



¹ Burak GÜLCEN

¹ Ömür KARACA

² Murat Abdülgani KU

³ Serdar ÇOLAKO LU

⁴ Murat ÖGETÜRK

¹ İter KU

¹ Balıkesir Üniversitesi Tıp
Fakültesi Anatomi Anabilim
Dalı

² Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Sağlık
Yüksekokulu

³ Düzce Üniversitesi Tıp
Fakültesi Anatomi Anabilim
Dalı

⁴ Fırat Üniversitesi Tıp
Fakültesi Anatomi Anabilim
Dalı

Submitted/Basın tarihi:
10. 08. 2012

Accepted/Kabul tarihi:
29. 11. 2012

Registration/Kayıt no:
12 08 242

Corresponding Address

/Yazın Adresi:

Dr. Ömür Karaca

e-posta:

insula1976@hotmail.com

© 2012 Düzce Medical Journal
e-ISSN 1307- 671X
www.tipdergi.duzce.edu.tr
duzcetipdergisi@duzce.edu.tr

**Deneyisel Karbon Tetraklorür Zehirlenmesinde Akciğer Doku
Hasarı ve Melatonin Hormonunun Koruyucu Rolü: İlk
Mikroskopik ve Biyokimyasal Bir Çalışma**

**Lung Tissue Damage in the Experimental Carbon Tetrachloride
Toxicity and Protective Role of Melatonin Hormone: A light
Microscopic and Biochemical Study**

ÖZET

Bu çalışmada, akciğer dokusu üzerindeki karbon tetraklorür (CCl₄) toksisitesine karşı melatonin hormonunun koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlandı. 24 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçanlar üç eşit gruba ayrıldı. Grup I'deki sıçanlar kontrol olarak kullanıldı. Grup II'deki hayvanlara gün aşırı olarak ve derialtı yolla CCl₄ uygulandı. Grup III'deki sıçanlara ise CCl₄ enjeksiyonu ile birlikte yine gün aşırı olarak ve derialtı yolla melatonin verildi. Dört haftalık deney süresi sonunda bütün sıçanlar dekapite edilerek akciğerleri çıkartıldı. Biyokimyasal incelemeler için, akciğer doku örneklerinin bir bölümünde süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri ve malondialdehit (MDA) seviyeleri spektrofotometrik olarak belirlendi. Mikroskopik incelemeler için, doku örnekleri rutin histolojik prosedürlerden geçirilerek parafine gömüldü. CCl₄ enjeksiyonu yapılan sıçanlara ait akciğer doku örneklerindeki SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı, MDA düzeylerinin ise arttığı tespit edildi. Mikroskopik incelemede ise, CCl₄ maruziyetinin akciğerde pulmoner interstisyumda hemoraji'ye, polimorf çekirdekli lökosit ve makrofaq infiltrasyonuna neden olduğu görüldü. CCl₄ enjeksiyonu ile birlikte melatonin uygulanan hayvanlarda, SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinde bir artışın meydana geldiği, MDA düzeylerinde ise anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlendi. İlk mikroskopik incelemelerde, CCl₄ toksisitesinin neden olduğu histopatolojik değişikliklerin melatonin uygulamasıyla düzeldiği görüldü. CCl₄ toksisitesinin akciğerlerde önemli ölçüde oksidatif doku hasarına yol açtığı ve bu hasarın melatonin uygulamasıyla önenebildiği tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Akciğer, CCl₄, Oksidatif hasar, Sıçan.

SUMMARY

In this study, it was aimed to investigate the protective effects of melatonin hormone against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced toxicity in lung tissue. Twenty-four male Wistar-Albino rats were randomly divided into three equal groups. Rats in group I were used as control. Rats in group II were injected subcutaneously every other day with CCl₄. Rats in group III were injected subcutaneously every other day with CCl₄ and melatonin. At the end of four weeks of experimental period, all animals were killed by decapitation and their lungs were removed. For biochemical examination, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) enzyme activities and malondialdehyde (MDA) levels were determined by a spectrophotometer in some of the lung tissue specimens. For light microscopic examination, tissue specimens were embedded in paraffin blocks following routine histological procedures. In lung tissue samples of rats treated with CCl₄, SOD and GSH-Px enzyme activities were significantly lower and malondialdehyde (MDA) levels were significantly higher than the control group. Microscopically, interstitial pulmonary hemorrhage, leucocytes with polymorphic nuclei and macrophage infiltration were observed in the lung specimens of rats exposed to CCl₄ alone. There is a statistically significant increase in SOD and GSH-Px enzyme activities, and a decrease in MDA levels in rats treated with CCl₄ and melatonin. Histopathological changes caused by CCl₄ toxicity were not observed in rats treated by melatonin. It is concluded that CCl₄ creates oxidative damage in lung tissue and melatonin has protective effects against this CCl₄ induced damage.

Anahtar kelimeler: Lung, CCl₄, oxidative stress, rat

G R

Karbon tetraklorür (CCl₄), renksiz, berrak ve uçucu bir sıvı olup, petrol ürünleri, vernik, cila, reçine çözücüsü ve organik bileşiklerin imalatında yaygın

olarak kullanılan bir kimyasaldır. Kuru temizleme, yangın söndürme, tahıl dezenfeksiyonu ve böceklerle mücadelede sıklıkla kullanılmaktadır (1-3). İnsan vücudunun çevreden günlük ortalama 0.1 µg CCl₄ girişi maruz kaldığı bildirilmiştir (1). Birleşik Devletler Çevre Koruma Dairesi (EPA) hayvan deneylerinden elde edilen sonuçlara dayanarak, CCl₄'ü insan için olası kanserojen madde sınıfına dahil etmiştir (1-3).

CCl₄ solunan hava, su, gıda alımı ve deriden temas yoluyla vücuda girer. Karaciğer, beyin, böbrek, kaslar, yağı dokusu ve kanda daha yüksek konsantrasyonlarda olmak üzere tüm vücuda dağılır (1). CCl₄'ün sitokrom P450 enzimi aracılığıyla serbest radikallere yıkılımı hücre hasarını başlatır (2-5). Vücuttan atılımı başta solunum yoluyla ve çok az miktarlarda idrar yoluyla (1). Deneysel olarak yapılan çalışmalarda, CCl₄ uygulamasına başlı olarak akciğer dokusunda da oksidatif hasar ve histopatolojik değişikliklerin meydana geldiği bildirilmiştir (6-13). Vücutta pineal bez tarafından salgılanan melatonin hormonu, endokrin sistemin düzenlenmesi, immun fonksiyonun artırılması, düz kas tonusunun ayarlanması ve gonadal fonksiyonların baskılanması gibi birçok fizyolojik işlevlerde görev alır (14-17). Bununla birlikte, melatonin hormonunun güçlü bir antioksidan olduğu (18, 19) ve dokularda lipid peroksidasyon sonucu oluşan oksidatif hasarı önlediği bildirilmiştir (20, 21). Hem yağda hem de suda çözünabilir özelliğe sahip olan melatonin, çekirdek dahil hücrenin her organeline kolaylıkla ulaşabilir. Bu özellik, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, melatonin bir üstünlük sağlamaktadır (14).

Biyokimyasal ve mikroskopik düzeylerde yapımı olduğu umuz bu çalışmada, CCl₄ maruziyetinin akciğer üzerindeki toksik etkileri ve aynı zamanda bu toksik etkilere karşı melatonin hormonunun koruyucu rolü araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, 24 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan üç eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubu (Grup I) sıçanlara deney boyunca güneş ışığı subkutan (sc) saf zeytinyağı (1 ml/kg) tatbik edildi. CCl₄ grubu sıçanlara (Grup II) dört hafta süresince güneş ışığı olarak zeytinyağı içinde CCl₄ (0.5 ml/kg, sc) uygulandı. CCl₄+Melatonin grubunda (Grup III) yer alan hayvanlara ise aynı süre ve dozda CCl₄'ün yanı sıra, serum fizyolojik ile 1/10 oranında sulandırılmış 25 mg/kg dozundaki melatonin (Sigma Chemical Co.) yine subkutan yolla güneş ışığı olarak enjekte edildi. Deney süresi sonunda tüm sıçanlar dekapitasyon yöntemiyle öldürüldü. Hayvanlardan alınan akciğer doku örneklerinin bir kısmı biyokimyasal analiz için,

bir bölümü de mikroskopik incelemeler için kullanıldı.

Biyokimyasal analiz

Sıçanların akciğerleri hızla çıkartılarak doku örnekleri soğuk (+4 °C) 0.15 M'lık potasyum klorür (KCl) ile yıkandı ve kurutma kabı ile kurutuldu. Daha sonra dokular homojenizatör ile (Ultra Turrax Type T25-B, IKA Labortechnik, Germany) 0.15 M'lık KCl çözeltisi içinde 16000 rpm'de 3 dakika homojenize edildi. Homojenizasyon bir buz kabının içerisinde gerçekleştirildi. Homojenat 5000 g'de 1 saat (+4 °C'de) santrifüjlenerek süpernatant elde edildi ve analiz zamanına kadar (1 hafta) -40 °C'de bekletildi. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktiviteleri süpernatanda, malondialdehit (MDA) aktiviteleri ise homojenatta spektrofotometrik olarak tayin edildi.

SOD tayini: Süperoksit dismutaz enzim düzeyleri Sun ve ark. (22)'nin modifiye ettiği metotla belirlendi. Bu metodun prensibi nitroblue tetrazolium'un (NBT) süperoksit üreticisi olan ksantin-ksantinoksidaz sistemi tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Çalışmamızda SOD aktivitesi ünite/gram (U/g) doku proteini olarak ifade edildi. GSH-Px tayini: Glutatyon peroksidaz aktivitesi Paglia ve ark. (23)'nin metoduna göre çalışıldı. GSH-Px hidrojen peroksit varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyona (GSSG) yükseltgenmesini katalize eder. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in olduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi, NADPH'ın NADP⁺'ya yükseltgenmesi sırasındaki absorbans azalmasının 340 nm'de okunmasıyla hesaplandı ve ünite/gram (U/g) doku proteini şeklinde belirtildi.

MDA tayini: Lipid peroksidasyon ölçüm metodu olan Esterbauer metodu uygulanarak yapıldı (24). Tiobarbutirik asit ile 90-95 °C'de reaksiyona giren malondialdehit, pembe renkli kromojen oluşturur. On beş dakika sonra hızla soğutulan numunelerin absorbansları 532 nm'de spektrofotometrik olarak okundu. Sonuçlar nmol/g doku proteini olarak ifade edildi.

Mikroskopik inceleme

Sıçanlardan alınan akciğer doku örnekleri % 10'luk formaldehit ile fikse edildi. Daha sonra doku örnekleri rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan kesitler Hematoksilen-eozin ile boyandı ve preparatlar Olympus BH-2 araştırma mikroskopunda incelenerek foto rafları çekildi.

statistiksel analiz:

Biyokimyasal parametre (SOD, GSH-Px, MDA) sonuçlarının analizi için "SPSS 15.0 for Windows"

istatistik programı kullanıldı. Grupların dağılımları, non-parametrik testlerden one-sample Kolmogorov-Smirnov Test ile değerlendirildi. Gruplar normal dağılım göstermediğinden de erlerin karşılaştırılmasında parametrik testlerden one-way ANOVA ve Post Hoc testlerden LSD kullanıldı. istatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ olan de erler anlamlı kabul edildi. Elde edilen veriler aritmetik ortalama \pm standart hata (SH) şeklinde tabloya geçirildi.

BULGULAR

Biyokimyasal bulgular

CCl₄ enjekte edilen sıçanlara ait akci er doku örneklerindeki SOD ve GSH-Px enzim miktarlarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde dü tü ü tespit edildi ($p < 0.05$). Bu gruba ait MDA düzeylerinin ise yine kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttı ı görüldü ($p < 0.05$). Di er taraftan, CCl₄ enjeksiyonu ile birlikte melatonin verilen sıçanlarda, akci er SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinin arttı ı, MDA seviyelerinin de

azaldı ı gözlemlendi ($p < 0.05$). (Tablo 1). Ara tırmamızın biyokimyasal sonuçları, CCl₄'ün akci er dokusunda oksidatif hasara yol açtı ını ve meydana gelen bu hasarın melatonin enjeksiyonu ile önlemlendi ini ortaya koydu.

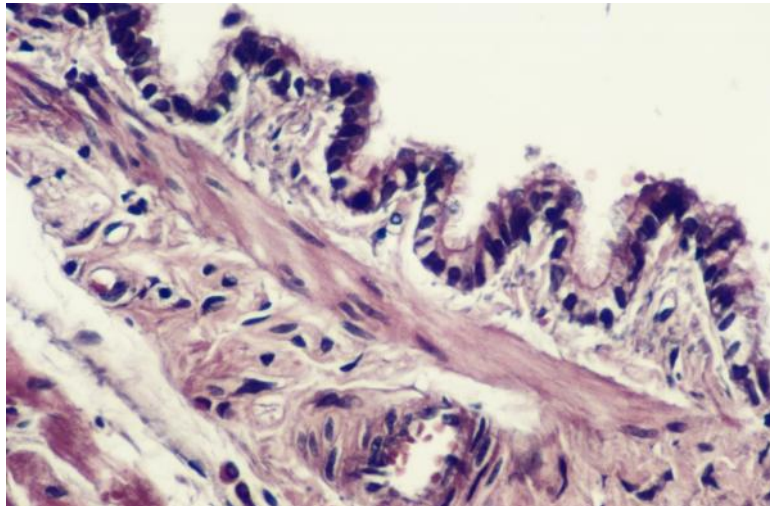
İ ik mikroskopik bulgular

Kontrol grubu sıçanlarda, akci er doku yapısının normal olduğu gözlemlendi (ekil 1). CCl₄ uygulanan sıçanlarda ise pulmoner interstisyumda hemoraji tespit edildi (ekil 2). Ayrıca, yine bu grupta polimorf çekirdekli lökosit ve makrofaj infiltrasyonunun olduğu görüldü (ekil 3). CCl₄ toksisitesi ile birlikte melatonin uygulanan hayvanlarda ise akci er doku görünümünün kontrol grubuna benzedi i ortaya kondu (ekil 4). Mikroskopik incelemelerde elde etti imiz bu sonuçlar, CCl₄ toksisitesinin akci erlerde histopatolojik de i ikliklere neden olduğunu ve olu an bu dokusal bozulmaların melatonin tarafından düzeltilindi ini gösterdi.

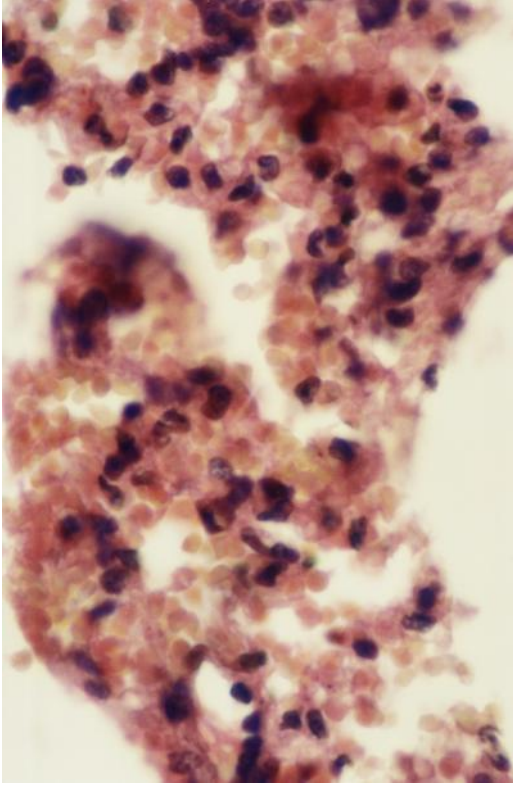
Tablo 1. Gruplara ait akci er doku örneklerindeki SOD, GSH-Px ve MDA de erleri (her grup için n=8).

PARAMETRE	KONTROL	CCl ₄	CCl ₄ + MELATONİN
SOD (U/g protein)	164,18 \pm 11,55	87,00 \pm 10,27*	156,19 \pm 13,72**
GSH-Px (U/g protein)	214,21 \pm 10,24	126,63 \pm 8,54*	201,11 \pm 12,50**
MDA (nmol/g protein)	1,94 \pm 0,32	6,35 \pm 1,22*	2,05 \pm 1,48**

*: $p < 0.05$ (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında); **: $p < 0.05$ (CCl₄ grubu ile karşılaştırıldığında).



ekil 1. Kontrol grubu sıçanlarına ait akci er dokusunun normal görünümü. H.E. X240.



ekil 2. CCl4 maruziyetine ba lı olarak pulmoner interstisyumda hemorajinin meydana geldi i görülmekte. H.E. X480.

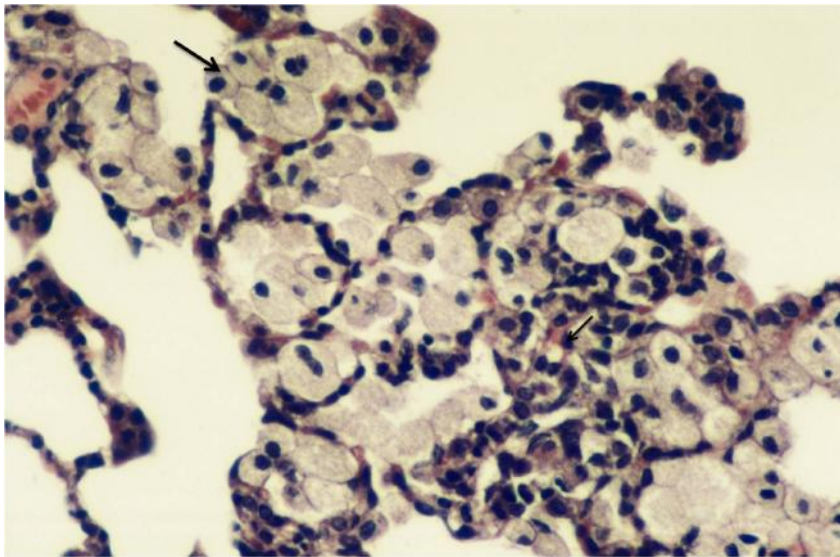
TARTI MA

Ba ta karaci er ve böbrek olmak üzere birçok organda doku hasarına yol açan CCl4, son derece toksik bir kimyasal maddedir (2, 4, 5, 25-27). Bu maddenin, dokularda hasar olu turma mekanizması, CCl4'ün sitokrom P450 enzimi aracılı ıyla oldukça toksik triklorometil (CCl3) ve triklorometil peroksil (CCl3O2) serbest radikallerine dönü ümü sonrası

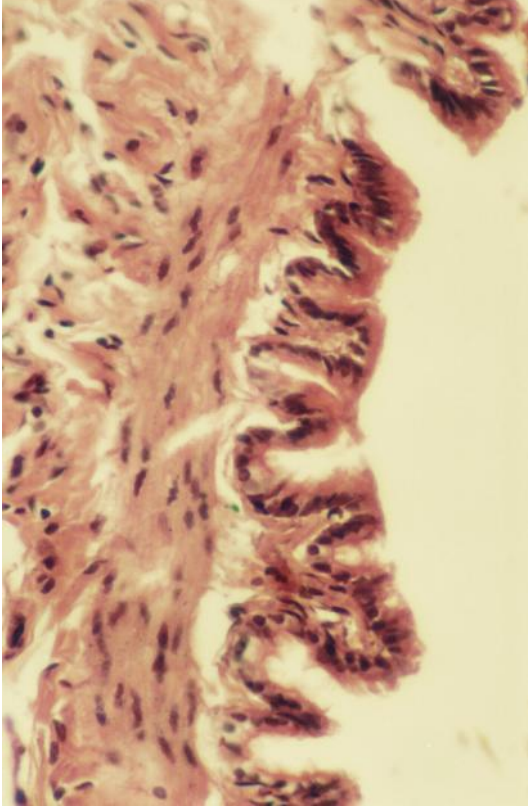
ba layan lipid peroksidasyonu ile ortaya çıkan oksidatif hasar olarak açıklanmı tır (2-5).

Vücutta, fizyolojik ortamda veya herhangi bir patolojik olay sonucunda olu an serbest radikaller ile bunların koruyucusu olan antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin serbest radikaller lehine kayması oksidatif stresi gösterir. Organizma, oksidatif hasara kar ı enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistem ve moleküllerle korunur. Hücre seviyesinde etkili olan enzimatik antioksidan sistemler içerisinde süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz yer alır (28).

Deneyssel olarak gerçekte tirilmi daha önceki ara tırmalarda, CCl4 maruziyetinin akci erlerde oksidatif doku hasarına ve lipid peroksidasyonuna yol açtı ı bildirilmi tir (6, 29). Yapmı oldu umuz bu çalı mada da, CCl4 toksisitesine maruz kalan sıçanlarda, akci er doku örneklerine ait SOD ve GSH-Px enzim de erlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir ekilde azaldı ı belirlenmi tir. SOD ve GSH-Px enzimlerindeki bu dü ü , CCl4'ün akci er dokusundaki antioksidan savunma mekanizmasını bozarak oksidatif hasara neden oldu unu göstermi tir. MDA, lipid peroksidasyonu sonucu olu an ürünlerden biridir ve oksidatif hasarı göstermede yaygın olarak kullanılan bir parametredir (30). Ara tırmamızda da, CCl4 enjekte edilen grupta akci er MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir ekilde arttı ı tespit edilmi tir. MDA düzeyindeki bu artı , CCl4'ün akci erde lipid peroksidasyonuna ve do al olarak oksidatif hasara yol açtı ını ortaya koymu tur. Benzer ekilde, Ganie ve ark. (29) da, sıçanlar üzerinde yaptıkları çalı malarında CCl4 maruziyetinin akci erlerde lipid peroksidasyonuna neden oldu unu bildirmi lerdir.



ekil 3. CCl4 verilen sıçanlarda, pulmoner interstisyumda polimorf çekirdekli lökosit (ince ok) ve makrofaj infiltrasyonunun olu tu u (kalın ok) gözlenmekte. H.E. X240.



ekil 4. CCl4 maruziyeti ile birlikte melatonin enjekte edilen sıçanlarda, akci er mikroskobik yapısının kontrol grubuna benzedi i dikkati çekmekte. H.E. X240.

Ayrıca, daha önce yapılmı olan benzer çalı malarda, CCl4 toksisitesine ba lı olarak akci er dokusunda histopatolojik de i ikliklerin de meydana geldi i ortaya konmu tur. Paakko ve ark. (7, 8) sıçanlar üzerinde yapmı oldukları benzer çalı malarda, intraperitoneal yolla uygulanan CCl4'ün, akci erde interstisyel fibrozis, alveolar dejenerasyon, hemoraji ve ödeme yol açtı nı göstermi lerdir. Miyamoto (9) CCl4 maruziyeti sonucu akci erde fibrozise ba lı olarak a ırlık artı nın ve pneumoninin meydana geldi ini bildirmi tir. Frukawa ve ark. (10) ise sıçanlarda derialtı yolla verilen CCl4'ün akci erde lenfosit infiltrasyonuna neden oldu unu tespit etmi lerdir. Chen ve ark. (11) da, sıçanlar üzerinde gerçekle tirmi oldukları çalı malarında, CCl4 uygulamasının akci er tip II pneumositlerinde hasara yol açtı nı bildirmi lerdir. Elde edilen bu histopatolojik bulgular daha sonra yine deneysel olarak yapılmı olan di er ara tırmalarda do rulanmı tir (12, 13).

Yapmı oldu umuz bu ara tırmada da CCl4 maruziyeti sonucu akci erlerde histopatolojik bulgular elde edilmi tir. Bir ba ka ifadeyle, CCl4 uygulanan sıçanların akci er doku örnekleri incelendi inde; pulmoner interstisyumda hemoraji,

polimorf çekirdekli lökosit ve makrofaj infiltrasyonunun oldu u tespit edilmi tir. CCl4'ün akci erlerde olu turdu u toksik etki yönüyle, çalı mamızın bulguları daha önce yapılmı olan ara tırmaların sonuçları ile paralellik arz etmektedir. Vücutta birçok fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde görev alan melatonin hormonunun güçlü bir antioksidan oldu u (18, 19) ve dokularda lipid peroksidasyon sonucu olu an oksidatif hasarı önledi i ifade edilmi tir (20, 21). Bu hormonun güçlü antioksidan etkisinin yanı sıra, süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini de stimüle etti i bildirilmi tir (31).

Deneysel olarak daha önce yapılmı olan çalı malarında, CCl4 toksisitesi sonucu karaci er ve böbrek dokularında meydana gelen oksidatif hasarın melatonin enjeksiyonu ile engellendi i ifade edilmi tir (32-34). Ayrıca, yapılan bu ara tırmalarda CCl4 maruziyeti sonucu karaci er ve böbreklerde meydana gelen mikroskobik bozulmaların melatonin tarafından düzeldi i bildirilmi tir. Gerçekle tirmi oldu umuz bu çalı mada da, CCl4 enjeksiyonuna ba lı olarak akci erlerde meydana gelen oksidatif hasarın melatonin uygulaması ile baskılandı nı gösteren biyokimyasal sonuçlar elde edilmi tir. Bir ba ka ifadeyle, CCl4 maruziyeti ile birlikte melatonin hormonu enjekte edilen sıçanlarda, akci er doku örneklerine ait SOD ve GSH-Px enzim aktivitelerinin arttı ı, MDA düzeylerinin ise azaldı ı tespit edilmi tir. Ayrıca mikroskobik incelemelerimizde, CCl4 uygulamasına ba lı olarak akci erlerde meydana gelen histopatolojik bulguların melatonin enjeksiyonu ile düzeldi i ortaya konmu tur. Sonuç olarak; biyokimyasal ve ık mikroskobik düzeylerde gerçekle tirmi oldu umuz bu ara tırmada, CCl4 toksisitesine ba lı olarak akci erlerde oksidatif doku hasarının ve histopatolojik de i ikliklerin meydana geldi i, meydana gelen bu hasarın ise melatonin tarafından önlendi i belirlenmi tir.

KAYNAKLAR

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for carbon tetrachloride. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2005.
2. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. Crit Rev Toxicol. 2003;33(2):105-36.
3. Thrall KD, Vucelick ME, Gies RA, et al. Comparative metabolism of carbon tetrachloride in rats, mice, and hamsters using gas uptake and PBPK modeling. J Toxicol Environ Health A 2000; 60: 531-48.
4. Ohta Y, Kongo M, Sasaki E, Nishida K, Ishiguro I. Therapeutic effect of melatonin on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. J Pineal Res 2000; 28: 119-26.

5. Rao PS, Mangipudy RS, Mehendale HM. Tissue injury and repair as parallel and opposing responses to CCl₄ hepatotoxicity: a novel dose-response. *Toxicology* 1997; 118: 181-93.
6. Abraham P, Wilfred G, Cathrine S.P. Oxidative damage to the lipids and proteins of the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication. *Clin Chim Acta*. 1999 Nov;289(1-2):177-9.
7. Paakko P, Ala-Kokko L, Ryhanen L. A light microscopic and biochemical study of carbon tetrachloride-induced pulmonary fibrosis in rats: the preventive effect of malotilate. *Eur J Clin Invest* 1987; 17(4):340-6.
8. Paakko P, Anttila S, Sormunen R, Ala-Kokko L, Peura R, Ferrans VJ, Ryhanen L. Biochemical and morphological characterization of carbon tetrachloride-induced lung fibrosis in rats. *Arch Toxicol* 1996;70(9):540-52.
9. Miyamoto K. Experimental study on changes of the pulmonary vessels in the cirrhotic rats. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1995; 96(1):44-53.
10. Furukawa T, Yasumoto K, Inokunchi K. Pulmonary interstitial edema in experimental cirrhosis of the liver in rats. *Eur Surg Res* 1984;16(6):366-71.
11. Chen WJ, Chi EY, Smuckler EA. Carbon tetrachloride-induced changes in mixed function oxidases and microsomal cytochromes in the rat lung. *Lab invest* 1977; 36(4):388-94.
12. Zhang HQ, Yau YF, Szeto KY, Chan WT, Wong J, Li M. Therapeutic effect of Chinese medicine formula DSQRL on experimental pulmonary fibrosis. *J Ethnopharmacol* 2007; 109 (3): 543-546.
13. Nagano K, Sasaki T, Umeda Y, Nishizawa T, Ikawa N, Ohbayashi H, Arito H, Yamamoto S, Fukushima S. Inhalation carcinogenicity and chronic toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *Inhal Toxicol* 2007; 19(13):1089-103.
14. Ku , Sarsilmaz M. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. *T Klin J Med Sci* 2002; 22: 221-226.
15. Kus I, Akpolat N, Ozen OA, et al. Effects of melatonin on Leydig cells in pinealectomized rat: an immunohistochemical study. *Acta Histochem* 2002; 104: 93-97.
16. Guerrero JM, Reiter RJ. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr Res* 1992; 18: 91-113.
17. Ayar A, Kutlu S, Yılmaz B, Kelestimur H. Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium in vitro. *Neuroendocrinol Lett* 2001; 22: 301-306.
18. Stastica P, Ulanski P, Rosiak JM. Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. *J Pineal Res* 1998; 25: 65-66.
19. Zang LY, Cosma G, Gardner H, Vallyathan V. Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1425: 469-477.
20. Longoni B, Salgo MG, Pryor WA, Marchiafava PL. Effects of melatonin on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. *Life Sci* 1998; 62: 853-859.
21. Sewerynek E, Melchiorri DA, Chen L, Reiter RJ. Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation in vitro. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 903-909.
22. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
23. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
24. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-421.
25. Manautou JE, Silva VM, Hennig GE, Whiteley HE. Repeated dosing with the peroxisome proliferator clofibrate decreases the toxicity of model hepatotoxic agents in male mice. *Toxicology* 1998; 127: 1-10.
26. Mbonifor JN, Chigbo FE, Mehendale HM. Polyamine Protection Against Chemically Induced Hepatotoxicity. *Int J Toxicol* 2000; 19: 391-400.
27. Wirth KJ, Bickel M, Hropot M, et al. The bradykinin B2 receptor antagonist Icatibant (HOE 140) corrects avid Na⁺ retention in rats with CCl₄-induced liver cirrhosis: possible role of enhanced microvascular leakage. *Eur J Pharmacol* 1997; 337: 45-53.
28. Akyol Ö. Beyin tümörlerinde doku SOD, CAT ve GSH-Px aktiviteleri. Uzmanlık tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Ankara 1994.
29. Ganie SA, Haq E, Hamid A, Qurishi Y, Mahmood Z, Zargar BA. Carbon tetrachloride induced kidney and lung tissue damages and antioxidant activities of the aqueous rhizome extract of *Podophyllum hexandrum*. *BMC Complement Altern Med* 2011; 28: 11:17.
30. Kamal AA, Gomaa A, el Khafif M, Hammad AS. Plasma lipid peroxides among workers exposed to silica or asbestos dust. *Environ Res* 1989; 49: 173-180.
31. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res* 1997; 29: 363-372.
32. Kus I, Ogeturk M, Oner H, Sahin S, Yekeler H, Sarsilmaz M. Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: a light microscopic and biochemical study. *Cell Biochem Funct* 2005; 23: 169-174.
33. Ogeturk M, Kus I, Kavakli A, Oner J, Kukner A, Sarsilmaz M. Reduction of carbon tetrachloride-induced nephropathy by melatonin administration. *Cell Biochem Funct* 2005; 23: 85-92.
34. Ogeturk M, Kus I, Pekmez H, Sahin S, Sarsilmaz M. Inhibition of carbon tetrachloride-mediated apoptosis and oxidative stress by melatonin in experimental liver fibrosis. *Toxicology and Industrial Health* 2008; 24: 201-208.