



T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL  
ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**FLOROZİSLİ KOYUNLARIN KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDAKİ  
APOPTOTİK VE OKSİDATİF MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI**

Hemşire Uğur EFE  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
(VETERİNER PROGRAMI)  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Prof.Dr. Semiha DEDE

İKİNCİ DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi Veysel YÜKSEK

VAN-2019

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FLOROZİSLİ KOYUNLARIN KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDAKİ  
APOPTOTİK VE OKSİDATİF MEKANİZMALARIN ARAŞTIRILMASI**

Hemşirelik Uğur EFE  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
(VETERİNER PROGRAMI)  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Prof.Dr. Semiha DEDE

İKİNCİ DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi Veysel YÜKSEK

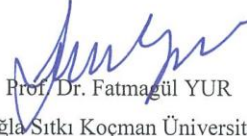
VAN-2019

Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2018-7329 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

## KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Uğur EFE tarafından hazırlanan "Florozisli Koyunların Karaciğer ve Böbrek Dokularındaki Apoptotik ve Oksidatif Mekanizmalarının Araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

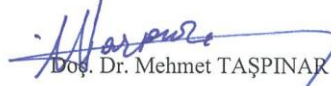
Tez Savunma Tarihi: 11/09/2019



Prof. Dr. Fatma Gül YUR  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi  
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Semiha DEDE  
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi  
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR  
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi  
Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.



Prof. Dr. Semiha DEDE  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

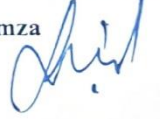
Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "FLOROZİSLİ KOYUNLARIN KARACİĞER VE BÖBREK DOKULARINDAKİ APOPTOTİK VE OKSİDATİF MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI" başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Uğur EFE

Tarih: 11.09.19

İmza



## TEŞEKKÜR

Çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde yol gösteren, ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Danışman Hocalarım Prof. Dr. Semiha DEDE'ye ve Dr. Öğr. Üyesi Veysel YÜKSEK'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Yüksek Lisans eğitimim sırasındaki değerli katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma, tezin deneme ve laboratuvar aşamasındaki yardımlarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Sedat ÇETİN ve Dr. Öğr. Üyesi Ayşe USTA'ya, öğrenim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu araştırmanın gerçekleşmesi için destek sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

## ÖZET

**Efe U, Florezisli Koyunların Karaciğer ve Böbrek Dokularındaki Apoptotik ve Oksidatif Mekanizmaların Araştırılması. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2019.** Bu tez çalışması, kronik olarak flora maruz kalan koyunlarda en çok etkilenen dokular olan böbrek ve karaciğerde oluşan hasarın, moleküler temeli ve nedenlerini apoptotik ve oksidatif yollar üzerinden belirlemek amacıyla planlandı. Bu amaçla, endemik florozis gözlenen Van ili Çaldıran İlçesine bağlı köylerde kesime gönderilmiş 4-6 yaş aralığında, klinik olarak florozis tanısı konulan koyunlardan karaciğer ve böbrek dokuları alındı. Kontrol grubu ise özel bir et kesim yerinden, florozis gözlenmeyen köylerden gelen klinik olarak sağlıklı koyunlardan oluşturuldu. Hedef genlerin apoptotik ve oksidatif gen ekspresyonları gerçek zamanlı-PZR yöntemi ile belirlendi. Apoptotik genlerin  $2^{-\Delta Ct}$  sonuçlarının göre, karaciğer dokusundaki, kaspaz 3 ve Bak değerlerinin florozis grubunda azaldığı ( $p \leq 0.05$ ), kaspaz-9 değerlerinin ise arttığı ( $p \leq 0.05$ ), böbrek dokusunda ise kaspaz 3 değerlerinde florozisli grupta önemli bir artış olduğu, kaspaz 9 ve Bak dışındaki bütün genlerin ise istatistiksel olarak önemli oranda azaldığı tespit edildi. Kontrol genine göre (GAPDH) ise; karaciğerde apoptotik genlerden kaspaz-8, kaspaz-9 ve Bim arttığı, kaspaz-3, Bcl-2, Bak azaldığı, böbrekte ise kaspaz-3, ve Bax'ta artış, kaspaz-8, Bcl-2, Bcl2l-1, Bim ve Bak'ta ise azalma gösterdiği tespit edildi. Oksidatif stres genlerinin  $2^{-\Delta Ct}$  değerlerine göre ise karaciğer dokusunda, CYGBc, GST1 ve NCF genlerinin florozisli grupta önemli oranda arttığı, GPx1, SOD1 ve SOD2 genlerinin ise önemli derecede azaldığı belirlendi. Böbrek dokusunda; florozisli grupta CYGBc ve GPx1 artarken, SOD1, SOD2, GST1, NCF ve CCS ve NOS2 istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi. Sonuç olarak; florozisli koyunların karaciğer ve böbrek dokularında apoptozis ve oksidatif mekanizmaların aktifleştiği ve florozis hastalığında doku hasarının moleküler temelini anlaşıldığı parametrelerin önemli rolünün olduğu ortaya konulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptozis, Florezis, Koyun, Oksidatif stres.

## ABSTRACT

**Efe U, Investigation of Apoptotic and Oxidative Mechanisms in Liver and Kidney Tissues of Sheep with Fluorosis. Van Yüzüncü Yıl University, Institute of Health Sciences, MSci. Thesis, Department of Biochemistry, Van, 2019.** This thesis was planned to determine the molecular basis and causes of damage to kidney and liver which are the most affected tissues in sheep exposed to chronic fluoridethroughout apoptotic and oxidative pathways. For this purpose, liver and kidney tissues were obtained from sheep in the age range of 4-6 years diagnosed as fluorosis clinically. The control group was consisted of clinically healthy sheep without fluorosis. Apoptotic and oxidative gene expression of target genes was determined by real qRT-PCR method. According to the  $2^{-\Delta Ct}$  results of the apoptotic genes, it was found that the levels of caspase 3 and Bak in the liver tissue decreased ( $p \leq 0.05$ ) and increased caspase-9 values ( $p \leq 0.05$ ) in the fluorosis group, however, there was a significant increase in the caspase 3 values in the renal tissue group, and all genes except caspase 9 and Bak decreased statistically significantly. According to the control gene (GAPDH) was detected that in the liver, the apoptotic genes caspase-8, caspase-9 and Bim increased, caspase-3, Bcl-2, Bak decreased, while in the kidney increased caspase-3, and Bax, caspase-8, Bcl-2, Bcl2l-1, Bim and Bak showed a decrease. According to the  $2^{-\Delta Ct}$  values of oxidative stress genes, it was determined that CYGBc, GST1 and NCF genes increased significantly in fluorosis group and GPx1, SOD1 and SOD2 genes decreased significantly. In kidney tissue; CYGBc and GPx1 increased in fluorosis group, while SOD1, SOD2, GST1, NCF and CCS and NOS2 were found to decrease significantly. As a result; It was shown that apoptosis and oxidative mechanisms are activated in liver and kidney tissues of sheep with fluorosis and these parameters have an important role in understanding the molecular basis of tissue damage in fluorosis disease.

**Key Words:** Apoptosis, Fluorosis, Sheep, Oxidative stress.

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	I
ETİK BEYAN.....	II
TEŞEKKÜRLER .....	III
ÖZET .....	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER .....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	X
TABLolar LİSTESİ.....	XI
1.GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Flor.....	2
2.2. Florun Metabolizması .....	2
2.3. Florozis .....	4
2.3.1. Akut florozis .....	4
2.3.2. Kronik florozis .....	5
2.3.3. Türkiye’de endemik florozis.....	6
2.4. Apoptozis ve Flor.....	7
2.5. Oksidatif Stres ve Flor .....	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
3.1 Gereç .....	11
3.1.1 Hayvan materyali .....	11
3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler .....	12
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler .....	13
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. İdrarda flor tayini .....	15
3.2.2. Dokuların toplanması.....	15
3.2.3. Doku homojenatının hazırlanması: .....	15
3.2.4. Total mRNA izolasyonu ve analizi.....	15
3.2.5. Komplementer DNA (cDNA) izolasyonu .....	17
3.2.6. Gerçek Zamanlı-PZR .....	17



3.2.7. İstatistiksel analiz.....	18
4. BULGULAR.....	19
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	26
KAYNAKLAR .....	33
ÖZGEÇMİŞ .....	38
EKLER:	
EK 1:ETİK KURUL ONAY BELGESİ .....	39
EK 2: ORJİNALLİK FORMU.....	41



## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik Asit
<b>PZR</b>	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>Rpm</b>	:	Dakika başına dönüş
<b>RT-PZR</b>	:	Reverse transkriptazPolimeraz zincir reaksiyonu
<b>Bak</b>	:	Bcl-2 homolog antagonisti
<b>Bax</b>	:	Apoptosis regülatör (bcl-2-ilişki protein 4)
<b>Bcl-2</b>	:	B-hücre lenfoma gen-2
<b>Kaspaz</b>	:	Sistein Aspartik Asit Spesifik Proteaz
<b>Bcl-xl</b>	:	B-hücreli lenfoma-ekstra large
<b>GAPDH</b>	:	Gliser aldehit 3-fosfat dehidrogenaz
<b>ROS</b>	:	Reaktif Oksijen Türleri(Serbest radikaller)
<b>CT</b>	:	Eşik Döngü Değeri
<b>Bad</b>	:	Bcl-2-bağlantılı ölüm promatör
<b>cDNA</b>	:	Komplementer DNA
<b>c-Jun</b>	:	N-terminal kinaz olarak ifade edilen bir proteimdir.
<b>EDTA</b>	:	Etilendiamin tetraasetik asit
<b>FasL</b>	:	Fas ligant
<b>g</b>	:	Gram
<b>HePG2</b>	:	İnsan karaciğer kanser hücre hattı
<b>Hfob 1.19</b>	:	İnsan osteoblast hücre hattı
<b>JNK</b>	:	c-Jun N-terminal kinaz
<b>LDL</b>	:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
<b>mg</b>	:	Miligram
<b>mM</b>	:	Milimolar
<b>NaF</b>	:	SODYum florür
<b>NRK-52E</b>	:	Sıçan böbrek epitelyal hücre hattı
<b>SOD</b>	:	Süperoksid dismutaz
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	:	Tümör nekrozis faktör alfa
<b>WHO</b>	:	Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 1.** Klinik olarak yapılan muayenede dişlerde florozise özgü renklenme..... 11
- Şekil 2.** Logaritmik standart CT curve ..... 19
- Şekil 3.** Apoptotik genlerin kontrol genine göre ekspresyon durumları..... 24
- Şekil 4.** Oksidan/antioksidan genlerin kontrol genine göre ekspresyon durumları ..... 25



## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b>	Ekspresyon analizinde kullanılan primerler ve dizilimleri.....	14
<b>Tablo 2.</b>	Gerçek zamanlı-PZR için reaksiyon içeriği.....	18
<b>Tablo 3.</b>	İdrar flor konsantrasyonları.....	19
<b>Tablo 4.</b>	Florozisli ve kontrol gruplarının karaciğer dokusundan elde edilen apoptotik genlerin ekspresyonunda $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	20
<b>Tablo 5.</b>	Florozisli ve kontrol gruplarının karaciğer dokusundan elde edilen oksidatif stres genlerinin ekspresyonunda $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	21
<b>Tablo 6.</b>	Florozisli ve kontrol gruplarının böbrek dokusundan elde edilen apoptotik genlerinin ekspresyonunda $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	21
<b>Tablo 7.</b>	Florozisli ve kontrol gruplarının böbrek dokusundan elde edilen oksidatif stres genlerinin ekspresyonunda $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	22
<b>Tablo 8.</b>	Florozisli böbrek ve karaciğer dokularındaki apoptotik genlerin ekspresyonlarının $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin kontrol genine (GAPDH) göre değişimleri.....	23
<b>Tablo 9.</b>	Florozisli böbrek ve karaciğer dokularındaki oksidatif stres genlerin ekspresyonlarının $2^{-\Delta Ct}$ değerlerinin kontrol geni (GAPDH) göre değişimleri.....	24

## 1.GİRİŞ

Flor, tüm organik ve inorganik maddelerle reaksiyona girebilen, en reaktif elementtir. Doğada flor kaynağı olarak; su, deniz ürünleri, bitkiler önemli yer tutmaktadır. Bu kaynaklardan alınan flor, kalsiyum ve SODYum ile bileşik olarak vücuda absorbe edilir. Diş ve kemiklerin yapısına katılmakta ve uzun süreli maruziyeti ve yüksek konsantrasyon da bulunması diş, kemik ve değişik dokuların zarar görmesine neden olmaktadır (Küçükeşmen ve Sönmez, 2008; Yur ve ark., 2014; Kurtdede ve ark., 2017).

Flor, insan ve hayvan sağlığı için fazlalığı birçok sağlık sorununa yol açan elementtir. Flor, günlük hayatta ve endüstriyel uygulamalarda oldukça geniş kullanım alanı bulmaktadır. Diş koruyucu ürünler, antidepresan, kolesterol düşürücü ve antibakteriyel, insektisit gibi amaçlarla kullanılan ilaçların yapısında yer almaktadır. Endemik florozis; su veya besin maddeleri yoluyla, flora uzun süre maruz kalınması sonucunda oluşur. Flor (florür), kemik mineral metabolizmasının homeoztazisini etkileyerek, kemik dokusu üzerine harabiyet verici kümülatif bir toksindir (Şanlı ve Kaya, 1995; Choubisa, 1999; Altıntaş ve ark., 2000; Collins ve Sprando, 2005; Song ve ark., 2014;Ergin ve Eden, 2017).

Florun vücutta başlıca atılma yolu böbrekler, metabolize olduğu organ ise karaciğerdir. Floroziste, böbrek ve karaciğer dokusunun hücre yapıları zarar görmektedir. Florun neden olduğu hücresel mekanizmaların aydınlatılması için bilimsel çalışmalar mevcuttur ve bu çalışmalarda oksidatif DNA hasarı, oksidatif stres ve apoptozin rolü araştırılmıştır. (Agalakova ve Gusev., 2011; Song ve ark., 2015).

Bu tez çalışması, Van ve çevresi için önemli bir geçim kaynağı olan koyunların ve halk sağlığı açısından da ayrıca önemli olan endemik florozise bağlı olarak oluşan flor toksikasyonun, böbrek ve karaciğer dokusunda oluşturduğu hasarların moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında apoptotik ve oksidatif parametrelerin rolünü ortaya koymak amacıyla planlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Flor

Kimyasal açıdan, halojen (7A grubu) elementleri arasında yer almaktadır ve yüksek elektronegatiflik özelliği göstermektedir. Flor, başta su olmak üzere gıdalar, solunum ve çeşitli ürünler ile birlikte vücuda alınmaktadır. Flor konsantrasyonu çevreden çevreye değişebilmektedir. Flor tüm doğal sulara değişen miktarlarda bulunabilir. Genellikle yer altı sularındaki miktarı daha fazladır. Doğada aktif bir element olduğundan, serbest olarak bulunmaz. Flor bağlayıcı mineraller ile bileşikler formunda ( $\text{CaF}_2$ ,  $\text{MgF}_2$ ,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ,  $\text{Na}_3\text{AlF}_6$ ,  $\text{NaF}$ ,  $\text{Al}_2(\text{SiO}_4)\text{F}_2$ ) bulunmaktadır (Collins ve Sprando, 2005; Agalakova ve Gusev, 2011; Ranjan ve Ranjan, 2015).

### 2.2. Florun Metabolizması

Canlılar suyun yanı sıra birçok farklı kaynaktan flor bileşiklerini almaktadır. Flor bileşiklerinin diğer kaynakları, florlu su ile işlenmiş diğer yiyecek ve içecekler, florlu diş ile ilgili ürünler, mekanik olarak kemikten ayrılmış etler, çay, tarım ve çeşitli böcek ilaçlarında yer almaktadır (Collins ve Sprando, 2005; Ranjan ve Ranjan, 2015; Poureslami ve ark., 2016; Zuo ve ark., 2018).

Flor kana geçtikten sonra tüm vücuda kolayca yayılır. En yoğun olarak kemik ve dişlerde bulunur. Flor kemik lezyonlarının gelişme döneminde kemikten aşırı miktarda mobilize olan kalsiyum ve fosforla birleşerek idrarla fazla miktarda atılır. Florun vücuda girişi azaldıktan sonra, kemik ve dişte depolanan flor kana geçer ve idrarla atılır (Blood ve ark., 1983; Collins ve Sprando, 2005; Ranjan ve Ranjan, 2015; Zuo ve ark., 2018).

Flor atılımının en iyi bilinen yolu böbreklerdir ve çok yavaş bir hızla atılır. Flor atılım hızı idrar pH'sı ile yakından ilgilidir ve alkali idrardaki flor atılımı daha fazla olur. İnsanlarda yapılan çalışmalarda anne sütünde bulunan flor miktarının çok düşük olduğu tespit edilmiştir. Florun transplental yolla bebeğe geçebildiği gösterilmiştir (Blood ve ark., 1983; Collins ve Sprando, 2005; Poureslami ve ark., 2016; Zuo ve ark., 2018).

Normal büyüme ve gelişme için gerekli olan 14 element arasında yer alır. Bütün doku ve organlarda bulunan florun yaklaşık % 95'i inorganik florapatit şeklinde iskelet ve dişlerde depolanmaktadır(Aoba, 1997).Apatit yapılarında bulunması dolayısı ile iskelet yapının ve dişlerin oluşumuna katılmaktadır (Dhar ve ark., 2009).

Florlu bileşiklerin biyolojik membranlardan geçişi suya benzer bir şekilde hidroflorür (HF) noniyonik diffüzyonuyla olur. Florun solunum yolları epitellerine geçirgenliği anyon kanalları aracılığıyla gerçekleşir. Mide gibi asitli ortamda ise hidrojenle birleşerek HF oluşturur ve vücuda alınan florun yaklaşık %40 bu şekilde vücuda alınır. SODYum florür ve SODYum fluorosilikat gibi çözünebilir flor bileşikleri sindirim kanalından çok iyi emilirken diğer bileşiklerin emilimi daha azdır (Collins ve Sprando, 2005; Barbier ve ark, 2010; Kurtdede, 2017; Zuo ve ark., 2018).

Vücuda çeşitli şekillerde alınan florür vücutta birikir. Sağlıklı yetişkin böbreklerinde, her gün alınan florürün %50 ila 60'ı atılır. Geri kalan kısım, büyük ölçüde kemiklerin ve pineal bezin kalsifikasyon dokularında birikir. Kemikteki florür yoğunluğu ömür boyu sürekli artar (Aoba, 1997).

Florun konsantrasyonlara bağlı olarak, canlı organizmalarda enzim sistemlerini inhibe ettiği veya sitümüle ettiği ortaya konmuştur (Strunecá ve ark, 2004). Hayvan çalışmalarına göre, yüksek konsantrasyonda florun karaciğer, böbrek, beyin ve beyincik gibi yumuşak dokularda zararlı etkilere sebep olabildiği ve yüksek miktarda flora maruz kalma sonrasında florun santral sinir sisteminde zarara sebep olduğu bildirilmiştir (Ergin ve Eden, 2017).

Florür, yüksek konsantrasyonlarda toksik olabilmekte ve üreme gibi fizyolojik fonksiyonlarda, bir takım bazı zararlı etkilere neden olmaktadır.Zaman ve konsantrasyona bağlı olarak NaF uygulanan çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalarda florun belli konsantrasyonlara kadar hücre canlılığı ve artışı sağlarken, daha yüksek konsantrasyonun tam tersi bir etki gösterdiği ortaya konulmuştur. (Lee ve ark., 2008; Yang ve ark., 2011; Yang ve ark., 2015; Yüksek ve ark, 2017; Zuo ve ark., 2018).

### 2.3. Florozis

Yüksek miktarda flor alınması sonucu şekillenen “Florozis” flor zehirlenmesi olarak adlandırılmaktadır (Karagül 2008). Florozis, genellikle uzun süre yüksek dozda flora maruz kalınması nedeniyle kronik olarak görülmekle beraber, ani olarak yüksek seviyelere maruz kalmak suretiyle akut toksisite olarak da görülebilir. Ani maruz kalma; böcek ilacı, diş macunu veya diş ürünlerinin fazla miktarda yutulması gibi durumlarda görülebilir. Florozisin ciddiyeti, florürün su içeriğine ve bu suyun tüketildiği zamana bağlıdır (Altıntaş ve ark., 2000; Peterson, 2003; Collins ve Sprando, 2005).

#### 2.3.1. Akut florozis

Flor tuzları içeren bazı insektisitler, pestisitler, antihelmintikler, SODYum florid tabletleri ve rodentisitlerin fazlaca alınması ya da florlu gazların solunması sonucu meydana gelen akut florozis nadiren görülen bir durumdur. Bulantı, kusma, karın ağrısı, ishal, dispne, salivasyon artışı, gözyaşı, sık ürünasyon ve vücut ısısında düşme ile karakterizedir. İnsanlarda ve hayvanlarda akut flor zehirlenmesinde başlıca mide, bağırsak, akciğer, kalp, beyin, böbrek, sinir ve kaslarda florun dağılayıcı, kalsiyumu bağlayıcı ve enzim sistemlerini baskılayıcı etkilerine bağlı olarak oluşan kalsiyum seviyesinde düşme, potasyum seviyesinde artma ve hücresel düzeyde kullanılabilir oksijen azalması sonucu çeşitli bozukluklar ortaya çıkabilmektedir (Heifetz, 1984; Sel, 1991; Koç ve Ersan, 2008). Sistemik semptomlar değişken ve şiddetli olup 30 dakika içinde başlamakta ve 24 saat devam edebilmektedir. Akut florozis vakalarında florun enzim inhibitörü olarak görev yaptığı hücrede aerobik glikoliz ve sellüler respirasyon bozulmakta, asidoz şekillenebilmekte, şok, koma ve kardiyak aritmi görülmektedir. Ölüm, genellikle solunum sistemindeki felç ya da kalp yetmezliği sonucu meydana gelmektedir (Uslu, 1984).

Akut flor zehirlenmesi ruminantlarda ani iştah azalması, kilo kaybı, rumenatonisi, halsizlik, tremor, hiperestezi, kollaps, solunum yetmezliği ve ölümle karakterizedir (Blood ve ark., 1983; Aytuğ ve ark., 1991).

Akut zehirlenmeler yönünden özellikle SODYum floroasetat ve SODYum florür tehlikeli bileşikler olarak kabul edilmektedir. Antihelmintik amaçlarla % 4-5



oranlarında yemlere karıştırılarak verilen SODYum florür şiddetli toksik etki oluşturmaktadır. Akut zehirlenmelere yol açacak ölçülerde alınan SODYum fluoroasetat ve SODYum florür protoplazma ve enzimlerin aktifliğini sürekli olarak durdurabilmektedir. Flor, moleküler düzeydeki etkisiyle lipaz, fosfataz ve kolinesteraz enzimlerini inhibe ederek oluşturduğu metabolik bozukluklar nedeniyle de ölüme yol açabilmektedir (Şanlı ve Kaya, 1995).

Flor kemik hücreleri üzerine mitoz bölünme üzerine uyarı yapmakta ve kemiklerdeki mineralizasyonu artırmaktadır. Diğer taraftan da flor konsantrasyonu belli bir değerin üzerine çıktığında toksik etki göstermektedir. Yapılan çalışmalarda tek seferde toksik olarak belirlenen 5 mg/kg düzeyinde verilen flor toksisiteye neden olmaktadır. Bir dozda tek seferde 3-5 mg/kg flor alımı ile gastrointestinal semptomlar ortaya çıkmaktadır. Ca, Mg veya Al tuzlarının verilmesi haricinde belirgin bir tedavisi yoktur. Bir çalışmada özellikle küçük çocukların (6 yaşından küçük) az miktarlarda flor içeren evde kullanılan ürünleri fazla miktarlarda yutması sonucunda muhtemel toksik doza ulaşabileceği gösterilmiştir. Örneğin, ortalama ağırlıkta (11,3 kg) 2 yaşında bir çocuk için muhtemel toksik doz 57 mg'dır. Bu miktar 1000 ppm florlu diş macununun 57 gr.'ında, 1500 ppm florlu diş macununun 38 gr.'ında, %0,05 SODYum florlu gargaranın 248 ml'sinde, 1 mg'lık flor tabletlerinin 57'sinde ve %1,23 asidüle fosfat florür (APF) jelinin 4,6 ml'sinde bulunmaktadır (Ergin ve Eden, 2017).

### **2.3.2. Kronik florozis**

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), içme sularında 1.5 ppm'i üst değer olarak kabul ederek, bunun üzerindeki flor düzeyinin florozise neden olacağını bildirmiştir (Fidancı ve Sel, 2001). Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda florun dokularda birikme özelliğinden dolayı her dozda toksik etki gösterebileceğine dair bilgiler mevcuttur.

Kronik florozis hayvanlar için sağlık sorunu olarak, hayvansal verimlerde azalmaya ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Normal koşullarda evcil hayvanlar, sürekli olarak yem ve sularla birlikte florlu bileşikleri alırlar. Uzun bir süreçte günlük olarak alınan flor miktarı güvenlik düzeyini aşacak olursa, florozis olarak bilinen kronik flor zehirlenmesi ortaya çıkmaktadır. Kronik flor zehirlenmesine neden olan flor kaynakları olarak; endüstriyel tesislere yakın kontamine olmuş araziler, yüksek düzeyde

flor içeren içme suları, katkı maddeleri ve mineral karışımları ile flor açısından zengin topraklarda yetişen bitkiler yer almaktadır (Şanlı ve Kaya, 1995; Choubisa, 1999; Altıntaş ve ark., 2000; Peterson, 2003; Collins ve Sprando, 2005).

Kronik florozis idrar, kemik ve dişlerdeki flor miktarında artışla karakterizedir. Hayvanlarda ilk belirtiler arasında diş minesindeki lekeli, tebeşirimsi lezyonlar ve aşınma, dışa doğru kemik büyümesi (ekzostoz) ve diğer kemik değişiklikleri, iştahın azalması ile sonuçlanan sistemik etkiler yer almaktadır (Heifetz, 1984; Şanlı ve Kaya, 1995; Choubisa, 1999; Altıntaş ve ark., 2000; Collins ve Sprando, 2005).

Yüksek miktarda ve uzun süreli alınması kronik florozis tablosunun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Gelişim döneminde yüksek konsantrasyonlarda ve sürekli flor alınması dental florozis ve ileri vakalarda iskeletsel florozis gibi kronik flor toksisitesine yol açar. Flor insan ve hayvanda kemikteki kalsiyumla yer değiştirerek kemik gelişimini önler. Dolayısıyla osteosklerozis, iskeletsel deformasyon ve büyüme geriliği meydana getirebilmektedir (Şanlı ve Kaya, 1995; Choubisa, 1999; Altıntaş ve ark., 2000; Collins ve Sprando, 2005; Ergin ve Eden, 2017).

### **2.3.3. Türkiye’de endemik florozis**

Türkiye’de florozis hakkında uzun yıllardır yapılmış ve devam etmekte olan önemli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar özellikle veteriner hekimliği ve diş hekimliği alanlarında yoğunlaşmıştır. Bu konuda ilk çalışma, 1955 yılında Isparta’da Prof. Dr. Pertev Ata tarafından yapılmıştır. Bu yörede içme sularında flor düzeyleri 4,03 ppm olarak tespit edilmiştir. Daha sonraki yıllar içerisinde, Eskişehir-Kızılcıören, Ağrı ili Doğueyazıt ilçesi ve köyleri, Van ili Muradiye ve Çaldıran ilçeleri ve köylerinde (Tendürek Dağı civarı) sulara saptanan yüksek flor düzeylerine bağlı olarak kronik flor zehirlenmesi olgularına rastlandığı bildirilmiştir. Bu bölgelerin birçoğunun volkanik bir yapıya sahip olduğu bildirilmektedir. Flor konsantrasyonunun yüksek olduğu bu bölgelerde insan ve hayvanlarda "endemik florozis" görülmektedir (Fidancı ve ark., 1994; Akyüz, 1997;Fidancı ve ark., 1998; Ağaoğlu ve ark., 2007).

## 2.4. Apoptozis ve Flor

Programlanmış hücre ölümü olan apoptozis farklı morfolojik karakter ve enerjiye bağlı biyokimyasal mekanizmalarla karakterizedir. Apoptozis normal hücre döngüsü, düzenli gelişim ve bağışıklık sisteminin işleyişi, hormona bağlı atrofi, embriyonik gelişim ve kimyasal indüklü hücre ölümü gibi çeşitli süreçleri içine alan önemli bir durumdur. İstenmeyen apoptozis (oldukça az veya oldukça çok) nörodejeneratif hastalıklar, iskemi hasar, otoimmün rahatsızlıklar ve birçok kanser içeren pekçok insani şartlarda bir faktördür. Bir hücrenin yaşamını veya ölümünü düzenleme kabiliyeti, apoptozun muazzam tedavi edici potansiyeli ile bilinir (Elmore, 2007; Ulukaya, 2007; Kaya ve ark., 2012).

Kaspaz enzim sistemleri, apoptotik hücre ölümünde rol oynayan önemli proteinlerdir. Sistemik olarak inaktif olarak sentezlenen sistein-proteaz enzimlerdir. Başlatıcı (Kaspaz 2, 8, 9, 10), uygulayıcı (Kaspaz 3, 6, 7) ve inflamatuvar (Kaspaz 1, 4, 5) olarak bilinmektedir (Spierings, 2004; Elmore, 2007; Ulukaya, 2007).

Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından kontrol edilen mitokondriyal yolak, en önemli hücre içi apoptoz sinyalleme yolağıdır. Bcl-2 ailesi, apoptozdaki çok önemli bir düzenleyici faktör grubu olarak, ilgili apoptotik yollardaki kaspazların aktivitesini dolaylı olarak düzenleyebilir. Bcl-2 familyası üyeleri iki gruba ayrılır: pro-apoptotik proteinler ve anti-apoptotik proteinler. Bax ve Bak gibi pro-apoptotik proteinler, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybına neden olarak apoptozu tetikler. Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik proteinler, mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneginin (MPTP'ler: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) normal geçirgenliğini koruyabilir ve seçici olarak Bax'ın aktif konformasyonuna bağlanarak mitokondriyal proapoptotik faktörün salınımını engelleyebilir. Böylece, anti-apoptosis proteini hücre apoptozisini önler (Fan ve ark., 2001).

Florürün hücre apoptozu üzerine etkilerini ortaya koymak üzere çalışmalar yapılmıştır. Florürün, broyler tavuklarının dalak lenfositlerinde Bcl-2 ve Bax ekspresyonunu değiştirerek apoptozu uyarabildiği (Liu ve ark., 2013), immün sistemde NaF ile apoptozisin indüklendiği saptanmıştır (Luo ve ark., 2013). Böbrek ve kemik

hücrelerinde, NaF bağımlı hücre ölümü üzerinde apoptozisin rolünü gösteren çalışmalarda mevcuttur (Yüksek ve ark., 2017).

Bcl-2 geni lenfoblastik lösemide keşfedilen ve programlanmış hücre ölümünden, hücreleri ölümden koruyan Bcl-2 gen ailesinden antiapoptotik bir gendir (Edlich, 2018).

Bcl2-L-1 geni tarafından kodlanan protein, Bcl-2 gen ailesine aittir. Bu gen tarafından kodlanan protein dış mitokondriyal membranda bulunmaktadır. Bu protein, hücre apoptozis indüklemesi potansiyeline sahip olan ROS'ların ve sitokrom-c'nin salınımını kontrol etmekte (Boise, 1993).

Apoptozis regülatörü olan Bax proteini, Bax geni tarafından kodlanan bir apoptotik Bcl-2 gen ailesi üyesidir. Mitokondriyal voltaja bağlı olarak, anyon kanallarının açılmasını sağlayarak, sitokrom-c'nin salınımına neden olmakta (Anonymous 1, 2019).

Çoğunlukla Bim olarak adlandırılan protein Bcl-2-like 11 proteini, BCL2L11 geni tarafından kodlanan bir apoptotik aktördür (Anonymous 2, 2019).

Bak geni tarafından kodlanan Bak proteini mitokondri içine yerleşmiş bir apoptozis indükleyicisidir (Kiefer ve ark., 1995).

## **2.5. Oksidatif Stres ve Flor**

Oksidatif stres, hücre metabolizma, sülfoksit radikali ve hidrojen peroksit gibi oksidatif ve çeşitli antioksidanlar arasındaki dengenin bozulmasının bir sonucudur. Serbest radikaller, besinlerin oksijen ile yanması sonucunda enerjiye dönüşümü sırasında meydana gelen reaktif moleküllerdir. Reaktif oksijen türleri (ROS) olarak bilinen reaktif ara ürünler, moleküler lipid, protein ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir. UV ışınları, ilaçlar, yağ oksidasyonu, immünolojik reaksiyonlar, radyasyon, stres, sigara, alkol ve biyokimyasal redoks reaksiyonları gibi pek çok yolla serbest radikal oluşumu gerçekleşebilir. Oluşan serbest radikaller, aralarında ateroskleroz, kalp hastalıkları, kanser, serebrovasküler hastalıklar, diyabet, akut böbrek yetmezlik, akciğer hastalıkları, amfizem, bronşit ve alkolik karaciğer hastalıkları gibi yaşlanmaya bağlı dejeneratif bozuklukların da yer aldığı patolojik durumların oluşumuna katkıda bulunurlar. Aerobik (oksijen soluyan) organizmalarda serbest radikal oluşumunu

kontrol etmek ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak için antioksidan savunma sistemleri mevcuttur. Antioksidan savunma sisteminin, serbest radikallerin zararlı etkilerini tamamen önleyememesi sonucunda, oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkar (Özcan ve ark., 2015; Haas ve ark., 2016).

Yüksek konsantrasyonlardaki florün ER stress ve oksidatif strese neden olmaktadır. Florürün bilinen bir etki şekli de oksidatif strestir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, florürün pek çok dokuda oksidatif hasara yol açabileceği bildirilmiştir. Reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikaller, nörodejeneratif süreçler de dahil olmak üzere birçok hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynamıştır. Oksidatif stres, çeşitli hücre tiplerinde in vitro ve aynı zamanda yumuşak dokularda in vivo gözlemlenen, florid maruziyetinin bilinen bir etki şeklidir ve oksidatif hasar, florun temel etki şeklidir (Akinrinade ve ark., 2015; Suzuki ve ark., 2015).

Aşırı florid, merkezi sinir sistemi disfonksiyonuna neden olabilir ve oksidatif stres, florür toksisitesinin bilinen bir etki şeklidir. Merkezi sinir sisteminde, aktive edilmiş mikrogliyal hücreler daha reaktif oksijen türleri (ROS) salabilir ve NADPH oksidaz (NOX) mikrogliada hücre dışı süperoksit üretimi için başlıca enzimdir. ROS, MAPK yolları dahil olmak üzere çeşitli memeli hücre içi sinyal yolları için önemli bir ikincil haberci ve modülatör olarak karakterize edilmiştir (Chen ve ark., 2013).

Süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ) oksijen molekülüne bir elektron eklenmesiyle oluşur. Bu sürece nikotin adenin dinükleotid fosfat oksidaz veya ksantin oksidaz ya da mitokondriyal elektron transport sistemi aracılık eder. Normal şartlarda elektronlar, oksijenin suya indirgenmesi için mitokondriyal elektron taşıma zincirine aktarılır. Süperoksit, süperoksit dizmutaz (SODs, EC 1.15.1.1) enziminin etkisiyle hidrojen peroksit'e dönüştürülür. SOD ya da ksantin oksidaz tarafından oluşturulan hidrojen peroksit, katalaz veya glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından suya indirgenir (Fukai ve Ushio-Fukai, 2011).

NCF geni nötrofil sitozolik faktör olarak bilinen bir proteinin yapılmasını uyarmaktadır. Bu protein, immün sisteminde önemli bir rol oynayan, NADPH oksidaz adı verilen enzim kompleksi oluşturan bir protein grubunun alt birimidir. Bu oksidaz, süperoksit anyonu üretmek için aktif hale getirilen çok bileşenli bir enzimdir.

Süperoksit anyonu hidrojen peroksitine dönüştürülür. İçinde hidrojen peroksitinde yer aldığı komponent fagositoz hücreleri tarafından yabancı ajanları yok etmek için kullanılır. Bu enzim NCF protein geni tarafından kodlanmaktadır (Anonymous 3, 2019).

Nitrik oksit (NO), birçok biyolojik olayda önemli rolü olan, çok kısa yarı ömürlü bir serbest radikaldir. NO ve diğer bir son ürün olan sitrüllin, argininden NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir. Nitrit oksit sentetaz NOS2 geni tarafından kodlanan indüklenabilir bir enzimdir (Geller ve ark, 1993; Çekmen ve ark, 2001).

Glutasyon S-transferaz (GSTs) indirgenmiş glutasyon ile birçok hidrofobik bileşikleri ve elektrofilik komponentleri katalizleyerek detoksifikasyonda önemli rol oynayan bir enzim ailesidir. GST, ksenobiyotik metabolizmasında işlev gördüğü için, kanser ve diğer pek çok hastalıkta rol oynadığı düşünülen aktif, fonksiyonel olarak farklı GST1 varyant proteinlerini kodlayan polimorfik bir genidir (Anonymous 4, 2019).

Sitogloblin insanlarda ve memelilerde bulunan CYGB geninin bir protein ürünüdür. Sitogloblin, oksijenin dokulardan difüzyonunu kolaylaştırabilen, nitrik oksit veya reaktif oksijen türlerini temizleyen veya oksidatif stres sırasında koruyucu bir fonksiyona hizmet edebilen, her yerde bulunan eksprese edilmiş bir hegzakoordine hemoglobindir (Trent ve Hargrove, 2002).

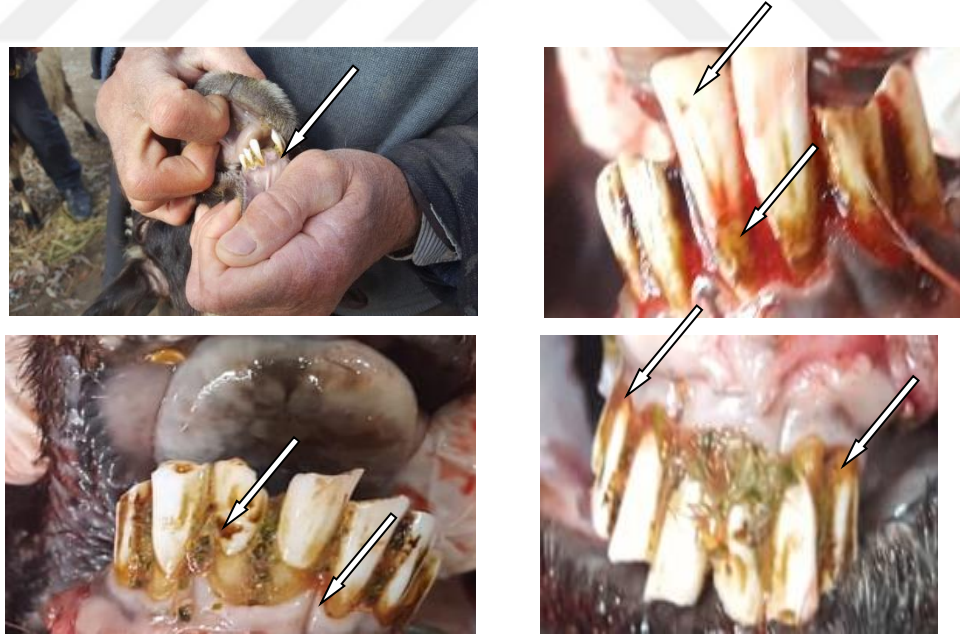
### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmanın laboratuvar aşamaları Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Hayvan materyali

Endemik florozis gözlenen Van ili Çaldıran İlçesi Aşağı Yanıktaş, Yukarı Yanıktaş ve Kılavuz köylerinden, ilçe mezbahanesine kesime gönderilen 4-6 yaş civarında hayvanlar florozis grubu olarak seçildi. Kesim öncesi, hayvan sahiplerinden anamnez alındı ve klinik olarak yapılan muayenede dişlerde florozise özgü renklenme ve eklemlerdeki belirtiler tespit edildi. Florozis şüpheli olarak ayrılan koyunlardan, flor tayini yapma üzerine usulüne uygun olarak idrar numuneleri alındı. Alınan idrar numunelerinde 5 ppm üzerinde flor konsantrasyonu çıkan koyunlar florozis grubu (Erkan ve Fidancı, 2011) olarak ayrıldı. Kesim sonrası bu hayvanlardan karaciğer ve böbrek dokuları alındı.



Şekil 1. Klinik olarak yapılan muayenede dişlerde florozise özgü renklenme.

Kontrol grubu için ise Van merkezde bulunan özel bir mezbahane Van ilinde florozis olgusu bildirilmeyen bölgelerden kesime getirilen ve klinik olarak sağlıklı koyunlar tespit edildi ve idrar numuneleri alındı. Alınan idrar numunelerindeki flor düzeylerinin ölçümü sonucunda flor iyon konsantrasyonu 5 ppm'in altında (Erkan ve Fidancı, 2011) çıkan koyunlar kontrol grubu olarak belirlendi. Kesim sonrası bu hayvanlardan uygun şartlarda karaciğer ve böbrek dokusu alındı. Her iki gruptan toplanan karaciğer ve böbrek örnekleri, steril Rnaz free tüplere alınarak dokuların üzerine RNA stabilizatörü eklendi ve RNA izolasyonu yapılmaya kadar -80 °C de saklandı.

### 3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler

<u>Alet/malzeme</u>	<u>Marka</u>	<u>Model</u>
Falkon tüpler	Spl	15, 50 ml' lik
Petri kabı	Isolab	İsolab
Otomotik Pipetler	Eppendorf	10, 100, 200, 1000 µl'lik
PCR tüpler	Qiagen	0,2 ml
Pipet uçları	Biologix	10, 100, 200 ve 1000 µl'lik
Ependorf tüpler	Ependorf	(1.5 ml'lik)
Ependorf tüpler	Ependorf	(2 ml'lik)
Soğutmalı santrifüj	Universal	320R
Distile su cihazı	Merck	Millipore direct-Q 3 UV
Hassas terazi	Radwag	220.R2
Kronometre	Elabscience	Elabscience
Karıştırıcı-Vorteks	Yellowline	Tts 2
RT-PCR	Rotor gene	Rotor gene
Nanodrop	Biodrop	Biodrop
Buzdolabı (+4 OC)	Profilo	Profilo
Derin dondurucu (-20 OC)	İndesit	İndesit
Derin dondurucu (-80 OC)	Sanyo	Sanyo
İyon kromatografi cihazı	Dionex	ICS 3000
Bistürü	plusmed	20'lik



### 3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

<b><u>Kimyasal madde</u></b>	<b><u>Marka</u></b>	<b><u>Katalog no</u></b>
Borik asit	Vivantis	PR 0607
Tris baz	Vivantis	PR 0612
EDTA	Vivantis	PC 0706
10XTBE solüsyon (pH:7,5)	Tris baz (54 gr ), borik asit (27,5) ve 20 ml EDTA (0,5 M) steril distile suda çözülerek 1 litreye tamamlanmıştır.	
Agaroz	Vivantis	PC 0701
% 0,7'lik agaroz	0,7 gr agaroz, 100 ml 1XTBE içerisinde mikro dalga fırın yardımıyla eritilerek hazırlandı. İçerisine 5 µl redgel karıştırıldı	
Redgel	İnvitrogen	15585-011
Brom fenol mavisi	Amresco	115-39-9
cDNA sentez kiti	Qiagen RT2 First Strand	330411
Trizol reagent	Thermo-Scientific	1029608
PBS	Sigma	P4417-50TAB
Kloroform	Sigma	242162, 5L
İzopropil alkol	Merck marka	109634
Etil alkol (%75,soğuk)	Merck	100986.2500
Master mix	Wizbio	W1711R-5
RNA stabilizatör	GeneALL	RiboSaver

**Tablo 1.** Ekspresyon analizinde kullanılan primerler ve dizilimleri.

Primer adı	F (5'-3')	R(5'-3')
GPx1	TTTGGGCATCAGGAAAACGC	CGTGATGAACTTAGGGTCGG
GST1	ACACCATCGTCTACTTCCCG	GTAAAGGGTGAGGTCTCCGT
VIMP	TTGCGAGGAGGAGGTTACAA	CCCCTGGCTAATGACTGTGA
SOD 1	GACCAGATGACTTGGGCAGA	GGGAATGTTTACGGGGCAAT
SOD 2	GGGTTGGCTTGGCTTCAATA	AAGGCTGACGGTTTACTTGC
CCS	GATCGCAGGCATCCAAAGTG	GCCCCTAAATTCTGCGACAG
NCF	AGCCCTACGTCACCATCAAA	GCTCTTGATCTGGCTTTGGG
NOS2	GCCCTCAGATTACAACAAGTGG	CTGGAGGAGCTGATGGAGTAG
CYGB	GGCGAGATGGAGATTGAGCG	GCTCCTCCATGTGCTTGAA
Bcl-2	TCTTTGAGTTCGGAGGGGTC	GGCCATACAGCTCCACAAAG
Bcl2l-1	TCGCAACTTGGATGGCTACT	CACACCAGCCACAGTCATG
Bax	GCAACTCCGTTCCCACTCTA	GCTGCGATCATCCTCTGCA
Bim	GAGTCTCGGGCTTTGTTCC	TGCCGCTCTGTCTGTAAAGA
Bak	CGAGGTGGAAAACAGGTGTG	CATTCCTCAGGTCCCCGTT
Kaspaz 3	ACGGAAGCAAATCAGTGGAC	GGTTTCCCTGAGGTTTGCTG
Kaspaz 8	AGTGAGTTGCAGACATCCGA	AGGTCTTGTCCAAAGCCTCT
Kaspaz 9	AGAGTGATGAAGCAGGACCC	CAGATCGGCATTTCCCTTGG
GAPDH	AGATGGTGAAGGTCGGAGTG	GTTCTCTGCCTTGACTGTGC

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1 İdrarda flor tayini**

Koyunlardan alınan idrar numunelerinin flor iyonu düzeyleri Van YYÜ Merkezi Laboratuvarında iyon kromatografi cihazında (Marka: Dionex Model: ICS 3000) ölçüldü. İyon kromatografisi ölçme metodu, iyon değiştirme reçineleri tarafından iyonları ayırma ve tayin etme metodudur.

### **3.2.2 Dokuların toplanması**

Steril ortamda, kesimi yapılan koyunlardan steril bistürü ve pens yardımıyla alınan yaklaşık 200 mg böbrek ve karaciğer dokusu 2 ml steril Rnaz free tüplere konulduktan sonra üzerine kaplayacak kadar RNA stabilazör konuldu. Alınan dokular, içinde buz aküleri bulunan köpük kutulara konularak taşındı. Doku bulundurulan tüpler total mRNA izolasyonuna kadar -80 °C saklandı.

### **3.2.3 Doku homojenatının hazırlanması:**

Florozisli ve kontrol gruplarından alınan ve -80 °C'de saklanan dokular, oda sıcaklığında çözülmeye bırakıldı. Çözündükten sonra yaklaşık 70-75 mg kadar steril ependorf tüplere alındı. Dokuların üzerine 0,2 ml steril serum fizyoloji eklenek homojenize edildi. Homojenize edilen dokular 1500 rpm 2-8 °C derece bir sıcaklıkta santrifüj edildi. Tüpün üstünde kalan sıvı kısım atıldı. Alta kalan dokuların üzerine soğuk steril fosfat buffer solisyon (PBS) eklendi ve pipetlenerek yıkandı. Daha sonra 1500 rpm hızda santrifüj edilerek üstü atılarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama işlemi 3 kere tekrarlandıktan sonra, total mRNA izolasyon aşamasına geçildi.

### **3.2.4 Total mRNA izolasyonu ve analizi**

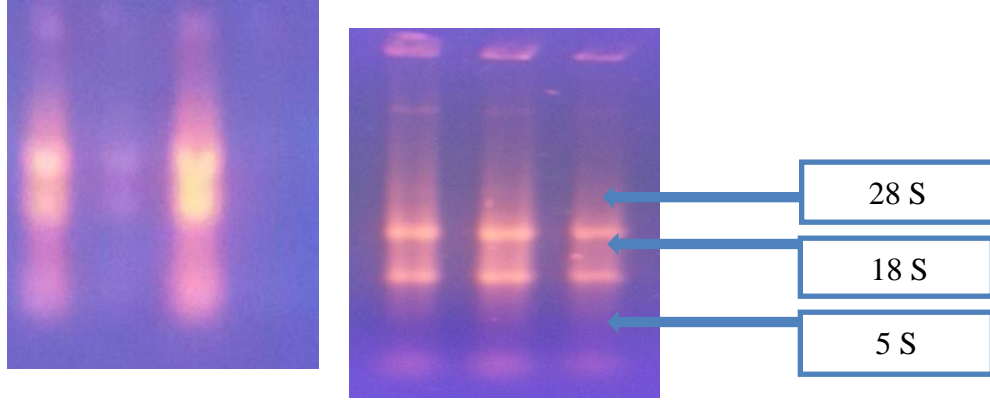
Bu basamaktan sonraki işlemler aksi belirtilmedikçe buz üzerinde devam edildi. Santrifüj edilen dokuların üzerindeki PBS pipet yardımıyla atılıp, alta kalan doku lizati 1.5 ml'lik yeni steril ependorf bir tüpe aktarıldı. Tüpe 1 ml soğuk trizol reagent ilave edilerek, doku lizati pipet yardımıyla iyice homojenize edildi. Pipetasyondan sonra nükleoproteinlerin kompleksinin tamamen parçalanması için, yaklaşık her biri 15-20 sn. olacak şekilde 2 dk. arayla 3 kere vortekslenerek, toplamda 10 dk. oda sıcaklığında

bekletildi. Bu aşamadan sonra numuneler 3500 rpm 10 dk santrifüj edildi. Üste kalan supernatant kısmı steril Dnaz/Rnaz free 1.5 ml'lik yeni ependorf bir tüpe aktarıldı. Pelet kısmı atıldı. Yeni tüpe aktarılan numunelerin üzerine her bir tüpe 0.2 ml soğuk kloroform ilave edilerek, 15 saniye şiddetli bir şekilde vortekslendi ve 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra numuneler 12000 x g'den fazla olmayacak şekilde 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj aşaması sonrasında karışım üç fazlı bir yapı halini almaktadır; altta kloroformlu alt faz, ortada hafif beyazımsı interfaz ve en üste RNA'nın bulunduğu şeffaf faz. Üste kalan şeffaf faz mikropipet yardımıyla dikkatlice alınarak, temiz steril bir 1.5 ml ependorf tüpe aktarıldı.

RNA seperasyon aşaması için yeni bir tüpe aktarılan üst faz, 0.5 ml izopropil alkole pipet yardımıyla iyice karıştırıldı. 10 dk 15-30 °C'de inkübe edildi ve 12000xg'den fazla olmayacak şekilde 10 dk 2- 4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpün dibinde jel benzeri bir pelet oluştu. Tüpün üstü tamamen atıldıktan sonra jel benzeri pelet olan RNA, 1 ml % 75'lik etil alkol ile vortekslenerek yıkandı. 7500xg'den fazla olmayacak şekilde 5 dk 2-8 °C'de santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi iki defa tekrarlandı ve santrifüj edilerek üstü atıldı. Pelet hücre kültürü laminar kabinde 12-15 dk tüpün ağzı açık bırakılarak kurumaya alındı. Kurutma işlemi takiben, RNA 30-50 µl steril Dnaz/Rnaz su ile çözüldü ve agaroz jelde yürütmek için 5-7 µl RNA alındı geri kalanı cDNA aşaması yapılmak üzere hemen -80 °C'ye kaldırıldı.

RNA miktarı ölçümü yapıldı (BioDrop). Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum emme özeliği taşıdığından, bu dalga boyundaki emme derecesi, nükleik asitlerin miktarının bir ölçüsüdür ve 1 optik dansite (OD) RNA için 40 µg/ml dir.

Elde edilen RNA'dan alınan 3-5 µl RNA, etidyum gelred eklenmiş % 0,7'lik agaroz jelde yürütüldü. Yürütme sonrasında fotoğrafları çekildi. 28S, 18S ve 5S RNA görüntüsü net şekilde gözlemlendi.



### 3.2.5 Komplementer DNA (cDNA) izolasyonu

RNA elde edilen dokulardan, gerçek zamanlı-PZR'da ekspresyon analizi için kullanılmak amacıyla cDNA sentezi gerçekleştirildi. Her bir numune için kullanılacak mRNA miktarı 1000 ng olarak belirlendi. cDNA eldesi için Qiagen RT2 First Strand cDNA kiti kullanıldı. Bu kitin önerdiği protokol kullanıldı. Ölçülen her bir numunenin total mRNA miktarı, suyla 8 µl olarak tamamlandı. Üzerine 6 µl genomik DNA eliminasyon buffer ilave edildi. Gerçek zamanlı-PCR cihazında; 5 dk 37 °C de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra içinde revers transkriptaz enzimi içeren BC4 solüsyonunda 6 µl ilave edilerek toplam karışım 20 µl olacak şekilde; sırasıyla 42 °C 15 dk., 95 °C 5 dk. ve 30 °C 1dk olacak şekilde protokol tamamlanarak cDNA elde edildi.

Elde edilen 20 µl toplam reaksiyon hacminin üzerine steril Dnaz ve Rnaz free bidistile su ilave edildi ve toplam hacim 91 µl oldu. cDNA reaktantı, gerçek zamanlı-PZR çalışmasına kadar -20 °C de muhafaza edildi.

### 3.2.6 Gerçek zamanlı-PZR

Apoptosis mekanizması için (Bcl211, Bax, Bim Bak, Bcl-2 ve kaspaz 3, 8, 9) ve oksidatif stres mekanizması için (GPx1, GST1, VIMP, SOD1, SOD2, CCS, NCF, NOS2, CYGB) genlerinin ekspresyonları belirlendi.

Gerçek zamanlı-PZR aşamasında, Wizbio sybrgreen master mix kit kullanıldı. Reaksiyon içerikleri, hem hedef hem de kontrol geni (housekeeping) için aynıdır. Yöntemin aşamaları bu kit protokoline aşağıdaki tabloda özetlendiği şekilde yapıldı.

**Tablo 2.** Gerçek zamanlı-PZR için reaksiyon içeriği

Reaksiyon içeriği	Bir örnek için	Reaksiyon döngüsü
Master miks (2X)	10 µl	*95°C 5' denatürasyon
Primer	Forward: 0,5 µl Reverse: 0,5µl	*95°C 15" *53-55°C 90" * 72°C 30"
dH <sub>2</sub> O	7 µl	} <b>50 döngü</b>
cDNA	2 µl	
Toplam	20 µl	<i>Melting Curve</i> Ramp: 50-99 (1'er derece artış) 90 °C 5"

\*Başlangıç denatürasyonu, master mix protokolüne göre yapıldı. Hedef genlerin baz uzunluğu yaklaşık olarak 140-180 bp aralığındadır.  
Daha önce optimizasyonu yapılan tüm hedef genlerin primer bağlanma sıcaklığına göre tm'leri belirlendi. Dolayısıyla tm sıcaklıkları değişkenlik göstermiştir

Kontrol geni olarak gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. Her bir örnek için üç bağımsız tekrar yapıldı. Bir ct (cycle treshold), amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcı itibarıyla belirlendi.

Hedef genlerin ürünlerinin değerlendirilmesi iki şekilde yapıldı: 1)  $\Delta Ct$  ve  $2^{-\Delta Ct}$  hesaplamaları yapılarak, çalışmanın kontrol grubu olarak belirlenen grubun ekspresyon değerleri istatistik yapılarak florozis grubuyla karşılaştırıldı. 2) Bu değerlendirmede ise kontrol grubunun ct değerlerinin farklılığı ve tekrarlanan gruplar, uygun ekspresyonun belirlenmesinde kullanıldı.  $\Delta \Delta Ct$  ve  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  değerleri belirlendi. Gruplar arasındaki farklılık kontrol (GAPDH) ekspresyonun artış-azalış kat (fold changes) sayısı ile karşılaştırılıp değerlendirildi.

### 3.2.7 İstatistik analiz

Üzerinde durulan özellikler için tanımlayıcı istatistikler; medyan, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değer olarak ifade edildi. Bu özellikler bakımından gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemek amacıyla Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Farklı grupları belirlemede, Dunnet çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Hesaplamalarda, istatistik anlamlılık düzeyi % 5 olarak alındı ve hesaplamalar için SPSS (ver: 13) istatistik paket programı kullanıldı.

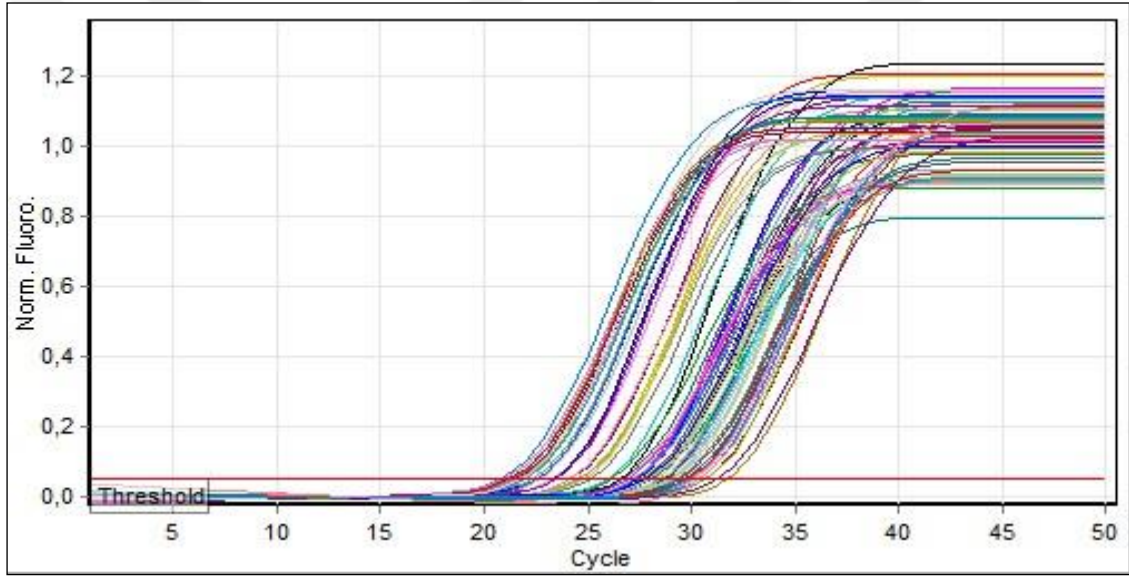
#### 4. BULGULAR

**Tablo 3.** İdrar flor konsantrasyonları

	Kontrol	Florozisli
İdrar flor düzeyleri (ppm)	0,9272±,01535	25,6903±7,00382**

\*\*( $p \leq 0.01$ )

Florozis belirtisi gösteren koyunların idrar flor düzeylerinin, sağlıklı koyunlardan oluşan kontrol grubuna göre önemli miktarda yüksek ( $p \leq 0.01$ ) olduğu belirlendi.



**Şekil 2.** Logaritmik standart CT eğrisi

**Tablo 4.** Florozisli ve kontrol gruplarının karaciğer dokusundan elde edilen apoptotik genlerin ekspresyonunda  $2^{-\Delta Ct}$  değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

<b>Karaciğer Apoptotik genler</b>	<b>Kontrol (n:6)x100</b>	<b>Florozisli(n:6)x100</b>
Kaspaz-3	0,66258±0,110772	0,31789±0,029298*
Kaspaz-8	0,00647±0,001781	0,00723±0,001053
Kaspaz-9	36,68139±1,793830	79,53940±7,685926*
Bcl-2	0,03779±0,013018	0,01859±0,004066
Bcl2l-1	0,03079±0,004630	0,01639±0,003602
Bim	0,00202±0,000344	0,00379±0,000678
Bax	0,03787±0,001925	0,04853±0,011613
Bak	0,02138±0,001984	0,01086±0,001653*

\*( $p \leq 0.05$ )

Karaciğer dokusundaki apoptotik genlerinin  $2^{-\Delta Ct}$  değerlerine göre, kaspaz 3 ve Bak değerlerinin flor grubunda azaldığı ( $p \leq 0.05$ ), kaspaz 9 değerlerinin ise arttığı ( $p \leq 0.05$ ) tespit edildi. Diğer genler bakımından ise kontrol ve florozisli koyunlar arasında önemli bir fark bulunamadı.



**Tablo 5.** Florozisli ve kontrol gruplarının karaciğer dokusundan elde edilen oksidatif stres genlerinin ekspresyonunda  $2^{-\Delta Ct}$  değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

<b>Karaciğer oksidatif genler</b>	<b>Kontrol (n:6)x100</b>	<b>Florozisli (n:6)</b>
Cybc	0,01092±0,001399	0,02667±0,002323*
GPx1	0,04518±0,003322	0,01499±0,005813*
SOD1	0,13591±0,043401	0,01478±0,003754*
SOD2	0,00680±0,000581	0,00355±0,000811*
GST1	0,03037±0,005162	0,05756±0,008615*
VIMP	0,01814±0,002761	0,02141±0,003342
CCS	0,06613±0,011639	0,05121±0,010537
NCF	0,63433±0,072444	1,57944±0,146460*
NOS2	0,02990±0,008476	0,01057±0,001764

\*(p≤0.05)

Karaciğer dokusundaki oksidatif stres genlerinin  $2^{-\Delta Ct}$  değerlerine göre; CYGBc, GST1 ve NCF genlerinin florozisli grupta önemli oranda arttığı saptandı (p≤0.05). Buna karşılık, GPx1, SOD1 ve SOD2 genlerinin ise florozisli grupta önemli derecede azaldığı belirlendi. VIMP ve CCS genlerinde ise herhangi bir fark bulunmadı.

**Tablo 6.** Florozisli ve kontrol gruplarının böbrek dokusundan elde edilen apoptotik genlerinin ekspresyonunda  $2^{-\Delta Ct}$  değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

<b>Böbrek Apoptotik genler</b>	<b>Kontrol (n:6)x100</b>	<b>Florozisli (n:6)x100</b>
Kaspaz 3	0,10773±0,011751	1,64085±0,369362*
Kaspaz 8	0,02269±0,004288	0,01050±0,003875*
Kaspaz 9	19,11080±4,096130	24,02771±2,439247
Bcl-2	0,06238±0,009653	0,01882±0,002998**
Bcl2l-1	0,02954±0,000651	0,02019±0,000539*
Bim	0,02220±0,003555	0,00821±0,001316*
Bax	0,04682±0,005281	0,06406±0,010434
Bak	0,03290±0,004035	0,01802±0,002666*

\*(p≤0.05) \*\*(p≤0.01)

Böbrek dokusundaki apoptotik genlerin,  $2^{-\Delta Ct}$  değerlerine göre, kaspaz 3 değerlerinde florozisli grupta önemli bir artış olduğu saptandı. Kaspaz 3 ve Bax değeri değişmezken, bunun dışındaki bütün genler için ise florozisli grupta istatistiksel olarak önemli bir azalma tespit edildi.

**Tablo 7.** Florozisli ve kontrol gruplarının böbrek dokusundan elde edilen oksidatif stres genlerinin ekspresyonunda  $2^{-\Delta Ct}$  değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

<b>Böbrek oksidatif genler</b>	<b>Kontrol(n:6) x100</b>	<b>Florozisli(n:6) x10</b>
CYGBc	0,00767±0,000982	0,01194±0,001039*
GPx1	0,05206±0,006927	0,09359±0,006201**
SOD1	43,31131±6,20390	12,07006±2,23230*
SOD2	0,04494±0,005837	0,01821±0,002959*
GST1	0,11790±0,049502	0,03306±0,004948*
VIMP	0,05387±0,025140	0,01230±0,001919
CCS	0,20177±0,006289	0,06517±0,013716**
NCF	1,55984±0,040638	0,99158±0,077515*
NOS2	0,07894±0,024396	0,01873±0,002805**

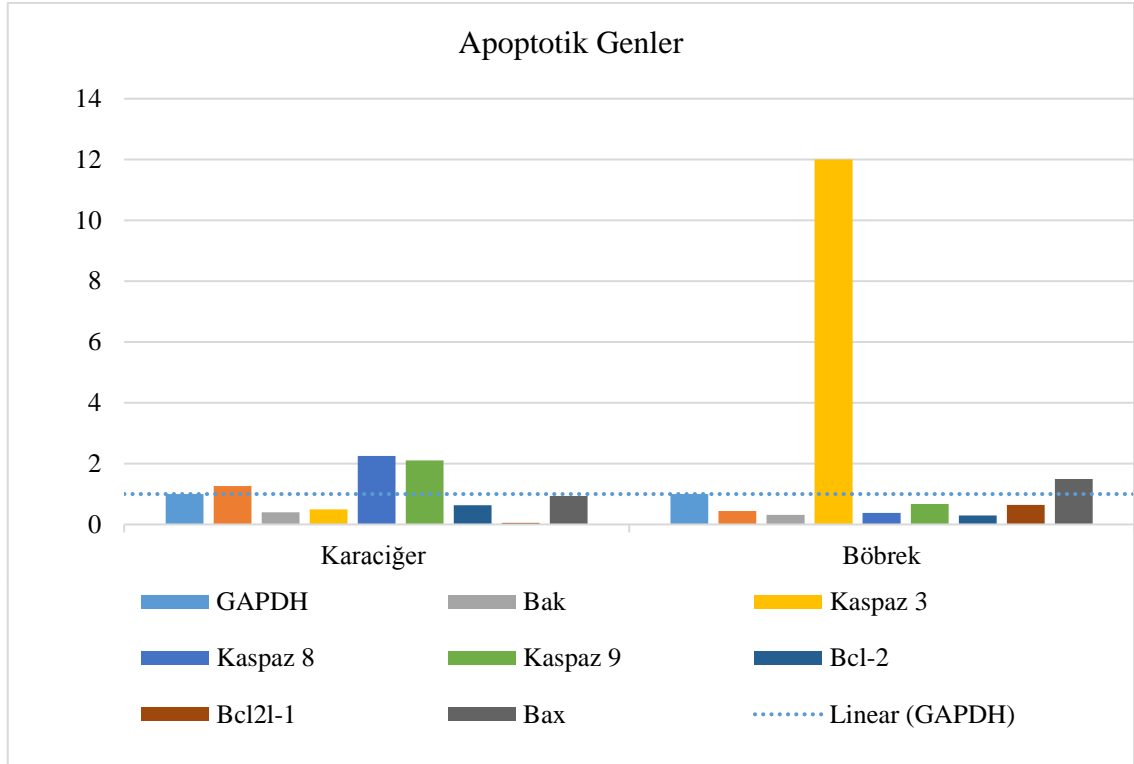
\*( $p \leq 0.05$ ) \*\*( $p \leq 0.01$ )

Böbrek dokusundaki oksidatif stres genlerinin  $2^{-\Delta Ct}$  değerlerine göre; VIMP değerinin gruplara göre değişmediği, florozisli grupta CYGBc ( $p \leq 0.05$ ) ve GPx1 ( $p \leq 0.01$ ) artarken, SOD1, SOD2, GST1, NCF ( $p \leq 0.05$ ) ve CCS ve NOS2 ( $p \leq 0.01$ ) istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi.

**Tablo 8.** Florozisli böbrek ve karaciğer dokularındaki apoptotik genlerin ekspresyonlarının  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  değerlerinin kontrol genine (GAPDH) göre değişimleri

	Karaciğer	Böbrek
GAPDH	1,00	1,00
Kaspaz 3	0,50	12,00
Kaspaz 8	2,20	0,40
Kaspaz 9	2,10	1,40
Bcl-2	0,60	0,30
Bcl2l1	0,05	0,60
Bim	1,30	0,40
Bax	0,90	1,50
Bak	0,40	0,30

Gruplar arasındaki farklılık kontrol (GAPDH) ekspresyonun artış-azalış kat (fold changes) sayısı ile karşılaştırılıp yapılan değerlendirmeye göre; karaciğerde bakılan apoptotik genlerden sırasıyla kaspaz-8 2.20, kaspaz-9 2.10 ve Bim 1.30 kat bir artış olduğu, kaspaz-3 0.5, Bcl-2 0.4, Bak 0.6 kat bir azalmanın olduğu, Bcl2l-1 de ekspresyonun olmadığı ve Bax'ta ise yaklaşık olarak değişim olmadığı tespit edildi. Böbrekte bakılan aynı genlerden kaspaz-3, kaspaz-9 ve Bax sırasıyla 12, 1.4 ve 1.5 kat bir artış, kaspaz-8, Bcl-2, Bcl2l-1, Bim ve Bak sırasıyla 0.6, 0.7, 0.4, 0.6 ve 0.7 kat bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir.



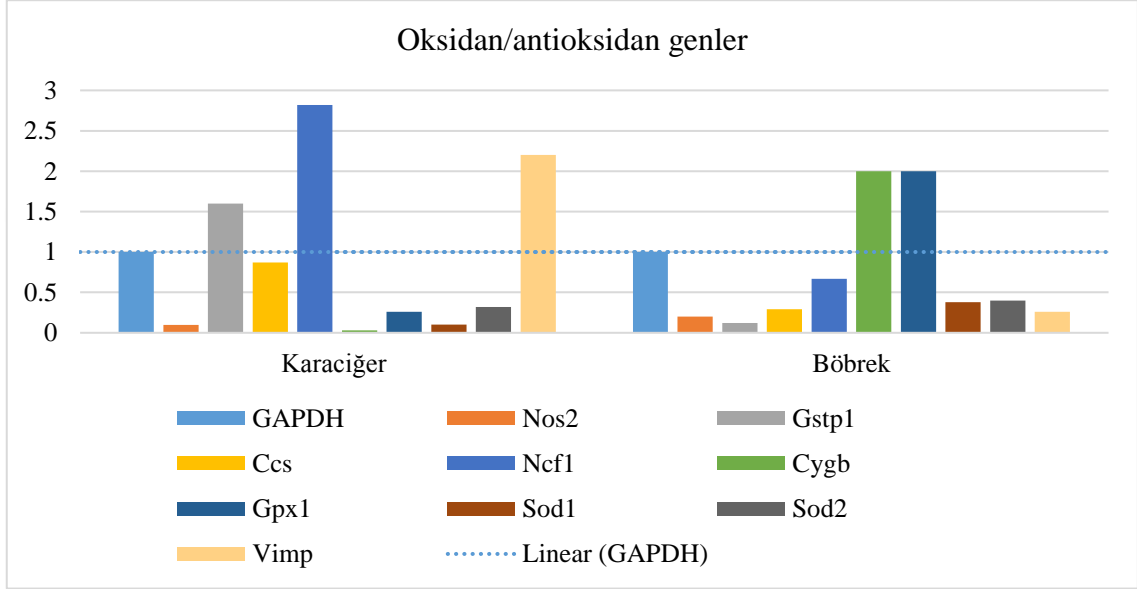
**Şekil 3.** Apoptotik genlerin kontrol genine göre ekspresyon durumları

**Tablo 9.** Florozisli böbrek ve karaciğer dokularındaki osidatif stres genlerin ekspresyonlarının  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerlerinin kontrol geni (GAPDH) göre değişimleri

Genler	Karaciğer	Böbrek
GAPDH	1,00	1,00
GPx1	0,30	2,00
SOD1	0,10	0,40
SOD2	0,30	0,40
GST1	1,60	0,10
VIMP	2,20	0,30
CCS	0,9	0,30
NCF	2,80	0,70
NOS2	0,10	0,20
CYGB	0,03	2,0

Gruplar arasındaki farklılık kontrol (GAPDH) ekspresyonunun artış-azalış kat (fold changes) sayısı ile karşılaştırılıp yapılan değerlendirmeye göre; karaciğerde bakılan

oksidan/antioksidan genlerden GST1, VIMP ve NCF sırasıyla 1.6, 2.2 ve 2.8 kat bir artış, GPx1, SOD1, SOD2 ve NOS2 sırasıyla 0.7, 0.9, 0.7 ve 0.9 kat bir azalış, yaklaşık olarak CYGB'de bir ekspresiyonun olmadığı ve CCS'de de bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir. Böbrekte araştırılan aynı genlerden GPx1 ve CYGB ikisinde 2 kat bir artış, SOD1, SOD2, GST1, VIMP, CCS, NCF ve NOS2 sırasıyla 0.6, 0.6, 0.9, 0.7, 0.7, 0.7, 0.3 ve 0.8 kat oranında bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir.



**Şekil 4.** Oksidan/antioksidan genlerin kontrol genine göre ekspresyon durumları

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çevresel ve doğal olarak ortaya çıkan kronik florozis vakalarına dünyada ve ülkemizde belli başlı bölgelerde rastlanmaktadır. Ülkemizde bugüne kadar yapılan çalışmalarda; Muğla, Eskişehir, Kırşehir, Çorum, Ankara, Konya, Hatay, Van ve Ağrı'da su, toprak, bitki, koyun idrarı, diş ve kemik örneklerinde flor düzeyleri belirlenmiş ve flor zehirlenmesi hakkında değerlendirmeler yapılmıştır. Doğal ve endüstriyel flor kirliliğine bağlı olarak sığırlarda ve koyunlarda kronik florozis tespit edilmiştir. Doğu Anadolu bölgesinde Ağrı, Van ve Doğubeyazıt üçgeninde yer alan Tendürek Dağı bölgesindeki yerleşim yerlerinde özellikle Muradiye ve Çaldıran bölgesinde insan ve hayvanlarda endemik olarak doğal florozis olduğu yapılan bir çok çalışmada tespit edilmiştir (Şendil ve Bayşu, 1973; Ergun ve ark., 1987; Altıntaş ve ark., 2000; Küçükeşmen ve Sönmez, 2008; Yur ve ark., 2008; Sanem ve Fidancı, 2011; Yur ve ark., 2013; Aydın ve ark., 2014; Kurtdede ve ark., 2017).

Van-Tendürek bölgesinde uzun yıllardan beri yapılan çalışmalarda su ve koyun idrarında flor konsantrasyonları tespit edilmiştir. Bayşu ve Şendil (1973), Van/Çaldıran ve Ağrı/Doğu Beyazıt ilçelerinde su örneklerinde flor konsantrasyonunun 5.70 mg/l-15.20 mg/l arasında olduğunu, koyun idrar örneklerinde ise 3.80-30.61 mg/l aralığında olduğunu bildirmişlerdir. Sanem ve Fidancı (2011), endemik florozis gözlenen Van ili Çaldıran İlçesi Aşağı Yanıktaş, Yukarı Yanıktaş ve Kılavuz köylerinde yetiştirilen ve klinik florozis gözlenen koyunlardan alınan idrar numunelerinde flor konsantrasyonunu  $48.70 \pm 10.60$  ppm olarak tespit etmişlerdir. Yur ve ark. (2013), Doğubeyazıt yöresinde endemik florozis görülen bölgede yaptıkları çalışmada, koyun idrarında flor düzeyinin  $6.74 \pm 0.49$  ppm olarak ölçmüşlerdir.

Bu tez çalışmasında ise, florozis teşhisi konulan koyunlardan alınan idrar numunelerinde çıkan flor iyonu konsantrasyonu  $25.69 \pm 7.00$  ppm olarak tespit edildi. Çıkan sonuç daha önce aynı bölge ve köylerde yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu saptanmıştır.

Hem karaciğer hem de böbrekler vücutta florür metabolizmasında önemli rol oynayan organlardır. Yüksek miktarda ve uzun süre flor alınımı, karaciğer ve böbrek fonksiyonunu etkileyerek, karaciğer ve böbrek dokularında patolojik değişikliklere

neden olabilir. Flor başta dişler, kemik ve iskelet yapısına katılmak üzere; karaciğer, böbrek ve bir çok yumuşak dokuda birikir ve böylece intrasellüler ve ekstrasellüler bir çok patolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler parametrelerin değişmesine neden olur (Akdoğan ve ark., 2002; Dimcevici ve ark., 2013; Martinez-Mier ve ark., 2016; Kurtdede ve ark., 2017; Nelson ve ark., 2019).

Florun uzun süreli ve yüksek oranda maruziyeti, kalsifiye dokular üzerinde bozulmalara yol açmaktadır. Ayrıca diğer yumuşak dokular da hücresel düzeyden başlayan hasarlara neden olmaktadır. Flor maruziyetinden kaynaklı oksidatif strese bağlı DNA hasarı ve apoptotik yolların aktif hale gelmesine neden olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Agalakova ve Gusev., 2012; Yur ve ark., 2013; Yüksek ve ark., 2017).

Nitekim, Kanagaraj ve ark., (2015), deneysel florozis oluşturulmuş ratlarda yaptıkları çalışmada, flor intoksikasyonunun hepatik gösterge enzimleri olan AST, ALT ve  $\gamma$ -GT değerlerinin, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli oranda arttığını rapor etmişlerdir. Ersan ve ark., (2015), farelerde yaptıkları çalışmada, histopatolojik ve elektroforetik bulgulara göre kronik flor toksikasyonunun karaciğer dokusunda çeşitli hasarlara yol açtığı ve serum protein bölünmelerinin artış veya azalmasına neden olduğunubulmuşlardır.

Nefrotoksite ve flor ilişkisinin ortaya konulması için yapılan bir çalışmada, dünyada endemik florozisin en yaygın görüldüğü ülkelerin başında gelen Hindistan'ın endemik olarak florozis görülen bölgelerinde, nefrotoksite şüphesi görülen 156 çocuğun idrar ve serumlarındaki flor düzeylerine bakılmış ve bunlardan 32 tanesinin idrar ve serum numunelerinde yüksek seviyede flor olduğu rapor edilmiştir. Flor oranı yüksek olan bu hastaların böbrek histopatolojinde; hücre şişmesi ve lizisi, sitoplazmik vakumlama, nükleer yoğunlaşma, apoptoz ve nekroz gibi tübüler epitelin yapısında çeşitli derecelerde hasar olduğu ve bununda florla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Quadri ve ark., 2018).

Karaciğer ve böbrekte görülen, flora bağlı hasarın hücreye bağlı moleküler temelini araştırdığı çalışmalar vardır. Moleküler mekanizmalar arasında özellikle apoptotik ve oksidatif yollar önem kazanmaktadır. Lavrik (2011), ekstrinsik apoptoz

yolunun kaspaz-3 aktivasyonunda rol oynadığını ve bu durumun hem dışsal hem de iç yolların apoptozisin yürütülmesindeki önemini değerlendirmek için, Fas, FasL ve kaspaz-8 protein seviyelerini ölçmüş ve NaF ilavesinden sonra da önemli ölçüde artış göstermişler.

Çeşitli hücre hatlarına NaF uygulanarak yapılan *in vitro* çalışmalarda NaF'ın belli bir konsantrasyondan sonra sitotoksik bir etki gösterdiği, bununda hücre proliferasyonu etkilediği, hatta ciddi anlamda hücre ölümlerine neden olduğu belirlenmiştir. Morfolojik olarak artan hasara bağlı olarak ve mitokondriyal iletkenliği azaltarak, kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonunun artmasına yol açtığı görülmüştür (Yan ve ark., 2017; Yüksek ve ark., 2017; Çetin ve ark., 2019).

Lee ve ark.(2008),*in vivo* olarak HGF hücre hattında yaptıkları çalışmada, florun sitozola sitokrom C geçişini artırarak kaspaz-9, 8 ve 3 etkinliğini artırdığını, antiapoptotik bir protein olan Bcl-2'nin azalmasına neden olduğunu saptamışlar ve florun hem iç hemde dış apoptotik yolağı kullanarak apoptoza neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Başka bir çalışmada da aynı şekilde, LS8 ameloblast hücrelerine 48 saat boyunca sitotoksik doz konsantrasyonda NaF uygulaması sonucunda, Bcl-2 ekspresyonunda azalma, kaspaz-3,8,9 ekspresyon seviyesinde bir artış olduğu bildirilmiştir (Li ve ark.,2018). İnsan osteoblast hücresi olan hFOB.1.19 hattına IC<sub>50</sub> konsantrasyonda flor uygulanarak yapılan çalışmalarda kaspaz-9, 8, 3 enzimlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri kontrol grubunda artış gösterdiği, en büyük artışta önemli oranda artan kaspaz-8'in olduğu saptanmıştır (Yüksek ve ark., 2017; Çetin ve ark., 2019). NaF ile indüklenen LS8 hücrelerinde apoptozisin hem zamana hemde konsantrasyona bağlı olduğu gösterilmiştir. Kaspaz-9, 8, 3 aktivitesinin NaF'ın konsantrasyon bağlı olarak artış gösterdiği saptanmıştır (Zhao ve ark., 2016).

*In vivo* olarak flor toksikasyonu oluşturulmuş ratlarda Nox4, p38 $\alpha$  MAPK, Bax, ve kaspaz-3 ekspresyonlarının önemli oranda arttığı ortaya konulmuştur (Kanagaraj ve ark, 2015). Song ve ark., (2014), sıçanlara NaF uygulayarak yaptıkları deneysel çalışmada, NaF uygulamasının apoptozisi ve DNA hasarını artırdığını bildirmiştir. Buna ilaveten NaF uygulamasının sitozolik Cyt C ve bölünmüş kaspazlar 9, 8 ve 3'ün protein ekspresyon seviyelerini arttırdığı bildirilmiştir. Yine başka bir çalışmada, sıçanlarda deneysel olarak florozis oluşturulmasını takiben, beyindeki Bax ve Bcl-2



ekspresiyonun, hem protein hemde mRNA miktarının açıkça arttığı belirtilmiştir (Lou ve ark., 2104).

Gao ve arkadaşları (2014), deneysel florozis oluşturulmuş ratlarda böbrek hücre dokusunda flow sitometri ile apoptozis ve imünohistokimyasal olarak kaspaz-9, 8, 3 ve Cty C'in ekspresyonun ölçüldüğü çalışmada ölüm reseptör ve mitokondriyal apoptozis yollarına flor indüklenebileceğini(enzim substratı olarak) ortaya koymuşlardır.

Bu tez çalışmasında ise, kronik florozis görülen köylerdeki florozis teşhisi konulmuş koyunlardan elde edilen karaciğer ve böbrek dokusundan mRNA elde edilmiş ve önemli apoptotik genlerden kaspaz-3, 8, 9 bax, bak, bim ve Bcl2l-1 ve antiapoptotik gen olan Bcl-2 apoptotik genlerin ekspresyonu gerçek zamanlı-PZR ile tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında, karaciğer dokusundaki  $2^{-\Delta Ct}$  değerlerine göre, flor grubunda kaspaz 3 ve Bak değerlerinin azaldığı, kaspaz 9'un ise arttığı belirlenmiştir. Böbrek dokusunda ise kaspaz 3 değerlerinin florozisli grupta arttığı, kaspaz-3 ve Bax dışındaki bütün genler için ise florozisli grupta istatistiksel olarak önemli bir azalma olduğu tespit edildi. Bu veriler, literatür verileri ile uyumludur. Gruplar arasındaki farklılık kontrol (GAPDH) ekspresyonun artış-azalış kat (fold changes) değişimi ile karşılaştırılıp yapılan değerlendirmeye göre de karaciğerdeki kaspaz-8, kaspaz-9 ve Bim arttığı, kaspaz-3, Bcl-2 ve Bak azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Böbrekte ise kaspaz-3, kaspaz-9 ve Bax artarken, kaspaz-8, Bcl-2, Bcl2l-1, Bim ve Bak gen ekspresyonlarının azaldığı saptanmıştır. Endemik florozisli koyunlarda, karaciğer ve böbrek dokularındaki hasarın moleküler temeli olarak apoptotik mekanizmanın işlediği ve hem iç hem de dış yolda yer alan genlerin ekspresyonlarının, florozisli grupta etkilendiği ortaya konulmuştur.

OCCM-30 hücrelerinde NaF indüklü apoptozisin hem intrinsik hem de ekstrinsik apoptotik yolağın aktive olduğunu göstermişlerdir. NaF'un yüksek dozlarından kaynaklanan yüksek ROS oluşumu aynı zamanda apoptozisi de intrinsik yolla aktive etmektedir (Ni ve ark., 2108). Ratların NaF (10 mg/kg) ile 5 hafta boyunca uygulama yapılmasını takiben, MDA ve ROS, kaspaz 3 ve 9 gen ekspresyonu ve aktivitesinin arttığı, Bax ekspresyonunun ise azaldığı gösterildi (Li ve ark., 2017)

Pek çok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda, flor maruziyetine bağlı olarak bazı organlarda ve dokularda aşırı miktarda serbest radikal oluşumunun gerçekleştiği ve lipid peroksidasyonuna yol açtığını bildirilmiştir. Florun neden olduğu oksidatif stres kaynaklı lipid peroksidasyonun önlenmesinde antioksidanların (vitaminler, metiyonin, N-asetil-sistein; polifenolik flavonoidler gibi) ve antioksidan bakımından zengin yiyeceklerin kullanılmasının, florozis tedavisi için antidotlar gibi davranabileceğine dair bildirimler yapılmıştır (Rice-Evans, 1995; Blaszczyk ve ark 2008; Hassan H.A. ve Yousef M.I., 2009; Altintas ve ark., 2011).

Akdoğan ve ark., (2002), 70 gün boyunca içme sularına NaF (40mg/L) verilen tavşanlarda, böbrek dokusunda SOD, Gsh-Px, CAT, Gsh-Rd ve G6pd aktivite düzeylerinde önemli oranda dşuş olduğunu tespit etmişlerdir.

Kanagaraj ve ark. (2015), sıçanlarda deneysel olarak yüksek konsantrasyonda flor uygulamasının, karaciğer hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) nemli oranda artmasına ve SOD-2, Cat, GPx ve Gst-Pi antioksidan enzimlerinde azalmasına neden olduğunu tespit etmişler.

Yapılan farklı çalışmalarda oksidatif strese yol açan ROS oluşumunun floridin neden olduğu intrinsik apoptotik yol ile de ilişkili olduğunu, NaF'in toksisitesinin, protein sentezinin inhibisyonu, oksidatif stres ve apoptoza bağlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir (Tiwari ve ark., 2002; Barbier ve ark, 2010).

Çeşitli hücrelerdeki flor uygulamalarının; konsantrasyon, hücre türü ve dokuya bağlı olarak farklı etki mekanizmalarını kullandığı ileri sürülmektedir. Suzuki ve ark.(2015), bir kaç farklı dokuda yaptıkları çalışmalarda yüksek konsantrasyonlardaki florn ER stresine ve oksidatif strese neden olduğunu dile getirmişler.

Mio ve ark. (2013), florozis oluşturulmuş ratlarda apoptozis ve oksidatif stres mekanizmalarını araştırdıkları çalışmada, karaciğer dokusundan elde ettikleri numunelerde kontrol grubuyla karşılaştırdıklarında NaF grubunda Gsh-px ve SOD'ın önemli oranda azaldığı, ayrıca sonuç raporlarında NaF'in karaciğerde apoptozu indüklediği bunun da ratlarda karaciğer hasarı oluşturduğunu tespit etmişler.

Dişi farelerde deneysel olarak florozis oluşturulan farelerin karaciğer dokusunda ROS ve önemli antioksidan enzimlerin mRNA seviyeleri geręek zamanlı-PZR ile belirlendiği çalışmada, ROS'ların önemli oranda arttığı buna mukabil SOD ve Gsh-Px aktivitesinin ve de antioksidan kapasitenin de azaldığı ortaya konulmuştur. CAT, Gsh-Px1 ve SOD'un mRNA ekspresyon seviyeleri önemli ölçüde downregule(reseptör azaltıcı) olurken, NOS2 mRNA ekspresyon seviyesi upregule(reseptör artışı) olmuştur (Zhou ve ark., 2015).

Ma ve ark. (2017), in vivo olarak göbek endotelyal hücrelerinde yaptıkları çalışmada, yüksek konsantrasyonda florun, çeşitli alt protein ünitelerden oluşan ve bu ünitelerden bir NCF olan ve geni tarafından kodlanan NADPH oksidaz enzim aktivitesinin artmasına neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Farelere flor vererek yapılan bir deneysel florozis çalışmasında da, fare testis ve epididimindeki dokulardan SOD-1 aktivitesinin ve mRNA seviyesinde, kontrol grubuna göre yüksek konsantrasyonda flor verilen (50 ve 100 mg NaF) her iki grupta da önemli oranda düştüğü tespit edilmiştir (Sun ve ark., 2018).

Luo ve ark. (2017), deneysel florozis oluşturulmuş ratlarda NaF kaynaklı böbreklerde görülen hasarın kaynağını ortaya koymak amacıyla yapılan çalışmada, biyokimyasal, patolojik ve oksidatif hasarı ile ilgili bazı enzimlerin aktivite ve mRNA seviyesi incelenmiştir. Çalışmanın sonunda reaktif oksijen türleri ile karaktize böbrek oksidatif hasarın arttığı ve antioksidan enzimler olan SOD, Cat, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin hem aktivitelerinin hem de mRNA seviyelerinin azaldığını tespit etmişlerdir.

Bu tez çalışmasında karaciğer dokusundaki oksidatif stres genlerinin  $2^{-\Delta Ct}$  değerlerine göre; CYGBc, GST1 ve NCF genlerinin florozisli grupta önemli oranda arttığı, GPx1, SOD1 ve SOD2 genlerinin ise florozisli grupta önemli derecede azaldığı belirlendi. Böbrek dokusundaki oksidatif stres genlerinin ise florozisli grupta CYGBc ve GPx1 artarken, SOD1, SOD2, GST1, NCF ve CCS ve NOS2 önemli oranda azaldığı bildirilmektedir. Bu sonuçlar literatür verileri ile uygunluk göstermektedir.

Gruplar arasındaki farklılık kontrol (GAPDH) ekspresyonun artış-azalış kat (fold changes) sayısı ile karşılaştırılıp yapılan değerlendirmeye göre ise; karaciğerde oksidan/antioksidan GST1, VIMP ve NCF gen ekspresyonları artarken, GPx1, SOD1, SOD2 ve NOS2 azaldığı bulunmuştur. Böbrek dokusunda ise GPx1 ve CYGB artarken, SOD1, SOD2, GST1, VIMP, CCS, NCF Ve NOS2 genlerinde azalma olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda; kronik flor toksikasyonuna bağlı olarak meydana gelen karaciğer ve böbrek dokularındaki hasarın temelinde apoptotik ve oksidatif yolların aktifleşmesinin önemli rolünün olduğu ve bazı genlerin gen ekspresyon düzeyinden başlamak üzere daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. Bundan sonra yapılacak tedavi ve takip çalışmalarında ise bu çalışma sonucunda en fazla etkilendiği tespit edilen genlerin seçilerek araştırılmasının, daha yararlı sonuçlar alınmasında yol gösterici olabileceği önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Agalakova NI, Gusev GP. Molecular mechanisms of cytotoxicity and apoptosis induced by inorganic fluoride. *ISRN Cell Biol* 2012;403835.
- Akdoğan M, Karaöz E, Gökçimen A, Eraslan G, Üstüner E. Flor zehirlenmesi oluşturulmuş tavşanların böbrek dokusunda yapısal ve biyokimyasal değişiklikler. *Turk J Vet Anim Sci.* 2002;26: 71-7.
- Akinrinade ID, Memudu AE, Ogundele OM. Fluoride and aluminium disturb neuronal morphology, transport functions, cholinesterase, lysosomal and cell cycle activities. *Pathophysiology.*2015;22(2):105-15.
- Altıntaş A, Fidancı UR, Sel T, Duru Ö, Başsatan A. doğal ve endüstriyel florozisli koyunlarda böbrek fonksiyonu ve serum protein elektroforezi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2000;47:105-14.
- Altintas L, Essiz D, Eraslan G, Ince S, Arslanbas E. Prophylactic effect of N-acetylcysteine against sodium fluoride-induced blood oxidative stress in mice. *Food Chem Toxicol.*2010;48:2838–41.
- Anonymous 1: BAXBCL2 associated X, apoptosis regulator [*Homo sapiens* (human)] [<https://rgd.mcw.edu/rgdweb/report/gene/main.html?id=2192>]. [Erişim Tarihi 25 Temmuz 2019].
- Anonymous 2: Entrez Gene Summary for BCL2L11 Gene [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10018>]. [Erişim Tarihi 25 Temmuz 2019].
- Anonymous 3: NCF gene (neutrophil cytosolic factor 1) [<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NCF>]. [Erişim Tarihi 25 Temmuz 2019].
- Anonymous 4: GST1glutathione S-transferase pi 1 [*Homo sapiens*(human) ] [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2950>]. 2019 [Erişim Tarihi 25 Temmuz 2019].
- Aoba T. The effect of fluoride on apatite structure and growth. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8(2):136-53.
- Aydın N, Dede S, Tanrıtanır P. The distribution of minerals in some tissues of sheep with fluorosis. *Fluoride,*2014;47(1):43–8.
- Aytuğ CN, Alaçam E, Görgül S, Gökçen H, Tuncer SD, Yılmaz K. Sığır Hastalıkları, Tüm Vet Hayv Hiz San Tic Ltd Sti., Yayın No 3, 1991; 457-60.
- Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact,* 2010;5;188(2):319-33.
- Barbier, Olivier, Laura Arreola-Mendoza, and Luz María Del Razo. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *ChemBiol Interactions.*2010;188(2):319–33.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9–19.
- Blaszczyk I, Grucka-Mamczar E, Kasperczyk S, Birkner E. Influence of fluoride on rat kidney antioxidant system: Effects of methionine and vitamin E. *Biol Trace Elem Res.* 2008;121:51–9.

- Blood DC, Radostits OM, Henderson JA. Fluorine Poisoning, Veterinary Medicine, Sixth Edition, London,1983.
- Boise LH, González-García M, Postema CE, Ding L,Lindsten T,Turka LAat all. Bcl-x, abcl-2-relatedgenethatfunctionsas adominant regulator ofapoptoticcelldeath. Cell. 1993;74(4):597-608.
- Chen T, Cui H, Cui Y, Bai C, Gong T, Peng X. Cell-cycle blockage associated with increased apoptotic cells in the thymus of chickens fed on diets high in fluorine.Hum Exp Toxicol.2013;30:685-92.
- Choubisa SL. Someobservations on endemicfluorosis in domesticanimals in SouthernRajasthan (India). VetRes Commun.1999;23:457–65.
- Collins TFX, Sprando RL. Fluoride-toxic and Pathologic Aspects: review of current literature on some aspect of fluride toxicity. Rev Food Nutr Tox. 2005;4:105-42
- Çekmen MB, Turgut M, Turkoz Y, Aygun D, Gozukara EM. Nitrikoksit ve nitrik oksit sentazın fizyolojik ve patolojik özellikleri. T Klin Pediatr. 2001;10:226–36.
- Çetin S, Yur F. Levels of trace elements in muscle and kidney tissues of sheep with fluorosis. Biol Trace Elem Res. 2019;174(1):82-4.
- Dimcevic Poesina N, Bălălău C, Bârcă M, et al.Testicular histopathological changes following SODium fluoride administration in mice. Rom J Morphol Embryol.2013;54(4):1019-24.
- Edlich F. BCL-2proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. Biochem Biophys Res Commun. 2018;500(1):26-34
- Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.
- Ergun HS, Russel-Sinn HA, Bayşu, N, Dündar Y. Studies on the floride contents in water and soil, ürine, bone and teeth of sheep and urine of human from eastern and western parts of Turkey. Dtsch Tierarstl Wschr.1987;94:381-440.
- Erkan S, Fidancı UR. Florozisli koyunlarda serum lipid profili. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2011;58:149-53.
- Ersan Y, Tıraşoğlu T, Koç E. Farede (*Mus musculus*) Kronik flor toksikasyonuna karşı c vitamininin iyileştirici etkilerinin histopatolojik ve elektroforetik yöntemlerle araştırılması. Kafkas Üniv Fen Bil Enst Derg.2015;8(2):23-33.
- Fan T, Xia L, Han YR. Mitochondrion and apoptosis.Acta Bioch Bioph Sin.2001;33:7–12.
- Fawell J, Bailey K, Chilton J, Dahi E, Fewtrell L, Magara Y. Fluoride in drinking-water. London: World Health Organization (WHO); 2006.
- Fidancı UR, Salmanoğlu B, Maraşlı S. İç Anadolu bölgesinde doğal ve endüstriyel florozis ve bunun hayvan sağlığı üzerindeki etkileri. J VetAnimSci. 1998;22:537-44.
- Fidancı UR, Sel T. The industrial fluorosis caused by a coal-burning power station and its effects on sheep. Tr J Vet Anim Sci.2001;25:735-41.
- Fukai T, Ushio-Fukai M.Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases.Antioxid Redox Signal. 2011;15(6):1583–606.

- Gao J, Song G, Liu M, Wang Y, Yang X. Study on the relationship between renal apoptosis and expression of caspase protein in fluoride induced rat. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2014;43(1):96-100.
- Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvio M, Wang SC, et al. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90(8):3491-5.
- Gutiérrez-Salinas J, García-Ortíz L, Morales González JA, Hernández-Rodríguez S, Ramírez-García S, et al. *In vitro* effect of Sodium fluoride on malondialdehyde concentration and on superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in human erythrocytes. *Sci World J*, 2013:864718.
- Hassan HA, Yousef MI. Mitigating effects of antioxidant properties of black berry juice on Sodium fluoride induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol*. 2009;47:2332-37.
- Heifetz SB, Horowitz HS. The amounts of fluoride in current fluoride therapy: safety considerations for children. *J Dent Child*. 1984;51(4):257-69.
- Kanagaraj VV, Panneerselvam L, Govindarajan V, Ameeramja J, Perumal E. Caffeic acid, a phyto polyphenol mitigates fluoride induced hepatotoxicity in rats: A possible mechanism. *Biofactors*. 2015;41(2):90-100.
- Karagül H. Florozis ve Hayvan Sağlığı. Uluslararası Katılımlı Tıbbi Jeoloji Sempozyumu Kitabı (Editör: Dr. Eşref Atabey), 2008:109-10.
- Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, et al. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature*. 1995;374(6524):736-9.
- Koç E, Ersan Y. Kronik florozisin fare (*Mus musculus albi* NOS) yavrularının bazı morfolojik parametreleri üzerine etkisi. *Kafkas Üniv Fen Bil Enst Derg*. 2008;1;38-43.
- Kurtdede E, Pekcan M, Karagül H. Türkiye’de florozis sorunu ve florun biyokimyasal etkileşimi. *Ata Üniv Vet Bil Derg*. 2017;12(3):320-26.
- Küçükşenmen Ç, Sönmez H. Diş hekimliğinde florun, insan vücudu ve dişler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi. *SDÜ Tıp Fak Derg*. 2008;15(3):43-53.
- Lavrik IN, Krammer PH. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ*. 2011;19:36-41.
- Lee JH, Jung JY, Jeong YJ, Park JH, Yang KH, Choi NK, et al. Involvement of both mitochondrial- and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts. *Toxicology* 2008;243(3):340-7.
- Liu J, Cui H, Peng X, Fang J, Zuo Z, Wang H et al. Dietary high fluorine induces apoptosis and alters Bcl-2, Bax, and caspase-3 protein expression in the cecal tonsil lymphocytes of broilers. *Biol Trace Elem Res*. 2013;152:25-30.
- Luo Q, Cui H, Deng H, Kuang P, Liu H, Lu Y et al. Histopathological findings of renal tissue induced by oxidative stress due to different concentrations of fluoride. *Oncotarget*. 2017;8(31):50430-46.

- Ma Y, Ma Z, Yin S, Yan X, Wang J. Arsenic and fluoride induce apoptosis, inflammation and oxidative stress in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chemosphere*. 2017;167:454-61.
- Martinez-Mier EA, Shone DB, Buckley CM, Ando M, Lippert F, Soto-Rojas AE. Relationship between enamel fluorosis severity and fluoride content. *J Dent*. 2016;46:42-6.
- Muro Y, Sugiura K, Mimori T, Akiyama M. DNA mismatch repair enzymes: genetic disorders and autoimmunity. *Clin Chim Acta*. 2015;442:102-9.
- Nelson EA, Halling CL, Buikstra JE. Evidence of skeletal fluorosis at the Ray Site, Illinois, USA: a pathological assessment and discussion of environmental factors. *Int J Paleopathol*. 2019;19;26:48-60.
- Ni J, Li Y, Zhang W, Shu R, Zhong Z. Sodium fluoride causes oxidative stress and apoptosis in cementoblasts. *Chem Biol Interact*. 2018;294:34-9.
- Peterson PE. The world oral health report: continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO global oral health program. Geneva: World Health Organization; 2003.
- Poureslami H, Khazaeli P, Mahvi AH, Poureslami K, Poureslami P et al. Fluoride level in the breast milk in Koochbanan, a city with endemic dental fluorosis. *Fluoride*. 2016;485-94.
- Quadri JA, Sarwar S, Sinha A, Kalaivani M, Dinda AK, Bagga A, et al. Fluoride-associated ultrastructural changes and apoptosis in human renal tubule: a pilot study. *Hum Exp Toxicol*. 2018;37(11):1199-206.
- Rafique T, Naseem S, Ozsvath D, Hussain R, Bhangar MI, Usmani TH. Geochemical controls of high fluoride groundwater in Umarmkot Sub-District, Thar Desert, Pakistan. *Sci Total Environ*. 2015;530-531:271-8.
- Ranjan R, Ranjan a. Fluoride Toxicity in Animals. Springer Briefs in Animals, Springer, New York, London. 2015.
- Song GH, Gao JP, FW Chun, Chen CY, Yan XY, Guo M et al. Sodium fluoride induces apoptosis in the kidney of rats through caspase-mediated pathways and DNA damage. *J Physiol Biochem*. 2014;70(3):857-68.
- Strunecká A, Paul C. Fluorine in medicine. *J Appl Biomed*. 2004;2:141-50.
- Sun Z, Li S, Guo Z, Li R, Wang J, Niu R et al. Effects of fluoride on SOD and CAT in testis and epididymis of mice. *Biol Trace Elem Res*. 2018;184(1):148-53.
- Şanlı Y, Kaya S. Veteriner Klinik Toksikoloji, Medisan Yayınevi, 1995; 80–85.
- Şendil Ç, Bayşu N. İnsan ve hayvanlarda Ağrı ili Doğubeyazıt ilçesi köylerinde görülen flor zehirlenmesi ve bunu Van İli Muradiye ilçesi köylerinde de saptamamızla ilgili ilk tebliğ. *AÜ Vet Fak Derg*. 1973;10:474-89.
- Tiwari BS, Belenghi B, Levine A. Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial permeability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol*. 2002;128(4):1271-81.



Trent JT, Hargrove MS. A ubiquitously expressed human hexacoordinate hemoglobin. *J Biol Chem.* 2002;277(22):19538-45.

Uslu B. Floroziste iskelet gelişmesi. *Türk Klin Tıp Bil Araşt Derg.* 1984;2:37-40.

Xiang QY, Chen LS, Chen XD, Wang CS, Liang YX, Liao QL et al. Serum flüoride andskeletalf fluorosis in twovillages in JianguProvince, China. 2005;38(3):178-84.

Yan X, Wang L, Yang X, Qiu Y, Tian X, Lv Y, et al. Fluoride inducesapoptosisin H9c2 cardiomyocytes via the mitochondrial pathway. *Chemosphere.* 2017;182:159-65.

Yüksek V, Dede, S, Taşpınar M, Çetin S. The effects of vitamins A, D, E, and C on apoptosis and DNA damage in sodium fluoride-treated renal and osteoblast cell lines. *Fluoride.* 2017;50(3)30: 300-13

Yur F, Mert N, Dede S, Değer Y, Ertekin A, Mert H, Yaşar S, Doğan I, Işık A. Evaluation of serum lipid fractions and tissue antioxidant levels in sheep with fluorosis. *Fluoride.* 2013;46(2):90-6.

Zhao L, Li J, Su J, Snead ML, Ruan J. LS8 cell apoptosis induced by NaF through p-ERK and p-JNK - a mechanism study of dental fluorosis. *Acta Odontol Scand.* 2016;74(7):539-49.

Zhou BH, Zhao J, Liu J, Zhang JL, Li J, Wang HW. Fluoride-induced oxidative stress is involved in the morphological damage and dysfunction of liver in female mice. *Chemosphere.* 2015;139:504-11.

Zuo H, Chen L, Kong M, Qiu L, Lu P, Wu P, et al. Toxic effects of fluoride on organisms. *Life Sci.* 2018;198:18-24.

## ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Mardin’de doğdu. İlk, orta, lise ve lisans eğitimini Diyarbakır’da tamamladı. Dicle Üniversitesi Atatürk Sağlık Yüksek Okulu Hemşirelik Bölümünde 2008-2012 yılları arasında eğitim gördü. Mezuniyetinden sonra, 2012 yılında özel bir hastanede işe başladı. Askerlik görevini 2014’te Gata Haydarpaşa Eğitim Hastanesinde sıhhiye olarak tamamladı. 2016 yılında da Van Yüzüncü Yıl Dursun Odabaş Hastanesinde göreve başladı. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine 2017 yılında başladı.



# ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Evrak Tarih ve Sayısı: 02/05/2018-32687



T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 27552122-604.01.02-E.32687  
Konu : Prof. Dr. Semiha DEDE'ye ait  
çalışma için Onay Gerektirmeyen  
Belge

02/05/2018

Sayın Prof. Dr. Semiha DEDE

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumun 26.04.2018 tarih ve 04 sayılı kararı gereğince, Yürütücülüğünü yapmış olduğumuz "Florozisli Koyunların Karaciğer ve Böbrek Dokularındaki Apoptotik ve Oksidatif Mekanizmalarının Araştırılması" adlı çalışma ile ilgili, 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 sayı ile yayımladığı yönetmeliğin 2. Maddesi 2. Fıkrasının b bendinde yer alan "Bu Yönetmelik; Deneysel olmayan klinik veteriner hekimliği uygulamalarını kapsamaz." hükmü gereğince YUHADYEK'ten Çalışma ve Araştırma Kesin Sonuç Onay Belgeleri alınmasına gerek olmadığına karar verilmiştir.  
Gereğini bilgilerinize rica ederim.

**e-İmzalıdır**  
Prof. Dr. Semiha DEDE  
Etik Kurulu Başkanı

Ek: Prof. Dr. Semiha DEDE (1 sayfa)

Adres: Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Zevce  
Campüsü 65080 Tuşba / Van  
Telefon: +90 432 2251701-04 / +90 4445060 Faks: +90 432 8865413  
e-Posta: yuhadyek@yyu.edu.tr Elektronik Ad: http://www.yyu.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için İrtibat: Mehmet Şah GÖZÜ  
Ünvan: Bilgiyeer İdari Sorumlusu  
Dahili No: 22007

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.



T.C.  
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
ONAY BELGESİ

YUZUNCU YIL UNIVERSITY (TURKEY)  
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE  
APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı / Title of the Research: Florozisli Koyunların Karaciğer ve Böbrek Dokularındaki Apoptotik ve Oksidatif Mekanizmalarının Araştırılması / Investigation of Apoptotic and Oxidative Mechanisms in Liver and Kidney Tissues of Sheep with Fluorosis

Araştırmacı(lar) / Investigator(s): Yürütücü / Chief investigator: Prof. Dr. Semiha DEDE  
Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Uğur EFE, Dr. Öğr. Üyesi Veyssel YÜKSEK

Araştırmada kullanılacak hayvanlar / Animals to be used in the research:

Tür / species: Koyun/Sheep

Sayı / Numbers: 25

Yaş / Age: 1-5

Cinsiyet / Sex: Erkek dişi/ male, female

Araştırmanın Öngörülen Başlama Tarihi / Proposed Research Starting Date: 1 Mayıs-2018

Araştırmanın Öngörülen Bitiş Tarihi / Proposed Research Completion Date: 1 Mayıs-2019

Dosya no / File no:

**Karar:**

Yukarıda bilgileri verilen planlanan araştırma projesi için Hayvan Deneyleri Etik Kuralı Onayı gerekmektedir. Tarih:26/04/2018 ; Karar no: 2018/04

**Decision:**

The proposed research project detailed above does not need Animal Researches Ethic Committee Approval. Date: 26/04/2018 - Decision number 2018/04

BAŞKAN/CHAIR		
	Prof. Dr. Semiha DEDE	
ÜYE	ÜYE	ÜYE
Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	Prof. Dr. Sudek KESKİN	Prof. Dr. Serpil DÜZLÜ
ÜYE	ÜYE	ÜYE
Prof. Dr. Nalan ÖZTAN	Prof. Dr. Alihan BİLİR	Doc. Dr. Yılmaz KESKİNGİL
ÜYE	ÜYE	ÜYE
Dr. Öğr. Ü. Ferda KARARUS	Dr. Öğr. Ü. Ömer ALLAHVERDİYEV	Dr. Öğr. Ü. Caner Yılmaz DEMİR
ÜYE	ÜYE	ÜYE
Dr. Öğr. Ü. Hacer SAHİN AYÇINYURT	Dr. Öğr. Ü. Şahin ÖNALAN	Yer. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET
ÜYE		
Zir. Mh. Kerem YILDIRIMGİLİ		

	<p style="text-align: center;">T.C. VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü</p>	
<b>LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU</b>		

Tarih:20/08/2019

Tez Başlığı / Konusu: **Florozisli Koyunların Karaciğer Ve Böbrek Dokularındaki Apoptotik Ve Oksidatif Mekanizmalarının Araştırılması/Veterinerlik**

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 54 sayfalık kısmına ilişkin, 19/08/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından TURNİTİN intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 17 (onyedi) dir.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı  
İmza

Öğrencinin Adı Soyadı	Uğur EFE
Anabilim Dalı	: Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
Öğrenci No	
Programı	: <input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza)	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza)

Prof. Dr. Semih DEDE