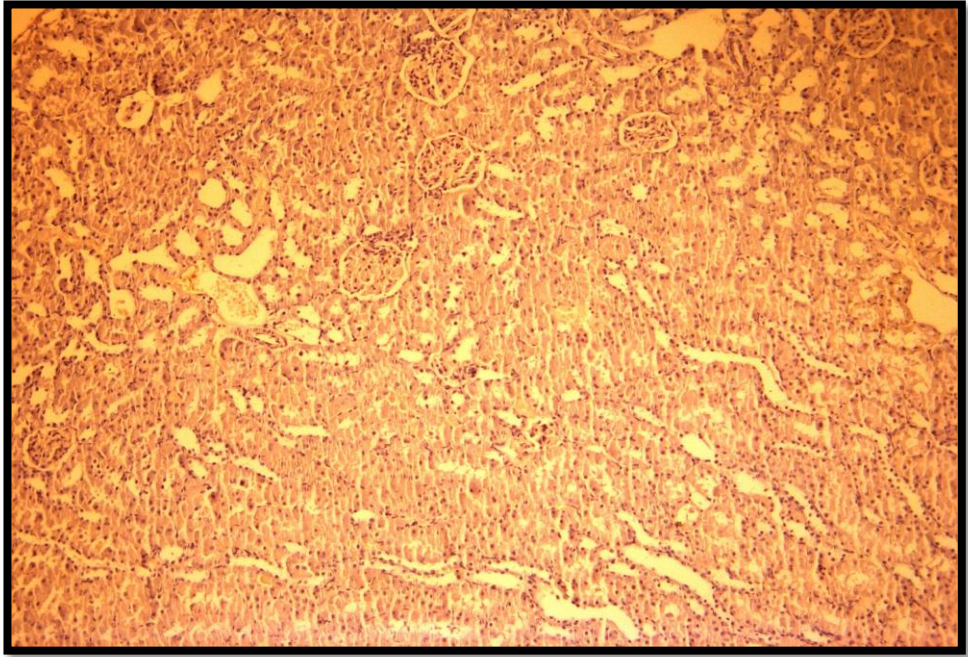
şekil 4.61 Kolon dokusunda kaspaz-3 pozitif immünreaktivitesi. X100

Kontrol grupları

Mısır yağı ve PBS+etanol kontrol gruplarına ait sıçanların böbrek dokuları kaspaz-3 enzim aktivitesi bakımından incelendiğinde kaspaz-3 imm nreaktivitesine rastlanmamıştır (şekil 4.62-4.63).



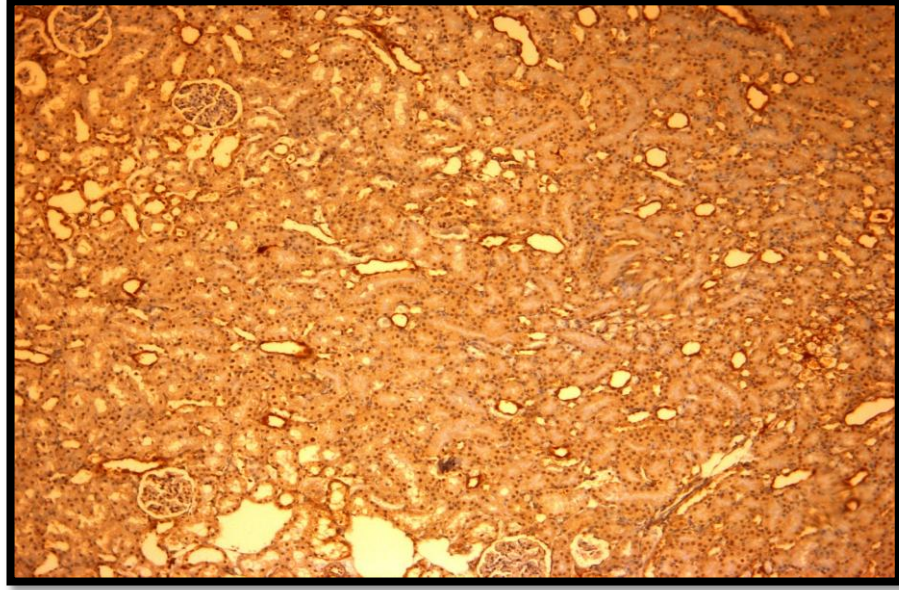
Şekil 4.62 Kontrol (PBS+Etanol) grubu sıçan böbrek dokusunda kazpaz-3 negatif immünreaktivitesi. X100



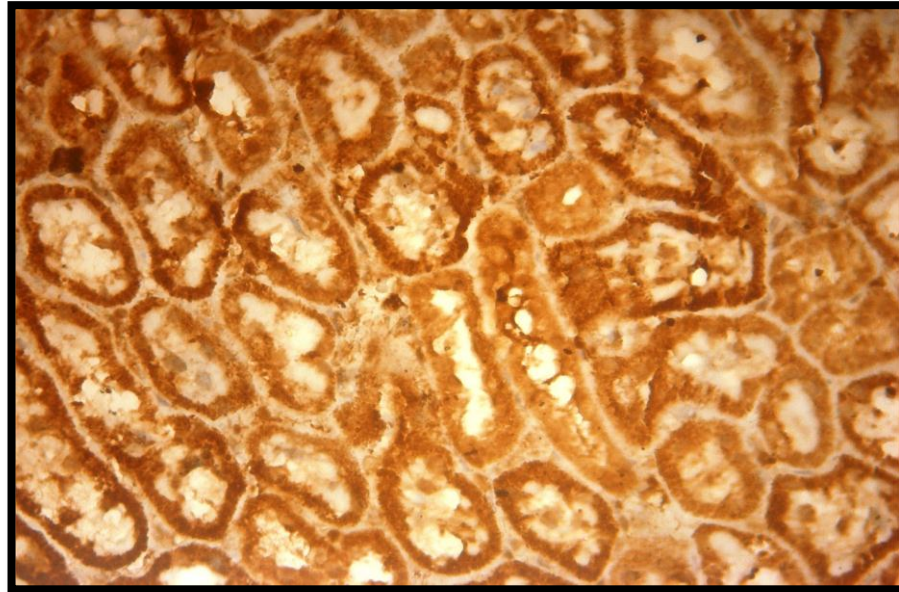
Şekil 4.63 Kontrol (mısır yağı) grubu sıçan böbrek dokusu kazpaz-3 negatif immünreaktivitesi. X100

CCl₄ grubu

CCl₄ sıçanların böbrek dokuları kazpaz-3 enzim aktivitesi bakımından değerlendirildiğinde tübüller orta dereceden şiddetliye kadar giden kazpaz-3 immünreaktivite göstermiştir (Şekil 4.64-4.65).



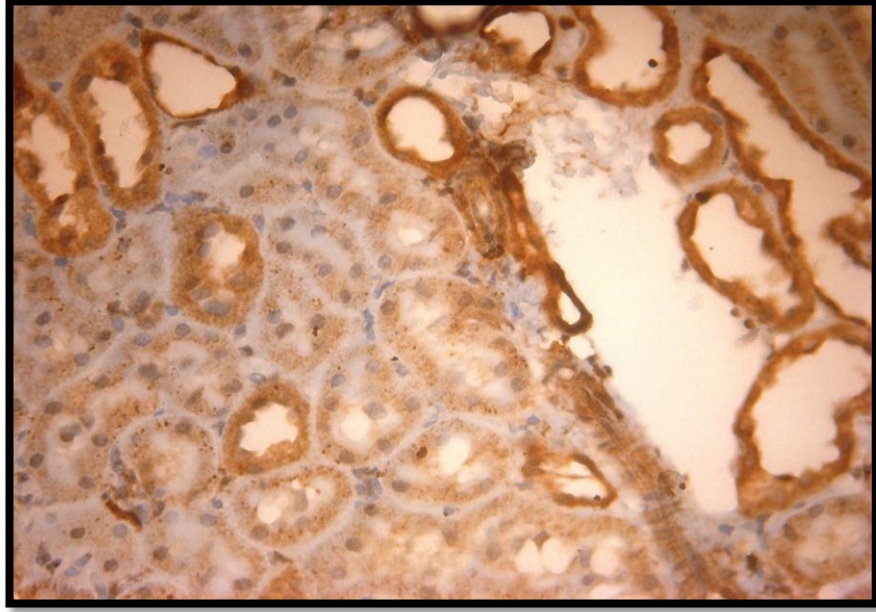
Şekil 4.64 CCl₄ uygulanmış gruba ait böbrek tübüllerinde orta derecede kazpaz-3 enzim reaksiyonu izlenmekte. Kazpaz-3 immünreaktivite. X100



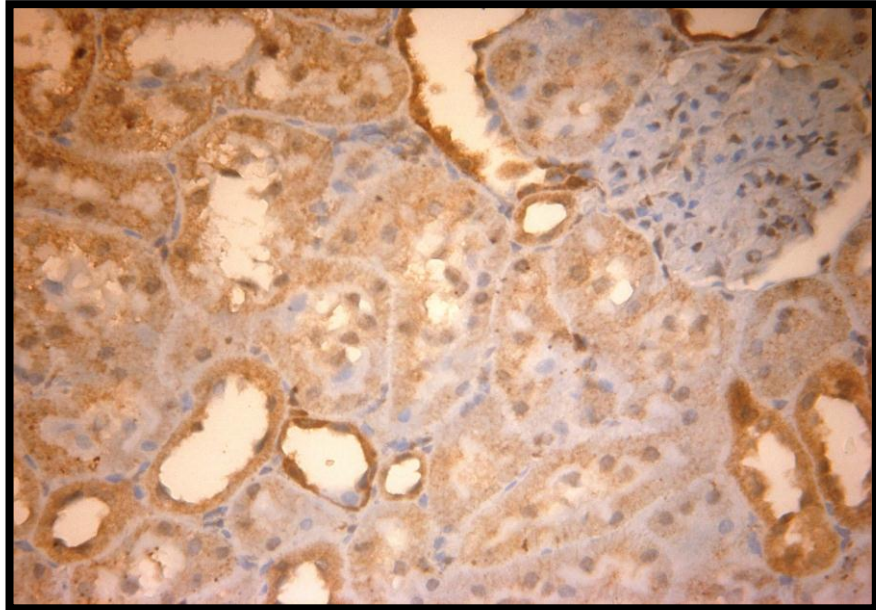
Şekil 4.65 CCl₄ grubunda şiddetli kazpaz-3 enzim aktivitesi gösteren boyanmış tübüller izlenmekte. Kazpaz-3 immünreaktivite. X400

Melatonin grupları

Melatonin uygulanmış CCl_4 grupların böbrek dokuları kazpaz-3 enzim aktivitesi yönünden incelendiğinde CCl_4 grubu ile kıyaslandığında daha zayıf kazpaz-3 reaksiyon gösteren tübüller tespit edilmiştir (Şekil 4.66-4.67).



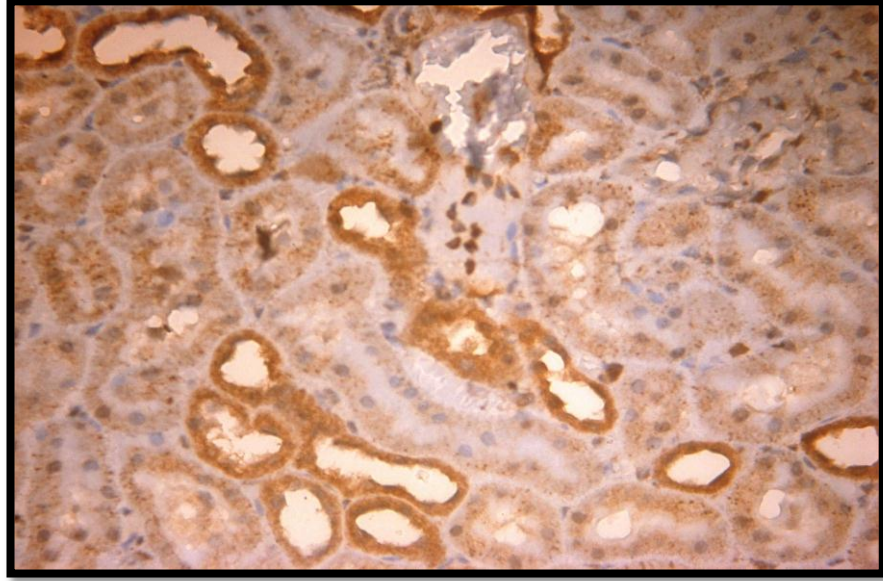
Şekil 4.66 10 hafta Melatonin+ CCl_4 grubu böbrek dokusunda kazpaz-3 immünreaktivitesi. X400



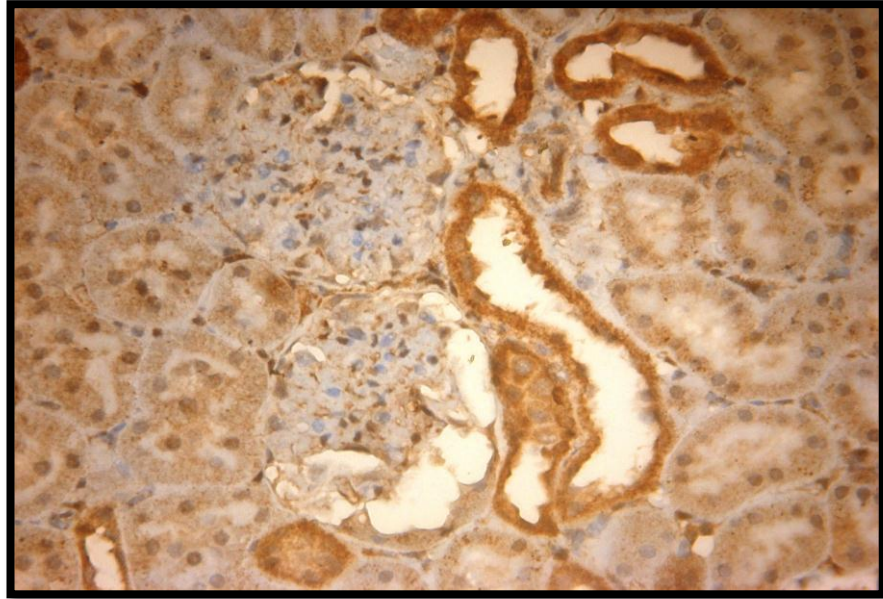
Şekil 4.67 12 hafta Melatonin+ CCl_4 grubunda böbrek dokusunda kazpaz-3 immünreaktivitesi. X400

D vitamini grupları

D vitamini uygulanmış grupların böbrek dokuları kazpaz-3 enzim aktivitesi bakımından incelendiğinde CCl_4 grubuna göre bazı tübüller kazpaz-3 pozitif immünreaktivitesi göstermiştir (Şekil 4.68-4.69).



Şekil 4.68 10 hafta D vitamini+ CCl_4 grubu böbrek dokusunda kazpaz-3 immünreaktivitesi. X400



Şekil 4.69 12 hafta D vitamini+ CCl_4 grubu böbrek dokusunda kazpaz-3 immünreaktivitesi. X400

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Genel olarak, çevrede bulunan toksik maddeler ve klinikte kullanılan ilaçlar vücudun farklı organlarında ciddi hasarlara sebep olabilir (Adewole vd. 2007). Organların toksisite duyarlılığı çeşitli faktörlerle bağlıdır. İlaç, endüstriyel ve çevresel kimyasallara maruz kalma sonucunda ortaya çıkan böbrek hastalığı ya da fonksiyon bozukluğu nefrotoksisite olarak tanımlanmaktadır (Asangansi vd. 2005). İlaç ve kimyasal maddelerin sebep olduğu böbrek hücre hasarının mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Böbrek diğer organlarla kıyasladığında iskemik veya toksik kimyasal maddelere karşı daha duyarlıdır. Çünkü böbreğin kimyasal maddelerin toksik reaktiflere dönüşmesinde önemli rolü vardır. Oluşan toksik maddeler hücre makromoleküllerine bağlanarak veya serbest radikalleri oluşturarak oksidatif hasara yol açmaktadır (Pfaller ve Gstraunthaler 1998).

Oksijen ATP yapımı için gereken bir maddedir. Hücreler oksijenden enerji oluştururken az miktarda olsa da zararlı reaktif oksijen türleri (ROS) oluştururlar. Bu radikaller lipitler, proteinler ve nükleik asitler ile birleşerek hücre hasarına yol açabilir. Meydana gelen ROS miktarı aşırı derecede artış gösterdiğinde vücutta yer alan ve antioksidan savunma mekanizmasında rol oynayan ajanlar aktive edilir. Bir çok patolojik durumlar sonucunda serbest radikal oluşumu ve sonlanması arasında bir denge bulunur. Bu dengenin bozulması nedeniyle oksidatif stres ortaya çıkar (Şen 2005).

Karbon tetraklorürün (CCl_4) biyolojik olarak tehlikeli olduğunu bilinmektedir. Nefrotoksisite oluşturmak için deneysel çalışmalarda hayvan modellerinde yaygın olarak kullanılan toksik bir maddedir. CCl_4 sitokrom P450 2E1 tarafından metabolize edilir ve triklorometil radikalleri oluşturur. Bu radikaller çoklu doymamış yağ asitlerden hidrojeni ayırarak lipid peroksidasyonunu başlatma yeteneğine sahiptirler (Adewole vd. 2007, Gültekin ve Hiçyılmaz 2007). Oluşan triklorometil (CCl_3) radikali oksijen ile birleşerek triklorometil peroksil (CCl_3O_2) radikalini oluşturur. Peroksil radikali, hücrenin zar yapısının bozulmasına sebep olmaktadır (Çetin ve Çetin 2011). Karbon tetraklorür sıçan, fare, kaz ve insan böbrek dokularında hasar oluşturduğu için çoğunlukla deneysel çalışmalarda kullanılmaktadır (Güven ve Yılmaz 2005, Ögetürk vd. 2005b, Manna vd.

2006, Mydlik ve Derzsiova 2006, Adewole vd. 2007, Kim vd. 2007, Balahoroğlu vd. 2008, Hermenean vd. 2013). Thrall vd. (2000), CCl₄'ün metabolize edilebilmesi bakımından farelerin sıçanlara göre daha yüksek kapasite ve düşük afiniteye sahip olduğunu göstermişlerdir. CCl₄ ile oluşturulan renal toksisite cinsiyet farklılığına bağlı olarak değişebilmektedir. Erkek farelerin renal hasara dişilere göre daha hassas olduğu bulunmuştur (Kim vd. 2007). Bu çalışmada böbrek dokusunda toksisite oluşturmak için erkek sıçanlar tercih edilmiştir.

Karbon tetraklorürün doz miktarı, uygulama şekli ve süresine bağlı olarak oksidatif hasara sebep olduğu gösterilmiştir. Kazlarla yapılan bir çalışmada, haftada 3 kez 1 ve 1.5 ml/kg dozlarında CCl₄ verildikten sonra böbrek dokularında oksidatif hasar tespit edilmiştir (Güven ve Yılmaz 2005). Diğer çalışmalarda farelere 10mmol/kg, 0.02ml/kg ve 1ml/kg CCl₄ intraperitoneal olarak farklı sürelerde verilmiştir. Çıkarılan böbrek dokularında oksidatif stres oluşumu saptanmıştır (Manna vd. 2006, Kim vd. 2007, Hermenean vd. 2013). Sıçanların böbrek dokusunda oksidatif hasar oluşturmak amacıyla 5ml/kg CCl₄ i.p olarak verilmiştir (Daniels vd. 1995). Çalışmamızda sıçanlara 10 hafta boyunca 1.5 ml/kg CCl₄ haftada iki kez olarak subkutan yoldan verilmiştir. CCl₄ grubundan alınan böbrek dokusunda oksidatif hasar tespit edilmiştir.

CCl₄ uygulandığında vücut ağırlığının önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır (Adewole vd. 2007, Manjrekar vd. 2008, El-kholy vd. 2013). Çalışmamızda kontrol grupları ve CCl₄ uygulanmış grupta gıda alımı ve vücut ağırlığının arttığı tespit edilmiştir.

CCl₄ uygulanmış sıçanların böbrek ağırlığında anlamlı derecede azalma olduğu saptanmıştır (Manjrekar vd. 2008, El-Maddawy ve Gad 2012). Buna kontrast olarak diğer çalışmada CCl₄ verilen hayvanların böbrek ağırlıklarının etkilenmediği tespit edilmiştir (El-kholy vd. 2013). Bizim çalışmamızda ise Ögetürk vd. (2005a), Adewole vd. (2007) ve Venkatanarayana vd. (2012)'nin bulgularına uygun şekilde CCl₄ uygulanmasından sonra hayvanların böbrek ağırlıklarının önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir.

CCl_4 ile oluşturulan renal fonksiyon bozukluğu ve patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Genel olarak CCl_4 'ün ilk başta karaciğer dokusunda hasara sebep olduğu bunu takiben böbrek fonksiyonlarının bozulmaya başladığı gösterilmiştir (Rincon vd. 1999). Böbrek hasarının tespit edebilmesi için böbrek fonksiyonu ile ilgili serum üre ve kreatinin gibi biyokimyasal analizler önem taşımaktadır. Üre proteinlerin metabolizması sonucundan oluşan son üründür. Bu maddenin emilimi renal tübüller içinde gerçekleştirilir. Kreatinin kas metabolizmasının ürettiği bir vücut atığıdır. Glomerüler filtrasyon yolu ile kandan emilir ve idrarla atılır (Anderson 1997.). El-Maddawy ve Gad (2012), erkek albino sıçanlara 6 hafta boyunca haftada iki kez 2ml/kg subkutan olarak CCl_4 vermişlerdir. Parashuram vd. 2013 ise erkek albino sıçanlara 7 gün boyunca 3ml/kg subkutan olarak CCl_4 vermişlerdir. İki çalışmanın sonucunda da serum kreatinin ve üre seviyelerini ölçüldükten sonra kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda nefrotoksisite oluşturmak için sıçanlara intraperitoneal ve oral olarak daha düşük dozlarda CCl_4 uygulandığında ölçülen serum örneklerinde kontrol gruplarına göre yüksek üre ve kreatinin seviyelerini saptanmıştır (Hamed vd. 2012, Morakinyo vd. 2012, Venkatanarayana vd. 2012, Onuoha ve Chinaka 2013). Ancak subkutan olarak düşük doz CCl_4 verildikten sonra üre ve kreatinin seviyelerin azaldığı da görülmüştür (Ögetürk vd. 2005b). Bashandy ve Alwasel (2011) çalışmalarında sıçanlara intraperitoneal enjeksiyon ile 0.2ml/kg CCl_4 uyguladıklarında plazma kreatinin seviyesinin yükselmesine rağmen plazma üre seviyesinin azaldığını rapor etmişlerdir. Yapılan diğer çalışmalara göre CCl_4 uygulanmış sıçanların serum ve plazma üre seviyesinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (Tirkey vd. 2005, Makni vd. 2012). 2ml/kg ve 0.5ml/kg subkutan olarak CCl_4 verilen sıçanların kreatinin seviyesinde anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (Ögetürk vd.2005a, Tirkey vd. 2005). Bizim çalışmamızda da bazı çalışmalara benzer olarak CCl_4 ile nefrotoksisite oluşturulan grupta kontrol gruplarına göre serum üre seviyesinin arttığı saptanmıştır. Bu durum böbrek fonksiyonunda bir düzensizliğin oluştuğunu göstermektedir. Serum üre seviyesindeki artışın sebebinin tübüllerdeki hasardan dolayı ürenin geri emiliminden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu çalışmada serum kreatinin düzeyi değerlendirildiğinde CCl_4 grubu dahil tüm grupların arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Böbrek fonksiyon bozukluğuna rağmen bazı durumlarda

serum kreatinin değeri normal seviyesinde bulunabilmektedir. Böbrek fonksiyonunun daha doğru değerlendirilebilmesi için kreatinin klirensi testi yapılması gerekmektedir (Anderson 1997).

CCl₄ uygulanmasının böbreğin glukoz filtrasyon hızını etkilemediği gösterilmiştir (Ramarajan vd. 2102). Bu çalışmada CCl₄ uygulanan sıçanların serum örneklerinde kontrol gruplarına göre glukoz seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Çalışmamızda CCl₄ uygulamasından 10 hafta sonra serum şekeri ölçümleri yapılmıştır. Bu süre serum glukoz seviyesinde herhangi bir artış olup olmadığını göstermek için yeterli olmayabilir.

Düşük ROS seviyeleri, hücre farklılaşması, hücre büyümesi, apoptoz, bağışıklık ve mikroorganizmalara karşı savunma gibi pek çok biyokimyasal süreçlerde gereklidir (Mates vd. 1999). Ancak yüksek seviyede bulunan serbest radikaller vücutta çeşitli bozukluklara yol açmaktadır. İlk başta, serbest radikaller tarafından oluşan lipid peroksidasyonu, hücre membranındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açmaktadır. Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucundan oluşan üç karbonlu düşük molekül ağırlıklı bir aldehit MDA, lipid peroksidasyonun en önemli son ürünüdür. MDA belirlenmesi lipid peroksidasyonunun değerlendirilmek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Türközkan vd. 2006). Yapılan pek çok çalışmada CCl₄'ün lipid peroksidasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Abraham vd. 1999).

Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, 0.5ml/kg dozunda CCl₄ verildikten sonra böbrek dokularında MDA düzeylerinin anlamlı bir şekilde artış gösterdiğini rapor edilmiştir (Ögetürk vd. 2005b, Manjrekar vd. 2008, Çetin ve Çetin 2011). 1ml/kg CCl₄ verilen grupların böbrek dokularında MDA düzeylerin yükseldiği belirtilmiştir (Manna vd. 2006, Adewole vd. 2007, Ganie vd. 2011, Makni vd. 2012). Kazlar ve sıçanlarda yapılan diğer çalışmaların sonucuna göre 1.5ml/kg CCl₄ uygulandığında böbrek dokularında MDA düzeylerinin kontrol gruplarına göre arttığı kaydedilmiştir (Güven ve Yılmaz 2005, Ramarajan vd. 2012). Turkey vd. (2005), El-Maddawy ve Gad (2012), sıçanlara 2ml/kg CCl₄'ün subkutan yoldan verilmesinden sonra böbrek dokularında MDA düzeylerinin yüksek olduğunu saptamışlardır. Diğer bir çalışmada, Wistar albino

sıçanlara intraperitoneal olarak 3ml/kg CCl₄ verildiğinde böbrek doku MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu bulunmuştur (Anand ve Gokulakrishnan 2012). 10ml/kg CCl₄ dozunda intraperitoneal yolla sıçanlara tek doz uygulandığında böbrek dokularında daha yüksek MDA düzeyi gösterilmiştir (Karadeniz vd. 2009). Çalışmamızda 1.5ml/kg CCl₄ dozu sıçanlara 10 hafta boyunca subkutan olarak verilmiştir. CCl₄ grubu böbrek doku MDA düzeylerinin kontrol gruplarına göre arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur.

ROS hücre içi GSH konsantrasyonu, SOD, CAT ve GSH-Px aktivitelerini azaltarak antioksidan savunma sistemi etkiler (Adewole vd. 2007). Serbest radikallere karşı savunma sisteminde bulunan, serbest radikallerin birikimini ve lipid peroksidasyonun başlamasını önleyen süperoksit dismutaz, GPx ve CAT enzimleri hidrojen peroksidi (H₂O₂) dokulardan uzaklaştırarak antioksidan olarak görev yaparlar. Bu antioksidanların hücre içi düzeyleri ve faaliyetleri arasında bir denge vardır (Mates vd. 1999). CCl₄ verilen sıçanların böbrek dokularında GSH, SOD ve CAT enzim aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı kaydedilmiştir (Szymonik-Lesiuk vd. 2003, Tirkey vd. 2005, Manna vd. 2006, Adewole vd. 2007, Karadeniz vd. 2009, Bashandy ve Alwasel 2011, Çetin ve Çetin 2011, Ganie vd. 2011, Anand vd. 2012, El-Maddawy ve Gad 2012, Makni vd.2012). Ancak yapılan diğer çalışmalarda CCl₄ verilen sıçanların böbrek dokularında GSH, SOD ve CAT enzim aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir (Öztürk vd. 2003, Ramarajan vd. 2012). Bu çalışmada CCl₄ uygulanmış sıçanların böbrek dokularında kontrol grupları ile karşılaştırıldığında GSH ve SOD enzim aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Ancak CAT enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Nitrik oksit vücudun çeşitli bölgelerinde yapılır ve birçok sistemde önemli bir rolü vardır (Jerca vd. 2002). Eşlenmemiş tek elektron içeren nitrik oksit anyon radikali ile reaksiyona girdikten sonra dokulara son derece zarar veren peroksinitriti oluşturmaktadır (Tamer vd. 2000). Nitrik oksit ateroskleroz, diyabet, iskemi-reperfüzyon ve inflamasyon gibi farklı patolojik süreçlere katılımı hala araştırılmaktadır (Jerca vd. 2002). Yapılan çalışmalarda 10ml/kg ve 1.6g/kg tek doz olarak CCl₄ verilen sıçanların böbrek dokularının nitrik oksit düzeylerinde artma gözlenmiştir (Karadeniz

vd. 2009, Çetin ve Çetin 2011). Bizim çalışmamızda farklı olarak 1.5 ml/kg CCl₄ uygulandığında CCl₄ grubuna ait böbrek dokularında nitrik oksit düzeyinde artma tespit edilmemiştir.

CCl₄'ün tek başına böbrek dokusunda belirgin histopatolojik hasara yol açtığı bildirilmiştir (Adewole vd. 2007). Ögetürk vd. (2005a,b), CCl₄'e bağlı böbrek doku hasarının daha çok korteks bölgesinde görüldüğünü medulla bölgesinin ise daha az etkilendiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada CCl₄ hasarı belirgin olarak araştırmacıların bulgularına uygun şekilde korteks bölgesinde gözlenmiştir. CCl₄'e bağlı böbrek hasarı tübül epitelinde yaygın vakuolar dejenerasyon ve konjesyon ile karakterize edilmiştir (El-kholy vd. 2013). Diğer çalışmada CCl₄ toksikasyonu ile oluşan böbrek doku hasarı incelendiğinde belirgin glomerüler ve tübüler hasar tespit edilmiştir (Makni vd. 2012). CCl₄ ile oluşturulan böbrek hasarı incelendiğinde böbrek doku Bowman kapsülü ve glomerul dejenerasyonu, hücresel vakuolizasyon, nekrotik alanlar (Venkatanarayana vd. 2012) ve belirgin inflamatuvar değişiklikler gösterilmiştir (Manjrekar vd. 2008). Fırat vd. (2009) yaptıkları çalışmalarında glomerül kapillerinde genişleme, proksimal tübül hücrelerinin bazal kısımlarında vakuolizasyon ayırt etmişlerdir. Olagunju vd (2009) glomerüler ve tübüler hücrelerin hidropik dejenerasyonu ile karakterize edilen şiddetli glomerüler ve tübülo-interstisyel nekroz saptamışlardır. İlave olarak böbrek dokusunda epitel hidropik değişikliği, dejeneratif değişiklikler, yoğun kortikal hasar, fokal glomerüler nekroz, glomerüllerde hiposellülerite ve küçülme, tübüler dilatasyon, epitel hücre vakuolizasyonu ve nekrotik alanlar, glomerüler bazal membran kalınlaşması, interstisyel hücre infiltrasyonu ve bazı tübüllerde intraluminal kast gösterilmiştir (Öztürk vd. 2003, Adewole vd. 2007, Jaramillo-Juarez vd. 2008, Morakinyo vd. 2012, Ramarajan vd. 2012). Çalışmamızda araştırmacıların bulgularına uygun şekilde CCl₄ uygulanmış grupta böbrek doku korteks bölgesinde belirgin glomerüler ve tübüler değişimler tespit edilmiştir. Tübüllerde dilatasyon, tübülo-interstisyel bölgelerde belirgin hemorajik alanlar, proksimal tübül hücrelerinde fırçamsı kenar kaybı, genel olarak proksimal ve distal tübül hücrelerinde şişme, vakuolizasyon ve ayrılma, glomerüler atrofi, belirgin glomerüler konjesyon, Bowman kapsülü bazal membranında kalınlaşma ve kortiko-medüller bölgede intersitisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonu saptanmıştır.

Böbrek fibrozisi organ kaybına sebep olan primer patolojik bir süreçtir (Schnaper 2005). Kronik böbrek hastalığında görülen fibrozis hücre-dışı matriks birikimi ile karakterize edilmektedir (Efstratiadis vd. 2009). CCl₄ ile oluşturulan böbrek hasarı sonucu bağ dokuda belirgin bir kollajen artışı olduğunu dikkati çekmiştir. Bu artışın fibrozis oluşumunun bir göstergesi olduğu ileri sürülmüştür (Ögetürk vd. 2005a,b, Hamed vd. 2012, Hermenean vd. 2013). Bizim çalışmamızda da CCl₄ uygulanan grupta tübulo-interstisyel alanda ve kortiko-medüller bölgede kollajen lif artışı gözlenmiştir.

CCl₄'ün katalaz enzimi dahil dokuda bulunan antioksidan enzim düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (Adewole vd. 2007). Katalaz hemo-protein enzimlerinden biridir (Morikawa ve Harada 1969). Johkura vd. (1998), sıçan böbreğinde peroksizomal enzimlerin immünohistokimyasal lokalizasyonunu incelemişlerdir. Böbrek doku korteksinde proksimal tübül epitelinde belirgin katalaz immünreaktivite görüldüğünü, medulla bölgesinde ise katalaz immünreaksiyonuna rastlanmadığını bildirmişlerdir. Sığırlarda yapılan bir çalışmada böbrek dokusunda katalazın spesifik olarak proksimal tübül hücrelerinin sitoplazmasında lokalize olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada; proksimal tübül epitel hücre çekirdeklerinde ve distal tübül hücrelerinde katalaz immünreaksiyonuna rastlanmadığı bildirilmiştir (Morikawa ve Harada 1969). Bingöl ve Kocamış (2010) çalışmalarında, deneysel olarak diyabet oluşturulmuş farelerin böbrek dokularında katalaz enzim lokalizasyonunu araştırmışlardır. Farelerin proksimal tübül epitel hücrelerinin sitoplazmasında katalaz immünreaksiyonu gözlemişlerdir. Ancak proksimal tübül hücre çekirdeklerinde ve distal tübül hücrelerinde katalaz immünreaksiyonuna rastlamamışlardır. Çalışmamızda genel olarak kontrol ve CCl₄ gruplarında spesifik olarak katalaz immünreaksiyonu görülmüştür. Ancak CCl₄ grubunun kontrol gruplarına göre zayıf katalaz immünreaktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir.

CCl₄ serbest radikal oluşumuna yol açan bir toksindir (Çetin ve Çetin 2011). Aşırı serbest radikal üretimi nekroz ya da apoptoz şeklinde hücre ölümüne yol açar (Kunduzova vd. 2003). Apoptozisin erken evrelerinde kaspaz proteinleri salınmaya başlar ve aktive olurlar. Kaspaz enzimleri hücrenin diğer sindirim enzimlerini de harekete geçirirler. Kaspaz enzimi aktive olduğunda hücre hem morfolojik hem de

biyokimyasal olarak değişir. Apoptosiz sırasında ilk görev alan kaspazlar 2, 8 ve 10 gibi başlatıcı kaspazlardır. Sonraki aşamalarda ise kaspaz 3, 6 ve 7 effktr kaspazlar olarak görev alırlar (Yıldırım vd.2010).

Apoptoz renal iskemi reperfüzyon hasarı sırasında hücre ölümü için birincil bir mekanizmadır. Bu nedenle kaspaz-3 aktivitesi iskemi-reperfüzyon çalışmalarda çok araştırılmıştır (Kunduzova vd. 2003, Sinanoğlı vd. 2012). CCl₄ ile oluşturulmuş nefrotoksisitede kaspaz-3 aktivitesi ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Yapılan alışmalarda CCl₄'n özellikle hepatositlerde apoptoza yol açtığı (Shi vd.1998) ve hepatositlerin kaspaz-3 immünreaktivite gösterdiği (Sun vd.2001, Cai vd.2005) ortaya konmuştur.

Zhang (2006), araştırmasında sıçanlara 3ml/kg dozunda 2 ve 6 hafta subkutan olarak CCl₄ vermiştir. 2 hafta CCl₄ uygulanan grubun böbrek dokusunda proksimal tübül hücrelerinde apoptoza rastlamıştır. Ancak bu hücrelerde Kaspaz-3 ve Bax pozitif ekspresyon tespit etmemiştir. 6 hafta CCl₄ uygulanmış sıçanların böbrek dokusunda az apoptotik proksimal epitel hücreleri görülürken distal tübüllerde daha fazla apoptotik hücre saptamıştır. Bu grupta Kaspaz-3 ve Bax pozitif ekspresyonu imnohistokimyasal olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda CCl₄ uygulanmasının sıçan böbrek dokusunda apoptoza yol açıp amadığı araştırılmıştır. CCl₄ grubuna ait böbrek dokusunda kontrol grupları ile kıyaslandığında yoğun kaspaz-3 immünreaktivitesi saptanmıştır. Oksidatif hasar CCl₄ nefrotoksisitesi oluşturmak için temel bir mekanizmadır. Çalışmamızda CCl₄'e bağlı nefrotoksisite sonucunda kaspaz-3 enzim aktivasyonu tespit edilmiştir. Bundan dolayı CCl₄'n apoptoz oluşumuna yol açtığı ifade edilebilir. Ancak yapılan çalışmalarda ilave olarak böbrek dokusunda apoptozun belirlenebilmesi için TUNEL tekniğinin de kullanılması önerilmektedir.

Bu çalışmada melatonin ve D vitamininin hem koruyucu hem de iyileştirici rollerinin anlaşılması için 2 ilave grup oluşturulmuştur. Melatonin ve D vitamini 10 hafta boyunca CCl₄ ile birlikte uygulanmıştır. İlave gruplarda CCl₄ enjeksiyonu kesilip 2 hafta sadece melatonin ve D vitamini verilmesine devam edilmiştir.

Melatoninin güçlü bir antioksidandır. Klasik antioksidanlardan farklı olarak melatonin redoks döngüsünü uğramaz ve bu şekilde oksidasyon gelişmesine bir katkısı olmamaktadır (Tan vd. 2000, Gültekin ve Hiçyılmaz 2007). Melatonin nefrotoksisiteye karşı kullanılan güçlü bir antioksidandır (Yousef vd. 2011, Kılıç vd. 2013). Böbrek dokusunda oluşan oksidatif hasarı koruduğu bildirilmiştir (Lee vd. 2012, Ramamoorthy vd. 2014). CCl_4 'e bağlı böbrek hasarına karşı melatoninin koruyucu etkisi tespit edilmiştir (Ögetürk vd. 2005a, Adewole vd. 2007).

Ögetürk vd. (2005a), Wistar albino sıçanlara 4 hafta boyunca günde bir subkutan olarak 0.5ml/kg CCl_4 verilmesi ile beraber 25mg/kg dozunda melatonin vermişlerdir. Çalışmanın bulgularına göre CCl_4 etkisi ile böbrek doku ağırlıklarının arttığı gözlenmiştir. Melatonin uygulanmış sıçanların böbrek doku ağırlıklarının kontrol grubuna yakın olduğu tespit edilmiştir. Alınan serum örneklerinde melatonin ile tedavi edilen CCl_4 grubunda üre düzeylerin azaldığı bildirilmiştir. Histolojik olarak melatoninin böbrek dokusunda görülen dejeneratif hasarı önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. Adewole vd. (2007), sıçanlara günde bir subkutan olarak 3 gün 5mg/kg melatonin yolla sadece melatonin verdikten sonra 8 hafta boyunca melatonin ve 1ml/kg CCl_4 'ü subkutan olarak enjekte etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda melatonin uygulanan CCl_4 grubunda böbrek doku ağırlıklarının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Melatonin tedavisinin serum örneklerinde yüksek nitrit, üre ve kreatinin seviyesini önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Böbrek doku örneklerinde melatonin uygulanan CCl_4 grubunda tiobarbitürik asit reaktif maddelerin (TBARS) seviyeleri azalırken, GSH, SOD ve katalaz seviyelerinin yükseldiğini bildirilmiştir. Histolojik olarak melatonin verilen grupta böbrek dokusunun normal morfolojisinin korunduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda 10mg/kg dozunda melatonin subkutan olarak hergün verilmiştir. Diğer araştırmacıların bulgularına benzer şekilde, sadece CCl_4 uygulanan grupta böbrek kitlesinin arttığı melatonin ile tedavi edilen CCl_4 grubunda ise azaldığı tespit edilmiştir. Ancak melatonin tedavisi CCl_4 grubunda serum üre artışında bir etki göstermemiştir. CCl_4 grubunda yüksek seviyede bulunan MDA'nın melatonin ile tedavi edilen gruplarda azaldığı gözlenmiştir. CCl_4 grubuna ait böbrek dokularında GSH ve SOD düzeyleri azalmıştır. Melatonin uygulaması ile GSH düzeyin arttığı gösterilmiştir. SOD düzeyi ise 10 hafta melatonin uygulanan CCl_4 grubunda artmamıştır. Ancak 12 hafta melatonin

verilen CCl₄ grubunda SOD düzeyinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda melatoninin koruyucu etkisi ile ilgili histolojik sonuçların oksidatif hasara karşı antioksidan sonuçlarla da desteklendiği gösterilmiştir. Histolojik olarak CCl₄'e bağlı böbrek dokusunda oluşan hasarın melatonin tedavisi ile azaldığı ve özellikle 12 hafta melatonin uygulanmış CCl₄ grubu böbrek dokularında proksimal tübül hücrelerinin apikalinde fırçamsı kenarların korunduğu gözlenmiştir. 12 hafta melatonin uygulanan CCl₄ grubu sıçanlarda PAS boyası sonuçlarına göre kontrol gruplarına yakın bir böbrek doku görüntüsü izlenmiştir.

Katalaz enziminde oluşan hasarın melatonin ile önlenemediği ileri sürülmüştür (Mayo vd. 2003). Çalışmamızda böbrek dokusunda katalaz enziminin antioksidan aktivitesi biyokimyasal olarak belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada katalaz enzim aktivitesi immünohistokimyasal sonuçlarla da desteklenmiştir. CCl₄ grubuna ait böbrek dokusunda zayıf katalaz immünreaktivitesi saptanmıştır. Araştırmacıların bulguları ile uyumlu olarak melatonin tedavisi ile bu enzimin böbrek dokusunda korunduğu gözlenmiştir.

Melatonin hücre apoptozu ve nekrozunun engellenmesinde ve kaspaz-3 aktivitesininin bloke edilmesinde önemli bir role sahiptir (Kunduzova vd. 2003, Sinanoğlu vd. 2012). İskemi-reperfüzyon renal hasarı ile yapılan çalışmalarda melatoninin renal tübüler apoptozis üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Sinanoğlu vd. 2012). Bu çalışmada da CCl₄ grubunda yoğun kaspaz-3 immünreaktivitesinin melatonin tedavisi ile azaldığı ve dolayısıyla melatoninin böbrek dokusunda antiapoptotik etkiye sahip olabileceği düşünülmüştür.

D vitamini biyolojik olarak aktif değildir. Biyolojik fonksiyonları gerçekleştirmek için önce karaciğerde 25-hidroksivitaminD₃'e metabolize edilmesi ve daha sonra böbrekte aktif formu olan 1 alfa 1,25-dihidroxyvitamin D₃'e dönüştürülmesi gerekir. D vitaminin aktif formu renal tübüler hücrelerin de dahil olduğu çeşitli hücrelerde metabolik etkisini gösterir. D vitamini kalsiyum ve fosfat homeostazını düzenler. Bunun yanı sıra D vitamini 1% kalsiyum geri emiliminde rol oynayan distal tübüllerin

uyarılmasında önemli rol oynamaktadır (Makin vd. 1989, Zehnder vd. 1999, Deluca 2004).

Kronik renal hastalarda 1 alfa hidroksilaz aktivitesinin azalmasından dolayı D vitamini eksikliğinin yaygın olduğu tespit edilmiştir. 1 alfa hidroksilaz 25-hidroksivitamin D₃'ün böbrekte son hidroksilasyon aşamasında ve 1,25 OH₂D₃ formuna dönüştürülmesinde rol oynamaktadır. (Andress 2006, Levin vd. 2007, Querfeld ve Mak 2010). Düşük D vitamininin böbrek hastalığının ilerlemesine sebep olduğu gösterilmiştir (Melamed vd.2009).

Böbrek hasarında renin anjiotensin sistemi (RAS) etkin rol oynar (Hur vd. 2013). D vitamini renin ekspresyonunu baskılayarak renin anjiotensin sistemi üzerindeki negatif düzenleyici bir etkiye sahiptir (Freundlich vd. 2008). Yapılan çalışmalarda böbrekteki renin anjiotensin sistemin aktivasyonu sonucunda, D vitamini reseptörü bulunmayan farelerin böbrek dokularında ekstraselüler matriks birikimi, glomerüloskleroz (Zang vd. 2008), intersitisyel fibrozis ve tübüler atrofi (Zang vd. 2010) gibi ciddi böbrek hasarının gelişebildiği ortaya konmuştur. Parikalsitol ile tedavi edilen sıçan böbreklerinde renin anjiotensin sisteminin inhibe edilerek tübülointerstisyel ve glomerüler hasarın azaldığı gösterilmiştir (Freundlich vd. 2008).

Renal iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturmada önce D vitamini kullandığında tübüler hücre nekrozunun azaldığı ve tübüler hücre proliferasyonunun arttığı gösterilmiştir (Kim vd. 2005).

D vitamininin biyoaktif TGF-beta1 seviyeleri ve sinyalizasyon sisteminin düzenleyerek ve immünomodulator fonksiyon göstererek böbrek naklinde kronik rejeksiyonunun gelişimini değiştirebileceği ifade edilmiştir (Aschenbrenner vd. 2001).

D vitamini ile ilgili yapılan çalışmalarda CCl₄ nefrotoksitesine karşı D vitamininin etkisi ile ilgili yeterli kaynağa rastlanmamıştır. Çeşitli hayvan modellerinde yapılan böbrek ile ilgili çalışmalarda D vitamini ve analoglarının etkileri incelenmiştir. Schwarz

vd. (1998), sıçanlarda glomerüloskleroz üzerine 1,25 (OH)₂D₃ etkisini incelemişlerdir. 8 ve 16 hafta boyunca hergün 30ng/kg 1,25 (OH)₂D₃ uygulanmasında glomerüler hacmin önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir. Benzer şekilde, Hirata vd. (2002), sıçanlarda D vitamini analogu olan 22-Oksa-kalsitriol'ün böbrekteki etkisi incelemişlerdir. Bu analogun glomerulosklerozisi önemli ölçüde inhibe ettiğini saptamışlardır.

İskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulmadan 7 gün önce 0.5 µg/kg dozunda D vitamini intraperitoneal olarak ön tedavi amaçlı uygulandığında kan üre ve serum kreatinin düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir (Kim vd. 2005). Sinanoğlu vd. (2012), iskemi-reperfüzyon hasarından sonra böbrek fonksiyonlarında D vitamininin etkisini incelemişlerdir. Sıçanlara bir hafta önce 0.5µg/kg D vitamini 7 gün boyunca intraperitoneal olarak enjekte etmişlerdir. D vitamininin yükselmiş serum üre ve kreatinin düzeyini önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir. Benzer bir çalışmada parikalsitol tedavisinden iki hafta sonra kreatinin konsantrasyonunun azaldığı bildirilmiştir (Freundlich vd. 2008). Hur vd. (2013), gentamisin kaynaklı akut böbrek hasarı oluşturulmuş deneysel sıçan modelinde D vitamininin etkisini araştırmışlardır. Sıçanlara 8 gün boyunca 0.4mcg/kg subkutan olarak 1α, 25 (OH)₂D₃ her gün vermişlerdir. Ancak diğer araştırmacıların bulgularından farklı olarak D vitamini tedavisinin artmış üre ve kreatininin düzeylerini etkilemediğini saptamışlardır. Nefritik sıçanlarda yapılan benzer bir çalışmada 250 ng/ kg dozda D vitamini uygulanmasından sonra üre ve kreatinin düzeylerinde değişiklik tespit edilmemiştir (Panichi vd., 2001). Çalışmamızda D vitamini, 0.5 µg/kg dozunda 10 ve 12 hafta boyunca intraperitoneal olarak hergün enjekte edilmiştir. D vitamini verilmesinin bir kısım araştırmacıların bulgularına benzer şekilde serum üre düzeylerini azalttığı tespit edilmiştir.

Hur vd. (2013), gentamisin ile indüklenen böbrek hasarında glutatyonunun düşük seviyede bulunduğunu göstermişlerdir. D vitamini tedavisi ile glutatyon seviyesinde anlamlı artış olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda benzer şekilde D vitamini tedavisi CCl₄ toksikasyonu ile uyarılan düşük GSH düzeyini arttırmıştır.

Histopatolojik olarak Kim vd. (2005), araştırmalarında D vitamini ile muamele edilmiş sıçanların böbrek dokusunda proksimal tübül hücrelerinin iskemi-reperfüzyon grubu ile karşılaştırıldığında, daha az nekroza uğradığını ortaya koymuşlardır. Panichi vd. (2001), D vitamininin nefrit durumundaki morfolojik değişiklikleri inhibe ettiğini göstermişlerdir. 250 ng/kg dozunda D vitamini ile tedavi edilen sıçanlarda glomerullerde polimorfonükleer hücre birikiminin azaldığı gözlenmiştir. D vitamini ve analoglarının (parikalsitol) renal interstisyel fibrozis ve inflamasyonu azaltmada koruyucu bir etkiye sahip olduğu ileri sürülmüştür (Tian vd. 2007, Tan vd. 2009). Ayrıca D vitamininin tip I kollajen ve trombospodin-1 ekspresyonu baskıladığı da gösterilmiştir (Li vd. 2005). Çalışmamızda D vitamini ile tedavi edilen CCl₄ sıçanların böbrek dokusundaki degeneratif değişikliklerin, interstisyel inflamasyon ve kollajen lif artışının azaldığı gözlenmiştir.

Renal proksimal tübüller toksik substratlara karşı oldukça duyarlıdır. Bu tübüller fazla miktarda mitokondri içerir (Isaka vd. 2011). Mitokondriyal hasar mekanizmasının, akut böbrek zedelenmesi sırasında tübüler hücre nekrozu ve apoptotik süreçte önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (Brooks vd. 2009). D vitamini ile tedavi edilen sıçanlarda nefrit sıçanlara göre apoptotik hücre sayısının azaldığı gözlenmiştir (Panichi vd. 2001). Proapoptotik faktör Kaspaz-3 apoptoz mekanizmasında önemli rol oynamaktadır (Kunduzova vd. 2003). İskemi-reperfüzyon hasarı ile ilgili yapılan bir çalışmada iskemi-reperfüzyon grubunda tübüller ve glomerüllerde orta ve yoğun derecelerde kaspaz-3 immunoreaktivitesi saptanmıştır. Aynı çalışmada 7 gün boyunca intraperitoneal olarak 0.5 µg/kg dozunda D vitamini verildikten sonra tübüller ve glomerüllerde zayıf veya orta derecede kaspaz-3 immünoreaktivite gözlenmiştir (Sinanoğlu vd. 2012). Çalışmamızda 0.5 µg/kg dozunda D vitamininin intraperitoneal olarak 10 ve 12 hafta uygulandığı gruplarda CCl₄ grubu ile kıyaslandığında zayıf kaspaz-3 immünoreaktivitesi saptanmıştır. Bu sonuç, D vitamininin böbrek toksisitesine karşı antiapoptotik bir role sahip olduğunu düşündürmüştür.

Sonuç olarak; bu çalışmada CCl₄ ile kronik böbrek hasarı oluşturulup bu biyolojik ajanının nefrotoksik etkisi saptanmıştır. Melatonin ve D vitamininin hem koruyucu hem de iyileştirici etkileri biyokimyasal, histokimyasal ve immünohistokimyasal

parametrelerle tespit edilmiştir. Melatonin ve D vitamini tedavisinin, CCl₄'e bağı böbrek fonksiyon bozukluklarını engellemesi, lipid peroksidasyonunu azaltması, antioksidan aktiviteleri arttırması, histopatolojik değişiklikleri azaltması, kollagen lif birikimi ve artışını inhibe etmesi ve kaspaz-3 bağımlı hücre apoptozunu önlemesiyle böbrek hastalıklarının tedavisi için yeni terapötik hedeflerin oluşturulmasına önemli katkılar sağlayabileceği düşünülmüştür. CCl₄ ile oluşturulan nefrotoksisiteye karşı melatoninin ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Ancak kaspaz-3 aktivitesine bakılmamıştır. Çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak kaspaz-3 enzim aktivasyonu bakımından melatoninin CCl₄ ile indüklenmiş nefrotoksisiteye karşı antiapoptotik etkisi de tespit edilmiştir. Deneysel olarak CCl₄ ile oluşturulmuş nefrotoksisiteye karşı D vitamininin etkisi ile ilgili çalışmalara rastlanmamıştır. Bunun için D vitamini ile ilgili elde ettiğimiz bulgular orjinal olup klinik düzeyde böbrek hastalıklarının tedavisi ile ilgili ileri aşamalarda yapılacak çalışmalar için başlangıç teşkil edebileceği ileri sürülebilir.

KAYNAKLAR

- Abraham, P., Wilfred, G. and Cathrine, S.P. 1999. Oxidative damage to the lipids and proteins of the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. *Clinica Chimica Acta Journal*, 289: 177-179.
- Acuna, C.D., Escames, G., Carazo, A., Leon, J., Khaldy, H. and Reiter, R.J. 2002. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(2): 133–151.
- Adewole¹, S.O., Salako, A.A., Doherty, O.W. and Naicker, T. 2007. Effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced kidney injury in wistar rats. *African Journal of Biomedical Research*, 10: 153 – 164.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2005. Toxicological profile for carbon tetrachloride. US department of health and human services, public health service: Atlanta, GA.
- Akpolat, T., Utaş, C. ve Sleymanlar, G. 1996. Nefroloji El Kitabı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 1-23.
- Akşit, H. ve Bildik, A. 2008. Apoptozis. Yznc Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19(1): 55-63.
- Al-badr, W. and Martin K.J. 2008. Vitamin D and kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3: 1555-1560.
- Anand, T. and Gokulakrishnan, K. 2012. Amelioration of carbon tetrachloride induced oxidative stress in kidney tissues by ethanolic extract of *Hybanthus enneaspermus* in Wistar rats. *International Journal of Pharmaceutical Science and Health Care*, 2: 62-70.
- Anderson, T. 1997. Cecil Essentials of Medicine 4th edition. W.B. Saunders, 184-186. Philadelphia.
- Andress DL. 2006. Vitamin D in chronic kidney disease: A systemic role for selective vitamin D receptor activation. *Kidney International*, 69: 33–43.
- Anonymous. 1999. Web Sitesi: <http://www.inchem.org>. Erişim Tarihi: 17.08.2015.
- Anonymous. 2006. Web Sitesi: <http://www.jpqb.bjmu.edu>. Erişim Tarihi: 17.08.2015.
- Anonymous. 2012. Web Sitesi. <http://www.drmetinan.net>. Boşaltım sistemi fizyolojisi. Erişim Tarihi: 17.08.2015.

- Asangansi, I.E., Oshain, A.O. and Akinloye, A.O. 2005. Drug nephrotoxicity. *Ifemed journal of medicine*, 1-3.
- Aschenbrenner, J.K., Sollinger, H.W., Becker, B.N. and Hullet, D.A. 2001. 1,25-(OH) 2 D 3 alters the transforming growth factor -signaling pathway in renal tissue. *Journal of Surgical Research*, 100: 171–175.
- Aykaç, A.G., Uysal, M., Yalçın, A.S., Koçak- Toker, N., Sivas, A. and Öz, H. 1985. The effect of cronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology*, 36: 71-76.
- Balahoroğlu, R., Dülger, H., Özbek, H., Bayram, I. and Şekeroğlu, M.R.2008. Protective effects of antioxidants on the experimental liver and kidney toxicity in mice. *European Journal of General Medicine*, 5:157-164.
- Barret, K.M., Barman, S.M., Boitano, S. and Brooks, H.L. 2011. Ganong'un tıbbi fizyolojisi. Nobel tıp kitabevleri. 1:42-43. Türkiye.
- Bashandy, SA. and Alwasel SH. 2011. Carbon tetrachloride- induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: protective role of vitamin C. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 6: 283-292.
- Bingöl, S.A. and Kocamış, H. 2010. The gene expression profile by RT-PCR and immunohistochemical expression pattern of catalase in kidney tissue of both healthy and diabetic mice. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16 (5): 825-834.
- Birben, E., Sahiner, U.M., Sackesen ,C., Erzurum, S. and Omer, K. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5: 9-19.
- Brooks, C., Wei, Q., Cho, S.G. and Dong, Z. 2009. Regulation of mitochondrial dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(5): 1275-1285.
- Bülbül, M. 2006. Üst üriner sistem obstrüksiyonlarında perkütan nefrostomi öncesi ve sonrası biyokimyasal verilerin böbrek sintigrafi verileri ile fonksiyonel rezerv açısından karşılaştırılması. Uzmanlık tezi. T.C. Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Üroloji Kliniği. 51. İstanbul.
- Cai, Y., Gong, L.K., Qi, X.M., Li, X.H. and Ren, J. 2005. Apoptosis initiated by carbon tetrachloride in mitochondria of rat primary cultured hepatocytes. *Acta Pharmacologica Sinica*, 26: 969–975.

- Casini, A.F, Ferrali, M., Pompella, A., Maellaro, E. and Comporti, M. 1986. Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene-intoxicated mice. *American Journal of Pathology*, 123(3): 520-31.
- Claustrat, B., Burn, J. and Chazot, G. 2005. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews Journal*, 9:11-24.
- Çavuşoğlu, H. ve Yeğen, B.Ç. 2007. Tıbbi fizyoloji. Nobel tıp kitabevleri. 3: 40. Türkiye.
- Çetin, E. and Çetin, N. 2011. Protective effect of ghrelin against the oxidative brain and kidney injuries induced by carbon tetrachloride in rats. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 6(3): 195-200.
- Çimen, Ç., Öter, Ç., Demir, H. ve Savran, A. 2005. Rat eritrositlerinden elde edilen katalaz enziminin karakterizasyonu ve kinetiğinin incelenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16 (1):15-20.
- Daniels, W.M., Reiter, R.J., Melchiorri, D., Sewerynek, E., Pablos, MI. and Ortiz, G.G. 1995. Melatonin counteracts lipid peroxidation induced by carbon tetrachloride but does not restore glucose-6 phosphatase activity. *Journal of Pineal Research*, 19: 1-6.
- Deeb, K.K., Trump, D.L. and Johnson, C.S. 2007. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nature Reviews Cancer*, 7: 684-700.
- Deluca, H.F. 2004. Overview of general physiology features and functions of vitamin D. *American Society for Clinical Nutrition Journal*, 8: 1689S-96S.
- DeShon, N.D. 1979. Carbon tetrachloride. *kirk-othmer, Encyclopedia of Chemical Technology*, 3rd edition. Grayson, M. and Eckroth, D. John Wiley and Sons, Inc. 5:704-714. New York.
- Doğukan, A., Akpolat, N., Çeliker, H., İlhan, N., Bahçecioglu, H.I. and Günel, A.I. 2003 Protective effect of interferon on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity. *Journal of Nephrology*, 16: 81-84.
- Doherty, R.E. 2000. A history of the production and use of carbon tetrachloride tetrachloroethylene and 1,1,1-trichloroethane. Part (1) 1: 69-81. US.
- Efstratiadis, G., Divani, M., Katsioulis, E. and Vergoulas, G. 2009. Renal fibrosis. *Hippokratia*, 13, 4: 224-228.
- El-kholy, T.A., Hassanen, N.H.M. and Abbas, H.Y. 2013. Protection of the mushroom (shiitake "*Lentinus-edodes*) against carbon-tetrachloride-induced renal injury in rats. *Life Sciences Journal*, 10(1): 1701-1708.

- El-Maddawy, Z.K.H. and Gad, S.H.B. 2012. hepato-renal protection of silymarin in comparison with vitamin E in rats. *Global journal of pharmacology*, 6 (3): 236-244.
- Fırat, T., Kükner, A., Töre, F. and Ergür, B.U. 2009. The effect of low molecular weight heparin on kidney tissue of rats exposed to carbon tetrachloride. *Erciyes Medical Journal*, 31(4):299-304.
- Freundlich, M., Quiroz, Y., Zhang, Z., Zhang, Y., Bravo, Y., Weisinger, J.R., Li, Y.C. and Rodriguez- Iturbe, B. 2008. Suppression of renin-angiotensin gene expression in the kidney by paricalcitol. *Kidney International*, 74: 1394–1402.
- Ganie, SA., Haq, E., Hamid, A., Qurishi, Y., Mahmood, Z., Zargar, BA., Masood, A. and Zargar M.A. 2011. Carbon tetrachloride induced kidney and lung tissue damages and antioxidant activities of the aqueous rhizome extract of *Podophyllum hexandrum*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11: 1-10.
- Gitto, E., Tan, D.X., Reiter, R.J., Karbownik, M., Manchester, L.C., Cuzzocrea, S., Fulia, F. and Barberi, I. 2001. Individual and synergistic actions of melatonin: studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferoxamine in liver homogenates. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 53:1393–1401.
- Gültekin, F. and Hıçyılmaz, H. 2007. Renal deterioration caused by carcinogens as a consequence of free radical mediated tissue damage: a review of the protective action of melatonin. *Archives of Toxicology*, 81:675–681.
- Güven, A. ve Yılmaz, S. 2005. The effect of carbon tetrachloride (CCl₄) and ethanol (C₂H₅OH) on the determination of levels glutathione peroxidase, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and lipid peroxidation liver and kidney in goose. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 11(2):113-117.
- Hamed, M.A., Ali, S.A. and El-Rigal N.S. 2012. Therapeutic potential of ginger against renal injury induced by carbon tetrachloride in rats. *The Scientific World Journal*, 1-12.
- Hermenean, A., Ardelean, A., Stan, M., Herman, H., Mihali, C.V. Costache, M. and Dinischiotu, A. 2013. Protective effects of naringenin on carbon tetrachloride-induced acute nephrotoxicity in mouse kidney. *Chemico-biological interactions*, 205: 138-147.
- Horoz, M. ve Özgür, Ö. 2004. Akut böbrek yetmezliği. *Harran Tıp Fakültesi Dergisi*, 1(3):48-63.

- Hsu, S.M., Raine, L., and Fanger H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 29: 577-580.
- Hur, E., Garip, A., Camyar, A., Ilgun, S., Ozisik, M., Tuna, S., Olukman, M., Özdemir, Z.N., Sozmen, E.Y., Sen, S., Akcicek, F. and Duman, S. 2013. The effects of vitamin D on gentamicin-induced acute kidney injury in experimental rat model. *International Journal of Endocrinology*. Article ID 313528, 7 pages.
- İnan, Y. ve Karataş, E. 2007. Patoloji. TUS-DATA. 11-26, 279-301. Türkiye.
- Isaka, Y., Kimura, T. and Takabatake, Y. 2011. The protective role of autophagy against aging and acute ischemic injury in kidney proximal tubular cells. *Autophagy*, 7(9):1085–1087.
- Iturbe, B.R. and Garcia, G.G. 2010. The role of tubulointerstitial inflammation in the progression of chronic renal failure. *Nephron Clinical Practice*, 116(2):c81-8. doi: 10.1159/000314656.
- Jaramillo-Juarez, F., Rodriguez-Vazquez, M.L., Rincon-Sanchez, A.R., Martinez, M.C., Ortiz, G.G., Llamas, J., Posadas, F.A. and Reyes, J.L. 2008. Acute renal failure induced by carbon tetrachloride in rats with hepatic cirrhosis. *Annals of hepatology*, 7(4): 331-338.
- Jerca, L., Jerca, O., Mancaş, M., Constantinescu, I. and Lupuşoru, R. 2002. Mechanism of action and biochemical effects of nitric oxide (no•). *The Journal of Preventive Medicine*, 10 (2): 35-45.
- Johkura, K., Usuda, N., Liang, Y. and Nakazawa, A. 1998. Immunohistochemical localization of peroxisomal enzymes in developing rat kidney tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 46 (10): 1161-1173.
- Junqueira, L.C. and Carneiro, J. 2009. Temel histoloji. Nobel Tıp Kitapevleri. 19: 373-381. Türkiye.
- Karadeniz, A., Yıldırım, A. and Çelebi, F. 2007. Protective effect of Panax ginseng against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced oxidative brain injury in rats. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2:117-121.
- Karadeniz, A., Yıldırım, A., Karakoç, A., Kalkan, Y. and Çelebi, F. 2009. Protective effect of Panax ginseng on carbon tetrachloride induced liver, heart and kidney injury in rats. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 160: 237-243.

- Khan, M.R., Rizvi, W., Khan, G.N., Khan, R.A. and Shaheen, S. 2009. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats: Protective role of *Digera muricata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 122: 91-99.
- Khan, K.A., Akram, J. and Fazal, M. 2011. Hormonal actions of vitamin D and its role beyond just being a vitamin. A review article. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 3(3):65–72.
- Kilic, U., Kilic, E., Tuzcu, Z.T., M., Ozercan, I.H., Yılmaz, O., Sahin, F. and Sahin, K. 2013. Melatonin suppresses cisplatin-induced nephrotoxicity via activation of Nrf-2/HO-1 pathway. *Nutrition & Metabolism*, 10:7.
- Kim, Y.O., Li, C. and Sun, B.K. 2005. Preconditioning with 1,25- dihydroxyvitamin D3 protects against subsequent ischemia reperfusion injury in the rat kidney. *Nephron Experimental Nephrology*, 100(2):85–94.
- Kim, H.J., Bruckner, J.V., Dallas, C.E. and Gallo, J.M. 1990. Effect of dosing vehicles on the pharmacokinetics of orally administered carbon tetrachloride in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 102(1):50–60.
- Kim, Y.C., Yim, H.K., Jung, Y.S., Park, J.H. And Kim, S.Y. 2007. Hepatic injury induces contrasting response in liver and kidney to chemicals that are metabolically activated: Role of male sex hormone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 223: 56-65.
- Kim, S.H. And Lee, S.M. 2008. Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver. *Journal of Pineal Research*, 44(2):165–171.
- Kochupillai, N. 2008. The physiology of vitamin D : Current concepts. *Indian Journal of Medical Research*, 127: 256-262.
- Koroshi, A. and Idrizi, A. 2011. Renoprotective effects of vitamin D and renin-angiotensin system. *Hippokratia*, 15: 308-311.
- Kumar, A., Rinwa, P., Kaur, G. and Machawal, L. 2013. Stress: Neurobiology, consequences and management. *Journal of Pharmacy and BioAllied Sciences*, 5(2): 91-97.
- Kunduzova, O.R., Escourrou, G. and Seguelas, M.H. 2003. Prevention of apoptotic and necrotic cell death, caspase-3 activation, and renal dysfunction by melatonin after ischemia/reperfusion. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 17(8):872–874.
- Kuzey, G.M., Ozdamar, S.O. And Zergeroglu, S. 2007. Basic pathology. Güneş kitabevi, 19: 539-589, Turkey.

- Lee, IC., Kim, SH., Lee, SM., Baek, HS., Moon, C., Kim, SH., Park, SC., Kim, HC. and Kim, JC. 2012. Melatonin attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Archives of Toxicology*, 86(10):1527-36.
- Li, Y., Spataro, B., Yang, J., Dai, C. and Liu, Y. 2005. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits renal interstitial myofibroblast activation by inducing hepatocyte growth factor expression. *Kidney International*, 68: 1500–1510.
- Li, Y.C. 2007. Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system: mechanism and implication. *Cin*, 1-6.
- Makin, G., Lohnes, D., Byford, V., Rahul, R. and Jones, G. 1989. Target cell metabolism of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ to calcitroic acid. *Biochemistry journal*, 262:173-180.
- Makni, M., Chtourou, Y., Garoui, E.M., Boudawara, T. and Fetoui, H. 2012. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and DNA damage in rats: Protective role of vanillin. *Human and Experimental Toxicology*, 31: 844-852.
- Manjrekar, A.P., Jisha, V., Bag, P.P., Adhikary, B., Pai, M.M., Hegde, A. and Nandini, M. 2008. Effect of *phyllanthus niruri* Linn treatment on liver kidney and testes in CCl₄ induced hepatotoxic rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46: 514-520.
- Manna, P., Sinha, M. and Sil, P.C. 2006. Aqueous extract of *Terminalia arjuna* prevents carbon tetrachloride induced hepatic and renal disorder. *BMC Complementary and alternative medicine*, 6(33): 1-10.
- Marshall, K.A., Reiter, R.J., Poeggeler, B., Aruoma, O.I. and Halliwell, B. 1996. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 21: 307–315.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C. and Castro, I.N. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, 32(8): 595-603.
- Mayo, J.C., Tan, D.X., Sainz, R.M., Lopez-Burillo, S. and Reiter, R.J. 2003. Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: Functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free Radical Research*, 37:543–553.
- Mejia, E.G. and Ramirez-Mars M.V. 2002. Leaf extract from *Ardisia compressa* protects against 1-nitropyrene-induced cytotoxicity and its antioxidant defense disruption in cultured rat hepatocytes. *Toxicology*, 179: 151-162.
- Morakinyo, AO., Oludare, GO., Anifowose, AA. and Adegoke OA. 2012. Protective effects of alpha lipoic acid on carbon tetrachloride-induced liver and kidney damage in rats. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 3: 21-28.

- Morikawa, S. and Harada, T. 1969. Immunohistochemical localization of catalase in mammalian tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 17, 30-35.
- Mydlik, M. and Derzsiova, K. 2006. Liver and kidney damage in acute poisonings. *Bantao Journal*, 4(1): 30-33.
- Namıduru, E.S., Meram, İ. ve Tarakçıoğlu, M. 2001. Melatonin. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 2: 139-146.
- Olagunjua, J.A., Adeneyeb, A.A., Fagbohunkac, B.S., Bisugac, N.A., Ketikuc, A.O., Benebod, A.S., Olufowobic, O.M., Adeoyec, A.G., Alimic, M.A. and Adeleke, A.G. 2009. Nephroprotective activities of the aqueous seed extract of *Carica papaya* Linn. in carbon tetrachloride induced renal injured Wistar rats: a dose- and time-dependent study. *Biology and Medicine*, 1: 11-19.
- Onuoha, S.C. and Chinaka, N.C. 2013. Carbon tetrachloride induced renal toxicity and the effect of aqueous extract of *Gongronema latifolium* in Wistar albino rats. *Drug discovery*, 4: 15-16.
- Owen, J.K., Iggo, B. and Scandrett, F.J. 1954. Determination of creatinine in plasma or serum and in urine. *Biochemical Journal*, 58: 426-437.
- Ögetürk, M., Kus, I., Kavaklı, A., Oner, J., Kukner, A., and Sarsilmaz, M. 2005. Reduction of carbon tetrachloride-induced nephropathy by melatonin administration. *Cell biochemistry and function*, 23:85-92.
- Ögetürk, M., Kus, I., Colakoglu, N., Zararsiz, I., Ilhan, N. and Sarsilmaz, M. 2005. Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 273-280.
- Öner, A. 2009. Üriner sistem taş hastalıklığının belirti, tanı, semptomatik, medikal tedavisi ve kemolizis. *Sürekli Eğitimi Etkinlikleri*, 68:11-18.
- Özçelik, F., Erdem, M., Bolu, A. and Gülsün, M. 2013. Melatonin: Genel özellikleri ve psikiyatrik bozukluklardaki rolü. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar-current Approaches in Psychiatry*, 5(2): 179-203.
- Öztürk, F., Ucar, M., Oztürk, I.C., Vardi, N. and Batcioglu, K. 2003. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats. *Urology*, 62: 353-356.
- Panichi, V., Migliori, M. and Taccola, D. 2001. Effects of 1,25(OH)₂D₃ in experimental mesangial proliferative nephritis in rats. *Kidney International*, 60(1):87-95.

- Parashuram, T., Priti, C., Jaywant, J., Aruna, K. and Abhrak, B. 2013. Mediated Alterations in liver and kidney functions in male albino rats during carbon tetrachloride induced toxicity. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 4: 696-700.
- Pfaller, W. and Gstraunthaler, G. 1998. Nephrotoxicity testing in vitro- what we know and what we need to know. *Environmental health perspectives*, 106 (2): 559-569.
- Querfeld, U. and Mak, R.H. 2010. Vitamin D deficiency and toxicity in chronic kidney disease: in search of the therapeutic window. *Pediatric nephrology*, 25: 2413-2430.
- Ramarajan, L., Somasundaram, ST., Subramanian, S. and Pandian V. 2012. Nephroprotective effects of *Colpomenia sinuosa* (Derbes & Solier) against carbon tetrachloride induced kidney injury in Wistar rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 435-441.
- Ramamoorthy, H., Abraham, P. and Isaac, B. 2014. Preclinical efficacy of melatonin in the amelioration of tenofovir nephrotoxicity by the attenuation of oxidative stress, nitrosative stress and inflammation in rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 25(4): 387–399.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Osuna, C. and Gitto, E. 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress: a review. *Journal of Biomedical Research*, 7: 444–458.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C., Lopez-Burillo, S., Sainz, R.M. and Mayo, J.C. 2003a. Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogenbased toxic reactants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 527:539–548.
- Reiter, R.J., Tan, D.X., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Leon, J. and Czarnocki, Z. 2003b. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4):1129–1146.
- Reiter, R.J. 1995. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochemistry International*, 27: 453–460.
- Rincon, A.R., Covarrubias, A., Pedraza-Chaverri, J., Poo, J.L., Armendariz-Borunda J. and Panduro, A. 1999. Differential effect of CCl₄ on renal function in cirrhotic rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 51: 199-20.
- Ruprah, H., Mant, T.G.K. and Flanagan, R.J. 1985. Acute carbon tetrachloride poisoning in 19 patients: implications for diagnosis and treatment. *Lancet*, 1: 1027- 1029.

- Sabuncuoğlu, S. ve Özgüneş, H. 2011. Kemoterapi, serbest radikaller ve oksidatif stres. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 31 (2): 137-150.
- Sainz, R.M., Mayo, J.C., Reiter, R.J., Tan, D.X. and Rodriguez, C. 2003. Apoptosis in primary lymphoid organs with aging. Microscopy Research and Technique, 62(6):524–539.
- Saltoğlu, N. 2008. Toplum kökenli üriner sistem enfeksiyonlarına yaklaşım. Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri, 61:139-150.
- Schnaper, H.W. 2005. Renal fibrosis. Springer, 117:45-69.
- Sener, G., Tosun, O., Sehirli, A.O., Kacmaz, A., Arbak, S., Ersoy, Y. and Ayanoglu-Dulger, G. 2003. Melatonin and N-acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. Life Sciences, 72: 2707-2718.
- Set, T. ve Şahin, E.M. 2003. Birinci basamak hekim için böbrek fonksiyon testleri. Sürekli Tıp Eğitim Dergisi, 12(9): 344-348.
- Shi, J., Aisaki, K., Ikawa, Y. and Wake, K. 1998. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. American journal of pathology, 153: 515-525.
- Sinanoglu, O., Sezgin, G., Ozturk, G., Tuncdemir, M., Guney, S., Aksungar, FB. and Yener, N. 2012. Melatonin with 1,25 Dihydroxyvitamin D3 Protects against Apoptotic Ischemia–Reperfusion Injury in the Rat Kidney. Informa Healthcare USA, Inc Renal Failure, 34(8): 1021–1026.
- Slater, T.F. and Sawyer, B.C. 1971. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reaction in rat liver fractions in vitro. Inhibitory effects of free radical scavengers and other agents. Journal of Biochemistry, 123: 823-828.
- Sun, F., Hamagawa, E., Tsutsui, C., Ono, Y., Ogiri, Y. and Kojo, S. 2001. Evaluation of oxidative stress during apoptosis and necrosis caused by carbon tetrachloride in rat liver. Biochimica et Biophysica Acta, 1535(2): 186-91.
- Symonik-Lesiuk, S.S., Czechowska, G., Stryjecka-Zimmer, M., Slomka, M., Madro, A., Celinski, K. and Wielosz, M. 2003. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, 10: 309-315.
- Şen, S. 2005. Hücre zedelenmesi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Dergisi, 1-15.

- Tabacco, A., Meiattini, F., Moda, E. and Tarli, P. 1979. Simplified enzymic/colorimetric serum urea nitrogen determination. *Clinical Chemistry*, 25: 336-337.
- Tamer, I., Polat, G., Eskandari, G., Ercan B. and Atik, U. 2000. Serbest Radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1: 52-58.
- Tan, D.X., Pöeggeler B., Reiter, R.J., Chen, S. Manchester, L.C. and Barlow-Walden, L.R. 1993. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Letters*, 70(1-2):65-71.
- Tan, X., He, W. and Liu, Y. 2009. Combination therapy with paricalcitol and trandolapril reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Kidney International*, 76: 1248–1257.
- Tan, D.X., Manchester, L.C., Reiter, R.J., Qi, W.B., Karbownik, M. and Calvo, J.R. 2000. Significance of melatonin in anti oxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept*, 9(34):137–159.
- Tan, D.X., Reiter, R.J. and Manchester, L.C. 2002. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2: 181–19.
- Tekelioğlu, M. 2002. Özel histoloji ince yapı ve gelişme. Ankara üniversitesi kitapevi. 8: 191-199. Ankara.
- Thrall, K.D., Vucelick, M.E. and Gies, R.A. 2000. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 60: 531–548.
- Tian, J., Liu, Y., Williams, L.A. and Zeeuw, D. 2007. Potential role of active vitamin D in retarding the progression of chronic kidney disease. *Nephrology dialysis transplantation*, 22: 321-328.
- Tirkey, N., Pilkhwai, S., Kuhad, A. and Chopra, K. 2005. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbontetrachloride in rat liver and kidney. *BMC Pharmacology*, 5, 2.
- Topal, T., Öter, Ş. ve Korkmaz, A. 2009. Melatonin ve kanser ilişkisi. *Genel Tıp Dergisi*, 19(3): 137- 143.
- Trinder, P. 1969. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *Journal of Clinical Pathology*, 22: 158-161.

- Tüközkan, N., Erdamar, H. and Seven, I. 2006. Measurement of Total Malondialdehyde in Plasma and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid Assay. *Fırat Tıp Dergisi*, 11(2): 88-92.
- Urata, Y., Honma, S., Goto, S., Todoroki, S., Ueda, T., Cho, S., Honma, K. and Kondo, T. 1999. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 27:838–847.
- Venkatanarayana G, Sudhakara G, Sivajyothi P, Indira P. Protective effects of curcumin and vitamin E on carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity in rats. *Excli Journal* 2012; 11: 641-650.
- Vijayalaxmi, Thomas, C.R., Reiter, R.J. and Herman, T.S. 2002. Melatonin: From basic research to cancer treatment clinics. *Journal of Clinical Oncology*, 10: 2575-2601.
- Weinreich, Z., Müller, A., Wüthrich, R.P., Booy, C. and Binswanger, U. 1996. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and the synthetic vitamin D analogue, KH 1060, modulate the growth of mouse proximal tubular cells. *Kidney Blood Press Research*, 19: 325–331.
- Weyers, A., Gorla, N., Ugnia, L., Garcia Ovando, H. and Chesta, C. 2001. Increase of tissue lipid hydroperoxides as determination of oxidative stress. *Biocell Journal*, 25(1):11–15.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B. 2010. Moleküler biyoloji. Nobel yayın dağıtım. 12: 425-433. Türkiye.
- Yıldırım, I., Magden, K. and Hur E. 2013. Infection inflammation and vitamin D. *Clinical Microbiology*, 2: 1-5.
- Yoni, Y., Hattori, A., Tsutsui, K., Okawa, M. and Ishizuka, B. 2010. Effect of melatonin: basic studies and clinical applications. *Anti-aging Medicine*, 7(7): 85-91.
- Yoshikawa, T. and Natio, Y. 2002. What is oxidative stress?. *The Journal of the Japan Medical Association*, 124 (11): 1549-1553.
- Yousef, J.M., Chen, G., Hill, P.A., Nation, R.L. and Li, J. 2011. Melatonin attenuates colistin-induced nephrotoxicity in rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(9):4044-4049.
- Yörükoğlu, K. 2005. Böbrek hücreli kanserlerde sınıflama, sitogenetik ve patolojik prognostik faktörler. *Türk Üroloji Dergisi*, 31(3): 305-317.

- Zhang, Z., Sun, L., Wang, Y., Ning, G., Minto, A.W., Kong, J., Quigg, R.J. and Li, Y.C. 2008. Renoprotective role of the vitamin D receptor in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 73:163-171.
- Zhang, R. and Naughton D.P. 2010. Vitamin D in health and disease: Current perspectives. *Zhang and Naughton Nutrition Journal*, 9(65): 1-13.
- Zhang, Y., Kong, J., Deb, D.k., Chang, A. and Li, Y.C. 2010. Vitamin D Receptor Attenuates Renal Fibrosis by Suppressing the Renin-Angiotensin System. *Journal of American Society of Nephrology*, 21(6): 966–973.
- Zheng, Z., Shi, H., Jia, J., Li, D. and Lin, S. 2013. Vitamin D supplementation and mortality risk in chronic kidney disease: a meta-analysis of 20 observational studies. *BMC Nephrology*, 14 (199): 1-13.
- Zehnder, D., Bland, R., Walker, EA., Bradwell, AR. Howie, AJ., Hewison, M. and Stewart, P.M. 1999. Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase in the human kidney. *Journal of American Society of Nephrology*, 10:2465-2473.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı Safa Mohamed Elmustafa Osman ELMUBARAK
Doğum Tarihi 30.10.1982
Doğum Yeri Sudan
Medeni Durumu Evli
Adres İlk Bahar Mahallesi. Sinpaş Altın Oran Konutları. Panorma 38 Blok. Daire No 11. Oran. Çankaya. Ankara
Telefon 05495911000
E- posta safa.mustafa@hotmail.co.uk
Sürücü Belgesi B (2009)

Eğitim Durumu

Lise : Medeni lisesi (1999)

Lisans : Alneelain Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü (2005)

Y.Lisans- Doktora: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans- Doktora Tezi: Sıçan Böbrek Dokusunda Karbon Tetraklorür (CCl₄) Toksisitesine Karşı Melatonin ve D Vitamininin Koruyucu Etkisi.

Danışman: Prof. Dr. Nesrin ÖZSOY ERDAŞ

Tez çalışmasının Kurumlar:

1. Hayvan deneyleri: Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezinde (GÜDEM) gerçekleştirilmiştir.
2. Kan Biyokimya analizleri: Düzen Norwest Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.
3. Antioksidan Enzimlerin Ölçülmesi: Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Bölümünde gerçekleştirilmiştir.
4. Histokimyasal işlemler: Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsünde gerçekleştirilmiştir.
5. İmmunhistokimyasal işlemler: Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

AKADEMİK/ MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Alneelain Üniversitesi	SUDAN	Hartum	Tıbbi Mikrobiyoloji	Araştırma Görevlisi	2005-2006
Tobb-ETU Hastanesi	TÜRKİYE	Ankara	Laboratuvar	Stajer biyolog	2010
Atatürk Hastanesi	TÜRKİYE	Ankara	Laboratuvar	Stajer biyolog	2014-Devam ediyor

ÇALIŞTIĞI KONULAR

Histology, Patoloji, Oksidatif Stres, Biyokimya

Yayınlar (SCI)

Elmubarak, SMEO., Ozsoy, N. (2015). Histoprotective effect of vitamin D against carbon tetrachloride nephrotoxicity in rats. Human and Experimental Toxicology: 1-11. DOI: 10.1177/0960327115598387. SAGE.

Ulusal Kongre Sunumu

1. Dilşad ÖZERKAN, Fevziye VURAL, Nesrin ÖZSOY, Suna CEBESÖY, **Safa Mohammed Elmustafa Osman ELMUBARAK** “Deneyisel Karbontetraklorür Toksisitesinde Soleus Kas Hasarı ve D Vitamininin Rolü” (2013) (1.Zooloji Kongresi).
2. Fevziye VURAL, Dilşad ÖZERKAN, Suna CEBESÖY, Nesrin ÖZSOY, **Safa Mohammed Elmustafa Osman ELMUBARAK** “Karbontetraklorür Uygulanmış Sıçan Soleus Kası Üzerine Melatoninin Etkisi” (2013) (1.Zooloji Kongresi).

Uluslararası Kongre Sunumu

1. **Safa Mohamed Elmustafa Osman ELMUBARAK**, Nesrin ÖZSOY “ Histoprotective Effect of Vitamin D against Carbon tetrachloride (CCl₄) Nephrotoxicity in Rats” (2014) (3. Molecular biyoloji and biyoteknoloji kongresi).

Görev aldığı projeler:

1. Ankara Üniversitesi BAP- Akciğer Dokusunda Karbon Tetraklorür CCl₄ ile Oluşturulan Oksidatif Hasara Karşı Melatonin ve D Vitamininin Koruyucu etkisi (2014-2015).

Yabancı Diller:

1. İngilizce: Okuma, Yazma, Konuşma
2. Türkçe: Türkçe diploması

Bilgisayar Bilgisi:

Microsoft word, excel, power point, picture manager.

Hobi:

Resim, internet.