



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**RATLARDA SODYUM FLORİD İLE OLUŞTURULAN
TOKSİKASYONDA KARVAKROLÜN BÖBREKLER
ÜZERİNE ETKİSİ**

Gizem ARALAN

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. Berrin SALMANOĞLU

ANKARA

2019

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA SODYUM FLORİD İLE OLUŞTURULAN
TOKSİKASYONDA KARVAKROLÜN BÖBREKLER
ÜZERİNE ETKİSİ**

Gizem ARALAN

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Berrin SALMANOĞLU**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
18L0239005 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ANKARA
2019**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Ratlarda Sodyum Florid ile Oluşturulan Toksikasyonda Karvakrolün Böbrekler Üzerine Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Gizem ARALAN

Tarih: 04.10.2019

İmza:

KABUL VE ONAY


Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalı'nda
Gizem ARALAN tarafından hazırlanan
“Ratlarda Sodyum Florid ile Oluşturulan Toksikasyonda Karvakrolün Böbrekler
Üzerine Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 04.10.2019

Prof. Dr. Berrin SALMANOĞLU
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Ögünç MERAL
Ankara Üniversitesi
Raportör


Prof. Dr. Tevhide SEL
Ankara Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. Gülcan AVCI
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Metin ÖĞÜN
Kafkas Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix
1. GİRİŞ	
1.1 Flor Elementi ve Doğada Bulunuşu	3
1.2. Florür Metabolizması	6
1.3. Uygun Miktarda Florür Alımı ve Yararları	10
1.4. Fazla Miktarda Florür Alımı ve Zararları	12
1.5. Florun Böbrekler Üzerine Etkisi	17
1.6. Böbrek Hastalıklarının Tespitinde Yararlanılan Biyokimyasal Parametreler	20
1.6.1. Kan Üre Azotu (BUN) ve Kreatinin (CR)	20
1.6.2. Clusterin ve KIM – 1 (Kidney Injury Molecule – 1)	21
1.7. Oksidatif Stress ve Antioksidan Sistemi	23
1.7.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	26
1.7.2. Flor ve Oksidatif Stres	28
1.7.3. Antioksidan Sistemi	31
1.7.4. Karvakrol	34
2. GEREÇ VE YÖNTEM	
2.1. Materyal	39
2.1.1. Hayvanların Gruplandırılması	40
2.1.2. Sodyum Florid’li (NaF) İçme Suyunun Hazırlanması	42
2.1.3. Karvakrolün Hazırlanması	42
2.1.4. %2,5 Dimetil Sülfoksit Çözeltisi Hazırlanması	43
2.2. İlk Kan Örneklerinin Alınması	43
2.3. Uygulamaların Yapılması	44
2.4. Sakrifikasyon Sonrası Kan Örneklerinin Alınması	45
2.5. Sakrifikasyon Sonrası Böbrek Örneklerinin Elde Edilmesi	46
2.6. Böbrek Doku Kesitlerinin Alınması, Boyanması ve Histopatolojik İncelemelerin Yapılması	48
2.7. Böbrek Dokusunun Homojenizasyonu	48
2.8. Superoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GPx) ve Tiyobarbitürik Asit Reaktif Substans (TBARS) Parametrelerinin Ölçülmesi	49
2.8.1. Superoksit Dismutaz (SOD) Analizi	49
2.8.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Analizi	51
2.8.3. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Substans (TBARS) Analizi	52

2.9. Clusterin ve KIM – 1 (Kidney Injury Molecule – 1) Parametrelerinin Ölçülmesi	54
2.9.1. Clusterin Analizi	55
2.9.2. KIM – 1 Analizi	56
3. BULGULAR	
3.1. Biyokimyasal Bulgular	62
3.2. Histopatolojik Bulgular	71
4. TARTIŞMA	
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	90
ÖZET	92
SUMMARY	93
KAYNAKLAR	94
EKLER	
Ek-1 Etik Kurul Raporu	114
ÖZGEÇMİŞ	116



ÖNSÖZ

Flor, yeryüzünde çok yaygın bulunan bir elementtir. Canlılar bir çok yolla flora maruz kalmaktadırlar. Belirli miktarda flor alınması kemik ve dişlerde yarar sağlarken, fazla flor alınması sonucunda flor toksikasyonu oluşmaktadır.

Flor toksikasyonu, gerek ülkemizde gerekse dünyada çok sık rastlanılan bir hastalıktır. Farklı yollarla fazla miktarda flora maruz kalınması sonucunda oluşan flor toksikasyonunun, kemik ve dişlerde olumsuz etkiler oluşturmasının yanında, organlarda da bazı zararlara neden olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Flor atılımının büyük çoğunluğunun idrar yoluyla gerçekleşmesinden dolayı, böbrekler, flor toksikasyonundan etkilenen organların başında gelmektedir.

Karvakrol, kekik gibi bitkilerin yapısında bulunan, antioksidatif özelliği yüksek olan bir maddedir. Yapılan çalışmalar, karvakrolün oksidatif strese karşı etkili olduğunu ortaya koymuştur.

Canlıların uzun süre ve fazla miktarlarda flora maruz kalması sonucu toksikasyonun oluşması, kronik bir hastalık durumunu ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle, çalışmaların deney hayvanları üzerinde yapılması, flor toksikasyonu olgularının oluşturulması yönünden etkili bulunmaktadır. Flora maruz kalma yollarının en yaygın olanının içme suyuyla alınması olduğu dikkate alınır, deney hayvanlarında içme suyuyla flor verilerek florozis oluşturulması yapılan çalışmanın, insan ve hayvanlarda görülen flor toksikasyonuna rol model olmasını sağlamaktadır.

Bu çalışmada, deneysel olarak ratların içmeye suyuna sodyum florid katılarak flor toksikasyonu oluşturulması ve bu flor toksikasyonunda karvakrolün böbrekler üzerine antioksidatif etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü Lisansüstü Tez Projesi (Doktora) kapsamında desteklenmiştir.

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine beni kabul eden ve eğitim süresince desteklerini esirgemeyen başta danışmanın Prof. Dr. Berrin SALMANOĞLU olmak üzere, değerli hocalarım Prof. Dr. Ş. Hilal KARAGÜL, Prof. Dr. Arif ALTINTAŞ, Prof. Dr. Tevhide SEL, Prof. Dr. Hamdi UYSAL, Doç. Dr. Mert PEKCAN, Doç. Dr. Görkem KISMALI, Doç. Dr. Ögünç MERAL ve Dr. Efe KURTDEDE'ye teşekkür ederim. Ayrıca, desteklerinden dolayı SETBİR Yönetim Kurulu Başkanı, Yönetim Kurulu Üyeleri ve Genel Sekreterlik personeline ve hep yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

BUN	Kan üre azotu
CAR	Karvakrol
CAT	Katalaz
Cl	Klor
CLU	Clusterin
CR	Kreatinin
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EFSA	European Food Safety Authority
EGVM	Expert Group on Vitamins and Minerals
FDA	Food and Drink Administration
FNB	Food and Nutrition Board
GPx	Glutatyon Peroksidaz
GSH	Glutatyon
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HF	Hidrojen Florür
HRP	Horseradish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
ip	Intraperitoneal
kDa	Kilodalton
KIM – 1	Kidney Injury Molecule – 1
MDA	Malondialdehit
µM	Mikrometre
Na	Sodyum
NADP	Nikotin adenin dinükleotit fosfat
NaF	Sodyum Florid
ng/ml	nanogram/mililitre
nmol/dk/ml	nanomolar/dakika/mililitre
NO	Nitrik oksit
OH ⁻	Hidroksit iyonu
ONOO ⁻	Peroksinitrit
PBS	Phosphate-buffered saline
pg/ml	pikogram/mililitre
ppm	parts per million
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SCCNFP	Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Substans
u/ml	Unit/Mililitre
WHO	World Health Organisation

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Karvakrolün yapısı	35
Şekil 2.1. Ratların Gruplandırılması	41
Şekil 2.2. Anestezi sonrası kalpten kan alınması	46
Şekil 2.3. Sakrifikasyon	46
Şekil 2.4. Sakrifikasyon sonrası elde edilen böbrekler	47
Şekil 3.1. Sağ ve Sol Böbrek Ağırlıkları Aritmetik Ortalaması Grafiği	60
Şekil 3.2. Zamana bağlı grupların ortalama ağırlık değişimleri (gr)	61
Şekil 3.3. Uygulama öncesi ve sonrası kreatinin değerlerinin kıyaslanması	66
Şekil 3.4. Uygulama öncesi ve sonrası BUN değerlerinin kıyaslanması	67
Şekil 3.5. Gruplar bazında MDA değerleri	69
Şekil 3.6. Gruplar bazında SOD değerleri	70
Şekil 3.7. Gruplar bazında GPx değerleri	70
Şekil 3.8. Tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon (oklar) ve tübül lümenlerinde proteinöz madde birikimi (yıldız), 2. Grup, H&E	71
Şekil 3.9. Bowman boşluğunda artış (yıldız), 4. Grup, H&E	72

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Bazı besin gruplarının içerdiği Florür miktarları	4
Çizelge 1.2. Ağız yoluyla alınan Flor metabolizması	9
Çizelge 1.3. FNB Florür diyet referansları	11
Çizelge 1.4. Reaktif Oksijen Türleri	26
Çizelge 1.5. Antioksidanlar	33
Çizelge 2.1. Kullanılan Rat yeminin bileşimi	40
Çizelge 2.2. Ratların Gruplandırılması	41
Çizelge 3.1. Böbrek ağırlıkları	60
Çizelge 3.2. Vücut ağırlık (gr) değişimlerinin değerlendirilmesi	62
Çizelge 3.3. WBC, LYM, MONO, GRAN, LYM %, MON %, GRA %, MPV, ALB, GPT değerleri	63
Çizelge 3.4. RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW _a , RDW %, PLT, GOT ve BIT	64
Çizelge 3.5. Kreatinin sonuçlarının istatistiki açıdan değerlendirilmesi	65
Çizelge 3.6. BUN sonuçlarının istatistiki açıdan değerlendirilmesi	66
Çizelge 3.7. KIM – 1 (pg/ml) ve Clusterin (ng/ml) Değerleri	67
Çizelge 3.8. Böbrek Dokusu MDA (μ M), SOD (U/ml) ve GPx (nmol/dk/ml) değerleri	68
Çizelge 3.9. Gruplar bazında Bowman boşluğu değerlendirmesi	73
Çizelge 3.10. Gruplar bazında böbrek dokusunda dejenerasyon değerlendirilmesi	74
Çizelge 3.11. Gruplar bazında tübül lümenlerinde proteinöz madde birikimi değerlendirilmesi	75
Çizelge 3.12. Gruplar bazında böbrek dokusu tübüllerinde dilatasyon değerlendirilmesi	76
Çizelge 3.13. Gruplar bazında böbrek dokusu fibrozis değerlendirilmesi	77

1. GİRİŞ

Flor, Dünya’da bulunan elementler sıralamasında 13. sırada yer alan ve elektronegativiteye sahip bir elementtir. Neon ve helyum dışındaki tüm elementlerle reaksiyona girebilme özelliğinden dolayı, flor ve bileşikleri doğada çok yaygın şekilde bulunmaktadır (Martinez-Mier, 2011).

Flor’un, yüksek miktarlarda alınması sonucu, hayvan ve insanlarda toksik etki yaratabileceği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Böbreklerin, flor toksikasyonundan en çok etkilenen organların başında geldiği bildirilmiştir. Bunun başlıca sebebi, böbreklerin flor atılması ve tutulmasından sorumlu olmasıdır. Buna bağlı olarak da fazla miktarda flora maruz kalınması sonucunda, böbreklerde histolojik ve patolojik bulgular ortaya çıkmaktadır (Reddy ve ark., 1969).

Moleküler formülü $C_6H_3CH_3$ olan karvakrol veya cymophenol kekiğin karakteristik kokusuna sahiptir. Özellikle, *Origanum hirtum*, yabani bergamot gibi bitkilerden elde edilen esansiyel yağların bir bileşenidir (Burt, 2004). Monoterpenik fenol olan karvakrol birçok bitkide bulunmaktadır ve uzun yıllardır gıda sektöründe katkı maddesi olarak da kullanılmaktadır (Ultee ve ark., 1999).

Aynı zamanda karvakrol, güçlü bir antioksidan madde olduğu ve bir çok hastalığın engellenmesinde etkili olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Liang ve Lu, 2012).

Bu çalışmanın amacı, ratlarda deneysel olarak oluşturulan flor toksikasyonunda, intraperitoneal yolla karvakrol verilmesinin böbrek dokusu

üzerinde meydana gelen histopatolojik yapı ve oksidatif sistem değişimlerini araştırmaktır.

Bu amaçla, bir ay süreyle ratların içme suyuna sodyum florid katılarak, böbreklerde flor toksikasyonu oluşturulmuştur. Böbreklerde oksidatif stres belirteci biyokimyasal parametreler değerlendirilmiş ayrıca karvakrol uygulamasının böbrek üzerine etkisi araştırılmıştır. Uygulamalar başlamadan önce ve sakrifikasyon öncesinde kan örnekleri alınmıştır.

Kronik florozis olgularına gerek Türkiye’de gerekse Dünya’da bir çok bölgede rastlanmaktadır. Doğal faktörlere bağlı oluşabilen bu vakalar, endemik olarak görülebilmektedir (Ergun ve ark., 1987; Fidancı ve ark., 1994; Fidancı ve ark., 1998; Karagül, 2008 ve Oruç, 1977). Su kaynakları ve toprak kontaminasyonu nedeni ile yüksek flor ile karşı karşıya kalan insan ve hayvanların yaşam kalitesi ve sağlıklı yaşaması anlamında, bilinmeyen metabolik etkiler araştırmaya değer özellik taşımaktadır.

Bu yeni yaklaşım, karvakrolün, ratlarda sodyum florid ile oluşturulan renal hasar ve oksidatif stres durumunda koruyucu ve tedavi edici etkisini ortaya koymakta yardımcı olacaktır.

1.1. Flor Elementi ve Doğada Bulunuşu

Hidroflorik asitten ayrıştırılarak ilk kez 1886 yılında Prof. Henri Moissan tarafından keşfedilen flor; atom numarası 9, molekül ağırlığı 19 ve yoğunluğu 1,265 olan zehirli bir gazdır. Flor'un erime noktası -220 °C ve kaynama noktası -188 °C'dir (Atkins ve ark., 2010 ve Gowda ve ark., 2013, s:709). Flor, açık sarı renkli ve tek değerli bir halojendir. Diğer elementlere göre en fazla reaktif elektronegativiteye sahiptir (Hem, 1989).

Flor yüksek elektronegativiteye sahip ve reaktif bir madde olduğundan dolayı, doğada serbest halde bulunamaz. (Santoyo-Sanchez ve ark., 2013). Sulu çözeltilerinde genellikle florür (F⁻) şeklinde bulunmaktadır. Flor, yer kabuğunun %0,08'ini oluşturmasının yanında, doğada en çok bulunan elementler arasında 13. sırada yerini almıştır. Az miktarda su, hava, bitki ve hayvanlarda bulunurken, toprakta bulunan flor miktarı yaklaşık 300 ppm olarak tespit edilmiştir (Brigatti ve Guggenheim, 2002).

Flor yeryüzünde, doğal veya yapay olarak bulunabilmektedir. Diş macunları, insektisidler, bazı ilaçlar, flor kullanılan bazı alanlardaki sanayilerden salınan dumanlarda flor bulunabilmektedir (Barbier ve ark., 2010). Florürün doğal yollarla bulunduğu bazı gıda maddeleri de mevcuttur. Bunlara örnek olarak, bazı sebze ve meyveler, tahıllar, et, balık gibi gıdalar; anne sütü, çay yaprakları, taze meyve suları gibi bazı içecekler verilebilir. Bunların dışında içme sularında da farklı miktarlarda florür bulunmaktadır. Böylece, canlılar çeşitli yollarla florür alımına maruz kalmaktadırlar (Dimcevici Poesina ve ark., 2013).

Deniz suyunda bulunan florür miktarı dikkate alındığında değerler 1,2 mg/L ve 1,5 mg/L arasında değişmektedir. Volkanik dağların eteklerinde bulunan suların

florür miktarları yüksektir. Bunun yanında, miktarı 25 mg/L olan yer altı suyu tespit edilmiştir. Yüzeyle bulunan sularda ise düşük miktarlarda florür bulunmaktadır. Ancak bazı göllerdeki miktarın yüksek olduğu görülmüştür. Örneğin Tanzanya’da 95 mg/L ve Kenya’da ise 2800 mg/L florür miktarı tespit edilen göller mevcuttur (The EFSA Journal, 2005; WHO, 2000).

Florür, tüm bitkilerde bulunmaktadır. Bitkilerdeki miktarı, topraktan ve sudan ileri gelmektedir. En yüksek florür miktarı bulunan bitkiler, kıvırcık lahanaya ve hindiba olarak belirlenmiştir. Taze kıvırcık lahanadaki florür miktarının 40 mg/kg’a kadar yükselebildiği belirlenirken, hindibadaki miktar ise 0,3-2,8 mg/kg olarak kaydedilmiştir (Sloof ve ark., 1988).

Bazı gıdalarda bulunan flor miktarları Çizelge 1.1.’de belirtilmiştir (Bergmann, 1994; EGVM, 2001):

Çizelge 1.1. Bazı besin gruplarının içerdiği Florür miktarları

Besin Grubu	İçerdiği Florür Miktarı
Süt ve Süt Ürünleri	0,05 – 0,15 mg/kg
Et ve Et Ürünleri	0,15 – 0,29 mg/kg
Yumurta	0,18 mg/kg
Balık ve Balık Krokot	0,48 – 1,91 mg/kg
Ekmek ve Tahıl	0,1 – 0,29 mg/kg

Sudaki flor miktarını belirleyen başlıca etkenin jeolojik nedenler olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında, sanayi faaliyetleri veya kömür yakma gibi etkiler de sudaki flor miktarı üzerinde rol oynamaktadır. Diğer yandan, florun en fazla ilişkili olduğu coğrafi olay ise, volkanik aktivitelerdir. Dünya’nın en yüksek florüre sahip bölgeleri, volkanik aktivitelerin olduğu ülkelerdir. Bu kapsamda önemli bölgeler olarak, Pasifik volkan kuşağı, Orta Afrika, Asya ve Kuzey ve Güney Amerika’da bölgeler, Doğu Afrika Rift Vadisi, Güney Amerika’nın güney kısmındaki geniş tortu özelliği olan havzalar önemli sayılmaktadır. Bunların dışında başka bölgeler ise, Türkiye’den Irak, İran, Afganistan, Hindistan, Kuzey Tayland, Çin ile Amerika ve

Meksika arasındaki sınırda bulunan bazı bölgeler de önem arz etmektedir (Dunipace ve ark., 2006). Türkiye’de Doğu Anadolu’da eski volkanik alanlarda, özellikle Van-Ağrı civarında florozis olayları yaygındır (Oruç, 1977; Şendil ve Bayşu, 1973)

Uygun miktarlarda flor alınımının kemik gelişimi ya da dişlerde çürümelerin önlenmesi gibi bazı yararları bulunmaktadır. Bunun aksine, yüksek doz flor alınımı hayvan ve insan sağlığına olumsuz etki göstermektedir. Florun erken toksik etkisi, insanlarda diş ve iskelete ait olarak ortaya çıkmaktadır. Dişlerde çürüme, iskelet yapısında anormallik gelişir. Ayrıca flor, hücre membranını geçer ve yumuşak dokulara nüfuz eder. Toksik etki, flor alınımının ağız yoluyla olmasının yanında inhalasyon yoluyla alınımında da benzer etki göstermektedir (Lech, 2011; Zabulyte ve ark.; 2007 ve Zhou ve ark., 2012).

Yapılan çalışmalar, deneysel modellerde böbrekte flor toksikasyonunun oluşmasında esas olarak Sodyum Florid (NaF) formunun etkili olduğunu ortaya koymuştur (Barbier ve ark.; 2010).

Sodyum florid (NaF), renksiz veya beyaz olabilen suda çözülebilir katı bir maddedir (WHO, Fluoride in Drinking Water, 2004). Florun laboratuvar yöntemleri ile ölçülmesi mümkündür. Flor analizleri, iyon seçici elektrot metoduyla gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem ile, serbest ve bağlı halde bulunan toplam flor miktarı tespit edilmektedir. Örneğin, sudaki florür miktarının tayini için bu metot kullanılabilir ve kullanılan bu metotla 20 µg/litre miktarına kadar ölçüm yapılabilir (Sloof ve ark., 1988).

1.2. Florür Metabolizması

Alınan florür miktarı ve süresine bağlı olarak florür, metabolizma üzerinde yararlı ya da zararlı etki gösterebilmektedir (Everett, 2011). Bu kapsamda florürün olumlu etkisi diş çürüklerine karşı korumada ya da kemik yapısında etki göstermektedir (Bratthall ve ark., 1996; Kobayashi ve ark., 2014). Bunun aksine negatif etkiyi ise diş ve kemiklerde florozis oluşturarak göstermektedir (Buzalaf ve ark., 2015; Everett, 2011;). Florun toksik etkisi, kemiklerde zayıflamaya ve kırıkların artışına sebep olmaktadır. Florozisin erken dönem semptomları klinik olarak belirgin değildir. Bu yüzden teşhisinde, romatoid artrit gibi bazı hastalıklarla karıştırılabilmektedir (National Research Council, 2006). Diş florozisi ise, fazla miktarda flor alımı sonucunda diş minesinde hipomineralizasyonun oluşmasıdır (Fejerskov-O-Kidd, 2009). Bunun sonucunda, diş minesi normale göre daha opak ve parlaklığını kaybetmiş durumdadır (Neville ve ark., 2015).

Florür metabolizmasında 3 önemli adım bulunmaktadır. Bu adımlar; *emilim*, *yayılm* ve *boşaltım* şeklinde özetlenmektedir. Tüm bu adımlarda en önemli etken ise pH değeridir (Buzalaf ve ark., 2015; Whitford, 1996).

Ağız yoluyla florür alınmasının ardından, alınan florürün %75-90'ı sindirim kanalından emilmektedir. Emilimin yaklaşık %40'ı ise mideden gerçekleşir. Midenin asidik yapısı sayesinde sindirilen florür, hidrojen florür yapısına dönüşmektedir ve bu şekilde emilim gerçekleşmektedir. Mideden emilmeyen florür ise, bağırsaktan emilmektedir. (IPCS, 2002; Whitford, 1997 ve WHO, 2006). Bağırsaktan emilim, pH'dan bağımsız olarak gerçekleşmektedir (Buzalaf ve ark., 2015; Whitford, 1994). Mideden emilim ise pH'ya bağlıdır. Asitlik arttıkça, emilim artmaktadır (Whitford ve Pashley, 1984). İnce bağırsaktan emiliminde florür, iyonik haldedir. Böylece iyonik halde, bağırsak epitelindeki küçük boşluklardan geçiş sağlayabilmektedir (Nopakun ve ark., 1989).

Alınan florürün çoğunun sindirim sisteminden emilmesi basit difüzyonla gerçekleşmektedir. Florürün emilimi diyetle de bağlıdır. Örneğin sulu çözeltilerle sodyum florid alınmasında emilim tamamıyla gerçekleşmektedir (Buzalaf ve ark., 2015; Whitford, 1996). İçme suyundaki florür de iyonik halde bulunduğundan, bağırsak mukozasından geçiş sağlamaktadır (Voznaya, 1981).

Florürün mideden emiliminin asitliğe bağlı olmasının yanında, emilimi etkileyen başka faktörler de bulunmaktadır. Bunların başında gelenlerden bir tanesi ise, alınan florür bileşiğinin çözünübilirliğidir. Kolay çözünebilir bileşikler daha hızlı absorbe edilebilmektedir. Bu bileşiklere örnek olarak sodyum florid ve hidrojen florid verilebilir. Bunun aksine kalsiyum florid veya magnezyum florid gibi daha az çözünübilirliğe sahip bileşikler daha yavaş emilmektedir (Ekstrand ve Ehrnebo, 1983; Whitford ve Pashley, 1984).

Hidrojen Florür (HF) zayıf bir asittir. 3,4 pH değerindedir. Florürün yarısı HF olarak diğer yarısı ise iyonik form olan F^- şeklindedir yani $pK_a (-\log (ka))$, 3,4'tür. pH bu değerden aşağı doğru indiğinde (asitleşme) HF konsantrasyonu artarken, bu pH değerinin yükselmesi (bazikleşme) durumda ise iyonik F^- konsantrasyonu artmaktadır (Buzalaf ve ark.; 2015 Whitford, 1996). Böylece florür, vücut-sıvı bölgelerinde daha asidik ortamdaki daha alkali ortama geçiş yapmaktadır (Buzalaf ve ark., 2015).

Emilim sonrası florürün kana geçmesiyle, tüm vücuda yayılması gerçekleşmektedir (IPCS, 2002; WHO, 1996 ve WHO, 2006;). Emilimin ardından plazma florür seviyesi maksimuma çıkmaktadır, bu süre yaklaşık 20-60 dakika olarak bildirilmiştir. En yüksek seviyeye çıkışın ardından plazma florür seviyesi

azalış göstermektedir. Bu süre ise, doza bağılı olarak 3-11 saat arasında değişmektedir (Buzalaf ve ark., 2015; Whitford, 1996).

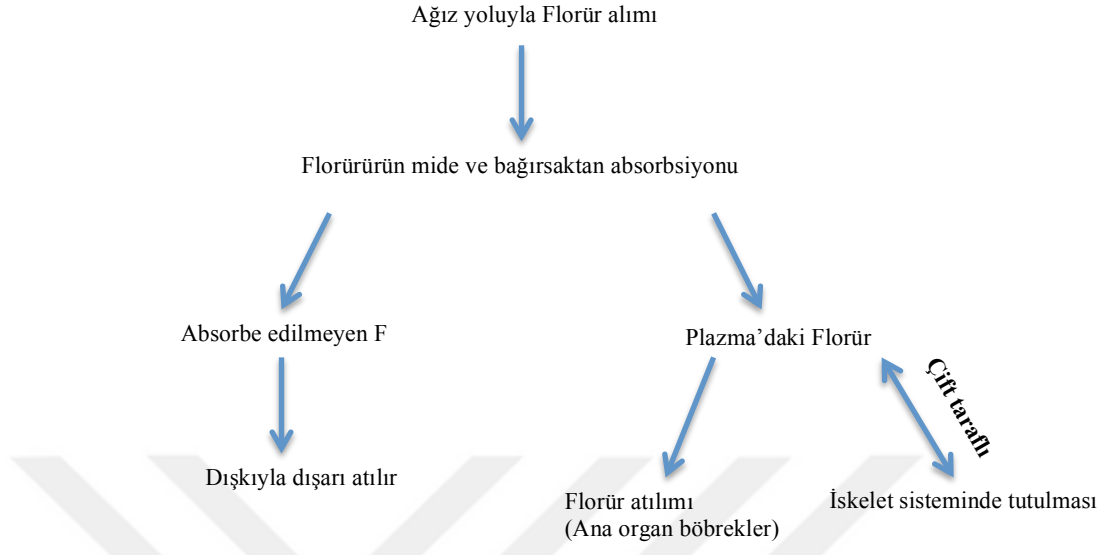
Florür kanla vücuda yayılarak, daha çok kalsiyumdan zengin alanlarda tutulmaktadır. Yetişkinlerde emilen florürün yaklaşık %60 tutulurken, bu oran bebeklerde daha yüksek olup, yaklaşık %80-90 oranındadır. Ayrıca, florür plasentayı geçebilmekte, anne sütünde bulunabilmektedir (IPCS, 2002; WHO, 1996 ve WHO, 2006).

Florür, tükürükle salınabilmektedir. Kandaki florür miktarı arttıkça, tükürükteki miktar da artmaktadır (Ingram ve ark., 2005). Ayrıca, depolanmayan florür, idrarla ve dışkıyla atılmaktadır (Whitford, 1996). İdrarla atılan miktar, yaşa bağımlı olarak değişim de gösterebilmektedir. İdrar atılımında da tıpkı emilimde olduğu gibi pH gibi bazı faktörler etki göstermektedir. Alınan gıdalara göre idrar pH'sı da değişmektedir. Örneğin, sebze ağırlıklı beslenmede idrar alkaliye dönmekte, protein ağırlıklı beslenmede ise aside dönmektedir. İdrarda gerçekleşen bu pH değişimleri de idrarda florür atılımını değiştirmektedir (Angeles Martinez-Mier, 2011).

Emilen florürün idrardan atılım yüzdesi, sağlıklı genç-orta yaşlı insanlarda %50, bebek-çocuklarda ise %10-20 oranındadır (Ekstrand ve ark., 1982; Schiffli ve Bingswanger, 1982).

Florür, renal glomerüllerden süzülmemektedir. Tubüller sıvısının pH'sına bağılı olarak da renal tubüllerden geri emilmektedir. Yetişkinlerde florürün renal kleransı 30-50 mL/dk'dır (Ekstrand ve ark., 1982; Schiffli ve Bingswanger, 1982). Böbrek fonksiyonunun bozulduğu durumlarda, idrarla florür atılımı azalmaktadır (Schiffli ve Bingswanger, 1980; Spak ve ark., 1985; Torra ve ark., 1998).

Çizelge 1.2. Ağız yoluyla alınan Flor metabolizması



Florür böbreklere geldiğinde, glomerulustan süzülmemektedir. Daha sonra proksimal tubulden geri emilimi gerçekleşmektedir. Bu geri emilim çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitlilikte en önemli etken glomerular pH'dır (Whitford, 1994). Renal tubullere florürün girmesinin ardından geri emilim gerçekleşmektedir (Whitford ve ark., 1976).

Bu geri emilimdeki en önemli rolün pH olması, HF'ün diffüzyonla zarı geçmesidir (Whitford ve ark., 1976). Tubuller sıvının pH'sı yüksek olduğunda, florür miktarı HF olarak düşük, fakat F⁻ olarak yüksektir. Bu durumda, düşük florür konsantrasyonu, renal tubul epitelinden interstisyel sıvıya geçerek yeniden emilebilmesi için uygundur. Emilemeyen florürün büyük kısmı ise F⁻ olarak idrarla atılmaktadır (Ekstrand, 1996). Bunun dışında idrar pH'sını etkileyen herhangi bir durum, idrarla atılan florür miktarını da etkilemektedir (Buzalaf ve Whitford, 2011).

1.3. Uygun Miktarda Florür Alımı ve Yararları

Flor her yerde bulunmaktadır. Bu nedenle flor olmayan bir durum yaratmak çok zor olduğundan, florun insan ve hayvan sağlığı için zorunlu bir element olduğu konusunda kanıtlar bulunmamaktadır (The EFSA Journal, 2005). Fakat yapılan çalışmalar, uygun miktarlarda florür alımının özellikle ağız sağlığı üzerine olumlu etkisinin bulunduğunu göstermiştir (Marthaler ve Petersen, 2005; Petersen ve Lennon, 2004 ve WHO, 2008).

Florürün düşük miktarlarda olmak üzere sürekli tükürükte bulunmasının, diş minesi lezyonlarının sağaltımında olumlu etkisinin olduğu belirlenmiştir. Özellikle diş gelişimi sırasında florür alımını, diş minesinin daha dirençli hale gelmesine neden olmaktadır (Marthaler ve Petersen, 2005; Petersen ve Lennon, 2004 ve WHO, 2008).

Yapılan çalışmalarda, günlük 0,5 mg/kg alımının diş çürüklerine engel olabileceği görülmüştür (Edmunds ve Smedley, 1996).

Bilimsel araştırmalar, uygun miktarda flor alımının kemiklerde güçlenmeye neden olduğunu da kanıtlamıştır. Ratlara 16 hafta boyunca içme suyuyla 16 mg/L florür verildiğinde, kemiklerde florür miktarında artışa sebep olduğu görülmüştür. Bu artışın kemiklerde 1200 mg/kg'a kadar çıkabileceği kanıtlanmıştır. Bunun yanında yüksek miktarda içme suyuyla florür alındığında ise negatif bir etki gösterdiği ve azalışa sebep olduğu görülmüştür. Bu yüzden de florürün kemiklerin kuvvetlenmesi açısından çift taraflı bir etkisinin olduğu sonucu ortaya çıkmıştır (The EFSA Journal, 2005; Turner ve ark., 1992).

1940'lı yıllarda, içme suyundaki florürün, tüm yaşlarda diş çürüklerini önlemede katkı sağladığı bulunmuştur (Dean ve ark., 1942; Russell ve Elvove, 1951). Yapılan çalışmalarda, ortalama sıcaklığa bağlı olarak 0,7 mg/L ve 1,2 mg/L arasında florür içeren suların tüketildiği toplumlarda, daha az florür içeren su tüketilen toplumlara göre diş çürüklerinin %40 ila %60 düşük olduğu ortaya konmuştur. Buna bağlı olarak içme suyunun 1 litresinde yaklaşık 1 mg florür bulunmasının ideal değer olduğu kabul edilmiştir (The EFSA Journal, 2005).

Bu ideal miktar yaş aralıklarına göre farklılık göstermektedir. Buna göre, Gıda ve Beslenme Kurulu'nun (FNB) 1997 yılında, Washington Tıp Enstitüsü Ulusal Akademi Yayını'nda belirttikleri diyet referansları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (FNB, 1997).

Çizelge 1.3. FNB Florür diyet referansları

Yaş Aralığı		Uygun Miktar
7-12 ay		0,5 mg/gün
1-3 yaş		0,7 mg/gün
4-8 yaş		1 mg/gün
9-13 yaş		2 mg/gün
14-18 yaş		3 mg/gün
19 yaş ve üstü	Kadın	3 mg/gün
	Erkek	4 mg/gün

Avrupa Komisyonu bünyesinde yer alan Tüketicilere Yönelik Kozmetik ve Gıda Dışı Ürünler Bilim Kurulu (The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Indeed for Consumers – SCCNFP) 2003 yılında, 6 yaş altındaki çocukların kullanacakları diş macunu miktarının 0,05 ila 0,8 g arasında olması gerektiğini belirtmişlerdir. Tavsiye edilen miktar bezelye büyüklüğü olarak bildirilmiştir. Bu da yaklaşık 0,25 g'a denk gelmektedir (SCCNFP, 2003).

1.4. Fazla Miktarda Florür Alımı ve Zararları

Florürün çeşitli yollarla vücuda alınması mümkündür. Bunların başında, sindirim ve solunum sistemleri ve deri yoluyla florüre maruz kalınması gelmektedir. Bu yollardan herhangi biriyle fazla miktarda flor alınması, canlılarda çeşitli olumsuzluklara yol açmaktadır.

Gerek hayvanlarda gerekse insanlarda, fazla miktarda flor alımıyla oluşan ve akut olarak adlandırılan flor toksikasyonu nadir görülmektedir. Ancak, az miktarda fakat uzun süreyle flor alımına bağlı olarak oluşan kronik flor toksikasyonuna ise yaygın rastlanmaktadır (Gowda ve ark., 2013).

Flor toksikasyonuna maruz kalmanın iki şekli bulunmaktadır. Bunlardan ilki endemik florozistir. Bu yolla oluşan toksikasyonda etken, içme suyudur. İçme suyuyla alınan yüksek miktarda flor sonucu toksikasyon görülmektedir (Saralakupari ve Ramakrishna, 1991).

Diğer bir maruz kalma şekli ise, endüstriyel florozistir. Bu da hava kirliliğine bağlı olarak toksikasyon oluşmasıyla sonuçlanmaktadır. Bu toksikasyona bağlı olarak da gerek insanlarda gerekse hayvanlarda çeşitli organlarda hasarlar oluşabilmekte, biyokimyasal parametrelerde değişiklikler oluşabilmektedir (Giri ve ark., 2016).

Florür, elektronegatif yapıya sahiptir, bu yüzden de, doza bağlı olarak, bazı katyonların yerine geçebilmektedir. Bunun yanında antioksidan sistemine etkisi ise, florun radikal yapısından kaynaklanmaktadır. Bu yapı ayrıca lipid peroksidasyonu üzerine de etki etmektedir (Gowda ve ark., 2013).

Amerikan Diş Hekimliği Birliği, herhangi bir zamanda 120 mg'dan fazla florür (264 mg sodyum florür) verilmesini önermemiştir (Bayless ve Tinanoff, 1985). Toksik etki yaratabilecek minimum florür miktarı 5 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirtilmiştir. Öldürücü doz ise 7-16 mg/kg vücut ağırlığı olarak bildirilmiştir (Whitford, 1996).

Oral yolla alınarak oluşan akut florozis sonucunda oluşan semptomlar arasında salivasyonda artış, diyare, kusma, kalp baskılanması görülmektedir. Bunun dışında akut olarak gelişen durumlarda, yaşa bağlı olarak böbreklerde nefrotoksisitenin görülmesi de mümkündür. Sıçanlarda yapılan çalışmada, akut olarak toksik etki yaratan 17,8 mg florür/kg vücut ağırlığı dozunda NaF'ün gavaj yoluyla verilmesi sonucu mide mukozasında değişiklikler görülmüştür. Bu değişiklikler NaF uygulamasının ardından 30 dakika içerisinde ortaya çıkmıştır (Easmann ve ark., 1985; The EFSA Journal, 2005).

Flor, hücre membranını kolayca geçebilen bir elementtir. Buna bağlı olarak fazla flor alınımı bazı hastalıklara neden olabilmektedir. Yüksek flor alımı sonucu ile toksik etkisi, hücresel bir zehir olarak nitelendirilebilmektedir. Bu etki, kalsiyumu bağlama ile proteolitik ve glikolitik enzimlerin aktivitesine müdahale yoluyla gerçekleşmektedir.

Florürün vücuda alınma yolların biri olan ağız yolu ile, sindirim sistemine dahil olmaktadır. Midede, mide asidi ile reaksiyona girmektedir. Bu reaksiyon sonucunda hidroflorik asit oluşmaktadır. Oluşan hidroflorik asit sonucunda, kusma, karın ağrısı, mide bulantısı gibi semptomlar ortaya çıkmaktadır. Bu semptomlar, yüksek dozda ve kısa süreli florür alınımında oluşan akut florozis durumlarında ilk ve hızlı olarak karşılaşılan semptomlardır. Ayrıca bunlardan başka olarak kas spazmlarına rastlanabilmekte, hatta solunum felci ve akabinde ölümler görülebilmektedir (WHO, 2010).

Florürün hüresel toksisite etkisinin, çoğunlukla enzimlerle etkileşimi sonucu oluştuğu görülmüştür. Florürün, çoğu zaman enzim inhibitörü olarak rol oynadığı tespit edilmiştir. Fakat enzim çeşidine bağlı olarak florür kimi zaman enzim stimülatörü olarak da görev alabilmektedir (Adamek ve ark., 2005).

Florür, sadece ağız yoluyla alınmamaktadır. Hidrojen florür şeklinde, solunum yoluyla alınması da mümkündür. Bunun sonucunda, solunum yolunda irritasyona neden olmaktadır. İritasyon sonucunda, tıkanma, öksürük ve pulmoner ödem gibi semptomlara rastlanılmaktadır. Bu yolla florürün alınması da ölümlere sebep olabilmektedir.

Florürün diğere bir maruz kalma şekli olan deri yoluyla alınmasıdır. Ciddi yanıklar ve uzun süre devam eden cilt kusurları, deri yoluyla florüre maruz kalma sonucunda görülen semptomlar arasındadır. Bu yolla florür alınımı da tehlikelidir (WHO, 2010).

Özellikle içme sularıyla, uzun süre düşük miktar flor alımı ise, dişlerde çürüklere yol açmaktadır. Normal seviyelerin üzerinde flor alımı, dental florozis ya da iskelet florozisine sebep olabilmektedir. Dental floroziste dişlerde benekler görülmektedir. İskelet florozisinde ise eklemlerde sertleşme, kemiklerde çarpıklık veya kırılabilirlik gözlenebilmektedir (Dissanayake, 1991).

Flor alımı bazı kan parametreleri üzerinde de değişikliklere sebep olabilmektedir. Ratlarla yapılan çalışmalarda, florürle tedavi sonucunda, serum kreatinin ve kan üre azotu değerlerinde artış ve kan proteini ve kalsiyum değerlerinde ise azalış gözlenmiştir. Bunların yanında hiperglisemi geliştiği de yapılan çalışma sonuçları arasında yer almaktadır (Henschler ve ark., 1975).

Dünya Sağlık Örgütü tarafından, içme suyu ile alınması gereken flor miktarının 1 mg/L'yi geçmemesi önerilmektedir (WHO, 2008). 1950'lerde ABD ve Avrupa'da, diş macunu ya da su ile alınan flor miktarının yaklaşık 1 mg/L olması durumunda, görülebilecek diş çürükleri ihtimalinin %50 azaldığı kabul edilmiştir (Diesendorf, 1986). Fakat, ilerleyen zamanlarda, bu miktarlar daha az seviyelere indirilmiştir. Bunun nedenleri arasında, uzun süreli topikal flor kullanımı, beslenmeyle flor alımının artmasının, artan diş sağlığı eğitimi gibi sebeplerin olabileceği düşünülmektedir (Edmunds ve Smedley, 1996).

Al-Hiyasat ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları çalışmada, dişi sıçanlara 200, 400 ve 600 ppm olmak üzere değişik konsantrasyonlarda NaF, içme sularına katılarak 30 gün boyunca verilmiştir. Çalışma sonucunda, 600 ppm NaF'ün tüm hayvanları öldürdüğü bildirilmiştir. Bunun yanında, 400 ppm'in hayvanların %70'sini öldürdüğü görülmüştür. 200 ppm'in ise herhangi bir ölüme neden olmadığı belirlenmiştir fakat su tüketimi ve vücut ağırlığında azalışa neden olduğu deneyimlenmiştir (Al-Hiyasat ve ark., 2000). Ayrıca yapılan çalışmalar, yüksek oranda florür içeren içme sularının, insanlarda doğum oranının düşmesiyle ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Freni, 1994).

Varsha Dhurvey ve Mangala Thakare'nin 2016 yılında yayınladıkları çalışmada, içme sularına farklı dozlarda NaF katılmış dişi ratlarda, hormon değerleri ve östrus siklusu değerlendirilmiştir. Bu kapsamda 30 gün boyunca, 5, 10, 15 ve 20 mg NaF/kg vücut ağırlığı/gün içme suyuyla verilecek şekilde gruplar oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda, 15 ve 20 mg NaF/kg vücut ağırlığı/gün uygulanan gruplarda Flor toksikasyonu tespit edilmiştir. Bunun yanında 15 ve 20 mg NaF/kg vücut ağırlığı/gün gruplarında, diöstrus, östrus ve metöstrus fazlarının azaldığı da tespit edilmiştir. Sonuç olarak elde edilen bulgular dikkate alındığında, içme suyuyla alınan NaF'ün üreme sistemi üzerine olumsuz etkilerinin olabileceği görülmüştür (Dhurvey ve Thakare, 2016).

Uzun süreli fazla miktarda flor alınımı, kronik florozise sebep olabilmektedir. Birçok mineral takviyesinin fazla miktarda flor barındırdığı düşünülürse, bu durumun bir çok canlıda görülmesi mümkündür. Özellikle çiftlik hayvanları açısından değerlendirildiğinde, florozis durumunun görülmesi büyük ekonomik kayıplara da neden olabilmektedir (Zhan ve ark., 2005).

Genç hayvanların flor toksikasyonuna daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Kanatlı hayvanların, flor toksikasyonuna en dayanıklı tür oldukları bulunmuştur (Gowda ve ark., 2013).

Xiu-an Zhan ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları çalışmada, genç domuzlarda görülen florozisin, lipid peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, 3 grup oluşturulmuş; yaklaşık 50 günlük hayvanlar kullanılmıştır. 50 gün boyunca çalışmada kullanılan domuzlara 100, 250 ve 400 mg/kg flor içeren NaF beslenme yoluyla verilmiştir (Zhan ve ark., 2005). Çalışmanın sonunda yapılan analizlerde, flor verilen gruplarda kontrol grubuna oranla serum MDA seviyelerinde artış, SOD ve GPx seviyelerinde ise azalış görülmüştür. Böbrek dokusu homojenatlarına bakıldığında ise, sırasıyla 250 ve 400 mg/kg F verilen hayvanlarda MDA seviyesinin önemli ölçüde arttığı ve GPx seviyesinin ise azaldığı görülmüştür. En yüksek miktarda flor verilen 4. grupta böbrek GPx değerlerinin kontrol grubuna göre düşük olduğu görülürken, 4. gruba göre daha az miktarda flor verilen 2. ve 3. gruplara göre ise bu değerlerin daha yüksek olduğu dikkat çekmiştir. SOD aktivitesinin ise, tüm flor verilen gruplarda önemli ölçüde azaldığı kaydedilmiştir (Zhan ve ark., 2005).

Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında, büyüme dönemindeki domuzların böbrek dokusunda, florun serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidatif enzimleri inhibe ettiği sonucuna varılmıştır. Böylece, florla oluşturulan oksidatif stresin, yumuşak dokularda flor toksikasyonuna neden olduğu ortaya konmuştur (Zhan ve ark., 2005).

1.5. Florun Böbrekler Üzerine Etkisi

Florun diş ve kemikler etkisi dışında, böbrek, karaciğer gibi organlara da etkisi bulunmaktadır. Emilen florürün yaklaşık %50-80'nin idrarla atıldığı ve flor alımının renal hasara yol açtığı yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Dissanayake, 1991).

Böbrekler, flor toksikasyonundan en çok etkilenen organlardandır. Gerek histopatolojik gerekse fonksiyonel yönden bozukluklar, flor toksikasyonunda gözlenmektedir. Bunun sebebi, fazla flora maruz kalınması durumunda florun atılması veya tutulmasında böbreklerin esas organlar olmasıdır (Kono ve ark. 1987; Ophaug, 1979). Dişi sıçanlarla yapılan çalışmalar, fazla flor alımında böbrek ağırlıklarının, kontrol grubuna ait sıçanların böbrek ağırlıklarına oranla artış gösterdiğini de kanıtlamıştır (Al-Hiyasat ve ark., 2000).

8 ppm veya daha yüksek miktarda içme suyuyla florür alınması durumunda, böbrek hasarlarında artış görüldüğü yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu durum böbrekte, yapısal ve fonksiyonel hasarlara yol açmaktadır. Ortaya çıkan yapısal değişiklikler sonucunda ise serum kreatinin ve BUN değerlerinde artış izlenmektedir (Ranjan ve Ranjan, 2015; Yang ve Liang, 2011).

Plazmada bulunan florür kan yoluyla tüm doku ve organlara yayılmaktadır. Bu nedenle yumuşak dokularda florür miktarının tayininde, kandaki florür miktarları etkili olmaktadır. Böbrek ve karaciğer gibi iyi perfüze edilmiş dokular ve plazma arasında florürün yayılımı daha hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Ayrıca, florürün vücuttan atılmasında en önemli yol böbreklerdir. Florüre maruz kalmanın en iyi göstergesi, idrardaki florür miktarıdır. İdrardaki florür miktarı ile içme suyunda bulunan florür miktarı ilişkilidir (Czarnowski ve ark., 1996). Nefronda, florürden en

çok etkilenen kısmın, proksimal tubül epitel hücreleri olduğu, yapılan çalışmalarda görülmüştür (Shashi, 2000; Usuda ve ark., 1998).

Çocuklarla yapılan bir çalışmada, içme suyuyla 2,0 mg/L'nin üzerinde florür alınması sonucunda, nefrotoksisite görülmüştür. Tubüle özgül iki belirteçte, kronik olarak artış saptanmıştır. Serum florür seviyesi ise yaklaşık olarak 1,25 mg/L civarında bulunmuştur (Xiong ve ark., 2007).

Inkielewicz ve Krechniak'nin 2003 yılında, içme suyundan florür alınımları sağlanan, 8 haftalık erkek Wistar sıçanların yumuşak dokularındaki florür miktarını tayin etmelerine yönelik çalışmalarının sonucunda, doza ve maruz kalma süresine bağlı olarak incelenen tüm doku ve organlarda florür miktarının arttığı saptanmıştır. Aynı çalışma sonuçlarına göre, en yüksek florür miktarı her durumda böbrekte, en düşük ise serumda bulunmuştur. Karaciğer, beyin ve testis gibi diğer dokularda ise florür miktarı benzerlik göstermiştir (Inkielewicz ve Krechniak, 2003).

Ramseyer ve arkadaşları, ratlara 500 gün boyunca içme suyuyla 1,5 ve 10 ppm miktarında florür vermişlerdir ve uygulama sonunda yapılan değerlendirmelerde, tubüllerde hipertrofi ve hiperplazi gözlemlenmiştir (Ramseyer ve ark., 1957). Diğer yapılan çalışmalarda ise böbreklerde kayda değer histopatolojik değerlendirmelerin başında tubüllerde vakuolleşme ve nekroz, interstisyel ödem ve nefrit ve glomerül atrofisi gelmektedir (Karaoz ve ark., 2004; Shashi ve ark., 2002 ve Zager ve Iwata, 1997).

Yapılan çalışmalar, içme suyuyla yüksek miktarda florür alan sıçanlarda, renal tubuler hasarın oluştuğunu ortaya koymuştur (Henschler ve ark., 1975). Bunun dışında hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda farklı değişimlere rastlanmaktadır.

Bunların başında, yangı, fibrozis, tubuler dejenerasyon, parankimatöz nefrit, dalgalı kanalların dilatasyonu gelmektedir (Bond ve Murray, 1952).

Renal bozukluklar, serum kreatinin ve BUN seviyeleri ile ilişkilidir. Bunun dışında serum Na⁺ ve Cl⁻ seviyeleri de renal foksion durumlarıyla ilgilidir (Emejulu ve ark., 2016; Kumar ve ark., 1988). Ratlarla yapılan çalışmalar sonucunda, 28 gün boyunca NaF verilmesi durumunda serum kreatinin, BUN ve ürik asit seviyelerinin artış gösterdiği görülmüştür (Giri ve ark., 2015).

Yapılan çalışmalar baz alındığında, flor toksikasyonunda en çok etkilenen organlardan birinin böbrekler olduğu söylenebilmektedir.

Ratlarda yapılan çalışmada, intraperitoneal olarak 600 ppm florür bir hafta süreyle verilmiştir. Çalışma sonucunda yapılan analizlerde nitrik oksit, oksijen serbest radikalleri ve lipid peroksidasyonunda artış saptanmıştır. Bunun aksine SOD, CAT ve Glutatyon'da (GSH) azalış tespit edilmiştir (Nabavi ve ark., 2013).

Florür oksijen serbest radikallerinin artışına sebep olmasının yanında, bazı enzim aktivitelerini de bozmaktadır. Yani florür, protein metabolizmasına da etki edebilmektedir (Zabulyte ve ark., 2007). Bunlardan farklı olarak florür, karbonhidrat ve yağ metabolizmasına da etki edebilmektedir, bağışıklık sistemi ve vücudun bazı kısımlarına etki edebilmektedir (Liu ve ark., 2003; Zabulyte ve ark., 2007).

1.6. Böbrek Hastalıklarının Tespitinde Yararlanılan Biyokimyasal Parametreler

1.6.1. Kan Üre Azotu (BUN) ve Kreatinin (CR)

Böbrek hasarlarının değerlendirilmesinde, serum biyokimyasal parametreleri ve histopatoloji çalışmalarından yararlanılmaktadır. Bu kapsamda en çok yararlanan biyokimyasal parametreler kan üre azotu (BUN) ve serum kreatinindir (CR). BUN, protein metabolizması sonucu oluşmaktadır. Glomerüler hasar ve böbrek fonksiyonlarının azalması durumlarında, BUN değeri artış göstermektedir. BUN'nun vücuttan atılımı ise idrarla gerçekleşmektedir. Kreatinin ise, bir kreatin ara ürünü olup, idrarla dışarı atılmaktadır. Bu atılım glomerüler filtrasyon yoluyla gerçekleşmektedir. Kreatininin kandaki seviyesinin yükselmesi böbrek fonksiyonunun bozulması durumlarında görülmektedir (Jung ve Kim, 2018; Ryu ve ark., 2018). Fakat bu parametre değerlerinin artışı, önemli derecede oluşan böbrek hasarları veya nefron fonksiyonel kapasitesinin büyük kaybından sonra görülmektedir (Boudonck ve ark., 2009; Davis ve Kramer, 2006; Hewitt ve ark., 2004; Thukral ve ark., 2005).

Uzun yıllardır, akut böbrek hasarı için kullanılan parametrelerden biri serum kreatinin değeridir. Bu parametreden, böbrek fonksiyon durumlarının teşhisinde yararlanılmaktadır. Kreatinin, 113 dalton ağırlığındadır. Kreatininin kan salınımının gerçekleşmesinin ardından, kreatin metabolizması sonucu kreatinin oluşmaktadır. Kreatininin, glomerulus tarafından süzülmemektedir ve böbrekten emilimi gerçekleşmemektedir (Stevens ve Levey, 2005).

Serum kreatinin ve kan üre azotu değerleri böbrek hastalıklarının teşhisinde en çok kullanılan parametrelerdendir. Bu parametreler, bir çok durumdan kolaylıkla etkilenebilirler. Örneğin bu değerler, şok ve dehidrasyon durumlarında artış gösterebilir, bunun yanında serum kreatinin değeri gastrointestinal kanama durumunda artış gösterebilmektedir. Dolayısıyla bu parametreler, böbrekle ilgili

olmayan durumlarda da artış gösterebilmektedir. Bu açıdan değerlendirildiğinde bu parametreler, akut nefrotoksisitenin teşhisine özgü değildir (Ferguson ve ark., 2008; Fuchs ve Hewitt, 2011; Uchino ve ark., 2017 ve Vaidya ve ark., 2008).

1.6.2. Clusterin ve KIM – 1 (Kidney Injury Molecule – 1)

Clusterin ve KIM-1, böbrek hasarını tespit etmekte kullanılan yeni parametrelerdir. Her iki parametre de, Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA) ve Avrupa İlaç Dairesi (EMA) tarafından kemirgen hayvan çalışmalarında kabul edilmiştir. Bu kapsamda, gerek Amerika gerekse Avrupa tarafından renal toksisitenin belirlenmesinde yararlanılmak üzere onaylanmıştır (Dieterle ve ark., 2010 ve Vaidya ve ark., 2010).

Clusterin, bir glikoproteindir. Renal tübüllerde hücre adhezyonu ve apoptozisi ile ilişkilidir (Gheith ve El-Mahmoudy, 2018).

Clusterin ilk olarak koç rete testis sıvısından elde edilmiştir. Sertoli hücreleri ve kırmızı kan hücrelerinin kümeleşmelerine neden olmaktadır. Bu özelliğinden dolayı, İngilizce kümeleşme anlamına gelen “clustering” ifadesinden yola çıkılarak, isimlendirilmesinde “Clusterin” kullanılmıştır (Blaschuk ve ark., 1983; Ritz ve ark., 1983).

Clusterin, 80 kDa ağırlığındadır ve çoğu dokuda bulunmaktadır (Ma ve ark., 2015). Plazma, süt, semen gibi biyolojik sıvılarda bulunan önemli bir glikoproteindir (Jones ve Jomary, 2002). Böbrek dokusunda, bilateral üreteral obstrüksiyon, iskemi reperfüzyon hasarı gibi hücresel stres durumlarının yanında intrinsik böbrek hasarı, reddedilen böbrek allogreft durumlarında yukarı yönlü regüle olmaktadır (Dvergsten

ve ark., 1994; Murphy ve ark., 1989; Sansanwal ve ark., 2015; Schlegel ve ark., 1992; Rosenberg ve Paller, 1991; Witzgall ve ark., 1994; Zhou ve ark., 2010).

Clusterin çeşitli olaylarda görev almaktadır. Bunlardan bazıları; programlanmış hücre ölümü, lipid taşınması, sperm olgunlaşması, dokunun yeniden yapılanmasıdır. Bunların dışında, oksidatif stres, yangı, hasar sonrası, miyokardit durumlarında da Clusterin yukarı yönlü regüle olmaktadır (Ma ve ark., 2015). Ayrıca clusterin, erken dönem organ gelişimlerinde de artış göstermektedir (Rosenberg ve ark., 1993; Rosenberg ve Silksen, 1995).

Yapılan çalışmalarda, Clusterin'in böbrek hasarında antiapoptotik olduğu ortaya konmuştur. Clusterin, insan ve deney hayvanlarında oluşturulan bir çok hücrel stres durumunda, böbrek dokusunda yukarı yönlü bir regülasyon göstermiştir. Hücre korumasında, hücre kümeleşmesi, hücre tutunmasına dahil olmaktadır (Pianta ve ark., 2013).

KIM-1, bir transmembran proteindir, immunoglobulin ve musin alanı içermektedir (Han ve ark., 2002). KIM-1, 36 kDa ağırlığındadır. Post-iskemik rat böbreğinde, proksimal tubülde yukarı yönlü bir regülasyon göstermektedir (Ichimura ve ark., 1998).

KIM-1 molekülü, Ichimura ve arkadaşları tarafından ilk olarak 1998 yılında bulunmuş ve adlandırılmıştır. Bu çalışmada, sıçanlar kullanılmıştır ve sıçanların postiskemik böbreklerinden tip 1 membran proteini için komplementer DNA tanımlanmıştır. KIM-1 molekülü, Ig benzeri ve musin alanı içermektedir. Bu alanlar, ekstrasellüler alanda yer almaktadır (Ichimura ve ark., 1998).

KIM-1 mesajcı RNA hasarlı böbrekte kopyalanır ve protein üretilir. Bu proteinin üretimi, proksimal tubülün apikal membranında gerçekleşir ve aynı kısma yerleşir. KIM-1, böbreğin glomerulus, iç medullar hücreler ve peritubular interstisyel hücrelerde bulunmamaktadır (Ichimura ve ark., 1998; Vaidya ve ark., 2006).

KIM-1, normal böbrek dokusunda tespit edilememektedir. Buna karşılık, akut ve kronik böbrek hasarlarında, KIM-1 analizi mümkündür (Han ve ark., 2002; Ichimura ve ark., 1998 ve Vaidya ve ark., 2006).

Yapılan çalışmalarda görülmüştür ki, kan üre azotu ve kreatinin seviyelerinde artış olmamasına rağmen, uriner KIM-1 seviyeleri iskemik akut böbrek hasarlarında yükseliş gösterebilmektedir (Vaidya ve ark., 2006; Vaidya ve ark., 2009).

Han ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları çalışmada, idrar KIM-1 protein konsantrasyonu, akut ve kronik böbrek yetmezliği olan hastalarla iskemik akut tubüler nekroz olan hastalar kıyaslanmıştır. Bunun sonucunda iskemik akut tubüler nekrozlu hastalarda idrar KIM-1 değeri, diğer hastalara göre çok daha yüksek bulunmuştur. İnsanlarda yapılan bu çalışma sonucunda, idrar KIM-1 değerinin, iskemik tubüler hasar tespitinde diğer değerlendirilen parametrelere kıyasla daha spesifik bir marker olduğu sonucuna varılmıştır (Han ve ark., 2002).

1.7. Oksidatif Stress ve Antioksidan Sistemi

Oksijen canlılar için vazgeçilmez olsa da, bazı durumlarda çok tehlikeli bir ajan olarak da bulunabilmektedir. Bu “Oksijen Paradoksu” olarak bilinmektedir (Davies, 1995; Davies, 2000 ve Davies ve Ursini, 1995).

Oksidatif stres, Reaktif Oksijen Türleri'nin (ROS) üretimi ve reaktif ara ürünlerin detoksifikasyonu arasındaki denge tarafından oluşur (Samarghandian ve ark., 2015a; Samarghandian ve ark., 2015b; Sies, 1993). Oksidatif stres durumunda hücreler, oksidan etkilerini azaltmaya, böylece dengeyi tekrar sağlamaya çalışmaktadır. Bu dengenin sağlanması için, transkripsiyon faktörleri, yapısal proteinler ve savunma enzimlerini kodlayan genleri aktive etmekte ya da susturmaktadır (Dalton ve ark., 1999; Scandalios, 2004). ROS üretiminin artması sonucu DNA yapısı etkilenebilmektedir. Bu da proinflamatuvar ve antiinflamatuvar sitokinlerin üretimi, protein ve lipid modifikasyonları gibi durumlara etki etmektedir (Birben ve ark., 2012). Fazla flora maruz kalınması da, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) ve antioksidanlar arasında dengesizlik yaratmakta ve böylece oksidatif stresin oluşmasına neden olmaktadır (Basha ve Sujitha, 2012). Biyomoleküllerde oksidatif hasara yol açan fazla flor alımına bağlı olarak; yumuşak dokularda metabolik bozukluklar, serbest radikal aktivitelerinin artması, yapısal değişiklikler ve fonksiyon bozuklukların olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (Chinoy ve ark., 1995; Halliwell ve Gutteridge, 1986; Monsour ve Kruger, 1985; Shashi, 1992 ve Vani ve Reddy, 2000).

Aşırı ROS üretimi, makromolekül oksidasyonunu arttırmaktadır. Bu da membran fosfolipidlerinin serbest radikal saldırısına neden olmaktadır. Bu saldırı sonucu, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal membran depolarizasyonu ve apoptozisin başlamasıyla membran hasarı oluşmaktadır (Barbier ve ark., 2010).

Oksidatif stres, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet gibi bir çok hastalığın oluşmasında ya da ilerlemesinde de rol oynamaktadır (Taniyama ve Griendling, 2003).

Oksidatif stresin oluşmasında, oksidanlara maruz kalınması veya oksidanlara karşı korunmanın azalması etkili olmaktadır. Bazı durumlarda ise, bu iki durum birlikte gerçekleşmektedir (Cadenas, 1989). Oksidasyon reaksiyonların negatif etkileri arasında, sütün ekşimesi, demirin paslanması, etin bozulması gibi örnekler gösterilebilmektedir. Bu kapsamda oksidasyonu en aza indirmek için bir çok savunma sistemi bulunmaktadır. Antioksidan sistemi, zararlı oksijen ortamına maruz kalma durumunda yardımcı bileşiklere ve yenilenebilir enzimlere sahiptir (Davies, 2000).

Oksidatif stres, reaktif moleküllerin artması sonucu oluşan bir durum olarak değerlendirilmektedir. Reaktif moleküllerin başında, reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri gelmektedir (RNS) (Elsayed, 2001; Maritim ve ark., 2003 ve Turko ve ark., 2001). Reaktif Oksijen Türleri'nin (ROS) başında, süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil iyonu (OH) gelirken, Reaktif Nitrojen Türleri'nin en temel örnekleri arasında nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) yer almaktadır (Evans ve ark., 2002).

Atomlar, merkezde bir çekirdek ve etrafında eşleşmiş halde bulunan elektronlardan oluşmaktadır. Bunun aksine bazı atom ve moleküller eşleşmemiş elektronlara sahiptirler. Bu eşleşmemiş elektronlara sahip atom ve moleküllere serbest radikal adı verilmektedir. Eşleşmemiş atomlar diğer elektronlarla birleşme eğilimi göstermektedirler. Bu, onlara kararsızlık ve yüksek reaktivite özelliği kazandırmaktadır. O_2 ile gösterilen bir oksijen molekülü, dört elektron indirgemeye maruz kalabilmektedir. Böylece reaktif oksijen metabolitleri daha yüksek reaktiviteye sahip olmakta ve aktif oksijen türleri olarak isimlendirilmektedir (Yoshikawa ve Naito, 2002).

Normal hücrel metabolizmanın sonucu moleküler oksijenden üretilen Reaktif Oksijen Türleri serbest radikaller ve radikal olmayanlar olarak 2 gruptan

oluşmaktadır. Serbest radikaller, eşleşmemiş elektron içermektedir bu da moleküle reaktivite özelliği kazandırmaktadır. Radikal olmayan yapılarda ise, iki serbest radikal eşleşmemiş elektronlarını paylaşmaktadır (Birben ve ark., 2012).

1.7.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Reaktif Oksijen Türlerinin 2 farklı kaynaktan oluşmaktadır. Bunlar endojen ve ekzojen olarak tanımlanmaktadır. Endojen kaynaklı ROS'ların başında, süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri, peroksil radikalleri ve hidroperoksil radikalleri gelmektedir. Ekzojen kaynaklı ROS'lar göz önüne alındığında, ağır metal iyonları, sigara dumanı, hiperoksiya gibi örnekler gösterilebilmektedir. (Birben ve ark., 2012).

Çizelge 1.4. Reaktif Oksijen Türleri



Reaktif Oksijen Türlerinin endojen kaynaklı olanlarından süperoksit anyonu (O_2^-), oksijen molekülüne 1 elektron verilmesiyle oluşmaktadır (Miller ve ark., 1990). Bu durum, NADPH (nikotin adenin dinükleotit fosfat) oksidaz ya da ksantin oksidaz aracılığıyla gerçekleşmektedir. Diğer bir yol ise mitokondriyal elektron transport sistemidir. Hücrenin Adenozintrifosfat üreten yeri olan mitokondriler, süperoksit üretiminin de başlıca yeridir. Normal koşullarda oksijen indirgenerek su oluşmaktadır ve bu elektronlar mitokondriyal elektron transport zinciri yoluyla

aktarılmaktadır. Bu durumdan %1 ila %3 oranında elektron kaçış sağlamakta ve süperoksit üretmektedir. NADPH oksidaz ise monosit, makrofaj ve polimorfonükleer lökositlerde bulunmaktadır ve böylece fagositoz ile bakteri yok edici aktiviteye sebep olan süperoksit üretimine sebep olurlar. Süperoksit de süperoksit dismutazların (SOD) etkisi ile plazma membranını rahatlıkla geçebilen hidrojen peroksit dönüştürülmektedir. Bunun dışında hidrojen peroksit başka şekillerde de üretilmektedir. Bu kapsamda, amino asit oksidaz, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz bu üretimde rol oynamaktadırlar (Birben ve ark., 2012; Dupuy ve ark., 1991; Granger, 1988).

ROS'inin başında gelenlerden hidroksil radikalleri en reaktif olanlarıdır. Hidroksil radikalleri DNA, protein, lipid ve karbonhidratlara zarar verebilmektedir ve çoklu doymamış yağ asitlerinden (PUFA) bir elektron alma yoluyla lipid peroksidasyonunu başlatabilmektedir (Birben ve ark., 2012). Ayrıca oksitadif stres karsinogenez, membran hasarı, mutageniz, protein oksidasyonu gibi durumlara da sebep olabilmektedir (Sies, 1993).

Ekzojen kaynaklı ROS'lerden olan sigara dumanı birçok oksidan ve serbest radikal içermektedir. Bunlardan bazıları nitrik oksit ve süperoksitlerdir (Church ve Pryor, 1985). Bunun dışında sigara dumanı, makrofaj ve nötrofil birikmesi gibi bazı durumlara da sebep olabilmektedir. Bunlar endojenik mekanizmalardır (Birben ve ark., 2012).

Ağır metallere örnek olarak civa, arsenik, demir, kadmiyum ve bakır verilebilir. Ağır metallere maruz kalınması durumunda, DNA ve nükleer proteinlerle reaksiyon veya lipid peroksidasyonu yoluyla enzim aktiviteleri azalmaktadır. Böylelikle reaktif radikaller artmakta, hücresel hasar oluşmaktadır (Stohs ve Bagchi, 1995). Hiperoksiya durumunda da normalden fazla miktarda oksijene maruz

kalmakta ve bunun sonucu olarak da reaktif oksijen ve nitrojen türleri artmaktadır (Comhair ve ark., 2000; Matthay ve ark., 1999).

Diğer yandan, düşük veya orta miktarlardaki reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin yararları da bulunabilmektedir. Hücresel yapının oluşmasında gerekli olmalarının dışında, konakçı savunma sisteminde de görev almaktadır. Bunun dışında fagositler de vücut savunması olarak patojen mikropları yok etmek için serbest radikalleri salmaktadırlar (Droge, 2002; Young ve Woodside, 2001).

Bunun dışında serbest radikaller hücre sinyal sistemine de dahil olmaktadır. Ayrıca diğer bir yarar ise mitojenik cevabın başlamasına neden olabilmeleridir (Genestra, 2007; Halliwell, 2007 ve Pacher ve ark., 2007).

1.7.2. Flor ve Oksidatif Stres

Flor toksikasyonunda, serbest radikallerin oluşumu önem taşımaktadır (Nabavi ve ark., 2012). Florür, serbest radikallerin oluşumunu uyarabilmektedir. Serbest radikaller de hücre membranlarının yapısını ve geçirgenliğini değiştirebilmekte ayrıca hücre fonksiyonunu bozabilmektedir (Chlubek, 2003). Böylelikle fazla flor alınımında, bir çok doku ve kanda oksidatif stresin artış gösterdiği kanıtlanmıştır (Grucka-Mamczar ve ark., 2009).

Çalışmalar, flor toksikasyonu sonucunda antioksidan enzimlerin aşağı yönlü regülasyonunun sağlandığını ortaya koymuştur (Vani ve Reddy, 2000). Bunun yanı sıra, ROS ve oksidatif streste artışın gerçekleştiği kanıtlanmıştır (Ghosh ve ark., 2002).

Fazla miktarda flor alınımı sonucunda, süperoksit anyonunun (O_2^-) miktarı artmaktadır. Bunun yanında, hidrojen peroksit, peroksinitrit ve hidroksil radikallerinde azalış gerçekleşmektedir (Garcia-Montalvo ve ark., 2009; Giri ve ark., 2016). Ayrıca florür, nitrik oksit (NO) üretimini de arttırmaktadır (Hassan ve Yousef, 2009) ve böylece süperoksitle reaksiyona girmesi ve peroksinitrit oluşmasına sebep olmaktadır. Ayrıca disülfid bağ oluşuma etkisi tespit edilmiş olup, endoplazmik retikulum stresi ve ROS üretiminde artışa neden olduğu görülmüştür (Giri ve ark., 2016).

Gerek insanlarda gerekse hayvanlarda yapılan çalışmalarda, kronik flor toksikasyonu ve oksidatif stres arasındaki ilişki tespit edilmiştir (Saralاکumari ve Ramakrishna, 1991; Sharma ve Chinoy, 1998). Ayrıca, sıçanlarda yapılan çalışmada, hayvanların böbrek dokularında TBARS (Tiyobarbitürik asit-reaktif maddeler) ve hidroperoksitlerde artış gözlenmiştir (Chen ve ark., 2008).

Florür, enzim inhibitörü gibi davranmaktadır. Böylelikle enzimlerle etkileşime geçmekte ve aktif kısımları ile bağlanmaktadır (Barbier ve ark., 2010). Florürün bazı antioksidan enzimlerin aktivitesini inhibe ettiği yapılan çalışmalarda görülmüştür. Bu enzimlerin başında, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peoksidaz (GPx) ve katalaz gelmektedir (Garcia-Montalvo ve ark., 2009; Izquierdo-Vega ve ark., 2008; Nobes ve ark., 1995). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, yüksek miktarda florür alınımı sonrasında dokularda SOD aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Bunun dışında ratlarda yapılan çalışmada ise böbrek dokusunda SOD ve katalaz aktivitesinin azaldığı ortaya konmuştur (Mc-Cord ve ark., 1984).

Oksidatif stres, böbreklerde de bazı hasarlarda rol oynamaktadır. Böbrek yetmezliği, tübül interstisyel nefrit, glomerulo interstisyel nefrit, üremi ve proteinüri gibi böbreği etkileyen hastalıklar örnek verilebilmektedir (Droge, 2002; Galle, 2001). ROS üretimi, inflamatuvar hücrelerin alınımına ve proinflamatuvar sitokin üretimini

başlatmaktadır. Bu yüzden de böbrekler oksidatif stres durumundan etkilenmektedirler. Erken aşamada, TNF-alfa ve IL-1b, proinflamatuvar mediatörler olarak görev alırlar. Aynı zamanda inflamatuvar süreci devam ettirmek için gerekli olarak NF- κ B de rol oynamaktadır. Son aşamada ise, TGF-beta üretiminde artış görülmektedir. TGDF-beta hücre dışı matriksinin sentezini düzenlemekten sorumludur. Böylece oksidatif stresin kronik etkisi sonucunda ilk etki inflamasyon oluşmasıdır. Bunun akabinde ise fibrotik dokunun oluşmasıdır. Fibrotik dokunun oluşması organ işlev bozukluğuna neden olmakta ve böbrek yetmezliği ile sonuçlanmaktadır. Kullanılan bazı ilaçlar da serbest radikallerin oluşmasına sebep olmaktadır. Bunun sonucunda lipid peroksidasyonu yoluyla oksidatif stres görülmektedir. Serbest radikal seviyelerinin yükselmesine neden olan ilaçlara örnek gentamisin, takrolimus, siklosporin gibi nefrotoksit etkili ilaçlar gösterilebilmektedir (Galle, 2001; Massicot ve ark., 1997a; Massicot ve ark., 1997b ve Sadeg ve ark., 1993).

Blaszczyk ve arkadaşlarının 2008 yılında yayınladıkları çalışmada, Wistar FL ırkı 4 aylık erkek sıçanlara 35 gün boyunca 10 mg/kg sodyum florür verilen grup ile kontrol grubunun karşılaştırılması sonucunda böbrekteki MDA konsantrasyonunun yaklaşık iki kat arttığı gözlenmiştir. Bunun da lipid peroksidasyonunu gösterdiği kanıtlanmıştır. Ayrıca bu grupta, SOD, GPX, MnSOD ve CAT aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalışlar gözlenmiştir (Blaszczyk ve ark., 2008).

Yapılan çalışmalar, antioksidan tedavisinin, florüre maruz kalınması durumunda oluşan lipid peroksidasyonundan hücreleri koruduğu bulunmuştur (Hassan ve Yousef, 2009; Mittal ve Flora, 2006).

Florla oluşturulan toksikasyonda, ratların böbrek dokularında ROS ve lipid peroksidasyonunun arttığını ortaya konmuştur (Kobayashi ve ark., 2009).

1.7.3. Antioksidan Sistemi

ROS'ların kontrolsüzce artması sonucu oksidatif stres oluşmaktadır. Hücrelerin kendilerini bu oksidatif hasardan korumak için bazı savunma mekanizmaları bulunmaktadır. Bu da ROS kontrolünü sağlamak için oluşan antioksidan savunmadır. Antioksidanlar, oksidasyonu azaltmakta ya da durdurmaktadır (Kohen ve Nyska, 2002). Antioksidanların ROS'un zararını azaltması durumu, kendi elektronlarını ROS'a vermesi yoluyla gerçekleşmektedir. Bir antioksidan, önleme, durdurma ve onarma olmak üzere 3 farklı şekilde çalışmaktadır. Önleme seviyesinde, reaktif türlerin oluşumunu en düşük seviyede tutmakta; durdurma görevinde katalitik ya da katalitik olmayan enzimleri kullanarak reaktif türleri temizlemektedir. Onarım seviyesinde ise glutasyon gibi maddelerle hasar görmüş moleküllerin onarımını sağlamaktadır (Kohen ve Nyska, 2002).

Antioksidan savunma, enzimatik ve enzimatik olmayan olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. Enzimatik antioksidan savunma, sodyum dismutaz (SOD), peroksidazlar ve katalazlar (CAT) gibi bileşikler ile yapılır ve bunların, süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksiti direkt temizlediği belirlenmiştir. SOD, O₂'nin H₂O₂'ye değişimini katalizle etmektedir. Bunun yanında peroksidazlar ve katalaz H₂O₂'yi 2H₂O'ya indirgemektedirler. Substratları SOD için O₂ ve CAT için H₂O₂ olan oksidasyon ve indirgeme reaksiyonlarında indirgeyici ve oksidan oluşları, SOD ve CAT reaksiyonlarının benzerliklerini göstermektedir. Bunun yanında peroksidazlarda ise farklı indirgeyiciler gerektiği ve bazı durumlarda ise CAT'in peroksidaz gibi davranabildiği belirtilmektedir. SOD ise O₂'yi H₂O₂'ye dönüştürür. Oluşan H₂O₂ de peroksidazlar ve CAT'in birlikte veya ayrı ayrı etki ile yok edilirler (Scandalios, 2005). Her iki grup da H₂O₂'yi su ve oksijene dönüştürmektedir (Davies, 2000).

Hidrojen peroksit metallerle de reaksiyona girebilmektedir. Eğer bu metal Fe⁺² ise bu reaksiyona Fenton reaksiyonu denir. Bu reaksiyon sonucunda hidroksil radikali HO• oluşmaktadır (Flora, 2009).

SOD, bir çok organizmadan elde edilebilmektedir. 4 farklı önemli çeşidi vardır. Bunlar, ilk grupta aktif kısmı bakır (Cu) ve çinkonun (Zn) oluşturduğu Cu/ZnSOD, ikinci grupta manganezden oluşan MnSOD, üçüncü grupta demirden (Fe) oluşan FeSOD ve dördüncü grupta ise nikelten (Ni) oluşan NiSOD'tur. Bunlar buldukları yerlere göre farklılık göstermektedirler. Örneğin, FeSOD bazı bitkilerin kloroplastları, algler ve prokaryotlarda bulunurken, NiSOD ise Streptomiçeslerde bulunmaktadır. Cu/ZnSOD ökaryot hücrelerin sitozolünde, kloroplastlarda ve bazı prokaryotlarda; MnSOD prokaryotlar ve mitokondrilerde bulunmaktadır (Scandalios, 1997; Fink ve Scandalios, 2002).

Enzimatik olmayan antioksidanlar da kendi aralarında 2 gruba ayrılmaktadır. Bunlar metabolik antioksidanlar ve besinsel antioksidanlardır. Metabolik antioksidanlar metabolizma tarafından üretilirler bu yüzden de endojen antioksidanlardır. Bu gruptaki antioksidanlara, glutatyon, bilirubin, melatonin vs. örnek gösterilebilir (Droge, 2002; Willcox ve Ash, 2004). Gıda antioksidanlarına bakıldığında ise, bunlar vücutta üretilemeyen gruplar olarak belirlenmektedir, bu yüzden de ekzojen antioksidanlardır. Gıda antioksidanları, besinlerle veya ek gıdalarla vücuda alınmalıdır. Örnek olarak E vitamini, C vitamini, omega-3 ve omega-6 yağ asitleri vs. verilebilmektedir (Pham-Huy ve ark., 2008).

Çizelge 1.5. Antioksidanlar



Antioksidanlar vücutta devamlı olarak yenilenmelidir. Çünkü bir antioksidan serbest radikali yok ettiğinde, kendi okside olmaktadır. Ayrıca bir sistemde etkili olan antioksidan diğer başka bir sistemde etkili olamayabilir. Bazı durumlarda ise antioksidanlar prooksidan olarak hareket edip, toksik radikalleri üretebilmektedirler (Young ve Woodside, 2001).

Antioksidanlar iki şekilde etki gösterirler. Bu yollar; zincir kırma ya da engelleme şeklindedir. Zincir kıran antioksidanlara E vitamini ve C vitamini örnek verilebilmektedir. Zincir kırma yolunda, bir radikal elektron vermekte ya da almaktadır, bu durumda başka bir radikalın oluşmasına sebep olmaktadır. Oluşan son radikal aynı reaksiyonu başka bir reaksiyona uygulamakta ve bu şekilde son serbest radikal stabilize olana kadar veya bir zincir kırıcı antioksidan ile zararsız bir ürüne dönüşene kadar devam etmektedir. Bu yola verilecek örneklerin başında lipit peroksidasyonu yer almaktadır (Young ve Woodside, 2001).

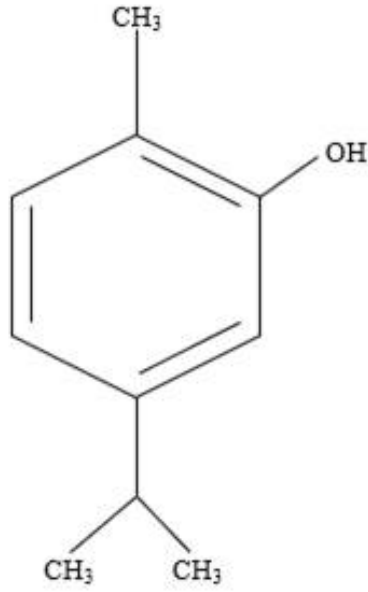
Diğer bir yol olan engelleme yolunda ise, katalaz, glutatyon, SOD gibi antioksidan enzimler yoluyla oksidasyon engellenmektedir. Zincir başlama oranı

azaltılmaktadır. Örnek olarak, demir ve bakır gibi geçiş metal radikallerinin dengede tutulması verilebilmektedir (Young ve Woodside, 2001).

1.7.4. Karvakrol

Karvakrol veya cymophenol, moleküler formülü $C_6H_3CH_3$ olan bir monoterpenoid fenoldür. Kekiğin karakteristik kokusuna sahiptir. Karvakrol özellikle, *Origanum hirtum*, yabani bergamot gibi bitkilerden elde edilen esansiyel yağların bir bileşenidir. Bunlar, antioksidan ve antimikrobiyal etkiye sahiptirler ve bazı gıdalarda belirli aromanın oluşumunda etkilidir. Karvakrolün tüketimi güvenlidir, bu yüzden de sentetik antioksidatif gıda katkılarının yerine doğal bir katkı olarak kullanılabilir (Burt, 2004).

Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC), Karvakrolün isimlendirmesinde “5-izopropil-2-metilfenol” ifadesini kabul etmiştir (Yadav ve Kamble, 2009).



Şekil 1.1. Karvakrolün yapısı

Karvakrol, sıvı bir maddedir ve oda sıcaklığında yoğunluğu 0,976 g/cm³'tür. Karvakrolün kaynama noktası 237-238 °C ve erime noktası ise 1 °C'dir. Molekül ağırlığı 150.217 g.mol⁻¹ olan Karvakrolün kokusu timol ile aynıdır. Karvakrol, suda çok az ya da hiç çözünmemektedir, yüksek derecede lipofiliktir. Etanol, aseton, dietil eter ve alkalilerde çözünmektedir. Doğrusal formülü (CH₃)₂CHC₆H₃(CH₃)OH'dır (Ultee ve ark., 2000; Mohammedi, 2017). Karvakrol, Labiatae ailesinde bulunan bitkilerin esasnsiyel yağlarında bulunmaktadır. Bu sınıfta yer alan bitkilere Thymbra (Zahter), Coridothymus (acı kekik) gibi türler örnek verilebilmektedir (Krimmer ve ark., 1995; Omidı ve ark., 2013).

Karvakrolün güçlü bir antioksidan madde olduğu ve bir çok hastalığın engellenmesinde etkili olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Liang ve Lu, 2012). Ayrıca yapılan çalışmalar Karvakrolün antioksidan etkisinin yanında, antiinflamatuvar, antitümör, analjezik, antihepatotoksik, antimikrobiyal ve böcek öldürücü etkiye sahip olduğunu da göstermiştir (Melusova ve ark., 2014).

Karvakrolün başlıca antimikrobiyal, antioksidan etkisinin olmasının yanında kansere karşı koruma etkisi de yer almaktadır. Bu kapsamda bir çok çalışma yapılmıştır. Özellikle antioksidan etkisi dikkate alındığında, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan aktivitelerine etki etmesi, hayvan beslemede kullanılması ve hatta paketli gıdaların raf ömrünü uzatması gibi özellikler ortaya konulmuştur (Sharifi-Rad ve ark., 2018).

Karvakrol metabolizması iki değişik yol izlemektedir. İlk yol, fenollü grubun sülfat ve glukuronik asit ile esterleşmesinden oluşmaktadır. İkinci yola ise daha az rastlanmaktadır. Bu yol, terminal metil grubunun oksidasyonu uğrayarak primer alkollere dönüşmesiyle ortaya çıkmaktadır. Albino ratlarla yapılan çalışmalarda, idrarda glukuronid ve sülfat bileşikleri yoluyla karvakrolün atıldığı görülmüştür (Austgulen ve ark., 1987).

Karvakrolün vücuttan atılımı ile ilgili çalışmalar çok eski yıllara dayanmaktadır. 1979 yılında Opdyke'nin yaptığı çalışmada, tavşanlara oral yolla 1,5 g Karvakrol verilmiş ve bağırsaklardan karvakrol emiliminin yavaş gerçekleştiği gözlenmiştir. Uygulanan karvakrolün, yaklaşık %30'unun gastrointestinal yolda bulunduğu görülmüştür. Bunun yanında, uygulamanın 22 saat sonrasında verilen Karvakrol miktarının %25'inin idrarla atıldığı tespit edilmiştir (Opdyke, 1979). Ayrıca başka bir çalışmada, ratlara 500 mg ve tavşanlara 1500 ve 5000 mg susam yağında bulunan karvakrolün gavaj yoluyla verilmesiyle, hayvanların kan, dışkı, idrar ve dokusunda karvakrole rastlanmıştır. Bu durum, uygulamanın 2-24 saat sonrasında gözlenmiştir (Schroder ve Vollmer, 1932).

Karvakrol, yem katkı maddesi olarak da kullanılabilir. Kanatlı beslenmesinde, aflatoksin kontrolünü sağlamak için karvakrol kullanılmış ve bunun sonucunda besi kültüründe aflatoksin üremesinin azaldığı görülmüştür (Yin ve ark., 2015).

Kanatlı hayvanlarda yem katkı maddesi olarak karvakrol uygulanması sonucu, doku lipid oksidasyonunun engellendiği görülmüştür. Bu da et kalitesini olumlu yönde etkilemektedir (Luna ve ark., 2010).

İnsanlarda beslenmede de karvakrolün kullanımı, Federal İlaç Dairesi tarafından uygun ve güvenli bulunmuştur. Avrupa Konseyi tarafından da kıtalarda kullanılabilir kimyasallar listesine girmiştir. Bu gıdalar arasında, alkollü ve alkolsüz içecekler, sakız, dondurulmuş süt ürünleri gibi gıdalar yer almaktadır (Ultee ve ark., 1999; De Vincenzi ve ark., 2004).

Ozturk ve arkadaşları, 2018 yılında ratlar üzerinde bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada, 3 grup oluşturulmuş ve her grupta 10 rat olmak üzere toplamda 30 hayvan kullanılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda, ratlarda görülen bilateral renal iskemi reperfüzyonu sonucu oluşan fonksiyonel ve histopatolojik değişimlerin, Karvakrol ile büyük ölçüde tedavi edildiği kanıtlanmıştır. Çalışmada, serum BUN ve kreatinin seviyelerinin yükselmesi sonucuyla bilateral iskemi reperfüzyonu ile oluşan akut böbrek hasarı tanısı belirlenmiştir. İskemi reperfüzyonu görülen ratların karvakrol ile tedavisi sonucu; akut tubüler hasar, tubüler dilatasyon, nekroz ve inflamasyonda azalışlar kaydedilmiştir. Çalışmanın sonucunda, karvakrolün ratlarda iskemi reperfüzyonu ile oluşan akut böbrek hasarını iyileştirdiği bulunmuştur. Bu kapsamda, serum BUN ve kreatinin, renal oksidatif stres parametreleri ve böbrek dokusunda histolojik incelemelerde olumlu değişimler yaptığı kanıtlanmıştır (Ozturk ve ark., 2018).

2015 yılında Hassan Ahmadvand ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, gentamisin verilen ratlarda, böbrek fonksiyonları ve histopatolojik değişimler üzerine Karvakrolün koruyucu etkisi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, her grupta 8 hayvan olmak üzere toplamda 32 erkek rat kullanılmıştır. Çalışma sonunda böbrek dokusu histopatolojik olarak değerlendirilmiş, serum kreatinin ve üre değerleri ölçülmüştür.

Serum üre sonuçları, tedavi edilmemiş nefrotoksik ratlarda, kontrol grubunda yer alan hayvanların değerlerinden 4 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. Karvakrol ile tedavi edilen nefrotoksik hayvanlar, tedavi edilmemiş nefrotoksik grupla karşılaştırıldığında, serum üre değerlerini anlamlı şekilde azalmadığı görülmüştür. Karvakrol ile tedavi edilen grubun değerlerinde, tedavi edilmemiş nefrotoksik gruba göre anlamlı bir azalma görülmediği bildirilmiştir. Sonuç olarak, karvakrolün nefrotoksik durumları kısmen azalttığı düşüncesi bildirilmiştir (Ahmadvand ve ark., 2016).

Çalışmamızın amacı, ratlara içme suyuyla NaF verilerek flor toksikasyonunun oluşturulması, bu toksikasyonda Karvakrolün böbrekler üzerine koruyucu ve tedavi edici etkisinin araştırılmasıdır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 10.05.2017 tarihli toplantısında, 2017-10-86 numaralı kararı ile 45 adet erkek Wistar Albino ırkı sıçanın kullanılmasına izin verilmiştir.

45 adet erkek sıçan, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı'nda 4 aylık büyüklüğe ulaşana kadar yetiştirilmiş olup, uygulama boyunca da kullanılacak bu sıçanların bakımı yine burada sağlanmıştır.

45 sıçan (240 – 350 gr), Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları ve Araştırma Laboratuvarı'nda, 24 °C sıcaklık ve %45 nemli ortamda, 12 saat ışıklandırma ile bakılmıştır. Kafes büyüklükleri, minimum bölge büyüklüğü 800 cm², hayvan başına taban alanı 250-350 cm² ve minimum bölme yüksekliği 18 cm olacak şekildedir. Sıçanlar, ad libitum olarak, Korkutelim Yem Gıda San. Tic. A.Ş. tarafından üretilen “Rat (Sıçan) Tam Yemi” ile beslenmiştir. Yemde kullanılan hammaddeler; soya fasulyesi küspesi, mısır, buğday kepeği, arpa, tam yağlı soya, yonca unu, dcp, pelet bağlayıcı, toksin bağlayıcı, minerali, D.L. methionine, kolin klorid, kanatlı minerali, E vitamini'dir. Yemde bulunan temel besin maddelerin yüzde oranları Çizelge 2.1.'de belirtilmiştir:

Çizelge 2.1. Kullanılan Rat yeminin bileşimi

TEMEL BESİN MADDELERİ	YÜZDE ORANI (%)
Ham Yağ	3,29
Ham Kül	6,48
Lysine	1,32
Fosfor	0,98
Ham Protein	24,00
Ham Selüloz	6,09
Methionine	0,44
Kalsiyum	0,87
Sodyum	0,05

2.1.1. Hayvanların Gruplandırılması

Sıçanlar, 4 aylık gelişimlerinin ardından, her grupta 9 hayvan olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Her grubun ortalama ağırlığı 295 ± 15 gr olacak şekilde gruplandırma yapılmıştır.

Grup 1 kontrol grubunu oluşturmuş, bu gruba 40 gün boyunca normal içme suyu verilmiş ve intraperitoneal olarak %2,5'lik Dimetil Sülfoksit (DMSO) uygulaması yapılmıştır.

Grup 2, flor toksikasyonunun oluşturulmasının amaçlandığı grubu temsil etmekte olup, bu gruptaki hayvanların içme sularına 30 gün boyunca 300 ppm (mg/L) sodyum florid (NaF) eklenmiştir (Ekambaram ve ark., 2010).

Grup 3, 30 gün boyunca içme sularına 300 ppm (mg/L) sodyum florid eklenmiş ve aynı süre boyunca (30 gün) 74 mg/kg dozunda karvakrolün intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandığı grubu oluşturmuştur. Bu gruptaki amaç, karvakrolün profilaktik (koruyucu) etkisinin araştırılmasıdır (Ahmadvand ve ark., 2016).

Grup 4'te ise, 30 gün boyunca hayvanların içme sularına 300 ppm (mg/L) NaF eklenmiş olup, 30 günün sonunda 10 gün boyunca deneklere intraperitoneal (i.p.) olarak 74 mg/kg karvakrol uygulanmıştır. Bu gruba 30 gün NaF içeren su verilmesinin ardından karvakrolün uygulanacağı 10 gün boyunca normal içme suyu verilmiştir. Grubun amacı ise, karvakrolün flor toksikasyonu durumunda tedavi edici etkisinin araştırılmasıdır.

Grup 5 ise, 30 gün boyunca 74 mg/kg intraperitoneal (i.p.) olarak karvakrolün uygulandığı grubu oluşturmuştur.

Çizelge 2.2. Ratların Gruplandırılması

GRUP	İÇME SUYU	İ.P. UYGULAMA
Grup 1 - KONTROL	40 gün boyunca normal içme suyu	Aynı süreçte (40 gün) i.p. %2,5'lik Dimetil Sülfoksit (DMSO) uygulanmıştır
Grup 2	30 gün boyunca içme suyuna 300 ppm NaF eklenmiştir	-
Grup 3	30 gün boyunca içme suyuna 300 ppm (mg/L) NaF eklenmiştir	Aynı süreçte (30 gün) 74 mg/kg dozunda i.p. karvakrol uygulanmıştır
Grup 4	30 gün boyunca içme suyuna 300 ppm (mg/L) NaF eklenmiştir	NaF uygulanan 30 günün sonunda, 10 gün boyunca i.p. 74 mg/kg karvakrol uygulanmıştır
Grup 5	30 gün boyunca normal içme suyu	Aynı süreçte (30 gün) 74 mg/kg i.p. karvakrolün uygulanması



Şekil 2.1. Ratların Gruplandırılması

2.1.2. Sodyum Florid'li (NaF) İçme Suyunun Hazırlanması

Sodyum Florid ise, Merck firmasından alınmış olup, oda sıcaklığında saklanmıştır. 300 ppm Sodyum Florid'li içme suyu her gün taze olarak hazırlanmıştır. 300 mg Sodyum Florid hassas terazi ile ölçülmüş ve 1 litreye distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

Hazırlanan çözeltinin taşınması plastik şişelerle yapılmıştır. Hayvanlara her gün aynı miktarda (250 ml) NaF'lü su, plastik suluklarla verilmiştir. Her uygulama öncesi, hayvanların içtikleri su miktarları tespit edilmiş ve kaydedilmiştir.

2.1.3. Karvakrolün Hazırlanması

%98 Karvakrol (5-isopropyl-2-methylpehol), Sigma – Aldrich firmasından satın alınmıştır.

Karvakrol, her grubun ortalama vücut ağırlığına göre hesaplanmış ve 74 mg/kg dozda olacak şekilde, %2,5 DMSO (Riedel-de Haën 60153) ile sulandırılarak hazırlanmıştır. Her bir hayvan için 74 mg/kg olacak şekilde gerekli olan karvakrol miktarı belirlenmiş, uygulama yapılacak hayvan sayısına göre toplam gerekli olan karvakrol miktarı hesaplanmıştır. %98 karvakrol miktarının %100 olması için hesaplama yapılmış, bu miktar hassas teraziyle (SHIMADZU AUW320) ölçülmüştür. Sulandırma için %2,5 oranında olacak şekilde DMSO miktarı belirlenmiştir. Belirlenen miktarların birleştirilmesinin ardından, %0,9 izotonik sodyum klorür çözeltisi ile tamamlanmıştır.

Karvakrol çözeltisi her gün uygulama öncesi taze olarak hazırlanmış ve i.p. olarak uygulama yapılmıştır.

2.1.4. %2,5 Dimetil Sülfoksit Çözeltisi Hazırlanması

Kontrol grubuna (1. grup) 40 gün boyunca i.p. olarak %2,5'lik Dimetil Sülfoksit çözeltisi uygulanmıştır. Bu çözeltinin hazırlanması için, 12,5 ml Riedel-de Haën (60153) marka DMSO'nun üzerine %0,9 izotonik sodyum klorür çözeltisi 50 ml'ye tamamlanarak eklenmiştir.

2.2. İlk Kan Örneklerinin Alınması

Gruplandırmaların yapılmasının ardından, ilk kan örneklerinin alınması ve Kan Üre Azotu (BUN) ve Kreatinin (CR) ölçümlerinin yapılması için; sıçanlar 12 – 15 saat aç bırakılmış ve sadece normal içme suyu verilmiştir. 12 – 15 saatin sonunda Richter Pharma ag Ketazol %10 (enjeksiyonluk çözelti, 10 ml), baVET Basilazin %2 (enjeksiyonluk çözelti, 25 ml) ile hayvanlar anestezide alınmıştır ve her hayvanın kalbinden kan örnekleri toplanmıştır.

Alınan kanlar 3000 devirde 10 dk Sigma 3K30 cihazında santrifüj edilmiş ve serumlar elde edilmiştir. Bu serumlardan ilk Kan Üre Azotu (BUN) ve Kreatinin (CR) değerleri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Merkez Tanı Laboratuvarı'nda bulunan Erba Mannheim Diagnostic XL600 cihazıyla ölçülmüştür.

2.3. Uygulamaların Yapılması

İlk kan örnekleri alındıktan 4 gün sonra ilk uygulamalara başlanmıştır.

İlk 30 gün boyunca, grup 3 ve grup 5'te bulunan sıçanlara, 74 mg/kg karvakrol uygulaması i.p. olarak yapılmıştır. Ayrıca, grup 2, grup 3 ve grup 4'te bulunan hayvanlara 300 ppm NaF içeren içme suyu verilmiştir. Her gün uygulamaya başlamadan önce, içilen su miktarları ölçülmüş ve bu miktarlar kaydedilmiştir.

30 günün sonunda, grup 2, grup 3 ve grup 5'teki hayvanlar 12 – 15 saat aç bırakılmıştır. 12 – 15 saat açlığın ardından, Richter Pharma ag Ketazol %10 (enjeksiyonluk çözelti, 10 ml), baVET Basilazin %2 (enjeksiyonluk çözelti, 25 ml) ile bu hayvanlar anestezide alınmıştır. Kalpten kan örnekleri alınan hayvanlar, sakrifiye edilmiştir.

Grup 4'te bulunan hayvanlara ise, 30 günün sonunda normal içme suyu verilmeye başlanmış ve – bu 30 günü takiben – 10 gün boyunca i.p. olarak karvakrol uygulaması yapılmıştır.

Grup 1'e (kontrol grubuna) ise, 40 gün boyunca normal içme suyu verilmiş, her gün i.p. olarak %2,5'lik DMSO uygulaması yapılmıştır.

Uygulamaların devam ettiği grup 1 ve grup 4'te bulunan sıçanlar, 40. günün sonunda, 12 – 15 saat aç bırakılmış ve bu sürenin sonunda Richter Pharma ag Ketazol %10 (enjeksiyonluk çözelti, 10 ml), baVET Basilazin %2 (enjeksiyonluk

çözelti, 25 ml) Basilazin ile anesteziye alınmıştır. Kalpten kan örnekleri alınan hayvanlar, sakrifiye edilmiştir.

Tüm uygulamaların, her gün sabah saatlerinde (07:00 – 08:00) ve aynı saat aralıklarında yapılmasına dikkat edilmiştir.

2.4. Sakrifikasyon Sonrası Kan Örneklerinin Alınması

Oluşturulan gruplandırma metoduna göre, her grubun sakrifiye edilmesinden önce 10 mg/kg dozda Richter Pharma ag Ketazol %10 (enjeksiyonluk çözelti, 10 ml) ve 90 mg/kg dozda baVET Basilazin %2 (enjeksiyonluk çözelti, 25 ml) ile hayvanlar anesteziye alınmış ve kalp kanları alındıktan sonra sakrifiye edilmiştir. Alınan kanlar 3000 devirde 10 dk Sigma 3K30 cihazında santrifüj edilmiş ve serumlar elde edilmiştir. Bu serumlardan son Kan Üre Azotu (BUN) ve Kreatinin (CR) değerleri, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Merkez Tanı Laboratuvarı'nda bulunan Erba Mannheim Diagnostic XL600 cihazıyla ölçülmüştür. Kalan serumlar, renal biyomarkerlardan olan Kidney Injury Molecule -1 (KIM-1) ve Clusterin (CLU) analizlerinin yapılması için Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda -80 °C'de dondurulmuştur. Rat spesifik KIM-1 (Kidney Injury Molecule – 1) Elisa Kiti (SEA785Ra) ve Rat spesifik Clusterin Elisa Kiti Cloud Clone (SEB180Ra) firmasından satın alınmıştır.



Şekil 2.2. Anestezi sonrası kalpten kan alınması

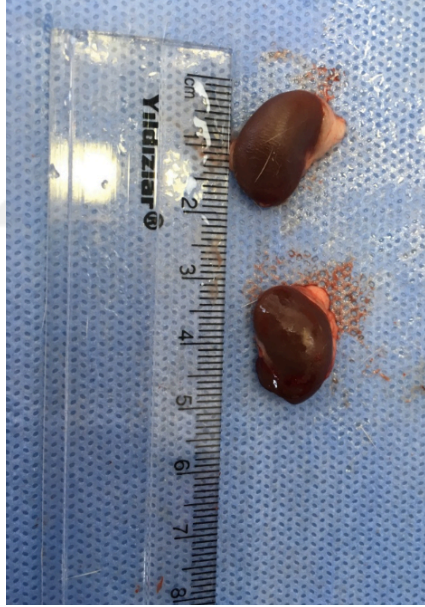


Şekil 2.3. Sakrifikasyon

2.5. Sakrifikasyon Sonrası Böbrek Örneklerinin Elde Edilmesi

Alınan dokular, Polifarma %0,9 izotonik Sodyum Klorür çözeltisinde yıkanmış, dondurulmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

Sakrifiye edilen hayvanların, sağ ve sol böbrekleri belirlenmiş, Polifarma %0,9 izotonik Sodyum Klorür çözeltisinde yıkanmıştır. Her iki böbreğin ağırlıkları ölçülmüştür. Sağ böbreğin tamamı ve sol böbrek dokusundan bir kısım %10'luk formaldehit solüsyonuna alınarak, patolojik değerlendirme için Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderilmiştir. Kalan böbrek dokuları TBARS (Tiyobarbitürik asit – reaktif maddeler), Süperoksit Dismutaz (SOD) ve Glutasyon Peroksidaz (GPx) lmlerinin yapılması amacıyla Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda -80 °C'de dondurulmuştur. Analizlerin yapılması için, Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical Item No: 706002), Glutathione Peroxidase Assay Kit (Cayman Chemical Item No: 703102) ve TBARS Assay Kit (Cayman Chemical Item No: 10009055) Cayman firmasından satın alınmıştır.



şekil 2.4. Sakrifikasyon sonrası elde edilen böbrekler

2.6. Böbrek Doku Kesitlerinin Alınması, Boyanması ve Histopatolojik İncelemelerin Yapılması

Böbrek dokuları tamponlu %10'luk formalinde 24 saat süre ile tespit edildikten sonra doku takip cihazında (Leica TP1020) dereceli alkol serisi ve ksilolden geçirilerek parafine bloklanmıştır (Thermo Shandon Histocentre 3). Parafin bloklardan alınan 5 µm'lik kesitler (Leica RM2255) Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyası ile boyanmış ve entellan ile kapatılmıştır (Leica Autostainer XL- Leica CV5030). Preparatlar kameralı ışık mikroskopunda (Olympus BX51-DP71) incelenmiştir.

Histopatolojik olarak: Bowman boşluğunda artış; tübüllerde dejenerasyon, proteinöz madde birikimi ve dilatasyon bulguları semikantitatif (0: Gözlenmedi, 1: Fokal, 2: Multifokal, 3: Diffuz) değerlendirilmiştir.

2.7. Böbrek Dokusunun Homojenizasyonu

Sakrifikasyon sonrası, -80 °C'de dondurulmuş sol böbrekler, doku homojenizasyonu için hazırlanmıştır. Dokular, pH 7.4, 50 mM fosfat buffer ile 9 kat sulandırılarak homojenize edilmiştir. 50 mM fosfat buffer'ın hazırlanması için, %0,13 monosodyum fosfat monohidrat ile %1,0734 disodyum fosfat heptahidrat kullanılmıştır. Bu kapsamda, Santa Cruz Biotechnology (sc-202342A) (1 kg) marka Sodyum fosfat, monobasic ve Merck, Almanya (A908979) (1 kg) marka di-Sodyum Hidrojen Fosfat dodekahidrat kullanılmıştır. Buna göre, 1,3 gr Sodyum fosfat, monobasic ve 27 gr di-Sodyum Hidrojen Fosfat dodekahidrat SHIMADZU AUW320 marka hassas terazi ile tartılmış ve 1 lt'ye distile su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan tampon solüsyonunun pH'sı, Hanna instruments, HI221 pH metre ile ölçülmüştür.

Her hayvanın sol böbrek dokusundan 0,1 gram hassas terazi ile tartılmış ve hazırlanan 1 ml fosfat buffer ile sulandırılmıştır. Sulandırılan dokular ultrasonik (Bandelin Sonopuls Mini 20) yöntemle homojenize edilmiştir. Oluşan homojenatlar, 10000 g hızda 4 °C’de 10 dakika, Sigma 3K30 cihazı kullanılarak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası, süpernatantlar farklı eppendorf tüplerine porsiyonlanarak, oksidatif stres parametreleri (SOD, GPx ve TBARS) ölçümlerinin yapılması amacıyla -80 °C’de dondurulmuştur.

2.8. Superoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GPx) ve Tiyobarbitürik Asit Reaktif Substans (TBARS) Parametrelerinin Ölçülmesi

2.8.1. Superoksit Dismutaz (SOD) Analizi

SOD Analizi için, Cayman Chemical Item No: 706002 Test kiti kullanılmıştır.

Superoksit dismutazlar (SOD), metalloenzimlerdir. Bunlar, superoksit anyonunun moleküler oksijen ve hidrojen peroksite tersdeğişimini (dismutasyonunu) katalize etmektedirler. Bu kapsamda da hücrel antioksidan savunma mekanizmasının çok önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar (Malstrom B. ve ark., 1975).



Bakır-çinko (Cu-Zn), manganez (Mn) ve demir (Fe) içermesi yönünden üç farklı çeşit SOD tanımlanmıştır. Gerek bitkilerde gerek ise hayvanlarda yaygın olarak bulunmaktadır. Özellikle böbrek, karaciğer, kalp gibi organlarda yüksek konsantrasyonlarda bulunabilmektedir. İnsanlarda 3 çeşit SOD tanımlanmıştır.

Bunlar; sitosolik Cu-Zn SOD, mitokondriyal MnSOD ve ekstraselüler SOD'dur (Sandstrom ve ark., 1994).

Hücrel ve ekstraselüler olan SOD miktarı, oksidatif strese bağlı olarak oluşan hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Maier ve Chan, 2002).

Cayman marka Superoksit Dismutaz Test Kiti, ksantin oksidaz ve hipoksantin tarafından üretilen superoksit radikallerinin tespiti için bir tetrazolyum tuzundan yararlanmaktadır. Bir birim SOD, superoksit radikalının %50 dismutasyonunu göstermek için gereken enzim miktarıdır. Bu SOD kiti, belirtilen üç SOD tipini de ölçmektedir. Bu analiz; plazma, serum, doku homojenatları gibi örneklerde SOD aktivitesini analiz etmek için basit ve hızlı bir olanak sağlamaktadır (Cayman Chemical Item No. 706002, Superoxide Dismutase Assay Kit kitapçığı).

Homojenize edilen ve -80 °C'de dondurulan böbrek dokularında, kit kılavuzunda yazan prosedürlere uygun şekilde analizler yapılmıştır. Kılavuzda belirtilen adımların uygulanmasının ardından, son adım olarak 450 nm dalga boyunda "TECAN" marka cihazda absorbans okunmuştur.

Çift çalışılan her standart ve örneğin ortalaması hesaplanmıştır. Standart A'nın absorbansı kendi değerine bölünmüş, ayrıca lineerleştirilmiş oranı bulmak için standart A'nın absorbansı diğer tüm standartlar ve örnek absorbanslarına bölünmüştür. Son SOD aktivitesinin bir fonksiyonu olmak üzere, lineerleştirilmiş SOD standart oranının grafiği çizilmiştir. Bu standart eğrinin denklemi elde edilmiş ve bu denklem üzerinde analiz verileri yazılarak, U/ml SOD değeri bulunmuştur (Cayman Chemical Item No. 706002, Superoxide Dismutase Assay Kit kitapçığı).

Hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler, istatistiki olarak değerlendirilmiştir.

2.8.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Analizi

GPx Analizi için, Cayman Chemical Item No: 703102 Test kiti kullanılmıştır

Glutasyon peroksidaz (GPx), hidrojen peroksit dahil olmak üzere hidroperoksitlerin indirgenmesini, indirgenmiş glutasyonla katalizler ve hücreyi oksidatif hasardan koruma işlevini yerine getirir. Bir monomer olan fosfolipid-hidroperoksit GPx dışında, GPx enzimlerinin tümü dört aynı alt birimin tetramerleridir (Ursini ve ark., 1985; Forstrom ve ark., 1978). Her alt birim, peroksit substratının iki elektron indirgenmesine doğrudan katılan aktif bölgede bir selenosistein içerir (Ursini ve ark., 1985; Forstrom ve ark., 1978). Enzim, selenosisteinin indirgenmiş halini yeniden oluşturmak için nihai elektron vericisi olarak glutasyon kullanır (Ursini ve ark., 1985; Forstrom ve ark., 1978).

Cayman marka test kiti, glutasyon redüktaz (GR) ile birleşmiş bir reaksiyonla GPx aktivitesini dolaylı olarak ölçmektedir. GPx ile hidroperoksitin indirgenmesi üzerine üretilen okside olmuş glutasyon, GR ve NADPH tarafından indirgenmiş durumuna geri dönüştürülür. NADPH'nin NADP⁺'ya oksidasyonuna 340 nm'de absorbanstaki bir azalma eşlik eder. GPx aktivitesinin sınırlı olduğu koşullar altında, A340'taki azalma oranı, örnekteki GPx aktivitesi ile doğru orantılıdır (Paglia ve Valentine, 1967). Cayman Test Kiti, plazma, doku homojenatlar ve hücre lizatlarındaki tüm glutasyon bağımlı peroksidazları ölçmek için kullanılabilir.

Homojenize edilen ve -80 °C’de dondurulan böbrek dokularında, kit kılavuzunda yazan prosedürlere uygun şekilde analizler yapılmıştır. Kılavuzda belirtilen adımların uygulanmasının ardından, son adım olarak 340 nm dalga boyunda SpectraMax i3x cihazında, birer dakika arayla 5 absorbans okuması gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen değerlerden, her bir örnek için absorbans değişimleri ölçülmüştür. Bunun için, her örnekte 2 farklı zamanda okunan değerlerin farkı, bu zamanlar arasındaki farka bölünmüştür. Absorbans değişimi, enzimatik olmayan kuyucuktan elde edilen veriler için de elde edilmiş ve elde edilen enzimatik olmayan kuyucuğun absorbans değişim oranı, diğer tüm örnekler değişim oranlarından çıkarılmıştır. Veriler, kit uygulama kitapçığında belirtilen formül uygulanarak hesaplanmıştır. Bu formüle göre; absorbans değişimi, $0,00373 \mu\text{M}^{-1}$ değerine bölünmüş ve 0,19 ml / 0,02 ml değeri ile çarpılmıştır. Buna göre, 340 nm’deki reaksiyon hızının, NADPH’nin yok olma katsayısı $0,00373 \mu\text{M}^{-1}$ kullanılarak belirlenebileceği test uygulama kitapçığında belirtilmiştir. Bir birim, 25 °C’de her dakikada, 1,0 nmol NADPH’in NADP⁺’ye oksidasyonuna neden olan enzim miktarı olarak belirtilmiştir (Cayman Chemical Item No. 703102, Glutathione Peroxidase Assay Kit kitapçığı).

Hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler, istatistiki olarak değerlendirilmiştir.

2.8.3. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Substans (TBARS) Analizi

TBARS Analizi için, Cayman Chemical Item No: 10009055 Test kiti kullanılmıştır.

Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonu ürünüdür ve doğal olarak oluşmaktadır. Lipid peroksidasyonu, bitki ve hayvanlarda oluşan ve iyi bilinen bir hücre hasarıdır. Hücre ve dokudaki oksidatif stresin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (1,2). PUFA'lardan (Poly Unsaturated Fatty Acid – Çoklu doymamış yağ asidi) türetilen lipit peroksitleri kararsızdır ve MDA gibi reaktif karbonil bileşikleri içeren karmaşık bir dizi bileşik oluşturmak üzere ayrışır (Wang ve ark., 2001).

MDA, tıyobarbitürik asit reaktif substans olarak tıyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girer ve 1:2 MDA-TBA oluşturur. Böylece TBARS miktarı ve MDA miktarı birbirleriyle orantılıdır.

TBARS ölçümü, lipid peroksidasyonunu göstermek için önemli bir metottur (Yagi, 1998; Armstrong ve Browne, 1994). TBARS testinin çeşitli modifikasyonları yapılmıştır, bu modifikasyonlar sonucunda, insan ve hayvan doku ve sıvıları, gıdalar, ilaçlar gibi bazı örnekler değerlendirilmektedir (Ohkawa ve ark., 1979; Dawn-Linsley ve ark., 2005; Draper ve ark., 1993; Scoccia ve ark., 2001; Richard ve ark., 1992). TBARS analizleri, lipid peroksidasyonunu belirlemek için kullanılan en yaygın testlerdir (Armstrong ve Browne, 1994).

Cayman marka TBARS test kiti, serum, plazma, doku homojenatları gibi örneklerde lipid peroksidasyonunu analiz etmek için kullanılan basit ve standart bir araçtır. Yüksek sıcaklık (90-100 °C'de) ve asidik koşullar altında MDA ve TBA reaksiyonu ile oluşan MDA-TBA ürünü, 530-540 nm'de kolorimetrik olarak ölçülmektedir. Ayrıca 530 nm'lik bir uyarı dalga boyunda ve 530 nm'lik bir emisyon dalga boyunda florometrik olarak ölçülebilmektedir (Cayman Chemical Item No: 10009055, TBARS Assay Kit kitapçığı).

Homojenize edilen ve -80 °C’de dondurulan böbrek dokularında, kit kılavuzunda yazan prosedürlere uygun şekilde analizler yapılmıştır. Kılavuzda belirtilen adımların uygulanmasının ardından, son adım olarak 540 nm dalga boyunda “TECAN” marka cihazda absorbans okunmuştur. Çift çalışılan her standart ve örneğin absorbansının ortalaması hesaplanmıştır. 0 µM olan standart A’nın absorbans değeri kendisi ve diğer bütün standart ve örneklerin absorbans değerlerinden çıkarılmıştır. Böylece düzeltilmiş absorbans değeri elde edilmiştir. MDA konsantrasyonu olarak, her standardın düzeltilmiş değerlerinin grafiği çizilmiştir. Bu standart eğrinin denklemi elde edilmiş ve bu denklem üzerinde analiz verileri yazılarak, µM MDA değeri hesaplanmıştır (Cayman Chemical Item No: 10009055, TBARS Assay Kit kitapçığı).

Hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler, istatistiki olarak değerlendirilmiştir.

2.9. Clusterin ve KIM – 1 (Kidney Injury Molecule – 1) Parametrelerinin Ölçülmesi

Tüm hayvanlardan, sakrifikasyon öncesi alınan kanlar, santrifüj edilerek (3000 devirde 10 dk Sigma 3K30 cihazında) serum elde edilmiştir. Bu serumlarda, böbrek parametrelerinden olan KIM-1 ve Clusterin değerlerinin analiz edilmesi planlanmıştır. Microplate’lerin okunmasında, “TECAN” marka microplate reader kullanılmıştır.

2.9.1. Clusterin Analizi

Clusterin analizi için, Rat spesifik Cloud Clone SEB180Ra Clusterin Elisa Test kiti kullanılmıştır. Serumlar 100 kat sulandırılarak, kit kılavuzunda yazan prosedürlere uygun şekilde analiz yapılmıştır.

3000 devirde 10 dk Sigma 3K30 cihazında santrifüj edilerek elde edilen ve -80 °C'de saklanmış serumlar, analiz öncesi oda sıcaklığına getirilmiştir. Standartlar, kit prosedüründe yazan talimatlar doğrultusunda hazırlanmış ve yine prosedürde belirtildiği üzere analiz başlamadan yaklaşık 15 dakika önce hazırlanmıştır. Hazırlanan standartların konsantrasyonları 800 ng/mL, 400 ng/mL, 200 ng/mL, 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,25 ng/mL ve 0 ng/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Örneklerin sulandırılmasında, 20 µl serum örneği, 1980 µl PBS (Phosphate buffered saline – fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile karıştırılarak 100 kat sulanması sağlanmıştır.

Rat spesifik Cloud Clone SEB180Ra Clusterin Test Kitinde bulunan mikropilaya Clusterine özgü bir antikorla kaplı şekilde bulunmaktadır. Clusterin'e spesifik biotin-bağlı antikorlu mikropilaya hücrelerine standart ve örnekler, sırasıyla ve uygun şekilde eklenmiştir. HRP'ye (Horseradish Peroxidase) bağlı Avidin, her hücreye eklenmiş ve inkübe edilmiştir. Ardından TMB substrat solüsyonunun eklenmesiyle, clusterin, biotin-bağlı antikor ve enzim-bağlı Avidin içeren mikropilaya hücrelerinde renk değişimi görülmüştür. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit solüsyonu eklenmesi ile sonlandırılmış ve ortaya çıkan renk değişimi 450 nm dalga boyunda "TECAN" marka microplate reader cihazında spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Örneklerde bulunan clusterin miktarının ölçülmesi, örneklerin optik konsantrasyonun standart eğri ile kıyaslanmasıyla yapılmıştır (Cloud Clone SEB180Ra Enzyme-linked immunosorbent Assay Kit For Clusterin, Analiz Uygulama Kitapçığı).

Ölçümlerin elde edilmesinin ardından hesaplamalar kit prosedüründe yazan talimatlara uygun olarak yapılmıştır. Bu kapsamda, çift okuma yapılan her standart, kontrol ve örneklerin ortalaması alınmış, sıfır standardının optik yoğunluğunun ortalama değeri tüm verilerden çıkarılmıştır. Her standart için optik yoğunluk ve konsantrasyon değerleri kullanılarak standart eğri grafiği oluşturulmuştur. y ekseninde konsantrasyon ve x ekseninde absorbans olacak şekilde standart bir eğri oluşturulmuştur. Bu standart eğrinin denklemi elde edilmiş ve bu denklem üzerinde analiz verileri yazılarak, her örnek için clusterin konsantrasyonu hesaplanmıştır. Hesaplanan veriler sulandırma miktarı 100 ile çarpılmıştır (Cloud Clone SEB180Ra Enzyme-linked immunosorbent Assay Kit For Clusterin, Analiz Uygulama Kitapçığı).

Hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler, istatisti olarak değerlendirilmiştir.

2.9.2. KIM – 1 Analizi

KIM-1 analizi için, Rat spesifik Cloud Clone SEA785Ra Kim1 Elisa Test kiti kullanılmıştır. Serum örnekleri sulandırılmadan KIM-1 ölçümleri yapılmıştır. Fakat elde edilen sonuçlara göre; tüm serum örneklerindeki değerler standart aralığının altında çıkmasından dolayı, yani serumda bulunan KIM-1 değerlerinin çok düşük miktarlarda olmasından dolayı, KIM-1 analizlerinin homojenize böbrek dokusunda yapılmasına karar verilmiştir. Bu doğrultuda, öncesinde homojenize edilen ve -80 °C’de dondurulan böbrek dokularında, kit kılavuzunda yazan prosedürlere uygun şekilde analizler yapılmıştır.

Homojenize böbrek dokuları 250 kat sulandırılmıştır. Bu doğrultuda, önce 20 µl homojenize doku örneğine 980 µl PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) katılarak,

örneğin 50 kat sulanması sağlanmıştır. Ardından 50 kat sulandırılan bu örnekten 200 µl alınarak, 1000 µl'ye PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) ile tamamlanması sonucu, homojenize doku örneğinin toplamda 250 kat sulanması sağlanmıştır.

Rat spesifik Cloud Clone SEA785Ra Kim1 Elisa Test kitinde bulunan mikrolaka, KIM-1'e spesifik antikorlarla kaplı haldedir. Standart ve örnekler, KIM-1 spesifik biotin-bağlı antikorlu uygun mikrolaka kuyucuklarına eklenmiştir. Sonrasında Horseradish Peroxidase'ye (HRP) bağlı Avidin, her bir kuyucuğa eklenmiş ve mikrolaka inkube edilmiştir. TMB substrat solüsyonunun eklenmesinin ardından, sadece KIM-1, biotin-bağlı antikor ve enzim-bağlı Avidin içeren kuyucuklar renk değiştirmektedir. Enzim-substrat reaksiyonu, sülfürik asit eklenmesiyle sonlandırılmıştır. Bu kapsamda "TECAN" marka cihazda 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak renk değişimi ölçülmüştür. Okumanın ardından, örneklerdeki KIM-1 konsantrasyonu, örneklerin optik yoğunluğunun standart eğri ile karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir (Cloud Clone SEA785Ra Enzyme-linked immunosorbent Assay Kit For Kim1, Analiz Uygulama Kitapçığı).

Ölçümlerin elde edilmesinin ardından hesaplamalar kit prosedüründe yazan talimatlara uygun olarak yapılmıştır. Bu kapsamda, çift okuma yapılan her standart, kontrol ve örneklerin ortalaması alınmış, sıfır standardının optik yoğunluğunun ortalama değeri tüm verilerden çıkarılmıştır. Her standart için, y eksenini üzerinde KIM-1 ve x eksenini üzerinde absorbans değerleri olacak şekilde bir standart eğri çizilmiştir. Bu standart eğrinin denklemi elde edilmiş ve bu denklem üzerinde analiz verileri yazılarak, her örnek için KIM-1 konsantrasyonu hesaplanmıştır. Hesaplanan veriler sulandırma miktarı 250 ile çarpılmıştır (Cloud Clone SEA785Ra Enzyme-linked immunosorbent Assay Kit For Kim1, Analiz Uygulama Kitapçığı).

Hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler, istatistiki olarak değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

Çalışmada, oksidatif stres parametrelerinden, SOD, MDA ve GPx parametreleri değerlendirilmiştir. Böbrek parametrelerinden KIM-1 ve Clusterin değerleri ölçülmüştür. Tam kan sayımı yapılmış ve kan değerlerinden BUN ve kreatinin değerlerine bakılmıştır. Tüm bu analiz sonuçları istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Deneyde kullanılan sıçanlara ait vücut ağırlık değişimleri ve sakrifikasyon sonrası böbrek ağırlıkları değerlendirilmiştir.

Bunun dışında, her hayvanın böbrek dokuları Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda histopatolojik olarak değerlendirilmiş, elde edilen sonuçlar istatistiki açıdan yorumlanmıştır.

İstatistiksel analize geçmeden önce, veriler parametrik test varsayımları için normallik yönünden Shapiro-Wilk, varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile incelenmiştir. Ağırlık, üre ve kreatinin parametrelerinin örnekleme zamanı, grup ve etkileşimlerinin test edilmesinde tekrarlı ölçümlerde varyans analizinden yararlanılmıştır. Etkileşim teriminin anlamlı bulunduğu durumlar için Bonferroni düzeltilmeli basit etki analizi uygulanmıştır.

Tam kan parametrelerinin, sağ böbrek ve sol böbrek ağırlıklarının, MDA, SOD, KIM-1 ve Clusterin parametrelerinin gruplar arasındaki farklılığının belirlenmesinde tek yönlü varyans analizinden yararlanılmıştır. Gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama (post-hoc) testi olarak Duncan testi kullanılmıştır. GPx parametresinin gruplar arasındaki farklılığının belirlenmesinde ise Kruskal Wallis testinden faydalanılmıştır. Histopatolojik bulgular ile gruplar arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde ki-kare analizinden

yararlanılmıştır. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelenmiştir. Tüm analizler SPSS (V22) paket programı aracılığı ile gerçekleştirilmiştir.

Sakrifikasyon sonrası, her hayvandan alınan sağ ve sol böbrek ağırlıkları istatistiki açıdan değerlendirilmiştir. İstatistik sonuçları Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Böbrek ağırlıkları arasındaki fark istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$).

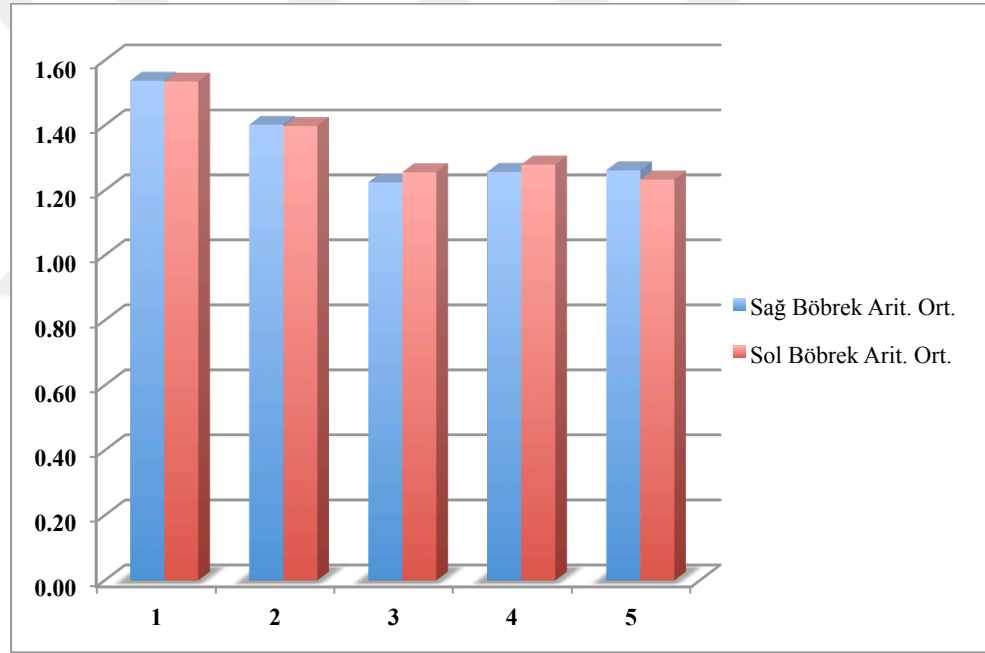
Buna göre; sağ böbrek ağırlığı dikkate alındığında; 1. ve 2. grupta yer alan sıçanların sağ böbrek ağırlıkları benzerlik göstermiştir. Yani, kontrol grubu ve flor toksikasyonu oluşturulan grupların sağ böbrek ağırlıkları benzer bulunmuştur. Bunun yanında, 3., 4. ve 5. grupta yer alan sıçanların sağ böbrek ağırlıkları kendi aralarında benzerlik göstermiştir. Yani, aynı anda içme suyuyla NaF verilen ve i.p. olarak karvakrol uygulanan 3. grup, 30 gün içme suyuyla NaF verildikten sonra 10 gün i.p. olarak karvakrol verilen 4. grup ve 30 gün boyunca i.p. olarak karvakrol uygulanan 5. grupta yer alan sıçanların sağ böbrek ağırlık artışlarında aynı yönlü değişimler görülmüştür.

Sol böbrek ağırlık değişimleri değerlendirildiğinde ise, sağ böbrek sonuçlarıyla aynı sonuçlar ortaya çıkmıştır. Buna göre, 1. ve 2. gruptaki hayvanlarda benzer ağırlık değişimleri görülürken; 3., 4. ve 5. grupta yer alan sıçanların sol böbrek ağırlıkları benzer eğilimler göstermiştir.

Çizelge 3.1. Böbrek Ağırlıkları

Parametre	Grup	N	Arit.O rt.	Std. Hata	Std. Sapma	Medyan	Min.	Max.	p	Harf
Sağ Böbrek Ağırlığı	1	9	1,54	0,07	0,20	1,63	1,16	1,75	0,030	a
	2	9	1,40	0,09	0,28	1,28	1,02	1,81		ab
	3	6	1,22	0,06	0,14	1,24	1,02	1,42		b
	4	9	1,26	0,06	0,18	1,26	1,04	1,49		b
	5	7	1,26	0,09	0,22	1,24	0,95	1,53		b
Sol Böbrek Ağırlığı	1	9	1,53	0,06	0,18	1,57	1,17	1,72	0,046	a
	2	9	1,40	0,11	0,32	1,25	1,10	2,13		ab
	3	6	1,26	0,05	0,12	1,21	1,15	1,45		b
	4	9	1,28	0,06	0,19	1,20	1,06	1,61		b
	5	7	1,23	0,07	0,16	1,17	1,10	1,54		b

Grup 1: Kontrol, Grup 2: 30 gün NaF, Grup: 30 gün NaF + 30 gün i.p. Karvakrol, Grup 4: 30 Gün NaF + ardından 10 gün i.p. Karvakrol, 5. Grup: 30 gün i.p. Karvakrol



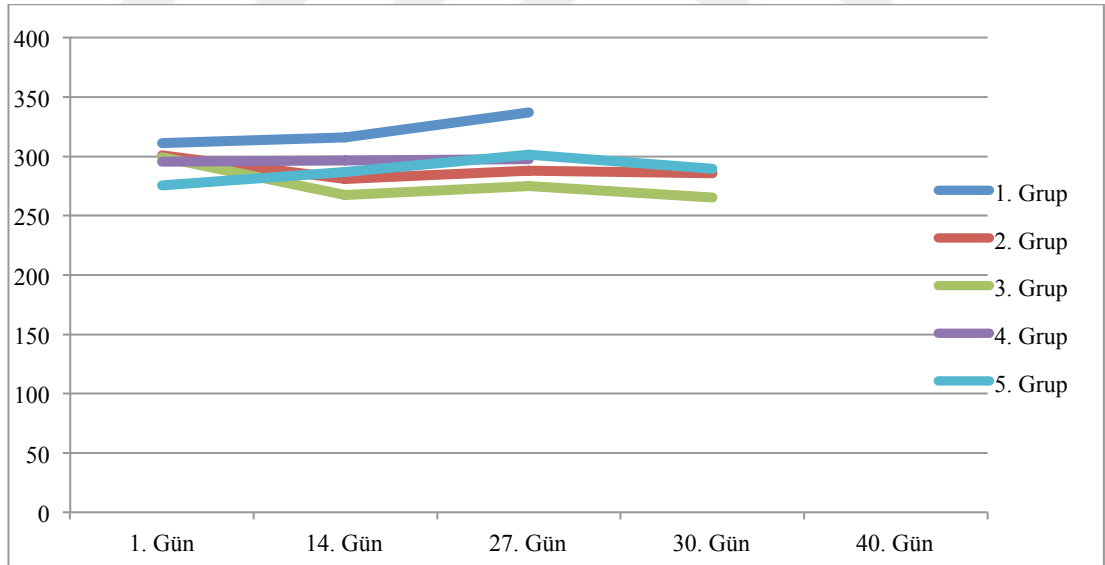
Şekil 3.1. Sağ ve Sol Böbrek Ağırlıkları Aritmetik Ortalaması Grafiği

Rat canlı ağırlıkları belirli aralıklarla ölçülmüş ve kaydedilmiştir. İlk ölçüm uygulama başlamadan önce yapılmış olup, 14. gün, 27. gün ve sakrifikasyon öncesi ağırlıklar da kaydedilmiştir. Bu ağırlıkların gruplar bazında ortalama değerleri alınarak oluşturulan ve zamanla ağırlık artışı gösteren grafik Şekil 3.1.'de yer almaktadır.

Grafik değerlendirildiğinde, flor toksikasyonu oluşması beklenen 2. grupta ağırlık artışının ilk ölçümden sonra ikinci ölçümde ani düşüş gösterdiği, daha sonra az miktarda artmaya başladığı ve ilk ağırlığa ulaşamadığı görülmüştür.

NaF ve karvakrolün birlikte verildiği ve karvakrolün koruyucu etkisinin ölçüldüğü 3. grupta 2. gruba göre daha fazla azalma belirlenmiştir. Karvakrolün tedavi edici etkisinin beklendiği 4. grupta ise ağırlık zamanla az miktarda artış göstermiştir. Fakat sakrifikasyon öncesi ölçülen ağırlıkta tekrarlanan azalış görülmüştür.

Sadece karvakrol uygulamasının yapıldığı 5. grupta kontrol grubuna nazaran daha az miktarda da olsa ağırlıkta zamanla artış görülmüş fakat sakrifikasyon öncesi yapılan son ölçümde azalışa rastlanmıştır.



Şekil 3.2. Zamana bağlı grupların ortalama ağırlık değişimleri (gr)

Belirli aralıklarla ölçülen canlı ağırlık değişimleri istatistiki açıdan değerlendirilmiş, bu değerlendirme sonuçları Çizelge 3.2.'de belirtilmiştir. Zamanla değişen ağırlık verilerinde istatistiki açıdan bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Çizelge 3.2. Vücut Ağırlık (gr) Değişimlerinin Değerlendirilmesi

Grup	Zaman				P-value		
	1	2	3	4	Grup	Zaman	G*Z
1	311,222 ± 40,932	316,111 ± 40,932	337,111 ± 40,932	334,111 ± 40,932	<0,001	0,514	0,487
2	300,667 ± 40,932	281,00 ± 40,932	288,00 ± 40,932	285,778 ± 40,932			
3	299,111 ± 40,932	267,333 ± 40,932	274,833 ± 41,764	265,333 ± 41,764			
4	295,556 ± 40,932	296,444 ± 40,932	297,556 ± 40,932	278,778 ± 40,932			
5	275,556 ± 40,932	286,875 ± 41,141	301,429 ± 41,409	289,571 ± 41,409			

3.1. Biyokimyasal Bulgular

Tüm gruplarda bulunan sıçanlardan sakrifikasyon sonrası alınan kan örneklerinde WBC, LYM, MONO, GRAN, LYM %, MON %, GRA %, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDW_a, RDW %, PLT, MPV, ALB, GOT, GPT, BIT değerlerine bakılmış olup, istatistiki açıdan değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda, WBC, LYM, MONO, GRAN, LYM %, MON %, GRA %, MPV, ALB, GPT değerleri istatistiki açıdan anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$), alınan sonuçlar Çizelge 3.3.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. WBC, LYM, MONO, GRAN, LYM %, MON %, GRA %, MPV, ALB, GPT değerleri

Parametre	Grup	N	Arit. Ort.	Std. Hata	Std. Sapma	Min.	Max.	p	Harf
WBC	1	9	6,94	0,30	0,90	5,90	8,80	0,253	
	2	9	6,13	1,04	3,11	2,10	11,10		
	3	6	5,18	0,65	1,59	4,00	8,30		
	4	9	6,83	0,89	2,51	3,00	10,00		
	5	7	17,30	9,88	26,15	4,10	76,40		
LYM	1	9	5,17	0,21	0,62	4,10	6,10	0,202	
	2	9	4,42	0,71	2,13	1,50	7,30		
	3	6	3,60	0,55	1,35	1,90	5,90		
	4	9	4,68	0,59	1,66	2,10	6,60		
	5	7	12,53	6,82	18,03	3,50	53,30		
MONO	1	9	0,23	0,03	0,09	0,10	0,40	0,260	
	2	9	0,22	0,03	0,10	0,10	0,40		
	3	6	0,30	0,06	0,15	0,10	0,50		
	4	9	0,34	0,09	0,26	0,10	0,80		
	5	7	0,71	0,40	1,06	0,20	3,10		
GRAN	1	9	1,54	0,24	0,71	0,90	2,90	0,806	
	2	9	1,49	0,31	0,94	0,20	3,40		
	3	6	1,28	0,25	0,61	0,40	2,00		
	4	9	1,81	0,31	0,87	0,80	3,00		
	5	7	1,49	0,29	0,76	0,40	2,80		
LYM %	1	9	75,02	2,80	8,40	60,40	82,40	0,308	
	2	9	72,79	1,80	5,40	65,90	83,50		
	3	6	69,25	5,65	13,84	44,80	85,20		
	4	9	69,41	2,45	6,92	57,10	78,80		
	5	7	77,11	2,35	6,22	69,70	86,90		
MON %	1	9	2,69	0,10	0,30	2,30	3,10	0,060	
	2	9	3,01	0,11	0,34	2,60	3,60		
	3	6	4,83	1,06	2,59	2,30	9,40		
	4	9	4,06	0,76	2,15	2,40	7,50		
	5	7	3,57	0,33	0,87	2,40	4,90		
GRA %	1	9	22,29	2,75	8,26	15,30	37,00	0,394	
	2	9	24,20	1,78	5,33	13,30	31,30		
	3	6	25,92	4,89	11,99	11,20	45,80		
	4	9	26,53	2,34	6,62	16,80	40,30		
	5	7	19,31	2,18	5,77	10,70	27,00		
MPV	1	9	6,28	0,17	0,52	5,30	7,00	0,337	
	2	9	6,20	0,24	0,72	5,30	7,60		
	3	6	5,90	0,32	0,78	4,80	7,10		
	4	9	5,90	0,09	0,24	5,40	6,10		
	5	7	6,46	0,25	0,65	5,70	7,50		
ALB	1	9	2,88	0,05	0,16	2,60	3,13	0,103	
	2	9	3,00	0,10	0,30	2,70	3,72		
	3	6	2,78	0,07	0,16	2,59	3,03		
	4	9	2,92	0,05	0,14	2,68	3,08		
	5	7	3,08	0,07	0,18	2,91	3,39		
GPT	1	9	50,63	2,26	6,78	39,70	60,50	0,391	
	2	9	50,47	2,49	7,48	41,00	60,30		
	3	6	48,07	3,63	8,89	31,50	55,50		
	4	9	47,41	5,66	16,00	31,90	81,30		
	5	7	41,44	2,95	7,80	28,50	52,90		

Grup 1: Kontrol, Grup 2: 30 gün NaF, Grup: 30 gün NaF + 30 gün i.p. Karvakrol, Grup 4: 30 Gün NaF + ardından 10 gün i.p. Karvakrol, 5. Grup: 30 gün i.p. Karvakrol

Diğer kan parametrelerinden RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDWa, RDW % ve PLT değerleri ise istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$), alınan sonuçlar Çizelge 3.4.'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.4. RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, RDWa, RDW %, PLT, GOT ve BIT değerleri

Parametre	Grup	N	Arit. Ort.	Std. Hata	Std. Sapma	Min.	Max.	p	Harf
RBC	1	9	7,12	0,30	0,91	4,92	7,95	<0,001	ab
	2	9	6,21	0,57	1,72	3,20	8,70		b
	3	6	4,55	0,34	0,82	3,39	5,68		c
	4	9	7,76	0,18	0,51	7,06	8,42		a
	5	7	5,05	0,27	0,71	3,90	5,89		c
HGB	1	9	14,49	0,40	1,20	11,70	15,70	<0,001	a
	2	9	13,13	0,97	2,90	7,60	17,50		ab
	3	6	10,07	0,70	1,72	7,60	12,40		c
	4	9	14,93	0,34	0,96	13,70	16,50		a
	5	7	12,01	0,53	1,41	9,80	13,70		b
HCT	1	9	44,04	0,92	2,76	38,40	47,90	<0,001	a
	2	9	36,34	3,29	9,86	16,30	48,20		b
	3	6	26,30	1,29	3,15	22,30	29,80		c
	4	9	43,53	1,15	3,26	39,10	47,90		a
	5	7	32,04	2,03	5,37	24,90	41,90		bc
MCV	1	9	62,51	2,10	6,31	56,40	78,00	0,019	a
	2	9	58,42	1,49	4,47	50,80	65,10		ab
	3	6	58,47	1,81	4,43	52,10	65,70		ab
	4	9	56,08	0,49	1,39	54,30	58,50		b
	5	7	63,44	1,91	5,05	57,00	71,20		a
MCH	1	9	20,49	0,45	1,34	19,30	23,90	0,004	bc
	2	9	21,64	1,03	3,09	18,80	28,50		abc
	3	6	22,45	1,57	3,83	19,00	29,90		ab
	4	9	19,24	0,19	0,53	18,30	19,90		c
	5	7	23,89	0,41	1,09	22,20	25,30		a
MCHC	1	9	32,84	0,42	1,25	30,60	34,30	0,014	c
	2	9	37,11	1,65	4,94	33,00	47,10		ab
	3	6	38,47	2,38	5,83	34,50	50,10		a
	4	9	34,33	0,24	0,69	33,70	35,80		bc
	5	7	37,81	1,03	2,73	32,70	40,40		ab
RDWa	1	9	36,88	2,43	7,29	28,30	53,30	0,001	b
	2	9	39,81	2,46	7,38	32,20	55,70		b
	3	6	39,77	3,57	8,75	26,00	51,30		b
	4	9	32,96	0,74	2,11	29,00	36,20		b
	5	7	48,56	2,03	5,37	39,40	57,10		a
RDW %	1	9	16,78	0,42	1,27	15,30	19,00	<0,001	c
	2	9	22,22	1,99	5,96	17,50	32,40		b
	3	6	22,72	1,72	4,20	16,00	28,30		ab
	4	9	17,34	0,62	1,74	14,60	19,80		c
	5	7	26,33	0,99	2,61	22,80	29,40		a
PLT	1	9	777,78	51,40	154,20	513,00	1027,00	0,044	a
	2	9	572,22	100,43	301,30	205,00	1019,00		a
	3	6	184,33	42,87	105,00	94,00	372,00		b
	4	9	543,00	112,62	318,55	104,00	1067,00		ab
	5	7	537,43	231,49	612,47	129,00	1896,00		ab

Grup 1: Kontrol, Grup 2: 30 gün NaF, Grup 3: 30 gün NaF + 30 gün i.p. Karvakrol, Grup 4: 30 Gün NaF + ardından 10 gün i.p. Karvakrol, 5. Grup: 30 gün i.p. Karvakrol

İstatistiki veriler değerlendirildiğinde aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur:

Uygulamalar başlamadan önce alınan ve sakrifikasyon sonrası alınan kan örneklerinden BUN ve kreatinin analizleri yapılmış olup, elde edilen sonuçların gruplar arası farklılıkları ve zamanla değişimleri istatistiki açıdan değerlendirilmiştir. Alınan sonuçlar Çizelge 3.5. ve Çizelge 3.6.'da belirtilmiştir. Sonuçlar gruplar arası değişimler ve zamana bağlı değişimler dikkate alındığında istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

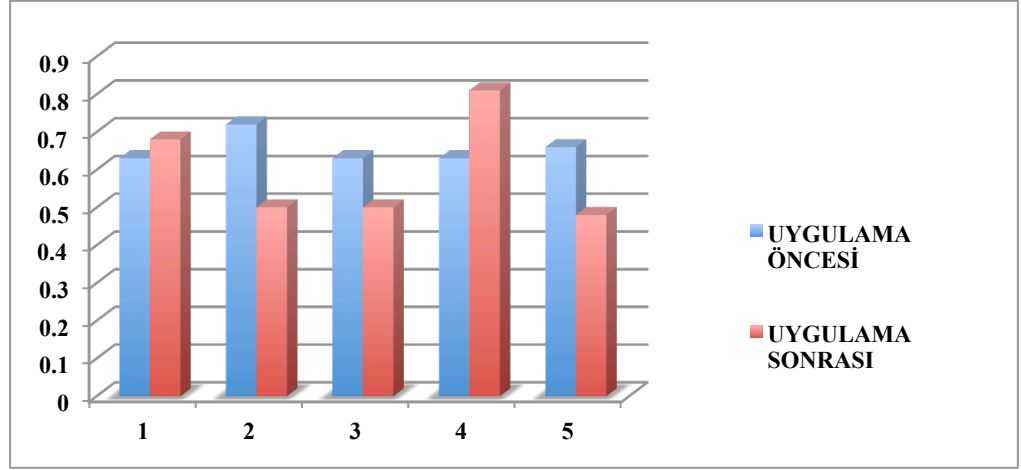
Çizelge 3.5. Kreatinin sonuçlarının istatistiki açıdan değerlendirilmesi

Parametre	Grup	Zaman		Grup	Zaman	G*Z
		Önce	Sonra			
Kreatinin	1	0,630 ± 0,081	0,676 ± 0,081 ^B	<0,001	<0,001	<0,001
	2	0,723 ± 0,081 ^a	0,497 ± 0,081 ^{b, C}			
	3	0,631 ± 0,081 ^a	0,500 ± 0,083 ^{b, C}			
	4	0,634 ± 0,081 ^b	0,808 ± 0,081 ^{a, A}			
	5	0,661 ± 0,081 ^a	0,476 ± 0,082 ^{b, C}			

Küçük harfler, zamandaki farklılığı göstermektedir.
Büyük harfler, gruplar arası farklılığı göstermektedir.

Sonuçlar dikkate alındığında, gruplar arası kreatinin değerlerindeki farklılıklar 2., 3. ve 5. gruplarda benzerlik gösterirken, 1. ve 4. grup değerleri hiç bir grup değerleriyle benzerlik göstermemektedir. Zamanla kreatinin değerlerindeki değişimler dikkate alındığında 2., 3. ve 5. gruplardaki değişimler benzer bulunmuştur. 4. grupta ise diğer gruplarla herhangi bir benzerlik görülmemiştir.

Analizler sonucu elde edilen verilerin gruplar bazında ortalaması alınarak çizilen grafik Şekil 3.3.'te yer almaktadır. Bu grafik değerlendirildiğinde, uygulama sonrasında, 1. ve 4. gruplarda ortalama kreatinin değerinin uygulama sonrasında arttığı, 2., 3. ve 5. grupların ortalama kreatinin değerlerinin ise uygulama sonrasında azaldığı görülmüştür.



Şekil 3.3. Uygulama öncesi ve sonrası kreatinin değerlerinin kıyaslanması

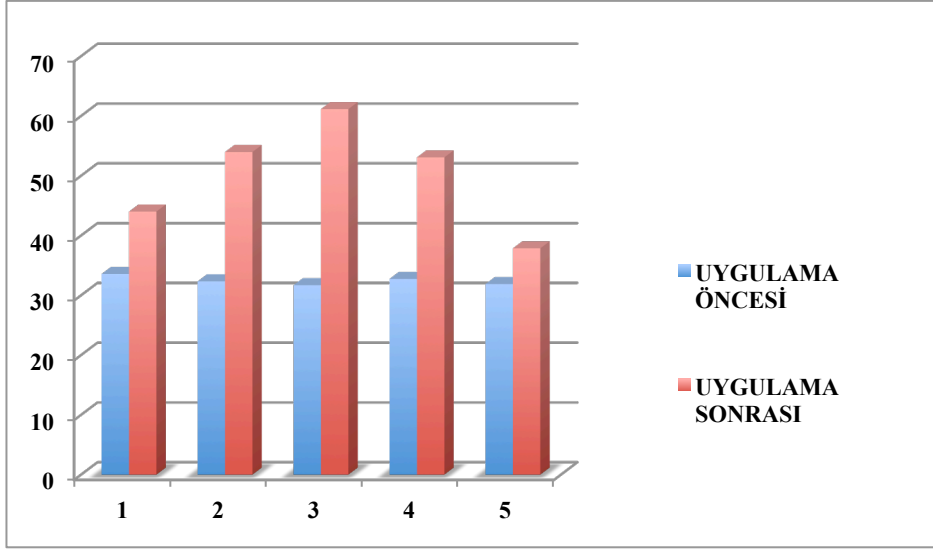
Çizelge 3.6. BUN sonuçlarının istatistiki açıdan değerlendirilmesi

Parametre	Grup	Zaman		Grup	Zaman	G*Z
		Önce	Sonra			
Üre	1	33,567 ± 2,857 ^b	44,011 ± 2,857 ^{a, BC}	0,004	<0,001	0,002
	2	32,333 ± 2,857 ^b	53,967 ± 2,857 ^{a, AB}			
	3	31,689 ± 2,857 ^b	61,15 ± 3,499 ^{a, A}			
	4	32,744 ± 2,857 ^b	53,067 ± 2,857 ^{a, AB}			
	5	31,878 ± 2,857	37,857 ± 3,239 ^C			

Küçük harfler, zamandaki farklılığı göstermektedir.
Büyük harfler, gruplar arası farklılığı göstermektedir.

BUN değerlerinin zamanla değişimi değerlendirildiğinde, 1., 2., 3. ve 4. gruplardaki değişimin benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Gruplar arası değer farklılıkları incelendiğinde, 2., 3. ve 4. gruplar kendi aralarında; 1., 2. ve 4. gruplar ise kendi aralarında benzer değerler göstermiştir. Bunun yanında 1. ve 5. grup BUN değerleri arasında da benzerlik görülmüştür.

Analizler sonucu elde edilen BUN verilerinin gruplar bazında ortalaması alınarak çizilen grafik Şekil 3.4.'te yer almaktadır. Bu grafik değerlendirildiğinde, uygulama sonrasında, tüm gruplarda BUN değerlerinin arttığı görülmüştür.



Şekil 3.4. Uygulama öncesi ve sonrası BUN değerlerinin kıyaslanması

Böbrek parametrelerinden olan KIM-1 ve Clusterin analiz sonuçlarının istatistiki değerlendirilmesi Çizelge 3.7.'de yer almaktadır. Sonuçlar istatistiki açıdan anlamsız bulunmuştur fakat, gruplar arası farklılıklar görülmüştür ($p>0,05$).

Çizelge 3.7. KIM – 1 (pg/mL) ve Clusterin (ng/mL) Değerleri

Parametre	Grup	N	Arit. Ort.	Std. Hata	Std. Sapma	Medyan	Min.	Max.	p	Harf
KIM-1 pg/mL	1	9	0,0204	0,0078	0,0192	0,0166	-0,0024	0,0552	0,206	
	2	9	0,0234	0,0067	0,0202	0,0142	0,0032	0,0560		
	3	6	0,0067	0,0014	0,0035	0,0065	0,0025	0,0131		
	4	9	0,0139	0,0049	0,0139	0,0127	-0,0001	0,0458		
	5	7	0,0106	0,0023	0,0061	0,0097	-0,0003	0,0194		
Clusterin ng/mL	1	9	6,569	0,004	0,011	6,567	6,561	6,596	0,551	
	2	9	6,570	0,006	0,017	6,562	6,558	6,611		
	3	6	6,576	0,003	0,006	6,576	6,568	6,584		
	4	9	6,566	0,001	0,004	6,567	6,558	6,572		
	5	7	6,569	0,003	0,009	6,567	6,558	6,585		

Homojenize böbrek dokusundan analizi yapılan KIM-1 değerleri incelendiğinde, karvakrol ve NaF'ün aynı anda verildiği 3. grupta büyük oranda düşüş gözlenmiştir. Flor toksikasyonunun oluşması beklenen grubun KIM-1

değerleri kontrol grubuna yakın olup, 4. ve 5. grup değerlerinde bir miktar düşüş ortaya çıkmıştır.

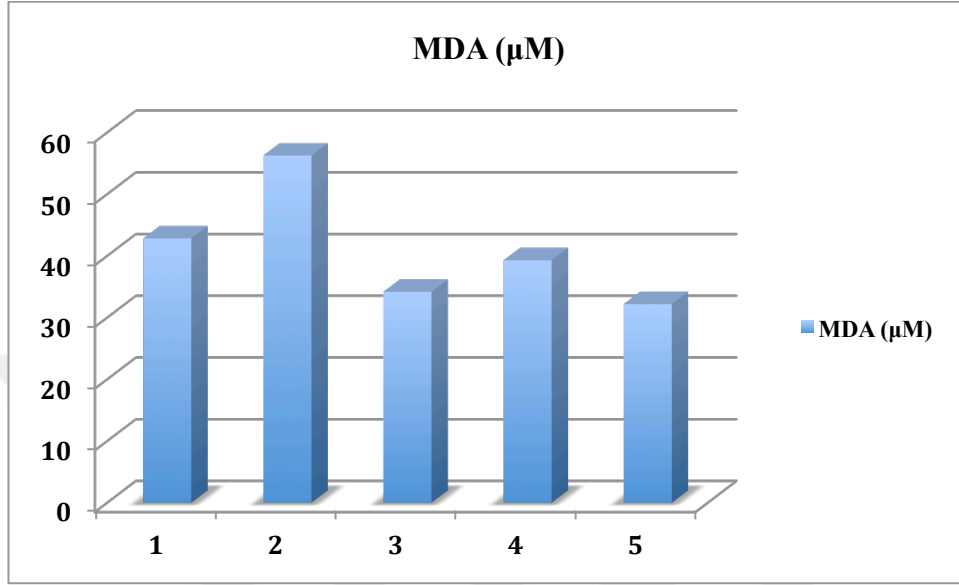
Grupların Clusterin değerleri ise birbirine yakın olup, kontrol grubundan farklı değildir. Bu kapsamda Clusterin değerleri istatistiki açıdan anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$).

Oksidatif stress parametreleri olan MDA, SOD ve GPx analiz sonuçlarının hesaplanması sonucunda elde edilen veriler, istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, Çizelge 3.9.'da belirtilmiştir. Veriler istatistiki açıdan anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$), fakat gruplar arası değerlerde farklılıklar olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.8. Böbrek Dokusu MDA (μM), SOD (U/mL) ve GPx (nmol/dk/mL) değerleri

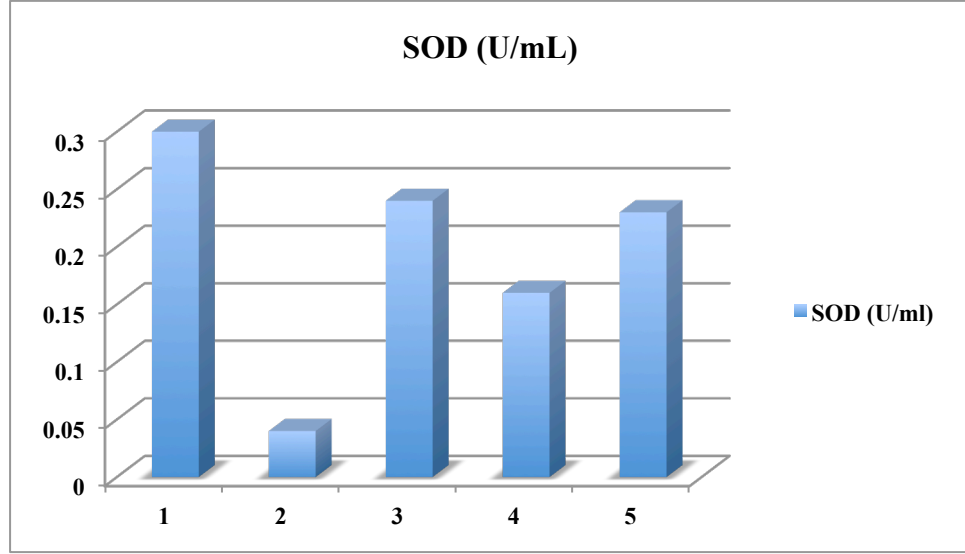
Parametre	Grup	N	Arit. Ort.	Std. Hata	Std. Sapma	Medyan	Min.	Max.	p	Harf
MDA μM	1	9	42,82	8,33	22,04	37,36	23,73	87,36	0,186	
	2	9	56,25	9,21	27,63	51,91	27,36	113,73		
	3	6	34,18	9,21	22,55	29,64	12,82	73,73		
	4	9	39,28	5,76	17,28	44,64	16,45	60,09		
	5	7	32,17	4,31	11,41	29,18	21,91	52,82		
SOD U/mL	1	9	0,30	0,09	0,25	0,31	-0,06	0,70	0,128	
	2	9	0,04	0,06	0,18	0,09	-0,18	0,26		
	3	6	0,24	0,07	0,17	0,21	0,01	0,50		
	4	9	0,16	0,08	0,23	0,12	-0,10	0,49		
	5	7	0,23	0,08	0,20	0,17	-0,01	0,56		
GPX nmol/dk/mL	1	9	7,30	7,88	20,86	3,69	-25,34	39,41	0,762	
	2	9	10,68	7,98	23,95	11,65	-43,68	35,78		
	3	6	21,09	9,54	23,37	10,63	5,41	66,41		
	4	9	19,59	6,25	18,76	10,19	-2,23	53,23		
	5	7	14,27	8,21	21,71	22,86	-31,65	28,84		

Bu kapsamda, yalnızca flor toksikasyonu olan grupta en yüksek MDA değeri 56,25 μM olarak ölçülmüştür. Karvakrol uygulanan diğer grup ölçümleri kontrol grubuna yakındır ve istatistiki önem bulunmamıştır.



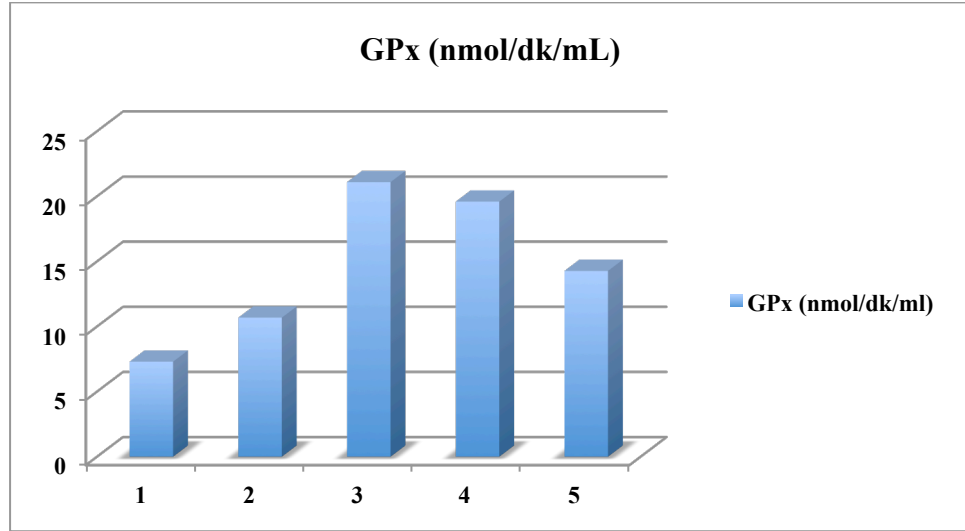
Şekil 3.5. Gruplar bazında MDA değerleri

SOD analiz sonuçlarına bakıldığında, flor toksikasyonu görülmesi beklenen 2. grupta önemli bir düşüş belirlenmiş olup, diğer grupların hepsinde azalış görülmüştür. Karvakrol ile NaF'ün aynı sürelerde verildiği 3. grup ve sadece karvakrol uygulamasının yapıldığı 5. grup değerleri birbirine yakın olup, kontrol grubundan düşüktür.



Şekil 3.6. Gruplar bazında SOD değerleri

GPx verileri göz önüne alındığında, tüm gruplarda GPx aktivitelerinin yükseldiği belirlenmiştir. Fakat karvakrol ve NaF'ün aynı süre boyunca verildiği 3. grup ve 30 gün boyunca NaF verilmesinin ardından 10 gün karvakrol uygulamasının gerçekleştiği 4. grupta artış diğer gruplara göre daha fazladır.

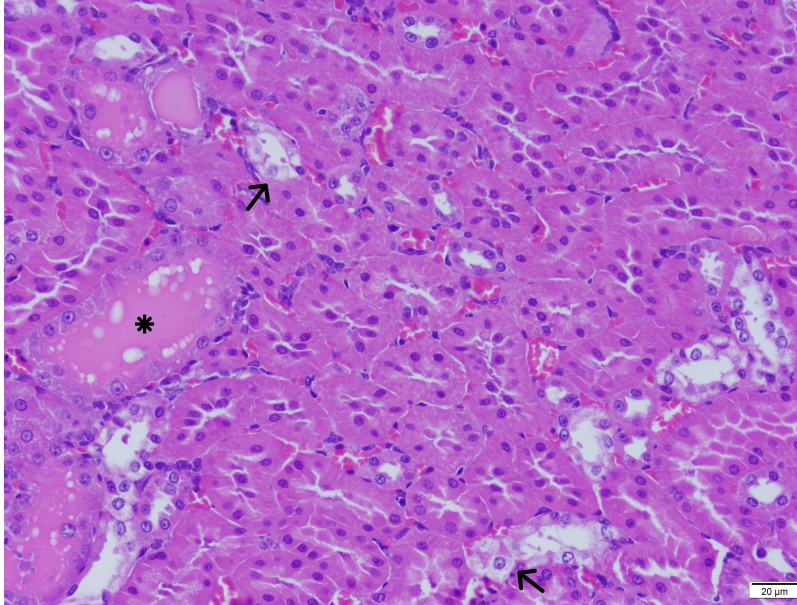


Şekil 3.7. Gruplar bazında GPx değerleri

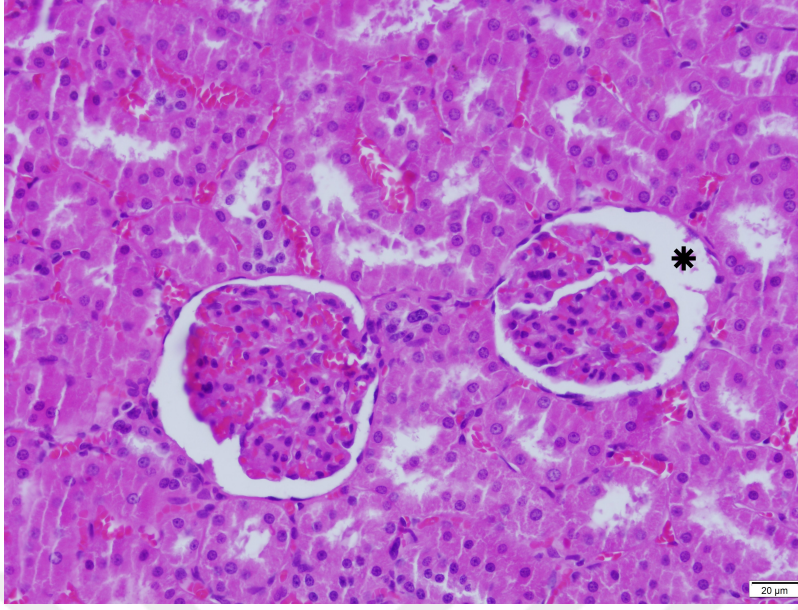
3.2. Histopatolojik Bulgular

Uygulamalar sonrasında alınan böbrek dokuları, histopatolojik yönden incelenmiştir. Bu incelemede bowman boşluğunda artış, dejenerasyon, proteinöz madde birikimi, dilatasyon ve fibrozis olguları ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Yapılan değerlendirmede; özellikle proksimal tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon dikkat çekmiştir (Grup II olgu no: 3-9, Şekil 3.8.; Grup IV olgu no: 2 ve 7; Grup III olgu no: 2; Grup I olgu no: 3). Çoğunlukla kortikomedullar bölgedeki tübül lümenlerinde de proteinöz madde birikimine rastlanmıştır (Grup II olgu no: 3-6 ve 9; Grup IV olgu no: 1, 3, 5 ve 7; Grup I olgu no: 3 ve 6; Grup III olgu no: 3). Grup II (Olgu no: 7) ve III'te (Olgu no: 2) sadece birer olguda tübüllerde dilatasyon fark edilmiştir. Bununla birlikte Grup III'te bir olguda (Olgu no: 2) intersitisyumda fokal fibrozis gözlenmiştir. Grup I'de sadece bir olguda (Olgu no: 6) Bowman boşluğunda artış gözlenirken, Grup IV'te (Olgu no: 1-3; Şekil 3.9.) belirgindir. Grup V'te ise herhangi bir histopatolojik bulgu saptanamamıştır.



Şekil 3.8. Tübül epitel hücrelerinde hidropik dejenerasyon (oklar) ve tübül lümenlerinde proteinöz madde birikimi (yıldız), 2. Grup, H&E



Şekil 3.9. Bowman boşluğunda artış (yıldız), 4. Grup, H&E

Histopatolojik sonuçlar, istatisti açıdan değerlendirilmiştir. Söz konusu değerlendirmede bowman boşluğunda artış, dejenerasyon, proteinöz madde birikimi, dilatasyon ve fibrozis olguları ayrı ayrı değerlendirilmiş olup, elde edilen sonuçlar aşağıda yer alan çizelgelerde belirtilmiştir (Çizelge 3.9.; 3.10.; 3.11.; 3.12. ve 3.13.) ($p>0,05$).

Çizelge 3.9. Gruplar bazında Bowman boşluğu değerlendirilmesi

Crosstab					
		Bowman			Total
		Gözlenmedi	Fokal		
Grup	1	N	8	1	9
		% Grup	88,9%	11,1%	100,0%
		% Bowman	22,2%	25,0%	22,5%
		% Total	20,0%	2,5%	22,5%
	2	N	9	0	9
		% Grup	100,0%	0,0%	100,0%
		% Bowman	25,0%	0,0%	22,5%
		% Total	22,5%	0,0%	22,5%
	3	N	6	0	6
		% Grup	100,0%	0,0%	100,0%
		% Bowman	16,7%	0,0%	15,0%
		% Total	15,0%	0,0%	15,0%
	4	N	6	3	9
		% Grup	66,7%	33,3%	100,0%
		% Bowman	16,7%	75,0%	22,5%
		% Total	15,0%	7,5%	22,5%
	5	N	7	0	7
		% Grup	100,0%	0,0%	100,0%
		% Bowman	19,4%	0,0%	17,5%
		% Total	17,5%	0,0%	17,5%
Total		N	36	4	40
		% Grup	90,0%	10,0%	100,0%
		% Bowman	100,0%	100,0%	100,0%
		% Total	90,0%	10,0%	100,0%
Pearson Chi-Square= 7,901 , p= 0,095					

Gruplarda yer alan hayvanların böbrek dokusunda bowman boşluğunda artış değerlendirildiğinde, 30 gün NaF uygulaması yapıp, ardından 10 gün karvakrol tedavisi denenen 4. grupta yer alan hayvanlardan 3'ünde fokal artış gözlenmiştir. 2, 3. ve 5. grupta yer alan hayvanlarda ise artışa rastlanmamıştır.

Çizelge 3.10. Gruplar bazında böbrek dokusunda dejenerasyon değerlendirilmesi

Crosstab						
			DEJENERASYON			Total
			Gözlenmedi	Fokal	Multifokal	
Grup	1	N	8	1	0	9
		% Grup	88,9%	11,1%	0,0%	100,0%
		% Deje	27,6%	10,0%	0,0%	22,5%
		% Total	20,0%	2,5%	0,0%	22,5%
	2	N	2	7	0	9
		% Grup	22,2%	77,8%	0,0%	100,0%
		% Deje	6,9%	70,0%	0,0%	22,5%
		% Total	5,0%	17,5%	0,0%	22,5%
	3	N	5	1	0	6
		% Grup	83,3%	16,7%	0,0%	100,0%
		% Deje	17,2%	10,0%	0,0%	15,0%
		% Total	12,5%	2,5%	0,0%	15,0%
	4	N	7	1	1	9
		% Grup	77,8%	11,1%	11,1%	100,0%
		% Deje	24,1%	10,0%	100,0%	22,5%
		% Total	17,5%	2,5%	2,5%	22,5%
	5	N	7	0	0	7
		% Grup	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
		% Deje	24,1%	0,0%	0,0%	17,5%
		% Total	17,5%	0,0%	0,0%	17,5%
Total	N	29	10	1	40	
	% Grup	72,5%	25,0%	2,5%	100,0%	
	% Deje	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	% Total	72,5%	25,0%	2,5%	100,0%	
Pearson Chi-Square= 21,111 , p= 0,007						

Böbrek dokusundaki dejenerasyon değerlendirildiğinde, sonuçlar istatistiki açıdan anlamsız çıkmıştır ($p>0,05$). Fakat sadece NaF verilerek, flor toksikasyonu oluşması beklenen grupta yer alan 9 hayvandan 7'sinde fokal dejenerasyona rastlanmıştır. Bunun dışında 3. ve 4. gruplarda yalnızca birer hayvanın böbrek dokusunda fokal dejenerasyon gözlenirken, 5. grupta hiç görülmemiştir.

Çizelge 3.11. Gruplar bazında tübül lümenlerinde proteinöz madde birikimi değerlendirmesi

Crosstab							
		PROTEİNÖZ				Total	
		Gözlenmedi	Fokal	Multifokal	Diffuz		
Grup	1	N	7	0	2	0	9
		% Grup	77,8%	0,0%	22,2%	0,0%	100,0%
		% Proteinöz	25,0%	0,0%	50,0%	0,0%	22,5%
		% Total	17,5%	0,0%	5,0%	0,0%	22,5%
	2	N	4	4	1	0	9
		% Grup	44,4%	44,4%	11,1%	0,0%	100,0%
		% Proteinöz	14,3%	57,1%	25,0%	0,0%	22,5%
		% Total	10,0%	10,0%	2,5%	0,0%	22,5%
	3	N	5	0	1	0	6
		% Grup	83,3%	0,0%	16,7%	0,0%	100,0%
		% Proteinöz	17,9%	0,0%	25,0%	0,0%	15,0%
		% Total	12,5%	0,0%	2,5%	0,0%	15,0%
	4	N	5	3	0	1	9
		% Grup	55,6%	33,3%	0,0%	11,1%	100,0%
		% Proteinöz	17,9%	42,9%	0,0%	100,0%	22,5%
		% Total	12,5%	7,5%	0,0%	2,5%	22,5%
	5	N	7	0	0	0	7
		% Grup	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%
		% Proteinöz	25,0%	0,0%	0,0%	0,0%	17,5%
		% Total	17,5%	0,0%	0,0%	0,0%	17,5%
Total	N	28	7	4	1	40	
	% Grup	70,0%	17,5%	10,0%	2,5%	100,0%	
	% Proteinöz	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	% Total	70,0%	17,5%	10,0%	2,5%	100,0%	
Pearson Chi-Square= 17,778 , p= 0,123							

Tübüllerde proteinöz madde birikimi açısından yapılan değerlendirmede, flor toksikasyonu oluşması beklenen 2. grupta 9 hayvandan 4'ünde fokal, 1'inde ise multifokal proteinöz madde birikimine rastlanmıştır. NaF ve karvakrol uygulamasının birlikte yapıldığı 3. grupta, 1 hayvanda multifokal proteinöz görülmüştür. Bunun dışında, 30 gün NaF verilmesinin ardından 10 gün karvakrol uygulanan 4. grupta ise, multifokal gözlenmemesine rağmen 3 hayvanda fokal 1 hayvanda ise diffuz dikkat çekmiştir. Sadece karvakrol verilen 5. grupta yer alan hayvanların hiç birinde proteinöz maddeye rastlanmamıştır.

Çizelge 3.12. Gruplar bazında böbrek dokusu tübüllerinde dilatasyon değerlendirilmesi

Crosstab						
		DİLATASYON				Total
		Gözlenmedi	Fokal	Multifokal		
Grup	1	N	9	0	0	9
		% Grup	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
		% Dilatasyon	23,7%	0,0%	0,0%	22,5%
		% Total	22,5%	0,0%	0,0%	22,5%
	2	N	8	1	0	9
		% Grup	88,9%	11,1%	0,0%	100,0%
		% Dilatasyon	21,1%	100,0%	0,0%	22,5%
		% Total	20,0%	2,5%	0,0%	22,5%
	3	N	5	0	1	6
		% Grup	83,3%	0,0%	16,7%	100,0%
		% Dilatasyon	13,2%	0,0%	100,0%	15,0%
		% Total	12,5%	0,0%	2,5%	15,0%
	4	N	9	0	0	9
		% Grup	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
		% Dilatasyon	23,7%	0,0%	0,0%	22,5%
		% Total	22,5%	0,0%	0,0%	22,5%
	5	N	7	0	0	7
		% Grup	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%
		% Dilatasyon	18,4%	0,0%	0,0%	17,5%
		% Total	17,5%	0,0%	0,0%	17,5%
Total	N	38	1	1	40	
	% Grup	95,0%	2,5%	2,5%	100,0%	
	% Dilatasyon	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	
	% Total	95,0%	2,5%	2,5%	100,0%	
Pearson Chi-Square= 9,298 , p= 0,318						

Tübüllerde dilatasyon görülmesi açısından yapılan değerlendirmede, 2. grupta 1 hayvanda fokal, 3. grupta 1 hayvanda multifokal olarak dilatasyon görülmüştür. Bunun dışında 4 ve 5. gruplarda yer alan hayvanların böbrek dokusu tübüllerinde dilatasyona rastlanmamıştır.

Çizelge 3.13. Gruplar bazında böbrek dokusu fibrozis değerlendirmesi

Crosstab					
		FİBROZİS			Total
		Gözlenmedi	Fokal		
Grup	1	N	9	0	9
		% Grup	100,0%	0,0%	100,0%
		% Fibrozis	23,1%	0,0%	22,5%
		% Total	22,5%	0,0%	22,5%
	2	N	9	0	9
		% Grup	100,0%	0,0%	100,0%
		% Fibrozis	23,1%	0,0%	22,5%
		% Total	22,5%	0,0%	22,5%
	3	N	5	1	6
		% Grup	83,3%	16,7%	100,0%
		% Fibrozis	12,8%	100,0%	15,0%
		% Total	12,5%	2,5%	15,0%
	4	N	9	0	9
		% Grup	100,0%	0,0%	100,0%
		% Fibrozis	23,1%	0,0%	22,5%
		% Total	22,5%	0,0%	22,5%
	5	N	7	0	7
		% Grup	100,0%	0,0%	100,0%
		% Fibrozis	17,9%	0,0%	17,5%
		% Total	17,5%	0,0%	17,5%
Total		N	39	1	40
		% Grup	97,5%	2,5%	100,0%
		% Fibrozis	100,0%	100,0%	100,0%
		% Total	97,5%	2,5%	100,0%
Pearson Chi-Square= 5,812 , p= 0,214					

Böbrek dokularında fibrozis açısından incelemede sadece, NaF ve karvakrolün birlikte uygulandığı 3. grupta 1 hayvanda fokal fibrozise rastlanmıştır. Bunun dışında hiç bir grupta fibrozis görülmemiştir.

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, ratlarda sodyum florid ile oluşturulan toksikasyonda karvakrolün böbrekler üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bir ay süreyle ratların içme sularına NaF konularak, flor toksikasyonu oluşturulmuş ve bu kapsamda, karvakrolün böbrekler üzerindeki hem koruyucu hem tedavi edici etkisi araştırılmıştır. Böbrek dokularında oksidatif stres belirteci biyokimyasal parametreler değerlendirilmiş ve bazı böbrek parametleri analiz edilmiştir.

Flor, doğada oldukça yaygın bulunan bir element olup, sanayiden ilaca bir çok sektörde kullanılmaktadır (Jha ve ark., 2011). Aynı zamanda diş, kemik, yumuşak dokular ve vücut sıvılarının da bir bileşenidir. Bu yüzden vücut için oldukça önemli bir elementtir (Zhang ve ark., 2014). Ancak, fazla miktarda flor alımı canlılar için toksik etki göstermekte, böbrekler ve gonadlar gibi organlarda hasara yol açmaktadır (Barbier ve ark., 2010). Bu kapsamda flor toksikasyonu; oksidatif stres, DNA hasarı ve gen ifadesinde değişim gibi hücrel metabolizmayla yakından ilişkilidir (Bai ve ark., 2010). Bu yüzden flor toksikasyonunda serbest radikallerin artması ve doku ve organlarda hasara yol açmasını engellemek için etkili uygulamalar gerekmektedir. Bu durum göz önüne alındığında, bir çok hastalıkta olduğu gibi flor toksikasyonunda da koruma ve tedavi için doğal maddelerin kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır (Alhusaini ve ark., 2018).

Karvakrol, kekik gibi aromatik bitkilerin organik bileşenidir (Suntress ve ark., 2015). Yapılan bu çalışmada da, ülkemizde yaygın olarak kullanılan kekiğin organik bileşeni karvakrolün, NaF ile oluşturulan toksikasyonda böbrekler üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

Karvakrolün yangı kaynaklı deneysel oluşturulmuş kolitis, artrit, böbrek yangıları, astma ve sepsis üzerinde antioksidant, antiinflamatorik ve sitoprotektif etkileri belirlenmiştir (Arigesevan ve ark., 2015; Banji ve ark., 2014; Khosravi ve ark., 2016; Ozer ve ark., 2017 ve Suo ve ark., 2014).

Deneysel çalışmalardan, sekal ligasyonla oluşturulan polimikrobiyal sepsiste, karvakrol kullanımının ölüm oranlarının azalmasını sağladığı belirtilmiştir (Canbek ve ark., 2008; Ozer ve ark., 2017 ve Yu ve ark., 2013).

Yapılan çalışmalarda, oksidatif stres durumunda karvakrol uygulamasının Glutasyon (GSH) seviyesini arttırdığı tespit edilmiştir. Bu durum, karvakrolün radikal temizleme etkisiyle gerçekleşmekte ve serbest oksijen türlerinin ortadan kaldırılması ile sonuçlanmaktadır (Aeschbach, ve ark., 1994). Bunun dışında yapılan çalışmalar yine göstermiştir ki karvakrol, total antioksidan kapasitesi seviyesini arttırmaktadır (Aydın ve ark., 2014).

Flor toksisitesinde oksidatif stresin etkili olduğu söylenebilir. Reaktif oksijen türleri etkisi ile geliştiği, başka bir deyişle, oksijen radikallerinin elimine edilmesinde yetersiz kaldığında (süperoksit radikali, H_2O_2 , OH^- radikali ve lipid peroksidleri gibi) özellikle böbrek tübül ve glomerular dejenerasyon dikkati çeker (Öztürk ve ark., 2018).

Normal anaerobik metabolizma çıkış süresince sentezlenen reaktif oksijen türleri, patolojik durumda daha fazla ve kontrol dışı üretilir. Sonuç olarak, hücre membranı, lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek yapılarını bozar.

Doku ve serumda ölçülen MDA, hücre yapısında gelişen oksidatif stres tanımında kullanılan önemli kriterdir. Biyolojik sistemde artan oksijen radikalleri GPx, SOD gibi antioksidatif enzim sistemlerini inhibe eder. GSH, oksidatif stresin de dahil olduğu toksik nedenlere karşı etkili olduğu bilinen, intrasellüler savunma hattı içinde yer almaktadır (Akdere ve ark., 2014).

Çalışmamızda böbrek dokusunda ölçtüğümüz MDA düzeyi, istatistiki anlamda önemli farklılık göstermese de, gruplar arasında farklılıklar belirlenmiştir. İçme suyuna flor katımı ile oluşturulan florozis grubunda (grup 2) en yüksek MDA düzeyi ölçülmüştür. Bu durumda kontrol grubu ve CAR gruplarında, MDA değerleri arasında istatistiki anlamda önemli fark bulunmadığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda, antioksidatif savunma sistemine ait olan iki enzim SOD ve GPx değerleri, yalnızca flor toksikasyonu grubunda en düşük değerleri göstermiştir. Toksikasyona rağmen, CAR uygulanan grupta bile, GPx ve SOD düzeylerinde daha yüksek değerler ölçülmüştür. Toksikasyon sona erdikten sonra, 10 gün CAR verilen 4. grup değerleri, flor uygulaması ile aynı anda CAR verilen 3. grup değerlerinden düşük bulunmuştur.

Bu durumda, CAR verilmesi toksik madde uygulaması ile birlikte yürütüldüğünde, toksik maddenin etkinliğini azalttığı belirtilebilir. CAR uygulamasının, SOD ve GPx değerlerini yükseltme, MDA değerlerini ise azaltma açısından daha etkili olduğu söylenebilir.

Öztürk ve ark. (2018) renal iskemi oluşturdukları ratlarda yapılan deneysel araştırmada, karvakrol ilavesinin MDA düzeyinde azalmalara ve CAT, SOD ve GPx gibi antioksidatif enzim sistemlerinde artış belirlendiğini bildirmişlerdir. Bu durumu

CAR kullanımı ile birlikte, olası bir oksidatif strese karşı gösterdiği koruyucu etki olarak yorumlanmıştır. Bu durum, çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızdaki amaç, antioksidatif etkisi bilinen doğal substrat olan CAR'un florozis durumunda böbreklerde yapabileceği oksidatif stres etkili dejenerasyonu ne oranda önleyebileceğini araştırmaktır. Samarghandian (2016) ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada GPx düzeyinde CAR etkisi ile artış olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubu (7,30 nmol/dk/mL) değeri ile toksik grup olan 2. grup arasında belirgin bir artış (10,68 nmol/dk/mL) görülmüştür. CAR verilen 3., 4. ve 5. gruplarda bu artış çok daha belirgindir (21,1 nmol/dk/mL; 19,6 nmol/dk/mL; 14,27 nmol/dk/mL). Kontrol grubunda ölçülen düşük değer, florozis etkisi sağlanan ve CAR ilave edilen gruplara göre istatistiki anlamda farklı bulunmuştur ($p<0,01$). CAR uygulanmasının, büyük oranda GPx salınımına neden olduğu söylenebilir.

GPx düzeyindeki azalma, dokuda yaşanan ROS stresine dayandırılmaktadır (Tong ve Zhong, 2014). Toksik grupta ölçülen GPx değeri kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Yalnızca flor etkisi olan gruplarda GPx değeri yüksektir. Dolayısı ile hem flor hem de CAR uygulanan grup 3 GPx değeri 21,09 nmol/dk/ml olarak ölçülmüştür. Yalnızca CAR verilen 5. grupta değerler ortalaması 14,27 nmol/dk/ml belirlenmiştir. Buna göre, 10,68 nmol/dk/ml belirlenen toksik grup, kontrol grubu dışında en düşük düzeyde ölçülmüştür. CAR uygulamasının GPx düzeyini artırdığı söylenebilir.

Yapılan deneysel çalışmada, toksik maddenin uygulama şekline, hayvanların gösterdiği bireysel farklılığa bağlı olarak kontrol grubunda ölçülen GPx değeri, florozis grubu olan 2. gruptan daha düşük düzeylerde ölçülmüştür. Chow ve Toppel'in yaptığı araştırmada, yüksek oranda oksidatif stres yaşatılan ratlarda, GPx düzeyinde artış belirlenmiştir (Chow ve Toppel, 1972).

Bu değişim SOD enzim düzeyleri için de söylenebilir. Yalnızca flor verilen grupta elde edilen SOD değeri en düşük seviyededir (Florozis: 0,04 U/mL). Florla birlikte CAR verildiğinde bu düzey 3. grupta 0,24 U/mL düzeyindedir ve istatistiki olarak önemlidir ($p<0,01$).

Antioksidatif sistem enzimlerinden SOD, toksik grup 2'de en düşük düzeydedir (0,04 U/mL). Toksikasyon etkisi ile birlikte kullanılan CAR, grup 3'te etkisini göstererek, SOD düzeyini yükseltmiştir (0,24 U/mL). Aynı şekilde, toksikasyon oluşmasının ardından CAR verilen 4. grupta elde edilen ortalama değer, toksikasyonun oluşması amaçlanan 2. grup değerinden daha yüksek elde edilmiştir (Grup 4: 0,16 U/mL).

CAR uygulamasının peroksidasyon reaksiyonlarının azalması yönünde etkili olduğu diğer bilimsel çalışmalarda bildirilmiştir (Öztürk ve ark., 2018).

Samarghandian ve ark., 2016 yılında yayınladıkları çalışmada, oksidatif stres oluşturulmuş bazı organlarda karvakrolün etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda her grupta 8 hayvan olacak şekilde toplamda 8 grup oluşturulmuştur. 1. grup kontrol grubu; 2. grup taşıyıcı maddenin verildiği ve stresin oluşturulduğu grup; 3., 4. ve 5. gruplar sırasıyla 20 mg/kg, 30 mg/kg ve 40 mg/kg i.p. karvakrolün uygulandığı ve stresin oluşturulmadığı grup; 6., 7. ve 8. gruplar sırasıyla 20 mg/kg, 30 mg/kg ve 40 mg/kg karvakrolün i.p. uygulandığı ve stresin oluşturulduğu gruplardır. Stres için hayvanlar 20 gün boyunca her gün olmak üzere 6 saat hareketleri kısıtlayan kafeslerde tutulmuşlardır. Uygulamalar sonunda oksidatif stres parametreleri değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda, tedavi uygulanmamış kontrol grubunda, böbrek MDA seviyesinde artışlar görülmüştür.

Zhang ve ark.'nın (2014) yaptıkları çalışmada, ratlarda sodyum floridle böbrek ve karaciğerde oluşan oksidatif hasarda mısır mor bitki pigmentinin koruyucu özelliği araştırılmıştır. Bu kapsamda böbrek ve karaciğerde oksidatif hasar oluşmasına neden olmak için, ratlara 100 ppm sodyum florid içme suyuyla verilmiştir. Yapılan araştırma sonucunda, flor toksikasyonu oluşan grupta, kontrol gruba göre nazaran MDA seviyesinde belirgin bir artış gözlenmiştir.

Çalışmamızda da, florozis etkisi ile MDA değerinde toksik grupta özellikle (56,23 μM) artma görülmesi, flor etkisi olarak değerlendirilebilir. CAR uygulanan florozis grubundaki düşme eğilimi (34,18 μM) diğer bilimsel çalışmalara benzer şekildedir. Kontrol grubuna göre, diğer CAR uygulanmış gruplarda, sırası ile G4:39,28 μM ve G5:32,17 μM olarak azalan MDA değerleri dikkat çekmektedir. Bu durum, lipid peroksidasyon kriteri kabul edilebilir. MDA düzeyindeki azalma eğilimini CAR ile ilişkilendirebiliriz.

Diğer çalışmalarda belirtildiği gibi, SOD ve GPx değerleri toksikasyon etkisi ile düşük bulunurken, CAR ilavesinin bu seviyeyi istatistiki anlamda önemli olan düzeye yükselttiği görülmektedir.

Böbreklerde flor etkisinin patolojik yorumunda, yalnızca flor uygulanan 2. gruptaki hayvanlarda fokal ve multifokal proteinöz madde birikimi belirlenmiştir. Bu patolojik değişim, florla birlikte CAR'ün de uygulandığı 3. grupta yalnızca bir hayvanda gözlenmiştir. Flor toksikasyonundan sonra 10 gün CAR verilen 4. grupta 3 hayvanda benzer durum belirgindir. Bu durumda, CAR uygulanan 5. grupta hiç bir oranda proteinöz madde oluşumu görülmemiştir. CAR'ün böbreklerde protein birikimini önlediği söylenebilir.

Genel olarak bütün gruplarda, flor toksikasyonu etkisi olarak değerlendirilebilecek böbrek patolojisi açısından bakıldığında, yalnızca CAR uygulanan 5. grupta herhangi bir değişime rastlanmıştır. Özellikle böbrekler yoluyla atılan yüksek orandaki florun, böbreklerde belirgin değişimlere yol açtığı söylenebilir. Öztürk ve arkadaşlarının yaptığı deneysel iskemik rat böbreklerinde tübüller atrofi, dilatasyon ve epitel hücre dejenerasyonlarında CAR kullanımının, histolojik anlamda iyileşmelere yol açtığı bildirilmiştir (Öztürk ve ark., 2018).

Ratlarla yapılan çalışmalar yüksek miktarda florür alınımında, renal tübüller hasarın oluştuğunu göstermiştir (Henschler ve ark., 1975). Bunun dışında inflamasyon, tübüller dejenerasyon, fibrozis, kıvrımlı tübüller dilatasyon görülebileceği ortaya konmuştur (Bond ve Murray, 1952).

BUN değeri, böbreklerin çalışma durumunu belirleyen kriterlerdendir. Eğer üre böbrekler aracılığı ile vücuttan uzaklaştırılmıyorsa, kanda BUN seviyesi yükselir.

Böbrek fonksiyonlarının bozulması kriterlerinden olan kreatinin ölçümleri de RIFLE Kriterleri ile değerlendirilir (Kellum ve Lameire, 2012). Buna göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yaralanmalarda 2 veya 3 kata kadar artar. Böbrek iflasında bu, 3 kat üzerindedir.

Çalışmamızda elde edilen BUN değerleri dikkate alındığında, florozis süresince CAR uygulanan 3. grupta ölçülen değerler en yüksek (61,15) ve yalnızca CAR kullanılan 5. grup ölçümleri en düşük (37,8) olarak belirlenmiştir. Yine kreatinin değerleri incelendiğinde, tedavi amaçla CAR uygulanan 4. grupta en yüksek (0,808) ve sadece CAR uygulanan 5. grupta ise en düşük (0,476) olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda elde edilen kreatininin değerlerine göre deney boyunca CAR verilmiş 5. grupta, kontrol ve flor toksikasyonu sonrası CAR takviyesi yapılan 4. grup arasında $p < 0,01$ düzeyinde fark görülmüştür. Sonradan CAR verilen 4. grup kreatinin değerlerinin, diğer gruplara göre çok yüksek (0,808) ölçülmüştür. Fakat 30 günlük deneme süresinde flor toksikasyonu boyunca CAR uygulanması yapılan 3. grup değerleri, kontrol grubundan daha düşük olarak belirlenmiştir. Yalnızca flor toksikasyonunun geliştirildiği 2. grup değerleri, kontrol grubuna göre daha düşük düzeydedir.

Öztürk ve arkadaşlarının (2018) yaptıkları çalışmada, karvakrol uygulamasının serum BUN ve kreatinin değerlerini kontrol grubuna göre yükselttiği görülmüştür. Çalışmamızda da BUN değerleri dikkate alındığında, 3. ve 4. grup değerlerinin (G3: 61,15; G4: 53,067) kontrol grubu değerine (44,011) oranla arttığı görülmüştür. Aynı şekilde kreatinin değerleri göz önüne alındığında; 4. grup değerinin (0,808) kontrol grubuna (0,676) oranla arttığı belirlenmiştir. Ancak bunun aksine 3. grup kreatinin değerleri (0,500) kontrol grubuna göre azalış göstermiştir.

Serum kreatinin değerinin ölçülmesi, GFR hızı üzerinden böbrek fonksiyonlarını değerlendirmektir. GFR değeri azaldıkça kreatinin değeri yükselir. Fakat kreatinin değerinde yükselme, ilk olarak GFR hızının %50 azalması ile başlar (Reindl-Schwaighofer ve Joannidis, 2010).

Serum kreatinin ve üre değerinde fazla artışın görülebilmesi için nefronların 2/3'nün fonksiyonunu kaybetmesi gerekir. (Davis ve Kramer, 2006; Hewitt ve ark., 2004; Thukral ve ark., 2005). Bu nedenle fazla iniş çıkış görülmeyen olaylarda, hemen böbrek fonksiyonlarındaki değişimin akla gelmesi, beslenme ve fizyolojik durumlarla da ilgili olabilir.

Kreatinin değerleri, üre ile karşılaştırıldığında daha sağlam kriter olarak düşünülebilir. Çünkü, iskelet kasının büyüklüğü ile orantılıdır ve bu orana bağlı olarak vücutta sabit kalır. Buna karşılık üre değerleri kreatinine göre çok daha fazla faktörden etkilenir ve inişli çıkışlı seyir gösterir (Bellomove ark, 2001).

Öztürk H. ve arkadaşlarının 2017 yılında ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada, bilateral renal iskemi - reperfüzyon ile oluşan histopatolojik ve fonsiyonel bozuklukların tedavisinde karvakrolün etkisi araştırılmıştır. Bu kapsamda toplamda 30 hayvan kullanılmış ve her grupta 10 hayvan olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır. 1. grup kontrolü oluştururken, 2. grupta karvakrol ile tedavi edilmeyen hasta grup ve 3. grupta ise karvakrol ile tedavi edilen grup yer almaktadır. Karvakrolle tedavi edilen 3. grupta, iskemiden 2 saat önce ratlara 75 mg/kg dozda intraperitoneal olarak karvakrol uygulaması yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda serum kreatinin ve BUN değerlerinin uygulama gruplarında kontrol grubuna nazaran yüksek olduğu görülmüştür. Fakat, karvakrol ile tedavi edilen gruptan elde edilen BUN ve kreatinin değerlerinin, stres oluşturulan gruba göre azalmakta olduğu tespit edilmiştir. Yine tedavi edilen grupta, doku MDA değerinin azaldığı, bunun yanında SOD ve GPx değerlerinin ise yükseldiğı görülmüştür. Tedavi edilmeyen hasta grupta ise, MDA değerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu, SOD ve GPx'in ise düşük olduğu tespit edilmiştir (Öztürk ve ark., 2017).

Yapılan çalışmalarda, NaF uygulamalarının böbrek hasarına yol açtığı ve bu kapsamda da böbrekte üre klirensinde bozulma ve kreatininde artışa neden olduğu bulunmuştur. Emejulu ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada NaF uygulanan ratların serum üre, kreatinin ve klorür iyon seviyeleri analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda, NaF verilen hayvanlarda serum üre ve kreatinin değerlerinin kontrol grubuna nazaran kayda değer bir yükseliş gösterdiği tespit edilmiştir (Emejulu ve ark., 2016). Yine Al-Harbi M.S. ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları çalışmada 4 hafta boyunca erkek farelere intraperitoneal olarak 10,3

mg/kg/gün dozda NaF verilmiş, uygulama sonrasında serum üre ve kreatinin değerleri analiz edilmiştir. Sonucunda, bu değerlerde artış gözlenmiştir (Al-Harbi ve ark., 2014).

BUN ve kreatinin testleri, böbrek fonksiyonlarının azaldığı durumlarda glomerüler filtrasyonun çok az ya da hiç olmadığı durumlarda, glomerüler filtrasyon oranını göstermek için kullanılan testlerdir. Fakat, glomerüler filtrasyon oranı parabolik bir eğriye sahiptir. Böylece, BUN ve kreatinin değerlerinin normal aralık dışına çıkması böbrek fonksiyonlarının %50'sinden fazlasının kaybolması sonucunda görülmektedir. Bu yüzden, böbrek hastalıklarının erken evrelerinde bu testlerin yanlış yol göstermesi normaldir (Hosten, 1990, s:877).

Böbrekler, florürün atılımından sorumlu olduklarından dolayı en çok etkilenen organlardır. Böbrek tübülleri florürün alınımında görev almaktadırlar (Jha ve ark., 2011). 8 ppm ve üzeri dozlarda flor içeren su tüketimine uzun süreli maruz kalındığında, böbreklerde değişimlerin ortaya çıktığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Bu değişimler fonksiyonel ya da yapısal değişiklikler olabilmektedir (Yang ve Liang, 2011; Ranjan ve Ranjan, 2015). Bu kapsamda yapısal değişiklikler değerlendirildiğinde, tübüler epitellerinde dejenerasyon, glomeruler atrofi, fibrozis ve tübüler nekroz görülebildiği ortaya konmuştur. Bu değişiklikler sonucunda da kan üre azotu ve kreatinin seviyelerinde yükselişler görülebilmektedir (Ranjan ve Ranjan, 2015).

Bu çalışmada, BUN ve kreatinin analizleri yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, sadece NaF verilen 2. grup, NaF ve karvakrolün aynı anda verildiği 3. grup ve NaF uygulamasından sonra 10 gün karvakrol uygulamasının yapıldığı 4. grupta BUN değerlerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu görülmüştür. Sadece i.p olarak karvakrol uygulamasının yapıldığı 5. grupta ise BUN değerinin kontrol grubu değerine göre düşük olduğu bulunmuştur. Kreatinin sonuçları incelendiğinde

ise, uygulamalar sonrasında 2.,3. ve 5. gruplarda değerlerin uygulama öncesinde görölen değerlerden daha düşük olduğu bulunmuş, ayrıca bu değerlerin kontrol grubundan da düşük olduğu tespit edilmiştir.

Her türlü çevre ve beslenme farklılıkları ile değişen bu parametreler yerine, daha spesifik olan KIM-1 ve Clusterin'i böbrek biyomarkerları olarak belirledik.

Diğer böbrek parametrelerin Clusterin, proksimal ve distal tübüller de dahil bazı dokulardaki hücre apoptozisi ve adezyonu ile ilgili olarak salınan bir glikoproteindir. KIM-1 ise herhangi bir hasar durumunda tübül epitel hücrelerinden elde edilen bir transmembran proteindir (Gheith ve El-Mahmoudy Abubakr, 2018). KIM-1 sağlıklı böbrek dokusundan elde edilememektedir. Fakat yapılan çalışmalar böbrek hasarına neden olan durumlarda tespit edilebileceğini göstermiştir (Damman ve ark., 2010).

Vaidya ve ark., 2005 yılında yaptıkları çalışmada, ratlara üç farklı dozda cisplatin uygulamışlar ve bu uygulamanın sonunda ratlardan idrar örnekleri almışlardır. Her dozun uygulanmasından bir gün sonra, idrar KIM-1 seviyesinde 3-5 kat artışa rastlanılmıştır. Bunun yanında rutin olarak bakılan BUN, kreatinin gibi değerlerde, uygulamaların başlangıç döneminde hiç bir değişiklik görülmemiştir. Bu yüzden idrar KIM-1 seviyesi böbrek hasarının erken dönemlerinde teşhis açısından hızlı, hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar sunmaktadır (Vaidya ve ark., 2005).

Yaptığımız çalışmada, serum Clusterin değeri dikkate alındığında, gruplar arası anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bunun dışında doku örneğinde bakılan KIM-1 değerleri çok düşük miktarlarda bulunmuştur. Sadece NaF verilen 2. grupta, kontrol grubuna göre çok az miktarda yükseliş gösterirken, diğer tüm gruplarda (3, 4, 5. gruplar) kontrol grubuna göre azalış göstermiştir.

Çalışmamızda, serum Clusterin analizi verileri değerlendirildiğinde, patolojik bulgulara paralel olarak gruplar arası anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durum böbrek tübüllerinde kayda değer bir dilatasyon olmadığının bir göstergesi olarak yorumlanabilir. Bunun dışında doku örneğinde analizi yapılan KIM-1 değerleri çok düşük miktarlarda bulunmuştur. Tübül epitel hücrelerinin hasar görmesi sonucu açığa çıkan KIM-1'in patoloji sonuçlarımızla paralel olarak eser miktarda tespit edilmiş olması tubuler dilatasyonun gerçekleşmemesiyle açıklanabilir. Sadece NaF verilen 2. grupta, kontrol grubuna göre çok az miktarda yükseliş gösterirken, diğer tüm gruplarda (3, 4, 5. gruplar) kontrol grubuna göre azalış göstermektedir.

Qin Luo ve arkadaşlarının 2017'de fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, toplam 240 fare kullanılmış ve bu 240 fare her grupta eşit sayıda olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. Bu gruplardan ilki kontrol olmak üzere, diğer gruplara 42 gün boyunca 0 mg/kg, 12 mg/kg, 24 mg/kg ve 48 mg/kg NaF ağız yoluyla verilmiştir. Uygulamaların başlamasının ardından, NaF verilen gruplarda büyüme, kontrol grubundan çok daha yavaş gerçekleşmiştir (Luo, ve ark., 2017). Bu kapsamda, yaptığımız çalışmada benzerlik görülmüş ve tüm gruplarda yer alan ratların ağırlık artışı kontrol grubuna göre daha az görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, ratlarda deneysel olarak NaF ile oluşturulan oksidatif strese karşı, karvakrolün böbrekler üzerinde antioksidan etkisi araştırılmıştır. Karvakrol, kekik benzeri aromatik bitkilerden elde edilen doğal bir antioksidan olarak tanımlanmaktadır. Yapılan çalışmalarla, karvakrolün antioksidatif etkisi ispatlanmış olup, çalışmamızda da bu durum benzer şekilde ortaya konmuştur.

Özellikle Doğu Anadolu Bölgesi'nde bulunan inaktif yanardağların çevresindeki toprak ve suda yüksek miktarda flor bulunması nedeniyle, insan ve hayvanlarda flor toksikasyonunun şekillendiği bilinmektedir. Oluşan toksikasyona bağlı olarak canlılarda, akut dönemde özellikle diş ve kemik dejenerasyonunun gözlemlenmesinin yanısıra, kronik dönemde ise, karaciğer ve böbrek gibi organlarda doku hasarlarının ortaya çıktığı belirlenmiştir. Buna ek olarak fazla alım sonucunda emilmeyen florun idrar ile atılması nedeniyle böbrekler, flor toksikasyonundan en çok etkilenen organlardır.

Yapılan diğer çalışmalara paralel olarak, karvakrolün flor toksikasyonunda böbrekler üzerine antioksidatif etki gösterdiği çalışmamızda da belirli oranlarda tespit edilmiştir. Bununla birlikte, karvakrolün antioksidan etkisinden faydalanmak büyük önem arz etmekte olup bu bitkilerin daha yüksek oranlarda tüketilmesi önerilmektedir. Günlük hayatta sık rastlanılan yüksek dozdaki flor etkisine karşı, ülkemizde ucuz ve kolay elde edilen karvakrol içeren gıdaların tüketilmesi, insan ve hayvan sağlığının korunması açısından önem arz etmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamızın bulgularına göre, karvakrol uygulamasının antioksidatif sistem enziminin yükselmesine yol açtığı ve böbrek dokusunun

korunmasında etkili olduğu söylenbilir. Yaptığımız deneysel çalışma sonuçları, diğer araştırma sonuçları ile genel anlamda yakınlık göstermiş olup, bu alanda yapılacak farklı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



ÖZET

Ratlarda Sodyum Florid ile Oluşturulan Toksikasyonda Karvakrolün Böbrekler Üzerine Etkisi

Flor, tek değerli bir gaz halojendir, açık sarı renklidir ve doğada çok yaygın olarak bulunmaktadır. Flor, kemikler için önemlidir ve diş çürümesine de engel olmaktadır. Fazla alınması sonucunda ise flor toksikasyonu oluşmaktadır. Bu çalışmanın amacı, ratlarda sodyum florid ile oluşturulan renal hasar ve oksidatif strese, karvakrolün antioksidan etkisinin araştırılmasıdır.

Çalışmada, her grupta 9 rat olmak üzere 5 grup oluşturulmuş ve toplamda 45 rat kullanılmıştır. Grup 1 kontrol grubu olup bu gruptaki hayvanlara sadece taşıyıcı madde olarak i.p. yolla %2,5 DMSO uygulaması yapılmıştır. Grup 2'nin içme sularına 30 gün süreyle 300 ppm dozda sodyum florid verilmiş ve flor toksikasyonu oluşması amaçlanmıştır. Grup 3'e 30 gün boyunca içme suyuyla 300 ppm dozda sodyum florid verilmiş aynı zamanda i.p. yolla 74 mg/kg dozda karvakrol uygulanmıştır. Bu grupta böbreklerde oluşan oksidatif strese karşı karvakrolün profilaktik etkisi araştırılmıştır. Grup 4'e 30 gün boyunca 300 ppm/gün dozunda sodyum florid verilip ardından bu 30 günü takiben 10 gün boyunca 74 mg/kg dozda karvakrol i.p. yolla uygulanmıştır. Bu grupta karvakrolün tedavi edici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Grup 5'te ise sadece karvakrol 74 mg/kg dozda 30 gün süreyle i.p. olarak uygulanmıştır.

Uygulamalar sonrasında toplanan kan örneklerinden serum kreatinin (CR) ve kan üre azotu (BUN) değerleri analiz edilmiştir. Ortalama CR değerleri toksikasyonun oluşması beklenen 2. grupta artarken, karvakrol verilen gruplarda 2. gruba göre azalış gösterdiği belirlenmiştir. Ortalama BUN değerleri ise gruplar bazında birbirine yakın elde edilmiştir. Clusterin değerleri; her grupta birbirine yakın elde edilmiştir. KIM-1 değerleri ise toksikasyonun oluşması beklenen 2. grupta, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek elde edilmiştir. Ortalama MDA değeri; 2. grupta kontrol grubuna kıyasla yükselirken, karvakrol verilen gruplarda düşmüştür (Grup 1: 42,82 μ M; Grup 2: 56,25 μ M; Grup 3: 34,18 μ M; Grup 4: 39,28 μ M; Grup 5: 32,17 μ M). SOD değeri; toksikasyon oluşması beklenen grup 2'de kontrol grubuna oranla düşük elde edilmiştir. Karvakrol verilen gruplarda ise bu değer grup 2'ye kıyasla daha yüksek tespit edilmiştir (Grup 1: 0,30 U/mL; Grup 2: 0,04 U/mL; Grup 3: 0,24 U/mL; Grup 4: 0,16 U/mL; Grup 5: 0,23 U/mL). GPx değerleri ise toksikasyon oluşması hedeflenen grup 2'de kontrol grubuna göre yüksek bulunurken, karvakrol verilmesinin GPx değerlerini daha fazla yükselttiği belirlenmiştir (Grup 1: 7,30 nmol/dk/mL; Grup 2: 10,68 nmol/dk/mL; Grup 3: 21,09 nmol/dk/mL; Grup 4: 19,59 nmol/dk/mL; Grup 5: 14,27 nmol/dk/mL).

Elde edilen analiz verileri sonucunda karvakrolün, böbrek dokusunda flor toksikasyonu sonucu oluşan oksidatif strese karşı belli oranda etkili olduğu söylenebilir. Ancak konunun daha iyi anlaşılabilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışma Ankara Üniversitesi BAP koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Böbrek, Flor Toksikasyonu, Karvakrol, Oksidatif Stres

SUMMARY

Fluorine is a univalent gaseous halogen, it is straw-yellow colour and it is found in nature very prevalently. Fluorine is very important for bones and it prevents to caries. Overdose fluorine taken can cause fluor intoxication. The aim of this study was to investigate the antioxidant effects of carvacrol on sodium fluoride induced renal damage and oxidative stress in rats.

In this study, 5 groups (9 rats in each) were formed and totally 45 rats were used. Group 1 was the control group and only vehicle (2.5% DMSO) was applied intraperitoneally. At group 2, 300 ppm sodium fluoride was given in drinking water for 30 days and it was aimed to cause fluoride toxicity. Sodium fluoride at a dose of 300 ppm with drinking water was given for 30 days and also 74 mg/kg carvacrol was administered by i.p. at group 3. In this group, the prophylactic effect of carvacrol against oxidative stress in the kidneys was aimed to investigate. Group 4 received sodium fluoride at a dose of 300 ppm for 30 days, followed by carvacrol implementation at 74 mg/kg i.p for 10 days. We aimed to investigate the therapeutic effect of carvacrol in this group. At group 5, only 74 mg/kg carvacrol was applied i.p. for 30 days.

Serum creatinine (CR) and blood urea nitrogen (BUN) values were analysed from blood samples, which were collected after the applications. While average CR values increased at group 2 where was expected to occur toxicity, it was determined that CR values decreased at the groups where carvacrol were implemented compared to group 2. Mean BUN values, the averages were obtained close to each other on the basis of groups. Also, Clusterin values of each group were obtained similar for each group. On the other hand, KIM-1 values were higher in the second group in which toxicity was expected to occur than in the control group. Mean MDA value; it was higher at the second group while the groups where carvacrol was implemented decreased compared to the control group (Group 1: 42.82 μM ; Group 2: 56.25 μM ; Group 3: 34.18 μM ; Group 4: 39.28 μM ; Group 5: 32, 17 MM). In terms of SOD values; it was lower at group 2 where the toxication was aimed than the control group. At the groups where carvacrol was implemented, this value was found to be higher than in Group 2 (Group 1: 0.30 U / mL; Group 2: 0.04 U / mL; Group 3: 0.24 U / mL; Group 4: 0.16 U / mL; Group 5: 0.23 U / mL). While GPx values were found to be higher in the group 2 targeted for toxicity than the control group, carvacrol administration increased GPx values more (Group 1: 7.30 nmol/min/mL; Group 2: 10.68 nmol/min/mL; Group 3: 21.09 nmol/min/mL; Group 4: 19.59 nmol/min/mL; Group 5: 14.27 nmol/min/mL).

As a result of the analysis data, it could be specified that carvacrol is effective against to oxidative stress caused by fluorine toxicity in kidney tissue. However, new studies are needed to better understand the issue. This study was supported by coordinatorship of Scientific Research Projects of Ankara University.

Keywords: Carvacrol, Fluor Toxicities, Kidney, Oxidative Stress

KAYNAKLAR

- ADAMEK E, PAWŁOWSKA-GÓRAL K, BOBER K (2005). In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity. *Ann. Acad. Med. Stetin*, **51**: 69–85
- AESCHBACH R, LÖLIGER L, SCOTTETAL BC (1994). Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food and Chemical Toxicology*, **32**: 31–36.
- AHMADVAND H, TAVAFI M, ASADOLLAHI V, JAFARIPOUR L, HADIPOUR-MORADI F, MOHAMMADREZAEI-KHORAMABADI R, KHOSRAVI P, SALEHI H, CHERAGHI A (2016). Protective Effect of Carvacrol on Renal Functional and Histopathological Changes in Gentamicin-Induced-Nephrotoxicity in Rats. *Zahedan J Res Med Sci*, **18**: 6446.
- AL-HARBI MS, HAMZA RZ, DWARI AA (2014). Sodium fluoride induced antioxidant defense impairment and impaired renal biomarkers and the ameliorative role of selenium and curcumin in male mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **4**: 990-997.
- AL-HIYASAT AS, ELBETIEHA AM, DARMANI H (2000). Reproductive toxic effects of ingestion of sodium fluoride in female rats. *Fluoride*, **33**: 79-84.
- ALHUSAINI AM, FADDAH LM, EL ORABI NF, HASAN IH (2018). Role of Some Natural Antioxidants in the Modulation of Some Proteins Expressions against Sodium Fluoride-Induced Renal Injury. *Hindawi BioMed Research International*, **2018**:1-9.
- ARIGESAVAN K, SUDHANDIRAN G (2015). Carvacrol exhibits anti-oxidant and anti-inflammatory effects against 1, 2-dimethyl hydrazine plus dextran sodium sulfate induced inflammation associated carcinogenicity in the colon of Fischer 344 rats. *Biochem Biophys Res Commun*, **461**: 314–320.
- ARMSTRONG D, BROWNE R (1994). Free Radicals in Diagnostic Medicine **366**: 43-58.
- ATKINS PW, OVERTON TL, ROURKE JP, WELLER MT, ARMSTRONG FA (2010). The Group 17 Elements In Inorganic Chemistry, 5th Ed, Publisher Great Britain by Oxford University Press, W. H. Freeman and Company, 41 Madison Avenue, New York, NY 10010. s:420
- AUSTGULEN LT, SOLHEIM E, SCHELIN RR (1987). Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol. *Pharmacology & Toxicology*, **61**: 98–102.

- AYDIN E, TÜRKEZ H, KELEŞ MS (2014). The effect of carvacrol on healthy neurons and N2a cancer cells: some biochemical, anticancerogenicity and genotoxicity studies. *Cytotechnology*, **66**: 149-157.
- BAI C, CHEN T, CUI Y, GONG T, PENG X, CUI HM (2010). Effect of high fluorine on the cell cycle and apoptosis of renal cells in chickens. *Biological Trace Element Research*, **138**: 173–180.
- BANJI OJ, BANJI D, SOUMYA N, CHILUPI KK, KALPANA CH, KRANTHI KUMAR CH, ANNAMALAI AR (2014). Combination of carvacrol with methotrexate suppresses complete Freund's adjuvant induced synovial inflammation with reduced hepatotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol*, **723**: 91–98.
- BARBIER O, ARREOLA-MENDOZA L, DEL RAZO LM (2010) Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact*, **188**: 319–333.
- BASHA PM, SUJITHA NS (2012). Combined Influence of Intermittent Exercise and Temperature Stress on the Modulation of Fluoride Toxicity. *Biol Trace Elem Res*, **148**: 69–75.
- BAYLESS JM, TINANOFF N (1985). Diagnosis and treatment of acute fluoride toxicity. *J Am Dent Assoc*, **110**: 209-211.
- BELLOMO R, KELLUM J, RONCO C (2001). Acute renal failure: time for consensus. *Intensive Care Medicine*, **27**: 1685- 1688.
- BERGMANN R (1994). Fluorid in der Ernährung des Menschen. Biologische Bedeutung für den wachsenden Organismus. Habilitationsschrift Medical Faculty, Free University Berlin.
- BIRBEN E, SAHINER UM, SACKESEN C, ERZURUM S, KALAYCI O (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, **5**: 9–19.
- BLASCHUK O, BURDZY K, FRITZ IB (1983). Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem*, **12**: 7714-7720.
- BŁASZCZYK I, GRUCKA-MAMCZAR E, KASPERCZYK S, BIRKNER E. (2008). Influence of Fluoride on Rat Kidney Antioxidant System: Effects of Methionine and Vitamin E. *Biol Trace Elem Res*, **121**: 51–59.
- BOND AM, MURRAY MM (1952). Kidney function and structure in chronic fluorosis. *Brit. J. Exp. Pathol*, **33**: 168-176.
- BOUDONCK KJ, MITCHELL MW, NÉMET LS, KERESZTES L, NYSKA A, SHINAR D, ROSENSTOCK M (2009). Discovery of Metabolomics Biomarkers for Early Detection of Nephrotoxicity. *Toxicologic Pathology*, **37**: 280-292.

- BRATTHALL D, HANSEL-PETERSSON G, SUNDBERG H (1996). Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *European Journal of Oral Sciences*, **104**: 416–422.
- BRIGATTI MF, GUGGENHEIM S (2002). Mica crystal chemistry and the influence of pressure, temperature, and solid solution on atomistic models. In: Mottana A, Sassi FP, Thompson Jr JB, Guggenheim S (eds). *Micas: Crystal Chemistry & Metamorphic Petrology*. *Mineralogical Society of America*, S: 1-98.
- BURT S (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, **94**: 223–253.
- BUZALAF MA, WHITFORD GM (2011). Fluoride metabolism. *Monographs in Oral Sciences*, **22**: 20–36.
- CADENAS E (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem*, **58**: 79– 110.
- Cayman Chemical Item No. 703102, Glutathione Peroxidase Assay Kit kitapçığı Cayman Chemical Item No. 706002, Superoxide Dismutase Assay Kit kitapçığı
- CANBEK M, UYANOGLU M, BAYRAMOGLU G, SENTURK H, ERKASAP N, KOKEN T, USLU S, DEMIRUSTU C, ARAL E, HUSNU CAN BASER K (2008). Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. *Phytomedicine*, **15**: 447–452.
- CHEN JC, MENG SL, HU GD, QU JH, WU W (2008). Effects of low concentration of atrazine on catalase activity in carassius auratus. *J Agro-Environ Sci*, **27**: 1151-1156.
- CHINOY NJ, NARAYANA MV, DALAL V, RAWAT M, PATEL D (1995). Amelioration of fluoride toxicity in some accessory reproductive glands and spermatozoa of rat. *Fluoride*, **28**: 75–86.
- CHLUBEK D (2003). Fluoride and oxidative stress. *Fluoride*, **36**: 217-228.
- CHOW CK, TAPPEL AL (1972). An enzymatic protective mechanism against lipid peroxidation damage to lungs of ozone-exposed rats. *Lipids*, **7**: 518-524.
- CHURCH DF, PRYOR WA (1985). Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect*, **64**: 111–126.
- Clinical Methods, 3rd edition. The History, Physical, and Laboratory Examinations Editors: H Kenneth Walker, MD, W Dallas Hall, MD, and J Willis Hurst, MD.,1990.
- Cloud Clone SEB180Ra Enzyme-linked immunosorbent Assay Kit For Clusterin, Analiz Uygulama Kitapçığı.

- COMHAIR SA, THOMASSEN MJ, ERZURUM SC (2000). Differential induction of extracellular glutathione peroxidase and nitric oxide synthase 2 in air-ways of healthy individuals exposed to 100% O(2) or cigarette smoke. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **23**: 350–354.
- CZARNOWSKI W, WRZEŚNIEWSKA K, KRECHNIAK J (1996). Fluoride in drinking water and human urine in Northern and Central Poland. *Sci Total Environ*, **191**: 177-184.
- DALTON TP, SHERTZER HG, PUGA A (1999). Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, **39**: 67–101.
- DAMMAN K, VAN VELDHUISEN DJ, NAVIS G, VAIDYA VS, SMILDE TD, WESTENBRINK BD, BONVENTRE JV, VOORS AA, HILLEGE HL (2010). Tubular damage in chronic systolic heart failure is associated with reduced survival independent of glomerular filtration rate. *Heart*, **96**: 1297-1302.
- DAVIES KJA (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp*, **61**: 1– 31.
- DAVIES KJA (2000). Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *IUBMB Life*, **50**: 279– 289.
- DAVIES KJA, URSINI F (1995). *The Oxygen Paradox*. CLEUP University Press, ISBN 88-7178-374-3, Padova, Italy.
- DAVIS JW, KRAMER JA (2006). Genomic-based biomarkers of drug- induced nephrotoxicity. *Exp Opin Drug Metab Toxicol*, **2**: 1–7.
- DAWN-LINSLEY M, EKINCI FJ, ORTIZ D, ROGERS E, SHEA TB (2005). Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. *J. Neurosci. Meth*, **141**: 219-222.
- DE VINCENZI M, STAMMATI A, DE VINCENZI A, SILANO M (2004). Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, **75**: 801–804.
- DEAN HT, ARNOLD FA, ELVOVE E (1942). Domestic waters and dental caries. V. Additional studies of the relation of fluoride domestic waters to dental caries in 4425 white children, age 12-14 years, of 13 cities in 4 states. *Public Health Rep*, **57**: 1155-1179.
- DEVASAGAYAM TPA, BOLOOR KK AND RAMSARMA T (2003). Methods for estimating lipid peroxidation: Analysis of merits and demerits (minireview). *Indian J Bioche Biophys*, **40**: 300-308.

- DEVASAGAYAM TPA, TILAK JC, BOLOOR KK, SANE KS, GHASKADBI SS, LELE RD (2004). Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India*, **52**: 794-804.
- DHURVEY V, THAKARE M (2016). The effect of sodium fluoride intoxication on the estrous cycle and ovarian hormones in rats. *Fluoride*, **49**: 223-232.
- DIESENDORF M (1986). The mystery of declining tooth decay. *Nature*, **322**: 125-129.
- DIETERLE F, PERENTES E, CORDIER A, ROTH DR, VERDES P, GRENET O, PANTANO S, MOULIN P, WAHL D, MAHL A, END P, STAEDTLER F, LEGAY F, CARL K, LAURIE D, CHIBOUT SD, VONDERSCHER J, MAURER G (2010). Urinary clusterin, cystatin C, β 2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury. *Nat Biotechnol*, **28**: 463-469.
- DIMCEVICI POESINA N, BĂLĂLĂU C, BÂRCĂ M, ION I, BACONI D, BASTON C, BĂRAN POESINA V (2013). Testicular histopathological changes following sodium fluoride administration in mice. *Rom J Morphol Embryol*, **54**: 1019–1024.
- DISSANAYAKE C (1991) The fluoride problem in the ground water of Sri Lanka—environmental management and health. *Int J Environ Stud*, **38**: 137–155.
- DRAPER HH, SQUIRES EJ, MAHMOODI H, WU J, AGARWAL S, HADLEY M (1993). A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic. Biol. Med*, **15**: 353-363.
- DROGE W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, **82**: 47–95.
- DUPUY C, VIRION A, OHAYON R, KANIEWSKI J, DÈME D, POMMIER J (1991). Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *J Biol Chem*, **266**: 3739–3743.
- DVERGSTEN J, MANIVEL JC, CORREA-ROTTER R, ROSENBERG ME (1994). Expression of clusterin in human renal diseases. *Kidney Int*, **45**: 828–835.
- EASMANN RP, PASHLEY DH, BIRDSONG NL, MCKINNEY RV, WHITFORD GM (1985). Recovery of rat gastric mucosa following single fluoride dosing. *J Oral Pathol*, **14**: 779-792.
- EDMUNDS WM, SMEDLEY PL (1996). Groundwater geochemistry and health: an overview. In: Appleton, Fuge, McCall (Eds.), *Environmental Geochemistry and Health*, vol. 113. *Geological Society Special Publication*, pp. 91-105.
- EGVM (Expert Group on Vitamins and Minerals) (2001). Review of Fluoride. EVM/01/03/P. London. May 2001.

- EKAMBARAM P, NAMITHA T, BHUVANESWARI S, ARULJOTHI S, VASANTH D, SARAVANAKUMAR M (2010). Therapeutic efficacy of *Tamarindus indica* (L) to protect against fluoride-induced oxidative stress in the liver of female rats. *Fluoride*, **43**: 134-140.
- EKSTRAND J, SPAK CJ, EHRNEBO M (1982). Renal clearance of fluoride in a steady state condition in man: influence of urinary flow and pH changes by diet. *Acta Pharmacol Toxicol*, **50**: 321-325.
- EKSTRAND J, EHRNEBO M (1983). The relationship between plasma fluoride, urinary excretion rate and urine fluoride concentration in man. *J Occup Med*, **25**: 745-748.
- EKSTRAND J (1996). Fluoride metabolism. In: Fluoride in dentistry, Ed.: Fejerskov O., Ekstrand J., Burt B.A., Copenhagen: Munksgaard. 55-68.
- ELSAYED NM (2001). Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental- nutritional interaction. *Nutrition*, **17**: 828 – 834.
- EMEJULU AA, ALISI CS, ASIWE ES, IGWE CU, NWOGU LA, ONWULIRI VA (2016). Renal and Hepato-Protective Effects of *Irvingia gabonensis* Juice on Sodium Fluoride-Induced Toxicity in Wistar Rats. *Journal of Clinical Toxicology*, **6**: 296.
- ERGUN HS, RUSSEL-SINN HA, BAYŞU N, DÜNDAR Y (1987). Studies on the fluoride contents in water and soil, urine, bone and teeth of sheep and urine of human from eastern and western parts of Turkey. *DTW*, **94**: 416-420.
- EVANS JL, GOLDFINE ID, MADDUX BA, GRODSKY GM (2002). Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev*, **23**: 599-622.
- EVERETT ET (2011). Fluoride's effects on the formation of teeth and bones, and the influence of genetics. *Journal of Dental Research*, **90**: 552–560.
- FEJERSKOV-O-KIDD E (2009) Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management. *John Wiley & Sons* pp: 299-327.
- FERGUSON MA, VAIDYA V, BONVENTRE JV (2008). Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury. *Toxicology*, **245**: 182-193.
- FIDANCI UR, BAYŞU N, ERGUN H (1994). The fluoride content of water sources in Kızılcacören Village in Eskişehir. *Tr. J. of Medical Sciences*, **20**: 15-17.
- FIDANCI UR, SALMANOĞLU B, MARAŞLI Ş, MARAŞLI N (1998). İç anadolu bölgesinde doğal ve endüstriyel florozis ile bunun hayvan sağlığı üzerindeki etkileri. *Tr. J. Of Veterinary and Animal Sciences*, **22**: 537-544.

- FINK RC, SCANDALIOS JG (2002). Molecular evolution and structure function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms, and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **399**: 19-35.
- GIRI A, BHARTI VK, ANGMO K, KALIA S, KUMAR B (2016). Fluoride induced oxidative stress, immune system and apoptosis in animals. *International Journal of Bioassays*, **5**: 5163-5173.
- BUZALAF CP, LEITE ADL, BUZALAF MAR (2015). Fluoride Metabolism, Chapter 4.
- FNB (Food and Nutrition Board) (1997). Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D and Fluoride. Institute of Medicine National Academy Press, Washington DC.
- FORSTROM JW, ZAKOWSKI JJ, TAPPEL AL (1978). Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry*, **17**: 2639-2644.
- FREI B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins. Linus Pauling Institute. Oregon State University. 1997. <http://lpi.oregonstate.edu/f-w97/reactive.html>.
- FRENI SC (1994). Exposure to high fluoride concentrations in drinking water is associated with decreased birth rates. *J Toxicol & Environ Health*, **42**: 109-12.
- FUCHS TC, HEWITT P (2011). Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity - an overview for applied toxicology. *AAPS J*, **13**: 615-631.
- GALLE J (2001). Oxidative stress in chronic renal failure. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, **16**: 2135-2142.
- GARCIA-MONTALVO EA, REYES-PEREZ H, DEL RAZO LM (2009). Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stress. *Toxicol*, **263**: 75-83.
- GENESTRA M (2007). Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*, **19**: 1807-1819.
- GHEITH I, EL-MAHMOUDY A (2018). Novel and classical renal biomarkers as evidence for the nephroprotective effect of Carica papaya leaf extract. *Bioscience Reports*, **38** (5): 1-10.
- GHOSH D, DAS SARKAR S, MAITY R, JANA D, DAS UB (2002). Testicular toxicity in sodium fluoride treated rats: association with oxidative stress. *Reprod Toxicol*, **16**: 385-390.

- GIRI DK, GHOSH RC, KASHYAP DK, DEWANGAN G, MAITI SK (2015). Haemato-Biochemical Alterations in Subacute Oral Toxicity of Sodium Fluoride in Wistar Rats. *Journal of Animal Research*, **5**: 595-598.
- GOWDA NKS, RAJENDRAN D, PAL DT, SAMPATH KT, PRASAD CS (2013). Fluorosis: An endemic toxicity, mode of action and methods of amelioration. Chapter **36**, 709-717.
- GRANGER DN (1988). Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia- reperfusion injury. *Am J Physiol*, **255**: H1269–H1275.
- GRUCKA-MAMCZAR E, BIRKNER E, BASZCZYK I, KASPERCZYK S, WIELKOSZYN T, SWIETOCHOWSKA E, STAWIARSKA-PIE B (2009). The influence of sodium fluoride on antioxidants and the concentration of malondialdehyde in rat blood plasma. *Fluoride*, **42**: 101–104.
- HALLIWELL B (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans*, **35**: 1147-1150.
- HALLIWELL B, GUTTERIDGE JM (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*, **246**: 501–514.
- HAN WK, BAILLY V, ABICHANDANI R, THADHANI R, BONVENTRE JV (2002). Kidney injury molecule-1(KIM- 1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int*, **62**: 237-244.
- HASSAN HA, YOUSEF MI (2009). Mitigating effects of antioxidant properties of black berry juice on sodium fluoride induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Food Chem. Toxicol*, **47**: 2332–2337.
- Helmut SIES Institut für Physiologische Chemie I, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Germany. (Received February 10/March 16, 1993) - EJB 93 0076/0. Strategies of antioxidant defense.
- HEM JD (1989). Study and Interpretation of the chemical characteristics of natural water. 3rd Ed, U.S. Geological Survey Water-Supply Paper 2254, U.S. Geological Survey, Washington, DC. S: 263.
- HENSCHLER D, BUTTNER W, PATZ J (1975). Absorption, distribution in body fluids and bioavailability of fluoride. Calcium Metabolism, Bone and Metabolic Diseases. Springer. S: 111-121.
- HEWITT SM, DEAR J, STAR RA (2004). Discovery of protein biomarkers for renal diseases. *J Am Soc Nephrol*, **15**: 1677–1689.

- HOSTEN AO (1990). Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition. Chapter **193**: 877.
- KARAGÜL H. Florozis ve Hayvan Sağlığı. Bu makale, 2008. Uluslararası Katılımlı Tıbbi Jeoloji Sempozyumu Kitabı (Editör: Dr. Eşref Atabey), ISBN: 978-975-7946-33-5, S: 109-110.
- HORDYJEWSKA A, PASTERNAK K (2004). Influence of fluoride on organism of human. *J. Elementol*, **9**: 883–987.
- ICHIMURA T, BONVENTRE JV, BAILLY V, WEI H, HESSION CA, CATE RL, SANICOLA M (1998). Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem*, **273**: 4135–4142.
- INGRAM GS, AGALAMANYI EA, HIGHAM SM (2005). Caries and fluoride processes. *J Dent*, **33**: 187-191.
- INKIELEWICZ I, KRECHNIAK J (2003). Fluoride content in soft tissues and urine of rats exposed to sodium fluoride in drinking water. *Fluoride*, **36**: 263-266.
- IPCS 2002 Fluorides. Environmental Health Criteria 227. World Health Organization, Geneva.
- IZQUIERDO-VEGA JA, SANCHEZ-GUTIERREZ M, DEL RAZO LM (2008). Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. *Toxicol Appl Pharmacol*, **230**: 352–357.
- JHA SK, MISHRA VK, SHARMA DK AND DAMODARAN T (2011). Fluoride in the environment and its metabolism in humans. *Rev. Environ. Contam. Toxicol*, **211**: 121–142.
- JONES SE, JOMARY C (2002). Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**: 427–431.
- JUNG YS, KIM HS (2018). Toxicology of the kidney. In: Lu's Basic Toxicology, Edt: Lee, M.B., Kacew S., Kim H.S., 7th Ed., 271–93. CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- KARAOZ E, ONCU M, GULLE K, KANTER M, GULTEKIN F, KARAOZ S, MUMCU E (2004). Effect of chronic fluorosis on lipid peroxidation and histology of kidney tissues in first- and second-generation rats. *Biol. Trace Elem. Res*, **102**: 199– 208.
- KELLUM JA, LAMEIRE N (2012). KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney International Supplements*, **2**: 13.
- KHOSRAVI AR, ERLE DJ (2016). Chitin-induced airway epithelial cell innate immune responses are inhibited by carvacrol/thymol. *PLoS One*, **11**: e0159459.

- KOBAYASHI CA, LEITE AL, SILVA TL, SANTOS LD, NOGUEIRA FC, OLIVEIRA RC, PALMA MS, DOMONT GB, BUZALAF MA (2009). Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. *Chem. Biol. Interact*, **180**: 305–311.
- KOBAYASHI CAN, LEITE AL, PERES-BUZALAF C, CARVALHO JG, WHITFORD GM, EVERETT ET, SIQUEIRA WL, BUZALAF MA (2014). Bone response to fluoride exposure is influenced by genetics. *PlosOne*, **9**: e114343.
- KOHEN R, NYSKA A (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*, **30**: 620-630.
- KONO K, YOSHIDA Y, YAMAGATA H, WATANABE M, SHIBUYA Y, DOI K (1987). Urinary fluoride monitoring of industrial hydrofluoric acid exposure. *Environ. Res*, **42**: 415-20.
- KRIMER N, BASER KH, TUMEN G (1995). Carvacrol rich plants in Turkey. *Chem Nat Compounds*, **31**: 37–42.
- KUMAR A, SHARMA SK, VAIDYANATHAN S (1988). Results of Surgical Reconstruction in Patients with Renal Failure Owing to Ureteropelvic Junction Obstruction. *Journal of Urology*, **140**: 484-486.
- LIANG WZ, LU CH (2012). Carvacrol-induced [Ca²⁺] rise and apoptosis in human glioblastoma cells. *Life Sciences*, **90**: 703-711.
- LIU G, CHAI C, CUI L (2003). Fluoride causing abnormally elevated serum nitric oxide levels in chicks. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, **13**: 199–204.
- LUNA A, LABAQUE MC, ZYGADLO JA, MARIN RH (2010). Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. *Poult. Sci*, **89**: 366–370.
- LUO Q, CUI H, DENG H, KUANG P, LIU H, LU Y, FANG J, ZUO Z, DENG J, LI Y, WANG X, ZHAO L (2017). Histopathological findings of renal tissue induced by oxidative stress due to different concentrations of fluoride. *Oncotarget*, **8**: 50430-50446.
- MA Y, KONG L, NAN K, QI S, RU L, DING C, WANG D (2015). Apolipoprotein-J prevents angiotensin II-induced apoptosis in neonatal rat ventricular cells. *Lipids Health Dis*, **21**: 114.
- MARCONDA FK, BIANCHI FJ, TANNON AP (2002). Determination of estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*, **62**: 609-14.

- MARITIM AC, SANDERS RA, WATKINS JB (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*, **17**: 24-38.
- MARTHALER T, PETERSEN PE (2005). Salt fluoridation—an alternative in automatic prevention of dental caries. *International Dental Journal*, **55**: 351–358.
- MARTINEZ-MIER EA (2011). Fluoride: Its Metabolism, Toxicity, and Role in Dental Health. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, **17**: 28-32.
- MASSICOT F, LAMOURI A, MARTIN C, PHAM-HUY C, HEYMANS F, WARNET JM, GODFROID JJ, CLAUDE JR (1997). Preventive effects of two PAF-antagonists, PMS 536 and PMS 549, on cyclosporin-induced LLC-PK1 oxidative injury. *J Lipid Mediat Cell Signal*, **15**: 203–214.
- MASSICOT F, MARTIN C, H. DUTERTRE-CATELLA (1997) Modulation of energy status and cytotoxicity induced by FK506 and cyclosporin A in a renal epithelial cell line, *Archives of Toxicology*, **71**:529–531.
- MATTHAY MA, GEISER T, MATALON S, ISCHIROPOULOS H (1998). Oxidant-mediated lung injury in the acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, **27**: 2028–2030.
- MC-CORD JM, KEELE BB, FRIDOVICH I (1984). An enzyme based theory of obligate anaerobiosis, the physiological functions of superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci*, **68**: 1024–1027.
- MELUSOVA M, SLAMENOVA D, KOZICS K, JANTOVA S, HORVATHOVA E (2014). Carvacrol and rosemary essential oil manifest cytotoxic, DNA-protective and pro-apoptotic effect having no effect on DNA repair. *Neoplasma*, **61**: 690-699.
- MILLER DM, BUETTNER GR, AUST SD (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med*, **8**: 95–108.
- MITTAL M, FLORA SJ (2006). Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice. *Chem. Biol. Interact*, **162**: 128–139.
- MOHAMMEDI Z (2017). Carvacrol: An Update of Biological Activities and Mechanism of Action. *Journal of Chemistry*, **1**: 53-62.
- MONSOUR PA, KRUGER BJ (1985). Effect of fluoride on soft tissues in vertebrates: a review. *Fluoride*, **18**: 53–61.
- MURPHY BF, DAVIES DJ, MORROW W, D'APICE AJ (1989). Localization of terminal complement components S-protein and SP-40,40 in renal biopsies. *Pathology*, **21**: 275–278.

- MUSTAPHA AR, BAWA EK, OGWU D, ABDULLAHI US, KAIKABO AA, DIARRA SS (2011). Effects of ethanolic extract of *Rhynchosia sublobata* (Schumach) Meikle on estrous cycle in Wistar rats. *Int J Med Arom Plants*, **1**: 122-127.
- NABAVI SF, MOGHADDAM AH, ESLAMI S, NABAVI SY (2013). Protective Effects of Curcumin against NaF Induced Toxicity in Rat Kidneys. *Biol Trace Elem Res*, **145**: 369–374.
- NABAVI SM, NABAVI SF, ESLAMI S, MOGHADDAM AH (2012). In vivo protective effects of quercetin against sodium fluoride-induced oxidative stress in the hepatic tissue. *Food Chem*, **132**: 931–935.
- National Research Council (2006) Fluoride in Drinking Water: A Scientific Review of EPA's Standards. Washington DC: National Academies Press.
- NEVILLE BW, CHI AC, DAMM DD, ALLEN CM (2015). Oral and Maxillofacial Pathology. (4th edn) Elsevier Health Sciences. S: 52-54.
- NOBES CD, HALL A (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, **81**: 53–62.
- NOPAKUN J, MESSER HH, VOLLER V (1989). Fluoride absorption from the gastrointestinal tract of rats. *Journal of Nutrition*, **119**: 1411–1417.
- OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*, **95**: 351-358.
- OLUYEMI KA, OYEWO OO, OKANLAWON AA (2008). Effect of methanolic extract of *Abrus precatorius* linn seeds on the estrous cycle, ovulation and body weight of adult cyclic Sprague-Dawely rats. *Int J Endocrinol*, **4**: 86-90.
- OMIDI A, TORABI Z, HASSANPOORFARD M, ZARDAST M (2013). Evaluation of protective effect of hydroalcoholic extract of *Crocus sativus* petals on preventing of gentamicin induced peliosis hepatis and hepatic telangiectasis in rats: Short communication. *J Birjand Univ Med Sci*, **19**: 455–62.
- OPDYKE DL (1979). Monographs on fragrance raw materials. *Food Cosmet Toxicol*, **17**: 695–923.
- OPHAUG RH (1979). Total fluoride intake of infants. *Pediatrics*, **63**: 460-466.
- ORUÇ N (1977). Fluoride content of some spring waters and fluorosis in the eastern anatolia. In: Seminar on “Problems of hinge fluoride waters”, 6-10 September, Erzurum, Turkey. CENTO Scientific Program, Report no 28, S: 43-55.

- OZER EK, GOKTAS MT, TOKER BARISKANER AH, UGURLUOGLU C, ISKIT AB (2017). Effects of carvacrol on survival, mesenteric blood flow, aortic function and multiple organ injury in a murine model of polymicrobial sepsis. *Inflammation*, **40**: 1654-1663.
- OZTURK H, CETINKAYA A, DUZCU SE, TEKCE BK, HAYRETTIN OZTURK H (2018). Carvacrol attenuates histopathologic and functional impairments induced by bilateral renal ischemia/reperfusion in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **98**: 656-661.
- PACHER P, BECKMAN JS, LIAUDET L (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev*, **87**: 315-424.
- PAGLIA DE, VALENTINE WN (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med*, **70**: 158-169.
- PETERSEN PE, LENNON MA (2004). Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: The WHO approach. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, **32**: 319-321.
- PHAM-HUY LA, HE H, PHAM-HUY C (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*, **4**: 89-96.
- PIANTA TJ, BUCKLEY NA, PEAKE PW, ENDRE ZH (2013). Clinical use of biomarkers for toxicant-induced acute kidney injury. *Biomark Med*, **7**: 441-456.
- RAMSEYER WF, SMITH CAH, MCCAY CM (1957). Effect of sodium fluoride administration on body changes in old rats. *J. Gerontol*, **12**: 14-19.
- RANJAN R, RANJAN A (2015). Fluoride toxicity in animals. New York: Springer; 2015.
- REDDY DD, MALLIKHAGUNARAO SG, SHARDA D (1969). Endemic fluorosis. *J. Ind. Med. Assoc*, **53**: 275.
- REINDL-SCHWAIGHOFER R, JOANNIDIS M (2010). Diagnose und Klassifikation des akuten Nierenversagens. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*, **47**: 411-416.
- RICHARD MJ, PORTAL B, MEO J, COUDRAY C, HADJIAN A, FAVIER A (1992). Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin. Chem*, **38**: 704-709.
- RITZ IB, BURDZY K, SETCHELL B, BLASCHUK O (1983). Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biol Reprod*, **28**: 1173-1188.

- ROSENBERG ME, DVERGSTEN J, CORREA-ROTTER R (1993). Clusterin: an enigmatic protein recruited by diverse stimuli. *J Lab Clin Med*, **121**: 205–214.
- ROSENBERG ME, PALLER MS (1991). Differential gene expression in the recovery from ischemic renal injury. *Kidney Int*, **39**: 1156–1161.
- ROSENBERG ME, SILKENSEN J (1995). Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol*, **27**: 633–645.
- RUSSELL AL, ELVOVE E (1951). Domestic water and dental caries. VII. A study of the fluoride-dental caries relationship in an adult population. *Publ Health Rep*, **66**: 1389-1401.
- RYU SH, KIM JW, YOON D, KIM S, KIM KB (2018). Serum and urine toxicometabolomics following gentamicin-induced nephrotoxicity in male Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **81**: 408-420.
- SADEG N, PHAM-HUY C, MARTIN C, WARNET JM, CLAUDE JR (1993). Effect of cyclosporin A and its metabolites and analogs on lipid peroxidation in rabbit renal microsomes. *Drug and Chemical Toxicology*, **16**: 165–174.
- SAMARGHANDIAN S, AZIMI- NEZHAD M, SAMINI F, FARKHONDEH T (2015). Chrysin treatment improves diabetes and its complications in streptozotocin-induced diabetic rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **94**: 388-393.
- SAMARGHANDIAN S, AZIMI-NEZHAD M, SAMINI F (2015). “Preventive effect of safranal against oxidative damage in aged male rat brain. *Experimental Animals*, **64**: 65–71.
- SANSANWAL P, LI L, SARWAL MM (2015). Inhibition of intracellular clusterin attenuates cell death in nephropathic cystinosis. *J Am Soc Nephrol*, **26**: 612–625.
- SANTOYO-SANCHEZ MP, SILVA-LUCERO MDC, ARREOLA-MENDOZA L, BARBIER OC (2013). Effects of acute sodium fluoride exposure on kidney function, water homeostasis, and renal handling of calcium and inorganic phosphate. *Biological Trace Element Research*, **152**: 367–372.
- SARALAKUMARI D, RAMAKRISHNA RP (1991). Red cell membrane alterations in human chronic fluoride toxicity. *Biochem Int*, **23**: 639–648.
- SCANDALIOS JG (1997). Molecular genetics of superoxide dismutases. In: Scandalios JG (Editor), *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, USA, 527-568.
- SCANDALIOS JG (2004). Genomic responses to oxidative stress. In: Meyers RA, ed. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*. Vol 5. 2nd ed. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, S: 489–512.

- SCANDALIOS JG (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **38**: 995-1014.
- SCCNFP (Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers) (2003). The safety of fluorine compounds in oral hygiene products for children under the age of 6 years. Expressed on 24-25 June 2003. European Commission, Luxembourg.
- SCHIFFL H, BINSWANGER U (1982). Renal handling of fluoride in healthy man. *Renal Physiol*, **5**: 192-196.
- SCHIFFL HH AND BINSWANGER U (1980). Human urinary fluoride excretion as influenced by renal functional impairment. *Nephron*, **26**: 69-72.
- SCHLEGEL PN, MATTHEWS GJ, CICHON Z, AULITZKY WK, CHENG CY, CHEN CL, SASO L, GOLDSTEIN M, JÄNNE OA, BARDIN CW (1992). Clusterin production in the obstructed rabbit kidney: correlations with loss of renal function. *J Am Soc Nephrol*, **3**: 1163-1171.
- SCHRODER J, VOLLMER H (1932). The excretion of thymol, carvacrol, eugenol and guaiacol and the distribution of these substances in the organism. *Arch. Exp. Path. Pharmacol*, **168**: 331-353.
- SCOCCIA AE, MOLINUEVO MS, MCCARTHY AD, CORTIZO AM (2001). A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins. *BMC Clinical Pathology*, **1**: 1.
- SENDIL C, BAYSU N (1973). İnsan ve hayvanlarda Ağrı ili Doğubeyazıt ilçesi köylerinde görülen flor zehirlenmesi ve bunu Van İli Muradiye ilçesi köylerinde de saptamamızla ilgili ilk teblig. *AÜ Vet Fak Derg*, **10**: 474-489.
- SHARIFI-RAD M, VARONI EM, IRITI M, MARTORELL M, SETZER WN, CONTRERAS MDM, SALEHİ B, SOLTANI-NEJAD A, RAJABI S, TAJBAKHSH M, SHARIFI-RAD J (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, **32**: 1675-1687.
- SHARMA A, CHINOY NJ (1998). Role of free radicals in fluoride-induced toxicity in liver and kidney of mice and its reversal. *Fluoride*, **31**: 26.
- SHASHI A (1992). Studies on alterations in brain lipid metabolism following experimental fluorosis. *Fluoride*, **25**: 77-84.
- SHASHI A, SINGH JP, THAPAR SP (2002). Toxic effects of fluoride on rabbit kidney. *Fluoride*, **35**: 38-50.
- SHASHI ATS (2000). Histopathology of fluoride-induced hepatotoxicity in rabbits. *Fluoride*, **34**: 34-42.

- SIES H (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, **215**: 213–219.
- SLOOFF W. (1988) Basisdocument fluoriden. Bilthoven, Netherlands, National Institute of Public Health and Environmental Protection (Report No. 758474005).
- SOD (2002). MAIER, C.M. AND CHAN, P.H. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *The Neuroscientist*, **8(4)**, 323-334.
- SOD (1975). MALSTROM, B., ANDREASSON, L., AND REINHAMMER, B. *The Enzymes*. Boyer, P. XIIB, Academic Press, New York, 533.
- SOD (1994). SANDSTROM, J., NILSSON, P., KARLSSON, K., et al. 10-Fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.* **269(29)**, 19163-19166.
- SPAK CJ, BERG U, EKSTRAND J (1985). Renal clearance of fluoride in children and adolescents. *Pediatrics*, **75**: 575-579.
- STEVENS LA, LEVEY AS (2005). Measurement of kidney function. *Medical Clinics of North America*, **89**: 457–473.
- STOHS SJ, BAGCHI D (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*, **18**: 321–336.
- SUO L, KANG K, WANG X, CAO Y, ZHAO H, SUN X, TONG L, ZHANG F (2014). Carvacrol alleviates ischemia reperfusion injury by regulating the PI3K-Akt pathway in rats. *PLoS One*, **9**: e104043.
- SUNTRESS ZE, COCCIMIGLIO J, ALIPOUR M (2015). The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **55**: 304-318.
- TANG Y, ZHONG Z (2014). Obtusifolin treatment improves hyperlipidemia and hyperglycemia: possible mechanism involving oxidative stress. *Cell Biochem Biophys*, **70**: 1751-1757.
- TANIYAMA Y, GRIENGLING KK (2003). Reactive oxygen species in the vasculature. *Hypertension*, **42**: 1075–1081.
- THE EFSA JOURNAL (2005) 192, 1-65; Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Fluoride; Request N° EFSA-Q-2003-018

- THUKRAL SK, NORDONE PJ, HU R, SULLIVAN L, GALAMBOS E, FITZPATRICK VD, HEALY L, BASS MB, COSENZA ME, AFSHARI CA (2005). Prediction of nephrotoxicant action and identification of candidate toxicity-related biomarkers. *Toxicol Pathol*, **33**: 343–55.
- TORRA M, RODAMILANS M, CORBELLA J (1998). Serum and urine fluoride concentration: relationships to age, sex and renal function in a non-fluoridated population. *Sci Total Environ*, **220**: 81-85.
- TURKO IV, MARCONDES S, MURAD F (2001). Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **281**: 2289-2294.
- TURNER C, AKHTER M, HEANEY R (1992). The effects of fluoridated water on bone strength. *J Orthop Res*, **10**: 581-587.
- UCHINO H, FUJISHIMA J, FUKUOKA K, IWAKIRI T, KAMIKURI A, MAEDA H, NAKAMA K (2017). Usefulness of urinary biomarkers for nephrotoxicity in cynomolgus monkeys treated with gentamicin, cisplatin, and puromycin aminonucleoside. *The Journal of Toxicological Sciences*, **42**: 629-640.
- UCHIYAMA M, MIHARA M (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, **86**: 271–278.
- ULLAH R, ZAFAR MS, SHAHANI N (2017). Potential fluoride toxicity from oral medicaments. *Iran J Basic Med Sci*, **20**: 841-848.
- ULTEE A, KETS EP, SMID EJ (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol*, **65**: 4606–4610.
- ULTEE A, SLUMP RA, STEGING G, SMID EJ (2000). Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J. Food Prot*, **63**: 620–624.
- URSINI F, MAIORINO M, GREGOLIN C (1985). The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*, **839**: 62-70.
- USUDA K, KONO K, DOTE T, NISHIURA K, MIYATA K, NISHIURA H, SHIMAHARA M, SUGIMOTO K (1998). Urinary biomarkers monitoring for experimental fluoride nephrotoxicity. *Arch Toxicol*, **72**: 104– 109.
- VAIDYA VS, FERGUSON MA, BONVENTRE JV (2008). Biomarkers of acute kidney injury. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol*, **48**: 463-493.
- VAIDYA VS, FORD GM, WAIKAR SS, WANG Y, CLEMENT MB, RAMIREZ V, GLAAB WE, TROTH SP, SISTARE FD, PROZIALECK WC, EDWARDS JR, BOBADILLA NA, MEFFERD SC, BONVENTRE JV (2009). A rapid urine test for early detection of kidney injury. *Kidney International*, **76**: 108–114.

- VAIDYA VS, OZER JS, DIETERLE F, COLLINGS FB, RAMIREZ V, TROTH S, MUNIAPPA N, THUDIUM D, GERHOLD D, HOLDER DJ, BOBADILLA NA, MARRER E, PERENTES E, CORDIER A, VONDERSCHER J, MAURER G, GOERING PL, SISTARE FD, BONVENTRE JV (2010). Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nat Biotechnol*, **28**: 478-485.
- VAIDYA VS, RAMIREZ V, ICHIMURA T, BOBADILLA NA, BONVENTRE JV (2006). Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, **290**: 517-529.
- VANI ML, REDDY KP (2002). Effects of fluoride accumulation on some enzymes of brain and gastrocnemius muscle of mice. *Fluoride*, **33**: 17-26.
- VOZNAYA NF (1981). Chemistry of Water and Microbiology. *Mir Publishers*, Moscow.
- WANG LH, TSAI A, HSU PY (2001). Substrate binding is the rate-limiting step in thromboxane synthase catalysis. *J. Biol. Chem*, **276**: 14737-14743.
- WHITFORD GM (1994). Intake and metabolism of fluoride. *Advances in Dental Research*, **8**: 5-14.
- WHITFORD GM (1996). The metabolism and toxicity of fluoride. *Monographs in Oral Science*, **16**: 1-153.
- Whitford GM (1997). Determinants and mechanisms of enamel fluorosis. *Ciba Foundation Symposium*, **205**: 226-241.
- WHITFORD GM, PASHLEY DH (1984). Fluoride absorption: the influence of gastric acidity. *Calcified Tissue International*, **36**: 302-307.
- WHITFORD GM, PASHLEY DH, STRINGER GI (1976). Fluoride renal clearance: a pH-dependent event. *American Journal of Physiology*, **230**: 527-532.
- WHO (1984). Fluorine and Fluorides. IPCS International programme on chemical safety, environmental health criteria 36, World Health Organization, Geneva.
- WHO (1996). Guidelines for Drinking-water Quality. Volume 2. Health Criteria and Other Supporting Information. 2nd ed, World Health Organization, Geneva.
- WHO (2000). Fluorides. In: Air quality guidelines for Europe, 2nd ed. Copenhagen, World Health Organization Regional Office for Europe.
- WHO (2004). Fluoride in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, World Health Organization, Geneva.

- WHO (2006) – Fluoride in drinking water, World Health Organization, Geneva.
- WHO (2008). Guidelines for drinking-water quality, 3rd Ed. incorporating 1st and 2nd addenda. Vol. 1 Recommendations, World Health Organization, Geneva.
- WHO (2010). Preventing disease through healthy environments. Inadequate or excess fluoride: A major public health concern. World Health Organization, Geneva.
- WILLCOX JK, ASH SL, CATIGNANI GL (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **44**: 275-295.
- WITZGALL R, BROWN D, SCHWARZ C, BONVENTRE JV (1994). Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogeneous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest*, **93**: 2175–2188.
- WK, BAILLY V, ABICHANDANI R, THADHANI R, JOSEPH V, BONVENTRE JV (2002). Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney International*, **62**: 237–244.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1996). Trace elements in human nutrition and health. Geneva: World Health Organization.
- XIONG X, LIU J, HE W, XIA T, HE P, CHEN X, YANG K, WANG A (2007). Dose–effect relationship between drinking water fluoride levels and damage to liver and kidney functions in children. *Environ Res*, **103**: 112–116.
- YADAV GD, KAMBLE SB (2009). Synthesis of carvacrol by Friedel–Crafts alkylation of o-cresol with isopropanol using superacidic catalyst UDCaT-5. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **84**: 1499–1508.
- YAGI K (1998). Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods in Molecular Biology*, **108**: 101-106.
- YANG K, LIANG X (2011). Fluoride in drinking water: effect on liver and kidney function. New York: Elsevier; 2011. S: 769-775.
- YIN HB, CHEN CH, KOLLANOOR-JOHN A, DARRE MJ, VENKITANARAYANAN K (2015). Controlling *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production in poultry feed using carvacrol and trans-cinnamaldehyde. *Poultry Science*, **94**: 2183–2190.
- YOSHIKAWA T, NAITO Y (2002). What Is Oxidative Stress? *JMAJ*, **45**: 271–276.

- YOSHIKAWA T, TOYOKUNI S, YAMAMOTO Y AND NAITO Y, (eds) Free Radicals in Chemistry Biology and Medicine, OICA International, London, 2000.
- YOUNG I, WOODSIDE J (2001). Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol*, **54**: 176-186.
- YU W, LIU Q, ZHU S (2013). Carvacrol protects against acute myocardial infarction of rats via anti-oxidative and anti-apoptotic pathways. *Biol Pharm Bull*, **36**: 579–584.
- ZABULYTE D, ULECKIENE S, KALIBATAS J, PALTANAVICIENE A, JASCANINIENE N, STOSIK S (2007). Experimental studies on effect of sodium fluoride and nitrate on biochemical parameters in rats. *Bull Vet Inst Pulawy*, **51**: 79-82.
- ZAGER RA, IWATA M (1997). Inorganic fluoride divergent effects on human proximal tubular cell viability. *Am. J. Pathol*, **150**: 735–745.
- ZHAN X, XU Z, LI J, HANGZHOU MW (2005). Effects of Fluorosis on Lipid Peroxidation and Antioxidant Systems in Young Pigs. *Fluoride*, **38**: 157–161.
- ZHANG Z, ZHOU B, WANG H AND XI S (2014). Maize purple plant pigment protects against fluoride- induced oxidative damage of liver and kidney in rats. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **11**: 1020–1033.
- ZHOU W, GUAN Q, KWAN CC, CHEN H, GLEAVE ME, NGUAN CY, DU C (2010). Loss of clusterin expression worsens renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, **298**: 568-578.



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI


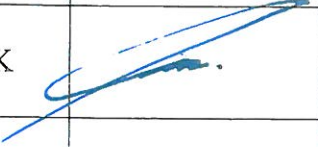
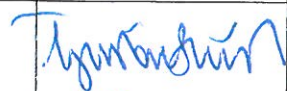
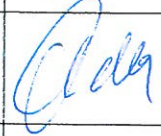

TOPLANTI TARİHİ : 10/05/2017
TOPLANTI NO : 2017-10
DOSYA NO : 2017-55
KARAR NO : 2017-10-86

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Berrin Salmanoğlu'nun yaptığı; araştırmacı olarak Vet.Hek.Gizem Aralan'ın katıldığı "Ratlarda Sodyum Florid ile Oluşturulan Toksikasyonda Karvakrol'un Böbrekler Üzerine Etkisi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına; oybirliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 45
Geçerlilik Süresi : 01/09/2017-01/09/2018



ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.M.Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Prof.Dr.Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Dr.Vet.Hek.Gülbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	



ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı	Gizem
Soyadı	Aralan
Doğum yeri ve tarihi	Samsun, 07.06.1990
Uyruğu	T.C.
Medeni Durumu	Bekar
İletişim adresi ve telefonu	gizemaralan@gmail.com, 05468080807

II. Eğitimi

2014-	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora öğrencisi
2008 – 2013	Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Lisans Eğitimi
2004 – 2008	Samsun Tülay Başaran Anadolu Lisesi, Ortaöğretim
1997 – 2004	Samsun Mustafa Kemal İlköğretim Okulu, İlköğretim

Yabancı Dili İngilizce

III. Ünvan

Veteriner Hekim

IV. Mesleki Deneyimi

2013 –

Türkiye Süt, Et, Gıda Sanayicileri ve
Üreticileri Birliği (SETBİR), Uzman

V. Bilimsel İlgi Alanları

Evaluation of Systemic Inflammation
Parameters in Dogs with Periodontitis -
Research Article / Acta Veterinaria 69
(2): 218-228, 2019

Gingivitisli Köpeklerde Bazı Sistemik
Yangı Parametrelerinin

Değerlendirilmesi / Kafkas Univ. Vet.

Fak. Derg, 23 (3): 391-394, 2017
2019 - “2. Ulusal Sütçülük Kongresi” –
Poster Sunumu / İzmir, Türkiye
2017 - “II International Congress on
Advances in Veterinary Sciences &
Technics (ICAVST) 2018)” – Poster
Sunumu/ Üsküp, Makedonya
2015 - “7. Ulusal Veteriner Biyokimya
ve Klinik Biyokimya Kongresi”/Samsun-
Sözlü Sunum
2010 – Özel Klinik Deneyimi, Samsun
(Staj)
2011 – Berlin Freie Üniversitesi,
Biyokimya Anabilim Dalı (Almanya)
(Staj)

VI. Bilimsel Etkinlikler