

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SODYUM FLORÜRÜN (NaF) BÖBREK HÜCRE SERİLERİNDEKİ  
SİTOTOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ferit URUT  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
(VETERİNER PROGRAMI)  
YÜKSEKLİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Semiha DEDE

VAN-2018

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SODYUM FLORÜRÜN (NaF) BÖBREK HÜCRE SERİLERİNDEKİ  
SİTOTOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ferit URUT  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
(VETERİNER PROGRAMI)  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Semiha DEDE


VAN-2018


Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı  
tarafından TYL-2017-6041nolu proje olarak desteklenmiştir

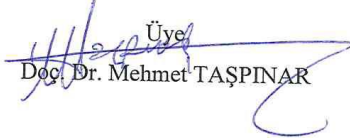
T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SODYUM FLORÜRÜN (NAF) BÖBREK HÜCRE SERİLERİNDEKİ  
SİTOTOKSİK ETKİSİ NİN ARAŞTIRILMASI**

Ferit URUT  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
(VETERİNER PROGRAMI)  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

  
Jüri Başkanı  
Prof. Dr. Fatmagül YUR

  
Üye  
Prof. Dr. Semiha DEDE

  
Üye  
Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR

TEZ KABUL TARİHİ  
28/09 / 2018

## TEŞEKKÜR

Çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde yol gösteren, ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tezin yapılmasında büyük katkıları olan bilgi ve hoşgörülerinden yararlandığım Sayın Hocam Prof. Dr. Semiha DEDE'ye 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 Veysel YÜKSEK, Arş. Gör. Dr. Sedat ÇETİN, Dr. Öğr. Üyesi Ayşe USTA'ya, Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR'a, istatistik analizlerin yapılması ve değerlendirilmesindeki kıymetli desteklerinden dolayı hocama teşekkür ederim. Ayrıca öğrenim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme ve her zaman yanımda olan eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu araştırmanın gerçekleşmesi için destek sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	I
Teşekkürler.....	II
İçindekiler.....	III
Simge ve Kısaltmalar.....	V
Tablolar Listesi.....	VII
Şekiller Listesi.....	VIII
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Flor.....	3
2.1.1. Florun Bulunuşu.....	3
2.1.2. Florun Metabolizması.....	3
2.1.3. Florun Toksikasyonu.....	4
2.2. Florozis.....	4
2.2.1. Florozisin Teşhisi.....	4
2.2.2. Florozisin Tedavisi.....	5
2.2.3. Florozisin Korunması.....	5
2.2.4. Floroziste Görev Alan Mollaküler Mekanizmalar.....	6
2.3. Apoptozis.....	6
2.3.1. Apoptozisin Tanımı.....	6
2.3.2. Apoptozisin Mekanizması.....	7
2.3.3. Kaspazlar.....	10
2.4. Otofaji.....	11
2.4.1. Otofajini Tanımı.....	11
2.4.2. Otofajini Mekanizması.....	11
2.5. Nekroz.....	13
2.5.1. Nekrozun Tanımı.....	13

2.5.2. Nekrozun Mekanizması.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	16
3.1.Gereçler.....	16
3.1.1. Hücre Materyali.....	16
3.1.2. Kullanılan Alet ve Malzemeler.....	16
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	17
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Hücre Kültürü.....	18
3.2.2. Hücre Pasajlama.....	18
3.2.3. Sodyum florür (NaF) çözeltilerinin hazırlanması.....	18
3.2.4. Liziz Solüsyonun Hazırlanması.....	19
3.2.5. Sitotoksisite (MTT Canlılık Testi ) Testi.....	18
3.2.6. Biyokimyasal Analizler.....	19
3.2.7. İstatistiksel Analiz.....	21
4. BULGULAR.....	23
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	28
ÖZET.....	37
SUMMARY.....	38
KAYNAKLAR.....	39
ÖZGEÇMİŞ.....	45
ETİK KURUL KARARI.....	46
TEZ ORJİNALLİK RAPORU.....	47

## SİMGELER VE KISALTMALAR

**DMSO:** Dimetil sülfoksit

**DNA:** Deoksiribonükleik Asit

**FBS:** Fetal Bovine Serum

**MTT:** (3-[4.5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue)

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**Rpm:** Revolutions Per Minute

**NaF:** Sodyum Florür

**RT-PCR:** Reverse- Transcription Polimeraze Chain Reaction

**CK-18:** Sitokeratin 18

**Fas:** Apoptoz indükleyici reseptör /ligand

**WHO:** Dünya Sağlık Örgütü

**Bak:** Bcl-2 homolog antagonisti/katil

**Bax:** Apoptosis regülatör (bcl-2-ilişki protein 4)

**Bcl-2:** B-cell Iymphoma 2

**Caspaz:** Cysteine Aspartic Acid Specific Protease

**Bid:** Bcl-2 etkileşim bölgesi

**Bim:** Bel-2 hücre ölümünün etkileşim mediatörü

**P53:** Tümör protein

**BCL-XL:** B-cell Iymphoma-extra large

**G6PD:** Guceso-6-phosphate dehydrogenase

**Ripk3:** Reseptor-interacting serine–threonine kinase 3

**Map11c3a:** Microtube-associated protein 1 light chain 3 alpha

**Atg3:** ATGautophagy related 3 homolog (s. Cerevisiae)

**Sqstm1:** Sequestosome 1

**Ripk 1:** Receptor (TNFRSF)- interactin serine-threonine kinas 1

**MAPK/JNK:** Mitojen aktif protein kinazı

**ZIP1:** Sinaptonemal kompleks proteini

**ACTB:** Beta aktin

**ROS:** Reaktif Oksijen Türleri(Serbest radikaler)

**NRK-52E:** Böbrek epiteryası

**NAD:** Nikotinamid adenin dinükleotit

**AIF:** Apoptoz indükleyici faktör

**CT:** Eşik Döngü Değeri





## TABLO LİSTESİ

**Tablo 1:** NRK-52E Hücre dizisinin genel özellikleri

**Tablo 2:** Otofajik genlerin NaF IC<sub>50</sub> uygulandıktan sonra saate göre ekspresyonları

**Tablo 3:** Apoptotik genler NaF IC<sub>50</sub> uygulandıktan sonra saate göre ekspresyonları

**Tablo 4:** Nekrotik genler NaF IC<sub>50</sub> uygulandıktan sonra saate göre ekspresyonları



## ŞEKİLLER LİSTESİ

**Şekil 1:** Apoptozisin Mekanizması

**Şekil 2:** Otofajinin Mekanizması

**Şekil 3:** Nekrozun Mekanizması

**Şekil 4:** 3. Saat MTT Sonuçları

**Şekil 5:** 12. Saat MTT Sonuçları

**Şekil 6:** 24. Saat MTT Sonuçları

**Şekil 7:** Otofajik genlerin kontrol genine göre ekspresyon durumları

**Şekil 8:** Apoptotik genlerin kontrol genine göre ekspresyon durumları

**Şekil 9:** Nekrotik genlerin kontrol genine göre ekspresyon durumları

## GİRİŞ

Flor, elektronegativitesi çok yüksek, doğada farklı bileşikler halinde bulunan, halojen bir iz elementtir. Uzun süre yüksek dozda flora maruz kalınması ile insan ve hayvanlarda florozis denilen toksikasyon durumu oluşur. Floroziste başta diş ve kemik olmak üzere pek çok dokuda hasar meydana gelir. Ülkemizde, yüksek miktarda flor içeren su kaynaklarının olduğu, Isparta, Eskişehir, Ağrı, Van gibi bölgelerde yaygın olarak endemik florozise rastlanmaktadır.

Flor büyük çoğunlukla böbrek yoluyla atılır. Böbrek, florun atılımında görevli başlıca organ olduğundan, etkilenmenin olması beklenir. Böbrekler florun filtrasyonu sırasında, büyük miktarda flora maruz kalırlar ve kalsifiye dokularla birlikte, flor hemostazisinde yer alırlar.

Flor, hücrede farklı mekanizmaları ile hücre ölümüne neden olmakla birlikte rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, en az yedi çeşit programlı hücre ölümü tarif edilmiştir. Apoptozis, otofaji ve nekroz bunların arasında yere almaktadır. Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, en çok hücreli organizmaların normal işleyişi ve hayatta kalması için gereklidir. Çeşitli hücre hatlarında flor uygulanmasının etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda, hücre tipine, zamana ve konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı, apoptozisi yükselttiği bildirilmektedir.

Otofaji, hücreye ait uzun ömürlü proteinler ve bazı sitoplazmik organellerin parçalanması olaylarını da içerir. Hücreyi etkileyen fizyolojik ve patolojik olaylarda hücre canlılığının devamı için yardımcıdır. Lizozomal parçalanmayı takiben, hücresel geridönüşümü sağlar. Otofaji bazen hücreyi apoptotik olmayan bir şekilde öldürebilmektedir. Dokuların lokal ve ani olarak ölümü nekroz olarak tanımlanmaktadır. Apoptoz, otofaji ve nekroz arasındaki karşılıklı etkileşime dair araştırmalar yapılmakta ve pek çok sağlık problemi için tanı, takip ve tedavi yöntemlerinde kullanılma araştırılmaktadır.

Anabilim dalımızda, böbrek epiteliyal hücre serisinde (NRK-52E), apoptozis göstergesi olarak M30, kaspaz-3, 8 ve 9 düzeylerinin incelendiği bir tez çalışmasında, kullanılan NaF dozunun hücre ölümünü arttırmasına rağmen, apoptozisi yeterince uyardığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte görülen hücre ölümünde, apoptotik yollardan daha başka mekanizmaların da etkin hale geldiği sonucuna varılmıştır. Yine bu çalışmada, ELISA ile tespit edilen apoptozis parametrelerinden olan kaspaz enzim konsantrasyonlarının, gen ekspresyonu ile uyumlu olmadığı saptanmıştır. Ayrıca, apoptozis sonuçları ile oksidatif DNA hasar arasında da anlamlı bir ilişki olmadığı görülmüştür (Yüksek ve ark, 2017).

Elde edilen bu sonuçlara dayanarak, farklı dozlarda ve zamanlarda alınan hücre örneklerinde gerçekleşen sitotoksitenin nedenlerinin araştırılması planlanmıştır. Bu çalışma, NaF uygulanması ile belirli düzeylerde sitotoksite olduğu belirlenen NRK-52 böbrek serisinde, sitotoksitenin meydana gelmesinde, apoptotik, otofajik ve nekrotik mekanizmaların olası rollerinin araştırılması amacıyla planlanmıştır. Apoptotik, otofajik ve nekrotik yollarda yer alan bazı genlerin ekspresyonlarının RT-PCR ile belirlenerek değerlendirilmesi, önemli veriler sağlayabilme potansiyeline sahiptir. NaF'ün bu hücre hattında farklı konsantrasyonlarda toksisiteye yol açtığı, daha önceki çalışmalarımızda gösterilmişti. Bu tez projesinde ise sitotoksiteye yol açan mekanizmaları aydınlatmak için, farklı doz ve sürelerde alınan örneklerde, apoptotik, otofajik ve nekrotik parametreleri moleküler bir teknik olan RT-PCR ile tespit edilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Flor

Florun (F), atom numarası 9, atom ağırlığı 19, yoğunluğu 1,265'dur. Halojenler (7A) grubunda yer alır. Kimyasal olarak çok reaktiftir. Flor, oda sıcaklığında açık sarı renkli, keskin kokulu ve çok tahriş edici bir gazdır. En küçük atom yarıçapına sahip halojendir. Elektronegatifliği çok yüksektir ve iyi bir yükseltgendir. Soy gazlar hariç tüm elementlerle doğrudan reaksiyon verebilir (Anonim, 2012; Kurtdede ve ark, 2017)

#### 2.1.1. Florun Bulunuşu

Flor çok reaktif olduğundan dolayı, oksijen ve asal gazlar dışında tüm elementlerle florür bileşiklerini oluşturmaktadır. Pek çok organik ve inorganik madde ile reaksiyon vermektedir. Organizma için oluşturduğu en önemli bileşik, kalsiyum florür ( $\text{CaF}_2$ )'dür. Flor ve bileşikleri II. Dünya Savaşı'ndan sonra ticari olarak kullanılmaya başlanmıştır. Hatta nükleer enerji ve atom bombası projelerinde kullanılmıştır (Avcı ve ark. 2009). Flor ülkemizde bazı yörelerde doğal olarak bol miktarda bulunmakta, endüstriyel ürünlerde çeşitli konsantrasyonlarda kullanılmakta ve çevre kirliliğine bağlı olarak yoğun flor kontaminasyonları gerçekleşmektedir (Kurtdede ve ark, 2017)

#### 2.1.2. Florun Metabolizması

İnsan metabolizması için gerekli eser elementlerden biri olan florun, çocuk ve erişkinlerdeki çürük önleyici etkinliği kanıtlanmıştır. Florun, özellikle çürükten korunma açısından dişlerin sürme öncesi ve sürme sonrası döneminde diş dokusuna ve plak oluşumuna çok önemli etkileri mevcuttur (Martı Akgün ve ark, 2012).

Çocuklarda diş çürüklerinden korunma ve kalıcı dişlerin çürüklere karşı dirençli olmasını sağlama için yeterli düzeyde flor alınımının birinci derecede öneme sahip olduğu ileri sürülmektedir (Eğri ve Çetinkaya, 1998).

İnsanlarda alınan florun büyük bir kısmı, hızlıca gastrointestinal sistemden ve akciğerlerden emilir. Emilen flor kan tarafından taşınır ve böbrek sistemi yoluyla atılır veya kalsifiye dokularda bulunur. İskelet ve dişlerde bağlı olan florun çoğu birkaç yıl biyolojik bir yarılanma ömrü bulunur. Yumuşak dokularda önemli bir birikim söz konusu değildir. Böbrekten atılımı glomerüler filtrasyon kaynaklı olabilir. Flor, plasenta tükürük, ter ve sütte düşük konsantrasyonlarda bulunur. Yıllarca, yararlı etkileri bildirilmiş olsa da doz-yanıt ilişkileri ve etkinliğinin daha fazla aydınlatmaya ihtiyacı vardır (WHO, 1984).

### **2.1.3. Florun Toksikasyonu**

Florun insanlardaki en önemli etkisi, yüksek flor içeren toprak ve su olan bölgelerde görülen dental ve iskelet florozisine neden olmasıdır. İskelette histolojik değişiklikler, kemik yoğunluğunda artış, kemik morfometrik değişiklikleri ve ekzostoz gibi durumlar, sakatlıklara kadar uzanan patolojilere neden olur. Bu durum genellikle tropikal ve subtropikal bölgelerle sınırlıdır ve sıklıkla kalsiyum eksikliği veya yetersiz beslenme gibi faktörlerle komplike hale gelir (WHO, 1984).

Flor, sistemik olarak, gastrointestinal sistemden hızla emilir ve dolaşıma karışır. Kalsifiye dokularda floroapatit tuzu olarak depolanır. Flor, diş minesindeki hidroksiapatit kristalindeki OH grupları ile yer değiştirerek, daha dayanıksız olan florapatit oluşturur. Ancak, minenin asitlere karşı direncini artırarak, dişi çürük oluşumuna karşı daha dirençli hale getirdiği için diş, çürüklerine karşı koruyucu olduğu düşünülmüştür. Ancak, sistemik uygulamaların (tablet, damla, tuz veya süte flor eklenmesi veya içme sularına katılma) florun diş yapısına katılması için yetersiz olduğu, hatta organizmada birikerek toksikasyona yol açtığı kanıtlanmıştır (Ökte, 2008).

## **2.2. Florozis**

### **2.2.1. Florozisin Teşhisi**

Florozis, evcil hayvanlarda ve insanlarda florun uzun süre, yüksek miktarda alınması sonucu ortaya çıkan, dişlerde lekelenme, aşınma ve daha ileri safhalarda

kemiklerde ve eklemlerde çeşitli bozukluklar ile karakterize bir problemdir. Dişlerin aşınarak kullanılamaz hale gelmelerinden dolayı iştahsızlık, verim kaybı, hatta ölümler meydana gelebilir (Comba, 2013; Ökte, 2008).

Florozis, iskelet-kas sisteminin klinik belirtileriyle seyretmektedir. Bu belirtiler, dişlerin renksizleşmesi ve yumuşaması, çiğnemede güçlük, kemik ekzostozları, topallık ve güç yürüme ile karakterizedir. Dişlerde görülen yumuşama, ameloblastlarda mine formasyonunun zarar görmesi sonucu ortaya çıkan bir tür mine hipoplazisidir. Aynı zamanda bu semptomlara ek olarak anemi, zayıflama, kuvvetten düşme, verim kaybı ve ölüm de görülebilmektedir (Comba, 2013).

### **2.2.2 Florozisin Tedavisi**

Akut flor zehirlenmelerinde damar içi kalsiyum infuzyonları ile iyi sonuçlar elde edilebilmektedir. Florun toksik etkilerine karşı hayvanların ihtiyaç duydukları normal kalsiyum miktarından daha fazlasının verilmesi, florun etkisini azaltmakta ve dişleri korumaktadır. Tedavi için NaCl glikoz solüsyonlarının intravenöz uygulamaları, tetaniye karşı ise yine intravenöz kalsiyum glukonat enjeksiyonları yararlı olmakta, floru çöktürmek için % 0.15'lik  $\text{Ca(OH)}_2$  solüsyonuyla mide lavajı yapılması gerekmektedir. Kronik olgularda, parenteral yollarla sık sık kalsiyum verilmesi ve yemlere her gün hayvan başına 30 g alüminyum sülfat eklenmesi florun birikmesini % 22 oranında azaltmaktadır ( Comba, 2013). Bununla birlikte, kronik florozisin tedavisi için öneriler yine de sınırlıdır.

### **2.2.3. Florozisten Korunma**

Koruma ve kontrol amacıyla, özellikle endüstri kuruluşlarınca çevreye yayılan toz ve gaz halindeki baca artıklarının yayılmasını engelleyecek önlemler geliştirilmelidir. Bu tür artıkların en fazla görüldüğü dönemlerde hayvanlar kirlenme olasılığı bulunan alanlardan uzak tutulması, 1 ppm'den daha az flor içeren suların tüketilmesi, yüksek flor içeren sların alüminyum sülfat, kalsiyum hidroksit veya magnezyum ile muamele edilmesi gibi korunma önlemleri tavsiye edilmektedir. Florozis saptanan bölgelerde, yersularının flor

yönünden rutin analizlerinin yapılması ve sağlığa elverişli olanların kullanılması gerekmektedir (Comba, 2013).

### **2.2.4 Floroziste görev alan moleküler mekanizmalar**

Flor uygulaması ile genellikle hidroksil gruplarının bazıları ile florun yer değiştirmesi ile florhidroksilapatit [ $Ca_{10}(PO_4)_6(FOH)_2$ ] oluşmaktadır (Ergin ve Eden, 2017). Aslında ilk aşamada minenin asitlere karşı direncini arttıran bu durumda, daha sonra flor toksikasyonuna bağlı belirtiler ortaya çıkmaktadır. 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 (Güney ve ark., 2007; Agalakova ve Gusev., 2012; Yur ve ark., 2013; Yüksek ve ark., 2017). Flora bağlı toksikasyon mekanizmalarının aydınlatılması için yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

## **2.3. Apoptozis**

### **2.3.1. Apoptozisin Tanımı**

Apoptozis, vücutta ihtiyaç duyulmayan veya anormalleşmiş hücrelerden kurtulmanın normal yoludur. Apotozis nekrozdan farklı olarak belirli bir moleküler işlem düzeniyle hücrenin ölümünü sağlar. Örneğin gelişen bir embriyoda insan parmaklarının birbirinden ayrılabilmesi için parmaklar arasındaki hücreler apoptozis ile birbirlerinden uzaklaştırılır (Vaux, 1994). Apoptozis, çok hücreli organizmaların normal işleyişi ve hayatta kalması için gereklidir. Her hücre belli bir süre yaşar ve zamanı gelince ölür. Hücre ölümüyle hücre çoğalması arasında kontrollü bir denge vardır. Apoptozisin başlamasında, çeşitli nedenlere dayanan oksidatif stres önemli rol oynar (Kannan ve Jani, 2000).

Apoptotik ölüm sinyali alan hücrenin kromatini, yoğunlaşmaya başlar. Sitoplazma yoğunlaşır ve hücrenin boyutları küçülür. Hücre bir süre sonra apoptotik cisimcik denilen küçük parçalara bölünür. Parçalanan hücreye ait tüm yapıların plazma membranı ile kaplı



olduğundan immün sistemi enflamasyon yönünden uyarılması önlenir. Yeni oluşan apoptotik cisimcikler, yüzeylerinde yeni sinyal yapıları ortaya çıkarır ve bu sinyalin uyarısı ile yanındaki hücre tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır (Lipponen, 1994; Wyllie, 2004).

Apoptozis kendi içerisinde bir denge halindedir. Apoptozisin artması halinde nörodejeneratif hastalıklar, azalması halinde de kanser oluşur. Fazla otoreaktif hücrelerin ortadan kaldırılamaması sonucu otoimmün hastalıklara yol açabilmektedir (Elmore, 2007; Gewies, 2003).

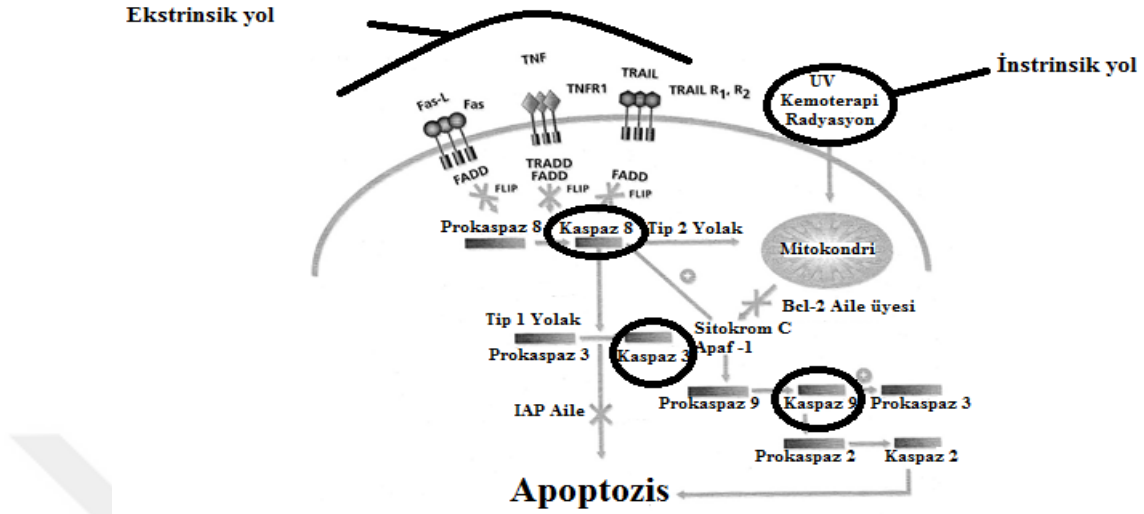
Apoptozis malign tümörlerde kendiliğinden ortaya çıkar ve genellikle tümörün büyümesini yavaşlatır. Işınlama, sitotoksik kemoterapi, ısıtma ve hormon ablasyonuna yanıt veren tümörlerde apoptozis artar (Kerr, 1994).

### **2.3.2. Apoptozis Mekanizması**

Apoptozis gerçekleşmesinde iki farklı yol mevcuttur:

- 1- İnstrinsik-Mitokondriyal yol
- 2- Ekstrinsik yol (a- Direkt, b- Dolaylı)

Kaspaz enzimleri her iki yolda da görevlidirler. İnstrinsik apoptozis yolağı hücre içi, ekstrinsik yolağı ise hücre dışı sinyaller aktiveştirir (Öktem, 2001; Danial, 2004; Kroemer ve ark., 2007) (Şekil 1).



**Şekil 1.** Apoptozis mekanizması

**İnstrinsik (Mitokondriyal) yol:** İnstrink yol ile başlayan apoptozis yolağında başlıca sorumlu organel mitokondridir. DNA’da oluşan hasar, hücre içi  $Ca^{++}$  seviyesinde artış ve hücre içi pH seviyesinde düşme gibi durumlar apoptozisi uyardıkları için mitokondrinin dış zarındaki geçirgenliği arttırarak, mitokondrinin çift membranda yer alan bazı proteinlerin (sitokrom C) sitoplazmaya çıkışına neden olur. Böylece hücreyi apoptozise götüren mekanizma aktifleştirilmiş olur (Tomatır, 2003; Elmore, 2007). Apoptotik uyarı hücre içi sinyallerle oluşuktan sonra, proapoptotik proteinlerden Bid; bir antiapoptotik protein olan Bcl-2’yi inaktive ederken, Bax ve Bak’ı aktifleştirir. Bax ve Bak aktifleşerek mitokondri membranında por oluşumunu indükleyerek zar potansiyelini değiştirir (Spierings ve ark., 2004). Böylelikle mitokondri membranındaki porlardan sitokrom-C, SMAC (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endo-G (Endonukleaz-G),  $Ca^{++}$  ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını uyarır. Sitokrom-C, oksidatif fosforilasyon için elektron taşıyır. SMAC, IAF (İnhibitör apoptotik faktör)’ü inhibe eder ve apoptozu hızlandırır. IAF’nin ortamda bulunması ise kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu engeller. AIF, çekirdeğe transloke olur ve parçalara ayırır. ENDO-G de DNA’yı parçalar. Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP’nin katılmasıyla sitozolde Apoptozom denen bir kompleks oluşturur. Apoptozom kaspaz- 9’u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9 da prokaspaz-3’ü aktif

kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur (Çoşkun ve Özgür, 2011).

**Ekstrinsik yol:** Çeşitli faktörlerle harekete geçer. Hücreler yaşamlarını devam ettirebilmek için, ekstrasellüler matriksten ve çevre hücrelerden alınan sinyallere ve önemli büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Büyüme faktörleri eksikliği ve yaşam sinyalinin azlığı nedeniyle apoptozis uyarılır ve p53 aktivasyonuna bağlı olarak apoptozis meydana gelir (Elmore, 2007).

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL) bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Bu şekilde trimerik yapı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek DISC (Death inducing signaling complex) adı verilen yapıyı oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek aktif kaspaz-8'in oluşması sağlanır. Aktif kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere 2 yolla kaspaz-3'ü aktive eder. Ya direkt kaspaz-8 kaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid'i keserek dolaylı olarak intrinsik mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Her 2 yolla da aktive olan kaspaz-3 yine CAD aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna neden olur. Sitotoksik T lenfositler aracılığı ile apoptozis tetiklenir. Bunların yanı sıra, dış etkenler (ısı, hipoksi, kanser ilaçları, ultraviyole) ve ayrıca serbest radikaller DNA hasarı oluşturarak apoptozise yol açar (Kanduc ve ark., 2000; Elmore, 2007; Coşkun ve Özgür, 2011).

Apoptozis hücrenin apoptozis ile ilgili olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle, aşağıda özetlendiği gibi başlar (Erdoğan, 2003).

1. Mitokondri/Sitokrom-C aracılıklı
2. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan aktivatör aracılıklı
3. Endoplazmik Retikulum aracılıklı

### 2.3.3. Kaspazlar

Kaspazlar, apoptozis esnasında önemli rol oynayan enzimlerdir. Kimyasal yapı olarak sistein-proteaz (Cysteine Aspartate Specific Proteases-CASPASE) grubuna dahildirler. Sentezlendiğinde inaktif olan proteinlerin aktivite göstermeleri için çeşitli yollar mevcuttur. Aktifleştikten sonra, hücresel hedeflerdeki tetrapeptit hedefleri tanıyarak, substratı bir karboksil tarafından ayırır. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücresel ve şekilsel değişimlere katılırlar. Memelilerde yaklaşık 14 adet kaspaz (Kaspaz-1 (ICE), Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2), Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama), Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICERen), Kaspaz-5 (ICERen11, TY), Kaspaz-6 (Mch2), Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1), Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH), Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6), Kaspaz-10 (Mch4), Kaspaz-11 (ICH-3), Kaspaz-12 DNA-PK, Kaspaz-13 (ERICE), Kaspaz-14 (MICE)) tanımlanmıştır (Nicholson, 1999; Ulukaya, 2007).

Kaspazlar sistein proteaz oldukları için, aspartik asitten sonraki peptit bağı kırarak inaktif proteinleri proteolitik olarak aktifleştirir ve hedef proteini keserek apoptozisi gerçekleştirir. Proteolitik aktivitelerine göre kaspazlar üç gruba ayrılır:

- Başlatıcı kaspazlar; Kaspaz 2, 8, 9, 10
- Efektör kaspazlar; Kaspaz 3, 6, 7
- İnflamatuar kaspazlar; Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14

(Adrain ve Martin, 2001; Spierings ve ark., 2004; Ulukaya, 2007).

Kaspaz 3, 6 ve 7 hücreyi parçalamaktan sorumludurlar. Başlatıcı kaspazlar olan kaspaz 8 ve 9, preteolitik kaskadı başlatırlar. Başlatıcı kaspazlar aktif hale geldiklerinde, etkileyici kaspazları ayırma ve aktif etme yeteneklerini kazanırlar (Kaufman ve Earnshaw, 2000).

Apoptozis sırasında sitokreatin 18 molekülü kaspazlarla aspartat-238 ve aspartat-396 noktasında bölünebilir. Sitokreatin 18'in aspartat 396'da bölünmüş fragmanını tanıyan antijene M30 belirteci denilir ve bu belirteç kantitatif olarak ölçülerek apoptozis hakkında

bilgi edinilebilir (Ueno ve ark., 2002). M30 immunohistokimyasal yönteminin temel prensibi; apoptotik hücreler boyanır ve sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölge tanınır. ELISA testi ile de tespit edilmektedir (Güleş ve Eren, 2008).

## **2.4. Otofaji**

### **2.4.1. Otofajinin Tanımı**

Otofaji, Yunanca kökenlidir ve 'kendini yeme' anlamına gelmektedir. İlk olarak 1963 yılında Christian de Duve tarafından sıçan karaciğer epitel hücrelerinde tespit edilmiştir. Günümüzde ise Japon bilim adamı Yoshinori Ohsumi'nin kendisine 2016 Nobel Tıp Ödülü'nün verilmesini sağlayan çalışmaları sayesinde popüler bir konu haline gelmiştir. Söz konusu araştırmacı, otofajiyi düzenleyen mekanizmaları tanımlamıştır. Otofaji, hasarlı hücrel proteinleri ve organelleri ortadan kaldıran fizyolojik bir mekanizmadır. Böylece hücre içeriği parçalanarak geri dönüştürülebilir bir duruma gelmektedir. Otofajinin başlaması ile birlikte, hasar oluşan sitoplazma organelleri bir vezikül ile kaplanır. Daha sonra prokaryot hücrelerde vakuol, ökaryot hücrelerinde ise lizozom içine alınır. Otofaji açlık, düşük oksijen seviyeleri ve büyüme faktörü yetersizliği gibi bazı olumsuz koşullar altında tetikler. Ayrıca fizyolojik şartlarda da bazal bir seviyede meydana gelir. Bu koşullar altında otofaji, sitoplazmik içerikleri geri dönüştürerek hücrel homeostazı korumaya yardımcı olan bir sitoprotektif program olarak görev yapar. Bu tür otofaji, seçici olmayan (non-selektif) otofaji olarak adlandırılır (Liman ve Suna, 2017).

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanması şeklinde seyretmektedir. Kısa ömürlü proteinler, ubiquitin-proteozom sisteminde parçalanır. Bunun yanı sıra uzun ömürlü proteinler ile hücre içi organellerin parçalanması, otofajik sistemde gerçekleşir. Sonuçta oluşan aminoasit gibi yapı taşları yeniden hücrede kullanılabilirler (Öz-Arslan ve ark, 2011).

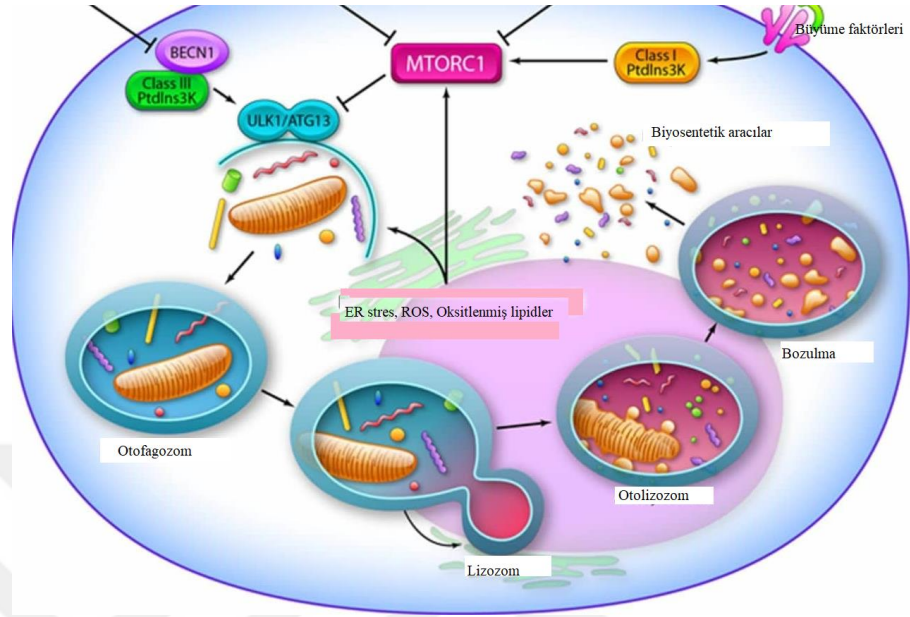
Otofaji mekanizması ile besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümü sağlanmaktadır. Otofaji ile stres ortamına uyumu sağlanarak hücre homeostazisi devam ettirilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmaların sonucunda, otofajik metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminin bir parçası olduğu ortaya konulmuştur. Bununla birlikte hasara uğramış olan ve patojenlere maruz kalmış olan hücrelerin de yıkımında rol oynadığı ortaya konulmuştur. Ayrıca bu araştırmalara sonucunda, otofajinin pek çok hastalıkların (kanser, enfeksiyon, nörodejeneratif) ve önemli sağlık sorunlarının ortaya çıkmasında da etkili olduğu gösterilmiştir (Öz-Arslan ve ark, 2011).

**Otofaji üç farklı yol ile gerçekleşir:** Makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılıklı otofaji.

**Makrotofaji**, genelde bazal düzeyde olur. Protein parçalarının ve hasar görmüş organellerin parçalanması bu yolla gerçekleşir.

**Mikrotofaji**, lizozom membranı içe doğru çöker. Sitoplazmanın parçalanması bu şekildedir. Lizozom sitoplazmayı bu şekilde içine alarak içeriği sindirilir.

**Şaperon aracılıklı otofaji**, KFERQ proteinlerinin lizozom zarına selektif olarak taşınması ile olur (Öz-Arslan ve ark, 2011).



**Şekil 2.** Otofaji mekanizması (Anonim 2)

## 2.5. Nekroz

### 2.5.1. Nekrozun Tanımı

Canlı organizmada doku ve organellerin lokal ve ani olarak ölümüne nekroz denir. Nekroz, rastgele gelişen, genler tarafından kontrol edilemeyen düzensiz bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir (hipoksidir, toksik maddeler ve ağır metal toksikasyonu vs.) (Coşkun ve Özgür, 2011).

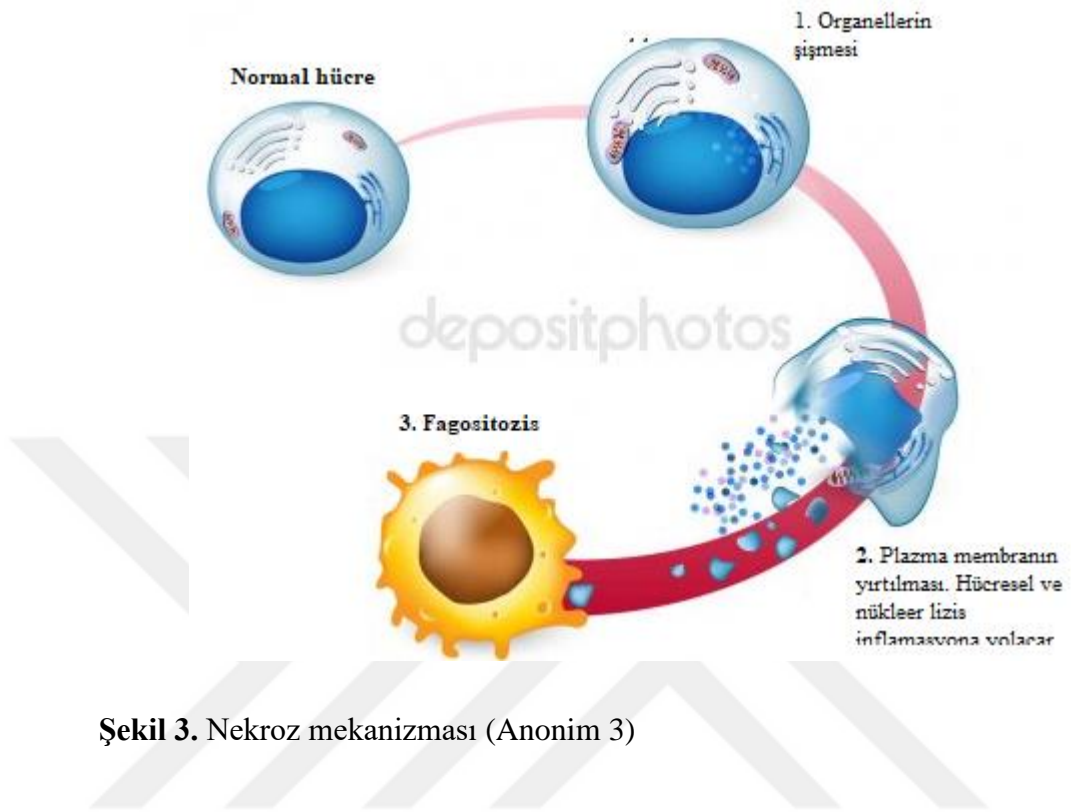
### 2.5.2. Nekrozun Mekanizması

Nekroz sırasında mitokondriyal ROS üretimi artar. Apoptotik olmayan proteazlar aktive hale gelir. ATP üretimi azalır ve  $Ca^{++}$  kanalları açılır. Dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılar (ısı, yanma, toksik maddeler) hücrenin iyon dengesini bozar. ATP noksanlığı iyon pompası yetersizliğine neden olur. Hücrenin sıvı almaya başlaması ile organeller şişer. Plazmanın membran bütünlüğü bozulduğu için ozmotik basınç artar ve hücre patlar (Coşkun ve Özgür, 2011).

Hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması yüzünden yangı (enflamasyon, iltihaplanma) olayı gerçekleşir. Bu olay sonucunda karakteristik olarak, makrofaj ve nötrofiller nekrotik dokuya göç eder. Göç eden bu hücreler nekrotik dokuyu fagosite ettikleri için, enflamasyon nekrozun önemli bir işareti sayılmaktadır. Fas, TNF reseptörlerinin aktivasyonu veya hücrel stres sonucu RIP1 ve RIP3 (Receptor interacting proteinler) aktive olur. RIP1 ve RIP3 mitokondriyi ya direkt aktive eder ya da NADPH oksidazın oluşturduğu ROS ile indirekt olarak etkileyip nekrozu indükler. Nekrotik uyarı ayrıca PARP'i aktive eder. PARP1 de kalpain aktivasyonu, RIP kinazların aktivasyonu ya da PAR polimerazlar yoluyla nekroza neden olur. PAR polimeraz ve kalpain, AIF salınımını sağlayarak nekrotik hücreleri indüklerler. Kalpain,  $Ca^{++}$  ile aktive olan kaspaz proteaz ailesi üyesidir ve lizozomal enzim salınımına neden olan kathepsin aktivasyonuna katkıda bulunur. Bcl-2 ailesinin bir diğer proteini olan BNIP, direkt olarak mitokondriyal por oluşumunu aktive eder (Coşkun ve Özgür, 2011).

Mitokondriyal porlar, aşırı ROS ve  $Ca^{++}$  üretiminde açılan geniş kanallardır. Bcl-2 ailesi proteini Nix ise endoplazmik retikülünden  $Ca^{++}$  salınımına neden olur. Kalsiyum, endoplazmik retikülüne yakın olan mitokondri matriksine geçer ve mitokondriyal porların açılmasına neden olur. RIP kinazlar da ROS üretimini elektron transport zinciri yoluyla sağlarlar. Aşırı  $Ca^{++}$  ve ROS artışı porun uzun süre açık kalmasına neden olduğu için hücre oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretmez hale gelir ve azalan ATP nekrozun gerçekleşmesinde çok önemlidir (Coşkun ve Özgür, 2011).





**Şekil 3.** Nekroz mekanizması (Anonim 3)

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın hücre kültürü ve biyokimyasal analiz aşamaları, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Hücre Materyali

Çalışmanın hücre materyali olarak, NRK-52E Renal epiteliyal hücre serisi kullanıldı.

**Tablo 1.** NRK-52E Hücre dizisinin genel özellikleri

<b>Organizma</b>	<b>Sıçan</b>
<b>Doku</b>	Böbrek epiteliyal
<b>Morfoloji</b>	Düzensiz şekilli, genellikle yuvarlak
<b>Yüzey tutulumu</b>	Yapışan hücreler
<b>Tümörojenik</b>	Hayır
<b>Besi yeri</b>	DMEM high glukoz, %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin
<b>Besi yeri yenileme süresi</b>	Haftada 2-3 defa
<b>Pasaj metodu</b>	0.25% tripsin, 0.02% EDTA
<b>Ayırma oranı</b>	1:3-1:4
<b>Biyogüvenlik düzeyi</b>	1

##### 3.1.2. Kullanılan Alet ve Malzemeler

Azot tankı (MRC- 40 Lt)

Buzdolabı (+4 C, Profilo marka)

Cam tüp

Derin dondurucu (-20 °C, İndesit marka)

Derin dondurucu (-80°C, Sanyo marka)

Distile su cihazı (Merck Millipore Direct-Q 3 UV)  
ELISA cihazı (Anthos-Zenith-200 rt)  
Ependorf tüp (Ependorf-683965)  
Flask (75 cm<sup>2</sup>) (SPL marka)  
Flask (25 cm<sup>2</sup>) (SPL marka)  
Hassas terazi (Radwag-220.R2)  
Kriyoviyal tüpler  
Laminar kabin (Biobasafety cabinet BSC-L300 marka)  
İnverted (ters) Mikroskop (Nikon ECLİPSE TS100 marka)  
İnkübatör (ESCO Cell Culture CO2 Incubator)  
Karıştırıcı -Vorteks (Yellowline TTS 2)  
Kültür Plakları (12 ve 96'lık) (Costar 3599 marka)  
Kronometre (Elabscience marka)  
Otomatik pipetler (50, 100, 250, 500, 1000, Eppendorf, Almanya)  
Otomatik pipet uçları (mavi, sarı, beyaz)  
Portüp  
Soğutmalı santrifüj (Universal 320R marka)  
Su Banyosu (MRC, WBO-100 marka)  
Thoma lamı (Neubour Hemetocytometer)  
RT-PCR (Qiagen)

### **3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler**

At serum (Capricorn Scientific Cat No: HOS-1A)  
Besi yeri (DMEM high glukoz, %5 FBS, %10 At serum, %1 L-Glutamin, %1 Penisilin/Streptomisin ve %0.0125 gentamisin)  
Dimetilsulfoksit (DMSO) (AppliChem Panreac A3672,0250)  
Distile su  
FBS (Capricorn Scientific Cat No: FBS-12B)  
Fosfat Tuz Tamponu (PBS) (pH: 7,4) Sigma-P4417 (Ca<sup>++</sup> ve Mg<sup>++</sup> içermeyen)  
Hidroklorik asit HCl (LIQUID)

İzopropil alkol (BRTR)  
L-Glutamin (Capricorn Scientific 200mM 100ml Cat No: GLN-B)  
Sodyum florür (Sigma)  
Penisilin-Streptomisin (Capricorn Scientific (100x) Cat No: PS-B)  
Poly-D-Lysine (Sigma Aldrich P8920)  
RPMI 1640 (Capricorn Scientific Cat No: RPMI-XA)  
Sterilizasyon amaçlı Etil Alkol (%75'lik)  
Tripsin-EDTA (%0,25-%0,1) (TRY-1B)  
Triton X-100 C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>(n=9-10) (Sigma-Aldrich)

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Hücre Kültürü**

NRK-52E-renal epiteliyal hücre serisi *in vitro* koşullarda düzenli pasajları yapılarak (% 5 FBS, % 10 host serum, %1 L-Glutamin, %1 penisilin/streptomisin DMEM high glukoz, % 5CO<sub>2</sub> ve % 95, 37°C inkübasyon) yetiştirildi.

### **3.2.2. Hücre Pasajlama**

NRK-52E-renal epiteliyal hücre serisi, hücre yoğunluğu flask içerisinde % 70-80 sıklığa (confluency) ulaşıncaya pasajlanmıştır. Pasaj işlemi Tripsin-EDTA (% 0,25-% 0,1) kullanılarak pasajlandı.

### **3.2.3. Sodyum florür (NaF) çözeltilerinin hazırlanması**

Çalışmada uygulanacak uygun dozların ve çözünme ortamlarını belirlemek için NaF dozları referans alınarak stok solüsyonlar hazırlandı. NaF'ün final konsantrasyonları 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 5000, 7500, 10000 ve 20000 µM olacak şekilde kullanıldı ve hücre serisinin kendi medyum ortamı içinde konsantrasyonları hazırlandı (Wei ve ark., 2014; Yüksek ve ark., 2017)

### 3.2.4. Liziz Solüsyonun Hazırlanması

100 µl liziz solüsyonu şöyle hazırlandı:

89 µl izopropil alkol + 1 µl triton x-100 + 10 µl 0,1 N hidroklorik asit hazırlandı.

### 3.2.5. Sitotoksosite (MTT hücre canlılık) Testi

NaF yarı maksimum inhibisyon konsantrasyon (IC) değerini belirlemek için yapılan MTT testi aşağıdaki gibi özetlendi:

- Uygun koşullarda çoğalan hücreler flask yüzeyini %80 oranında kaplayınca, Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırıldı.
- Santrifüj (1200 rpm, 5 dakika) sonrasında hücreler Thoma lamında sayıldı.
- 96 kuyucuklu kültür plakın her bir kuyucuğuna 10.000 hücre ekildi.
- Hücreler (24 saat, 37°C, CO<sub>2</sub>) inkübatörde inkübe edildi.
- Daha sonra, üstteki besi yeri alındı ve deneme grupları, her doz için en az 3 kuyucuk olacak şekilde hazırlandı.
- Kuyucuk başına 100 µl medyum olmak üzere, farklı dozlarda NaF eklendi. 3, 12 ve 24 saat sonra her bir kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu ilave edildi.
- Kültür kapları formazan kristallerinin oluşması için (4 saat 37°C, CO<sub>2</sub>) inkübe edildi. Formazan kristallerinin çözülmesi için, her bir kuyucuğa 100 µl MTT liziz solüsyonu eklendi ve pipetlendi.
- Hücrelerin optik yoğunlukları ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutuldu.
- IC<sub>50</sub> değeri belirlendi.

### 3.2.6. Biyokimyasal Analizler

#### Total RNA ve cDNA İzolasyonu

NaF'ın IC<sub>50</sub> toksik değerinin NaF'ın toksisitesini azaltacağı konsantrasyon aralığı saptandıktan sonra, belirlenen değerlerde meydana gelen sitotoksitenin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması amacıyla önceden belirlenen ve farklı fenotipik mekanizmalara ait majör genlerin ekspresyonları saptandı. Bu amaçla, belirlenen toksisite

konsatrasyonlarında, NaF uygulanan hücrelerde ticari olarak temin edilen kit protokolüne göre total RNA ve ardından cDNA izolasyonu yapıldı.

### **Gerçek Zamanlı PZR**

Apoptosis mekanizması için (Bax, Bad, Bak1, kaspaz 3, 8, 9), otofaji mekanizması için (Atg 3, 5, Becn1, pG2 (SQSTM1), LC3-I, LC3-II) ve nekrotik yolak için ise (RIP 1 ve RIP 3) genlerinin ekspresyonları araştırıldı. Ekspresyon analizlerinde kontrol geni olarak glikoz 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. Her bir örnek için 3 tekrarlı Gerçek Zamanlı PZR yapıldı ve bir CT (cycle treshold) amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcı itibariyle belirlendi. Ekspresyon analizlerinde  $\Delta\Delta C_t$  formülasyonu kullanıldı.

#### ***Adım I: RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi***

- Üreticinin talimatlarına göre, RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Germantown, MD) kullanılarak, toplam RNA altı adet 5 µm kesit formalinle sabitlenmiş parafine gömülü (FFPE) numunesinden izole edildi.
- Daha sonra, toplam RNA kalitesi ve miktarı spektrofotometrik yöntem (Anthos-Zenyth) kullanılarak kontrol edildi.
- Daha sonra cDNA'lar RT2 First Strand cDNA kiti (SABiosciences, Frederick, MD) kullanılarak sentezlendi.
- Bu Labcycler Termal Cycler (SenSoquest) içinde toplam RNA 2 µg ters transkripsiyon gerçekleştirmek için tüm örnekler için kullanıldı (RT-qPZR analizi için, seyreltilmiş cDNA bir şablon olarak kullanılmıştır).

#### ***Adım II: Kantitatif RT-qPCR***

- Bir RT2 PZR Mastermix (Kat. No. 330500) (Qiagen, Germantown, MD) ile kombinasyon halinde cDNA, RT-qPZR primer analizleri için kullanıldı.
- RT-qPCR bir Rotor-Disc 72 diskinde, reaksiyon hacimleri 25 ° C'de 40 dakika 95 ° C 2 dakika, 15 dakika 94 ° C, Qiagen Rotorgen içinde 30 saniye 60 ° C'de kullanılan reaksiyon hacimleri ile gerçekleştirildi (Qiagen, Hilden).

- Tepkime karışımı 12.5 µL SYBR Green Master, her bir primerden 1 µL (ileri ve geri primeri), 6,5 µL DNase/RNase içermeyen damıtılmış su ve 5 µL cDNA şablonunu içermektedir.
- Tüm primerler için referans dizi numaraları GenBank'tan elde edildi ve Tablo 1'de gösterildi (sıçanlar için üretilen genler) (Qiagen SABiosciences USA).
- Ct değerleri bir Excel dosyasına aktarıldı, bir Ct değerleri tablosu oluşturuldu ve tablo <http://www.qiagen.com/geneglobe> adresindeki veri analizi web aracına yüklendi.
- Numuneler saatlere göre sınıflandırıldı ve etiketlendi.
- Elde edilen referans genler, elde edilen Ct değerlerini normalleştirmek için kullanıldı.
- Çevrimiçi araç, katlama/düzenlemeyi (fold-change/regulation) hesaplamak için  $\Delta\Delta Ct$  yöntemi kullanıldı.
- Kat değişimi, aşağıdaki formülü kullanarak değerlendirildi:  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ . Veri analizi raporu, GeneGlobe'deki QIAGEN web portalından ihraç edildi.

### **Fold-change (katlama-değişim)**

- Katlama değişimi ( $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ), test örneğindeki normalize gen ekspresyonunun ( $2^{(-Ct)}$ ) kontrol örneğindeki normalleştirilmiş gen ekspresyonu ( $2^{(-\Delta Ct)}$ ) üzerine oranıdır.
- Diğer taraftan katlama düzenlemesi, kat değişim sonuçlarının biyolojik olarak anlamlı bir şekilde temsilidir. Özetle, katlama düzenlemesi, katlama değerinin birinden büyük olduğu, pozitif veya yukarı regülasyon durumlarında kat değişimine eşittir.
- Tersine, kat değişimi bir negatif veya aşağı regülasyonun göstergesi olan birinden daha az olduğunda, katlama düzenlemesi  $(-1/(\text{kat değişimi}))$  değerine eşittir.
- Kontrol grubundaki her bir genden elde edilen  $2^{(-\Delta Ct)}$  değerler ile hasta grubundakiler arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için Student t-testi kullanıldı ve p değerleri buna göre hesaplandı.

### **3.2.7. İstatistiksel Analiz**

RT-PCR verileri, Gen Globe Veri Analiz Merkezi (Qiagen) kullanılarak analiz edildi. BCt yöntemine dayanan ham veriler, GAPDH kontrol geni kullanılarak normalize edildi. Katlama değişim değerleri  $\leq 2$  yukarı veya aşağı düzenleme (up-regulation, down-

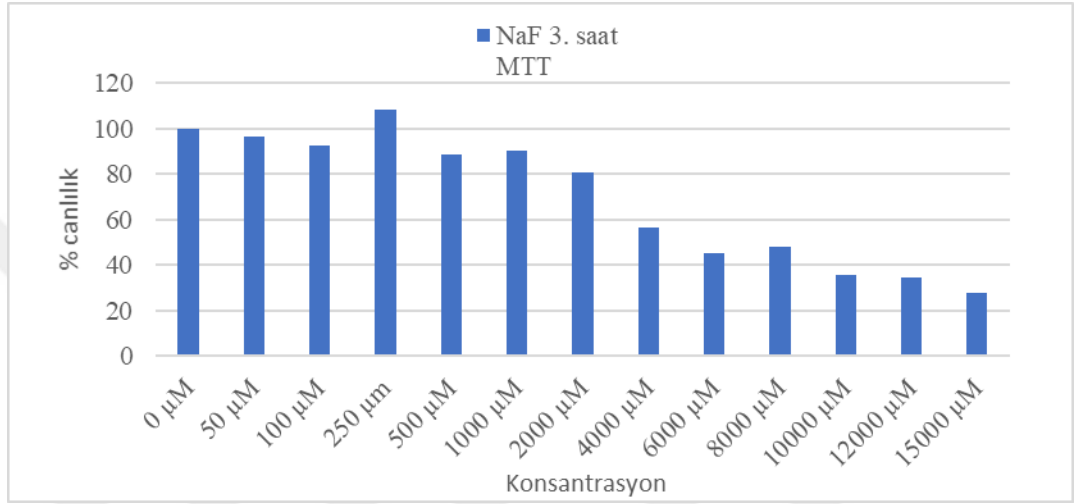
regulation) olarak kabul edildi. Sürekli verilerin karşılaştırması, gerektiğinde eşleştirilmiş veya eşleştirilmemiş Student t-testi kullanılarak gerçekleştirildi. 0.05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



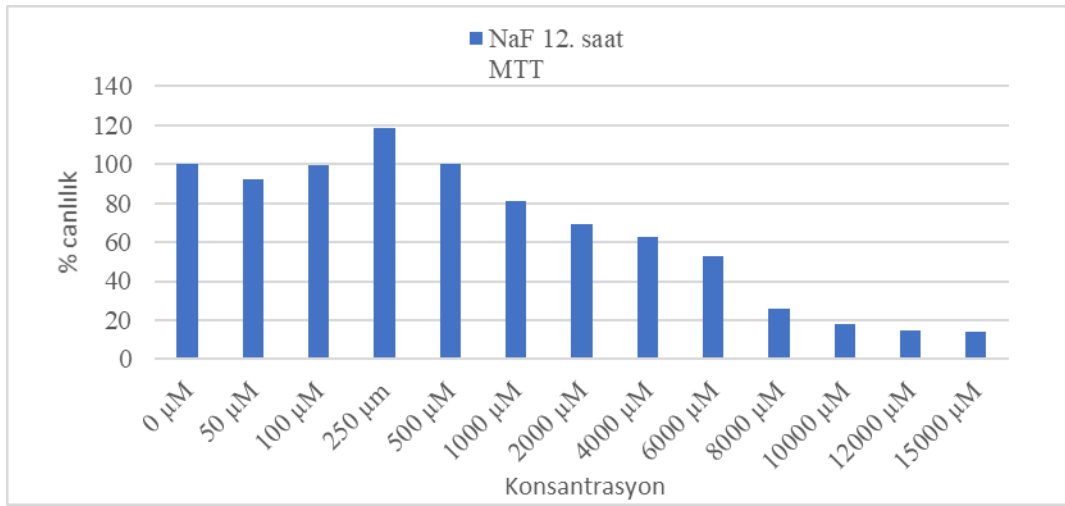


#### 4. BULGULAR

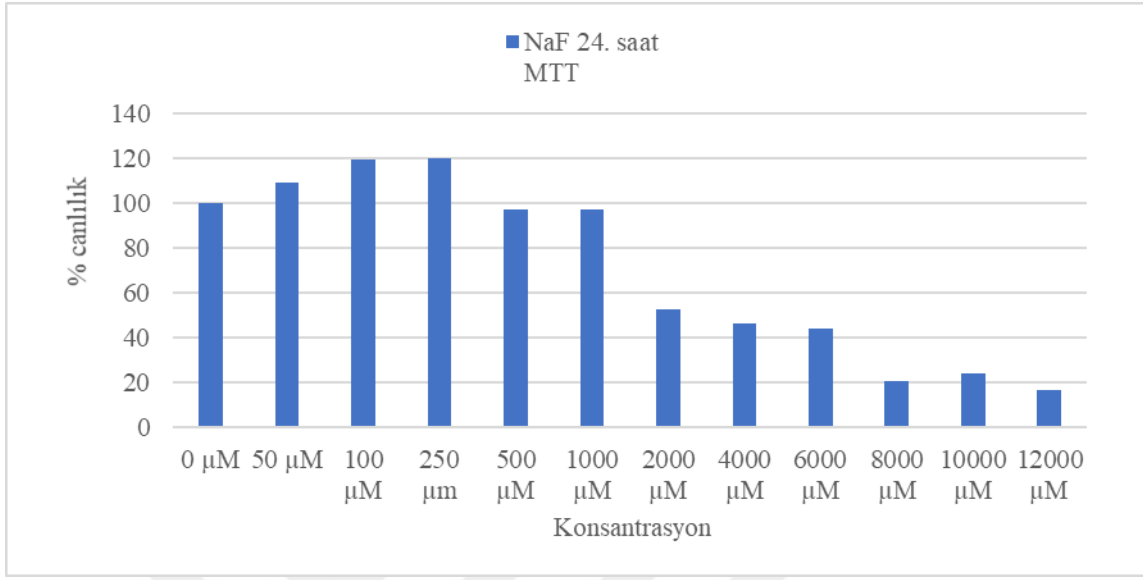
Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi ile elde edilen sonuçlar tablo olarak sunulmuştur (Tablo 2, 3, 4). Ayrıca şekil olarak da verilmiştir (Şekil 4, 5, 6, 7, 8, 9).



Şekil 4. 3.Saat MTT Sonuçları



Şekil 5. 12. Saat MTT Sonuçları



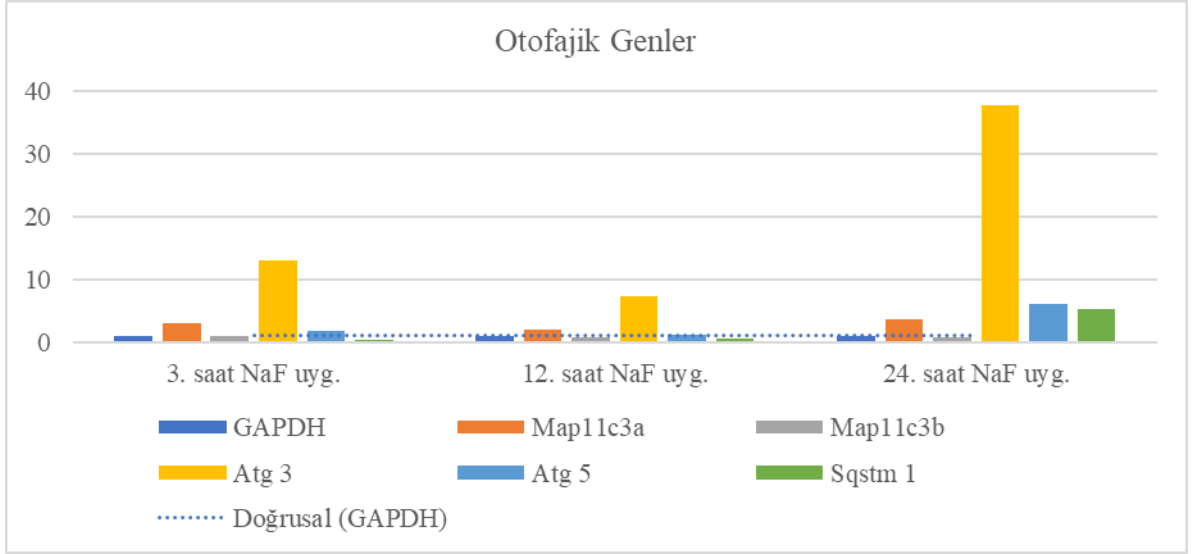
**Şekil 6.** 24. Saat MTT Sonuçları

**Tablo 2.** Otofajik genlerin NaF IC<sub>50</sub> uygulandıktan sonra saate göre ekspresyonları

	3. saat	12. saat	24. saat
GAPDH	1	1	1
Map11c3a	3	1,98	3,63
Map11c3b	1,01	0,84	0,83
Atg 3	13,06	7,23	37,88
Atg 5	1,79	1,1	6,02
Sqstm 1	0,37	0,54	5,3
Becn1	1,19	0,6	2,51

Map11c3a; 3 ve 24. Saatler arasında önemli bir fark olmadığı, 3 kattan fazla, 12. saatte ise diğer saatlere azalma olmakla beraber 2 kata yakın fazla ekspresyon olduğu görüldü. Map11c3b; zamana bağlı olarak ve kontrol genine göre farklılık saptanmadı. Atg 3; 3. Saat itibariyle ekspresyonun arttığı, 12. Saatte azalmakla beraber yine de 7 kat arttığı, 24. Saatte ise 38 kat kadar bir ekspresyon olduğu belirlendi. Atg 5; saate bağlı olarak özellikle 24. Saatte 6 kat bir artış belirlendi. Sqstm 1; 3 ve 12. Saatlerde ekspresyonda

yarıya yakın bir azalma saptanırken, 24. Saatte 10 kattan fazla artış tespit edildi. Bak1, ise 1.7 kat artış olduğu görüldü.



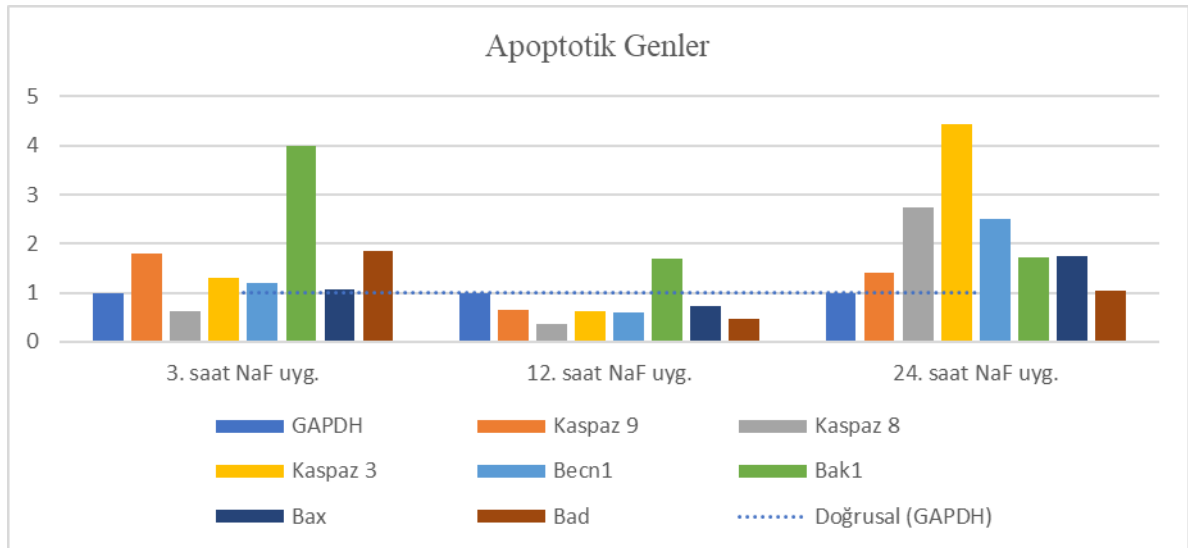
**Şekil 7.** Otofajik genlerin kontrol genine göre ekspresyon durumları

Otofajik genlerin saate bağlı olarak artan şekilde up-regule olduğu tespit edildi. En fazla artışın Atg3 geninde gerçekleştiği tespit edildi.

**Tablo 3.** Apoptotik genlerin NaF IC<sub>50</sub> uygulandıktan sonra saate göre ekspresyonları

	3. saat	12. saat	24. saat
GAPDH	1	1	1
Kaspaz 9	1,8	0,64	1,4
Kaspaz 8	0,63	0,37	2,75
Kaspaz 3	1,3	0,63	4,44
Bak1	4	1,7	1,72
Bax	1,06	0,72	1,75
Bad	1,84	0,46	1,03

Üçüncü saatte en fazla artış Bak1, 24. Saatte ise kaspaz 3 geninde saptandı. Kaspaz 9; 3 ve 24. Saatlerde 1,4 ve 1,8 kat artarken, 12. Saatte yarıya yakın bir azalma olduğu görüldü. Kaspaz 8; 3 ve 12. Saatlerde azalma olurken, 24. Saatte 3 kata yakın bir artış oldu. Kaspaz 3; 12. Saatte yarıya yakın bir azalma, 24. Saatte 4 kattan fazla bir artış gösterildi. Bax ve Bad genlerinde kaspazlarda olduğu gibi, 12. Saatte kontrol genine göre azalma olduğu görüldü. Saate bağlı olarak apoptotik genlerin farklı tepkiler verdiği dikkat çekmektedir.

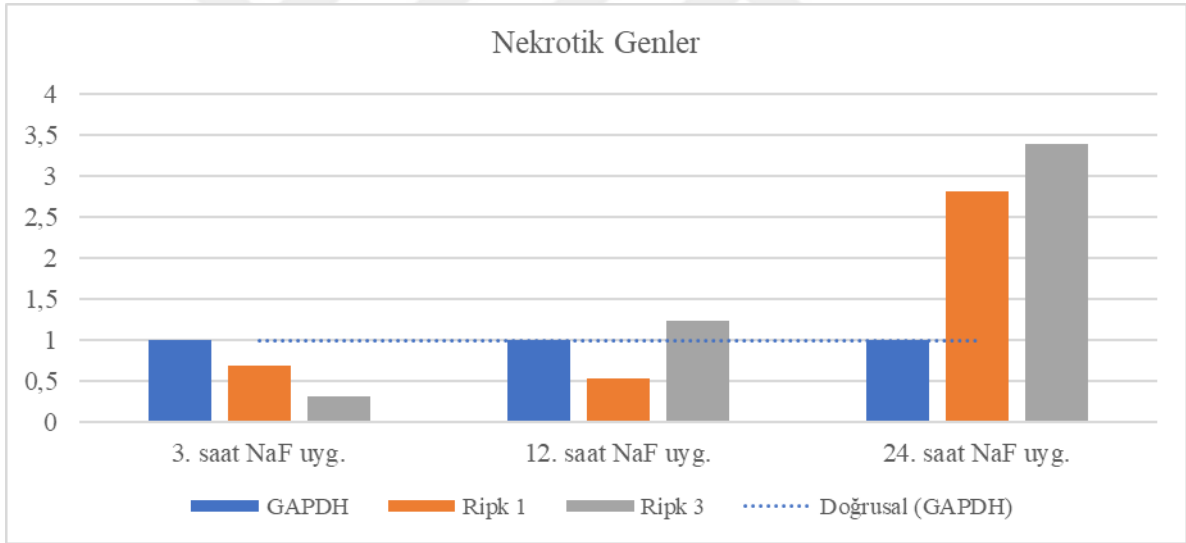


**Şekil 8.** Apoptotik genlerin kontrol genine göre ekspresyon durumları

**Tablo 4.** Nekrotik genlerin NaF IC<sub>50</sub> uygulandıktan sonra saate göre ekspresyonları

	3. saat	12. saat	24. saat
GAPDH	1	1	1
Ripk 1	0,69	0,53	2,82
Ripk 3	0,32	1,23	3,4

Ripk 1; 3 ve 4. Saatlerde yarıya yakın bir azalma olurken, 24. Saatte 3 kata yakın bir artış oldu. Ripk 3; 3. Saatte azalma olurken, 12. Saatte önemsiz bir artış, 24. Saatte ise 3 kattan fazla bir olduğu belirlendi. Nekrotik genlerin 24. Saatte daha etkili olduğu görüldü.



**Şekil 9.** Nekrotik genlerin kontrol genine göre ekspresyon durumları

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünyada ve ülkemizde epidemiyolojik olarak rastlanan flor toksikasyonuna; günümüzde pek çok alanda flor maruziyeti yaşanmasından dolayı, her yerde görülmesi muhtemeldir. Florun organizmanın gelişimini ve işlevlerini, farklı mekanizmalarla olumsuz yönde etkilediği de bilinmektedir (Kuang ve ark., 2018). Florun nörotoksisitedeki rolünün, kan-beyin bariyerinden geçerek, beyinde birikebilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Apoptozun florun nörotoksisitesinde hayati bir rol oynadığı öne sürülmüştür (Tu ve ark, 2018).

Yüksek düzeyde flor maruziyetine bağlı olarak hücresel düzeyden başlamak üzere doku ve organ harabiyetlerine neden olmaktadır. Bu hasarın özellikle moleküler temeli üzerinde pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu konuda gerek hücresel gerekse deneysel olarak araştırmalar planlanmaktadır. Özellikle flora bağımlı olarak ortaya çıkan hücre ölümlerinde apoptotik, otofajik ve nekrotik yollarda yer alan parametreler dikkat çekmektedir.

Aşırı flor alımının böbrek lezyonlarına neden olabileceği bildirilmiştir. Bununla birlikte, patogenezi hala daha az anlaşılmaktadır. Farelerde oksidatif hasarı ve oksidatif hasar ile renal lezyonlar arasındaki ilişkilerin araştırıldığı bir çalışmada, florun renal oksidatif hasara yol açtığını, renal fonksiyon parametrelerinin değişmesiyle uyumlu olan tübüler hücrelerin dejenerasyonuna ve nekrozuna, renal tübüler hiyalin atımlarına ve glomeruli şişmesine neden olduğu bildirilmiştir (Luo ve ark, 2017a).

Flor intoksikasyonun erken aşamalarında, karaciğer enzim aktivitelerinde bazı değişikliklerin ve ardından renal hasarın olabileceği bildirilmektedir (Perera ve ark, 2018). Quadri ve ark. (2018), florun bir şekilde böbrek patogenezinin yol açabilen renal anatomiye ve fizyolojiye müdahale etmenin yanı sıra, hücre şişmesi ve lizisi, sitoplazmik vakumlama, nükleer kondensasyon, apoptoz ve nekroz gibi tübüler epitel mimarisi üzerine çeşitli derecelerde hasarlara yol açtığını gözlemişlerdir.

Luo ve ark. (2017b), florun farelerde neden olduğu oksidatif hasarı ve oksidatif hasar ile renal lezyonlar arasındaki ilişkilerini araştırdıkları çalışmada, florun renal oksidatif hasara yol açtığını, renal fonksiyon parametrelerinin değişmesiyle uyumlu olan

tübüler hücrelerin dejenerasyonuna ve nekrozuna, renal tübüler hiyalin oluşumu ve glomeruli şişmesine neden olduğunu bildirmişlerdir.

Aynı şekilde bir başka çalışmada, deneysel olarak NaF-intoksikasyonu yapılan ratlarda böbrek kesitleri üzerinde yapılan histolojik çalışmada, flor uygulanmasının fokal nekroz olmak üzere farklı derecelerde hücresel yıkıma neden olduğu gösterilmiştir (Alhusaini ve ark, 2018).

Flor aynı zamanda karaciğer dokusunda da portal enflamasyon ve fokal nekroza neden olmaktadır. Hepatik hücrelerin nekrozu ve hepatik dokulardaki portal inflamasyon uygulanan florun dozu ve uygulanma süresiyle orantılı olarak artmaktadır. Flor maruziyetinde hepatosit ve karaciğer fonksiyonunun bozulmasına dair veriler, aynı zamanda serum AST, ALT ve ALP aktivitesinin artması ile de desteklenmektedir (Perera ve ark, 2018).

Perera ve ark. (2018), daha uzun uygulama süreleri ve daha yüksek flor uygulanması ile böbrek hasarını indüklenme olasılığı olduğunu göstermişlerdir. Ancak flora bağlı hücre hasarının karaciğerde daha erken dönemde ortaya çıktığı bildirilmektedir.

NaF'un, renal histopatolojik lezyonları ve nükleer faktör-kappa B (NF- $\kappa$ B) sinyal yolunun aktivasyonu ve anti-enflamatuar sitokinlerin ekspresyonunun azaltılması yoluyla enflamatuar yanıtları indüklediğini gösterilmiştir (Luo ve ark, 2017a).

Bu tez çalışmasında, farklı doz ve sürelerde NaF uygulanan NRK-52 renal epiteliyal hücre hattında tespit edilen hücre ölümlerinin moleküler temelini ortaya koymak amacıyla, farklı hücre ölüm mekanizmalarını temsilen genler seçilmiştir. Bu genlerin RT-PCR ile ekspresyonları belirlenmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Buna göre, 3. saatte görülen sitotoksitenin nedenleri olarak; hücrelerin intrinsik apoptotik yolağı kullanarak apoptoza girdikleri görülmüştür. Ancak apoptoz öncesi bir miktar otofaji, hatta mitofajinin ilerlemiş olduğu, ancak tamamlanamadığı saptanmıştır. Bu yolun tamamlanamamasını takiben, intrinsik apoptotik yolağın devreye girdiği, dış yolak olan reseptör yolak kullanılmadan kaspaz 9 üzerinden ölümün başlamış olduğu tespit edilmiştir.

On ikinci saatte görülen hücre ölümlerinde tamamen otofajik yolağın tesirli olduğu tespit edilmekle birlikte, 24. saatte, otofajide duramayan hücrelerde ölüm sinyalleri verilmiş ve hücrelerde nekrotik sinyalin kuvvetli olduğu görülmüştür. Ama hücreler dinlenmek için otofaji denemişlerse de, apoptoza girerek hücre ölümünün tamamlandığı tespit edilmiştir.

Apoptozis; genetik olarak hücre ölümünü, nekroz gibi diğer hücre ölüm mekanizmalarından farklı karakteristik özelliklere sahip geri dönüşsüz hücre yaşlanma sürecini programlamıştır (Ribeiro ve ark, 2017).

Son yıllarda, kanser gibi kronik dejeneratif hastalıkların zaman seyrini takiben önemli bir rol oynadığının belirlenmesi nedeniyle, apoptozis bilimsel literatürde kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Bu nedenle, çeşitli araştırmacılar apoptotik sürece hangi kimyasal ajanların karışabildiğini tespit etmek için uğraşmaktadırlar (Ribeiro ve ark, 2017).

Xu ve ark. (2014), MC3T3-E1 hücre hattında fazla florun apoptozu uyarabildiğini, sadece hücre proliferasyonunu inhibe etmekle kalmayıp, hücre içi reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırdığını da bildirmişlerdir. Flor zamana bağımlı bir şekilde, ZIP1 ifadesini arttırarak, PI3K/AKT yolağının aktivasyonuna da neden olmaktadır.

*In vitro* olarak rat ameloblastlarında NaF uygulanmasının doza bağlı olarak ameloblast aktivitesini inhibe ettiği, bu durumun da erken evre apoptozun aktive edilmesinden kaynakladığı bildirilmektedir. Aynı çalışmada apoptozisin endoplazmik retikulum stres aracılığı ile de gerçekleştiği ortaya konulmuştur (Ying ve ark., 2014).

Florun toksisitesinde esas olarak apoptozisin indüksiyonu rol almaktadır (Wei ve ark, 2014). Sodyum florür kaynaklı akut renal yıkımın araştırıldığı çalışmada, Bax proteinlerinin ifadeleri yukarı doğru düzenlenirken, Bcl-2 ve NF-E2-ilişkili faktör 2 (Nrf2) proteinleri ifadeleri daha az düzenlendiği ve DNA fragmentasyonunun da güçlendirildiği saptanmıştır (Alhusaini ve ark, 2018). Flor maruziyetinin, hücre yüzeyi ölüm reseptörü Fas düzeylerinde sitoplazmik sitokrom c ile paralel bir artışla, hem ekstrinsik hem de intrinsik yollar üzerinden apoptoziste önemli yükselmelere yol açtığı gösterilmiştir (Zhang ve



ark., 2016). Florun *in vivo* ve *in vitro* sistemlerde, memeli hücrelerinde hem intrinsik hem de ekstrinsik yollardan apoptozisi indükleyebildiğini gösterilmiştir (Ribeiro ve ark., 2017).

Yüksek doz flor uygulanmasının neden olduğu hasarın moleküler temelini araştırdığı çalışmalarda, farklı doku ve hücreler kullanılmıştır. NaF maruziyeti reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına neden olduğu için, tek başına akut NaF alımıyla sıçanlarda karaciğer ve bronş hasarı oluşmaktadır (Sana ve ark., 2017). Yüksek doz flor, ameloblastlarda endoplazmik retikulum (ER) stresi ve oksidatif stresi indüklemektedir. Hücre stresi, gen baskı, mitokondriyal hasar ve apoptozu indüklemekte, anti-apoptotik Bcl2/Bax oranı, önemli ölçüde artmaktadır (Suzuki ve ark., 2017).

Flor kaynaklı osteoblast apoptozisinin potansiyel yollarının ve moleküler özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, Bim, kaspaz 9, kaspaz 14, Bcl2 ve Bax ekspresyonunun sodyum florür dozları ile arttığı, kaspaz 3'ün ekspresyonunun doza bağlı olarak değiştiği, kaspaz 7 ekspresyonunun etkilenmediği, ancak kaspaz 10, artan sodyum flor dozları ile azaldığı anlaşılmıştır. Bu hücre tipinde flor kaynaklı apoptozun, mitokondriyal yoldan (endoplazmik retikulum stres yolu dahil) ve ölüm reseptör yolundan olabileceği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2015).

Zhang ve ark., (2015), flor uygulanan iskelet kası hücresi (C2C12 cell) modelinde hücrelerin hayatta kalma oranlarının giderek artan flor dozlarıyla yavaş yavaş azaldığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, PI3K, BAD, Bcl-2, Bax ve kaspaz-9'daki mRNA'nın ekspresyonu, flor grubunda belirgin bir şekilde artmışken, PDK1 ve P-AKT1 ekspresyonu belirgin olarak azaldığı, sonuç olarak, C2C12 hücrelerinde flor kaynaklı apoptozun, PI3K / AKT sinyal yoluna bağlı olduğu ortaya konulmuştur.

İskelet kası hücrelerinde (C2C12 hücreleri) mitokondri aracılı yolak yoluyla, aşırı flor kaynaklı apoptozis mekanizmalarını araştırmak için tasarlanan başka bir çalışmada, hücreler 48 saat süreyle farklı konsantrasyonlara maruz bırakılmış, Bax, Bcl-2, sitokrom c, kaspaz-3 ve kaspaz-9'un ifade seviyelerinin, flor muamelesinden sonra arttığı, aktif kaspazların kaskad apoptosis sürecini bir mitokondri aracılı yol boyunca başlattığı sonucuna varılmıştır (Tan ve ark., 2018).

Sodyum florür uygulanan farelerden alınan splenositlerde, Bim, Bax, Bak, kaspaz-3 ve poli ADP-riboz polimerazı ve anti-apoptotik proteinler Bcl-2 ve Bcl-xL'nin düşük ifadesi dahil olmak üzere pro-apoptotik proteinlerin yüksek düzeyde ekspresyonu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, sodyum florürün ROS-bağımlı NF-κB sinyalini arttırarak fare splenositlerinde apoptozisi indüklediğinin kanıtı olarak kabul edilmektedir (Deng ve ark, 2017).

Dalak kaynaklı lenfositlerde (Splenic lymphocytes), NaF kaynaklı mitokondriyal transmembran potansiyelinin azalması, Bax, Bak, Fas, FasL, kaspaz 9, kaspaz 8, kaspaz 7, kaspaz 6 ve kaspaz 3 protein ekspresyonunun artması ile lenfosit apoptozisi teşvik edilmektedir. Bcl-2 ve Bcl-xL protein ekspresyonunun azalması ile apoptotik yıkıma uğramaktadır. Özetle, bu hücrelerdeki NaF-uyarımlı apoptozun, mitokondriyal ve ölüm reseptörü yollarından kaynaklanabileceğini ileri sürülmüştür (Deng ve ark, 2017).

PC12 hücrelerinde Cav1.2 ve kalsiyum sinyal yolağı apoptozis düzenleyicilerinin mRNA ekspresyonu üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, yüksek florun Cav1.2 ekspresyon düzeyini azalttığı saptanmıştır. Cav1.2, florozis tedavisi için önemli bir moleküler hedef olabileceği ve florozis tedavisinde yeni bir tedavi yaklaşımı olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir (Liao ve ark, 2017).

Flor, hücre apoptozunu indükleyebilir, ancak, flor tarafından başlatılan apoptozda otofajinin rolü hala anlaşılammıştır. Bunu ortaya koymak için apoptozis ve otofajinin başlaması ve baskılanmasını sağlayan FOXO arasındaki etkileşim araştırılmıştır (Gu ve ark., 2016). Otofaji, hasarlı organelleri ve protein agregatlarını bozan, yüksek oranda korunmuş bir hücre içi sindirim sürecidir. Otofaji insan veya hayvan sağlığı ve hastalığında düzenleme rolünü oynar (Lei ve ark, 2015; Kuang ve ark., 2018).

Kuang ve ark., (2018), NaF uygulanması ile mRNA seviyelerinin ve otofaji belirteçlerinin protein ekspresyonu düzeyinde arttığını, LC3, Beclin1, Atg16L1, Atg12, Atg5 ve p62'nin mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinde azaldığını saptamışlardır. NaF'un mTOR (katabolik ve anabolik metabolizmalar arasında anahtar işlevi olan bir kinazı) sinyal yolu ile otofajiye yol açtığı doğrulanmaktadır. mTOR aktivitesinin

inhibisyonu ve otofaji ile ilişkili genlerin ve proteinlerin değiştirilmesi, NaF kaynaklı splenosit otofajisinin potansiyel moleküler mekanizması olarak tanımlanmaktadır.

Otofaji, üreme fonksiyonunda flor kaynaklı hasarın mekanizmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Florun, testis dokularının ve üreme hücrelerinin yapısına ve işlevine zarar verdiği, testis fonksiyonunu bozduğu ve testosteron seviyelerini azalttığı bilinmektedir. Bununla birlikte, toksisitesinin altında yatan mekanizmalar belirsiz kalmıştır. Bu konuyu açığa çıkarmak için çalışmalar yapılmaktadır (Feng ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2017).

Feng ve ark. (2018), sertoli hücrelerinde florun otofajiye olan etkisini araştırdıkları çalışmada, hücreler 24 saat 0, 0.125, 0.25 ve 0.5 mM NaF'e maruz bırakılmış, aşağı regüle edilmiş mRNA ve LC3 ve Atg5 protein ekspresyon seviyeleri ile birlikte Beclin1 ve p62 mRNA ve protein ekspresyon seviyelerini yukarı doğru düzenlediğini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak flor maruziyeti nedeniyle, erkek sertoli hücrelerindeki otofaji sürecinin gerçekleştiği belirlenmiştir.

Hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak Leydig hücrelerinde, flor kaynaklı otofajinin rolünün araştırıldığı bir başka çalışmada ise, otofaji markerları olan LC3, Beclin1 ve Atg 5'in mRNA seviyelerini ve protein ekspresyonunu arttırdığı ortaya konulmuş ve Leydig hücre hasarında otofajinin rolü olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2017).

Florun nörotoksositeyi açık olmayan bir mekanizma ile tetiklediği bilinmektedir (Tu ve ark., 2018). NaF ile indüklenen nörotoksitede endoplazmik retikulum (ER) stresi ve otofajinin rollerinin araştırılması amacıyla yapılan bir çalışmada, kaspaz-3'ün arttığı, ER stresi ve apoptozun indüklendiği ve otofajinin ortaya çıktığı gösterilmiştir. NaF'un nöroblastoma hücrelerinde aşırı ER stresi ve otofajiyi indüklediğini doğrulamıştır (Niu ve ark., 2017).

Aynı hücre hattında (insan nöroblastoma SH-SY5Y) florun otofaji düzeyi üzerindeki etkileri araştırılmış ve 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (20, 40, 60 mg/L) flor uygulanmasına bağlı olarak Atg5, LC3 ve P62 gibi otofaji ile ilgili proteinlerinin

ekspresyon seviyeleri değerlendirilimiş ve doza bağımlı olarak azaldığı saptanmıştır. Sonuç olarak florun, SH-SY5Y hücrelerinde otofajinin seviyesini baskılayabileceği kanısına varılmıştır (Tang ve ark, 2017).

Doku homeostazının sürdürülmesi ve embriyonik gelişimin kontrolünde önemli rolleri olan geniş bir sitokin ailesinin başlıca üyesi olan TGF- $\beta$ 1 (transforme edici büyüme faktörü-beta 1) çok çeşitli hücre aktivitelerini etkileyen ve floroziste önemli bir rol oynayan bir markırdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, florun otofajiyi indüklediği, bununla birlikte mekanizmanın hala belirsiz olduğu ve flor kaynaklı otofajide TGF- $\beta$ 1'in rolünün daha fazla gösterilmesi gerektiği kanıtlanmıştır. Bu araştırmacı grubu daha önceki çalışmalarında, NaF maruziyetinin, fare osteoblast hücrelerinin proliferasyon oranında, doza bağımlı bir şekilde, TGF- $\beta$ 1 ve otofajik ekspresyon düzeylerinde eşzamanlı bir artışla belirgin bir azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. TGF- $\beta$ 1'in fare osteoblast hücrelerinin NaF ile indüklenen otofajisinde bir aracı rol oynadığı sonucuna varılmıştır (Zhao ve ark., 2018).

Flor maruziyetinden sonra otofaji göstergeleri olan otofagozom sayısının ve otofaji işaretçisi olan LC3-II'nin düzeyinin arttığı, otofaji ile parçalanmış bir substrat olan p62'nin ekspresyonunun da önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2016).

Hücrelerde gerçekleşen otofajinin değerlendirilmesinde, otofagozomlar transmisyon elektron mikroskobu (TEM) da kullanılmaktadır. HAT-7 hücreleri (kansere hücre hattı) 48 saat boyunca farklı flor konsantrasyonlarında bırakılmasının ardından, TEM sonuçlarına göre otofajom miktarının anlamlı derecede arttığı saptanmıştır (Lei ve ark., 2016).

Osteoblast hücre hattı olan MC3T3-E1'te hücrelerinde otofajinin altında yatan mekanizmaların araştırıldığı bir çalışmada, NaF'un hem hücre apoptozunu hem de otofajiyi indüklediği bulunmuştur (Gu ve ark., 2016).

Yüksek seviyelerde flora maruz kalınması sonucunda oluşan diş florozisinin mekanizması açık değildir ve bu mekanizmayı aydınlatmak üzere dişe ait farklı hücre hatlarında NaF kullanılarak toksikasyon oluşturulan ve sorumlu olduğu düşünülen genlerin

değerlendirildiği çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, NaF bağımlı diş florozisinin gelişim mekanizmalarını aydınlatmak için Beclin1 ve mTOR genlerin ekspresyonu ve TEM incelemesinde otofajik vakuolların artışı gözlenmiş ve otofajinin dental florozisteki öneminin kanıtlandığı bildirilmiştir (Lei ve ark, 2015).

Florun sementoblastlar üzerindeki etkileri daha az dikkat çekmiştir. Yüksek konsantrasyonda NaF'a maruz kalan OCCM-30 hücrelerinde apoptotik morfolojik değişiklikler ve DNA fragmantasyonu gösterdiği belirlenmiştir. NaF tarafından aktive edilen yüksek düzeyde ROS oluşumu sonucunda, hem ekstrinsik yoldan hem de oksidatif strese bağlı olarak intrinsik yola bağlı olarak apoptozisin meydana geldiği gösterilmiştir (Niu ve ark., 2018).

Flor maruziyeti reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına ve oksidatif hasarın artışına yol açtığı ameloblastlarda, c-Jun N-terminal kinaz (JNK) üzerinden sinyalleme ile otofaji de indüklenmektedir. Ayrıca mitokondriyal hasar ve DNA hasarına neden olmaktadır (Suzuki ve ark, 2015).

Florun dişin emaye formasyonundan sorumlu ameloblastlarda ER-strese neden olduğu ve ER-stresin diş florozisinde rol oynadığı düşünülmekle beraber, hücrelerin flor kaynaklı hücre stresine nasıl tepki verdiğinin moleküler mekanizması belirsizdir, ancak otofajinin önemini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Suzuki ve ark, 2014).

Suzuki ve ark., (2014), flor maruziyetinin otofajiye neden olduğunu göstermek için, otofaji ile ilişkili genlerin (Atg) ifadesi incelemiş ve Atg5, Atg7 ve Atg8 hem mRNA hem de protein düzeyinde anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir.

Flor kaynaklı otofajinin ve müteakip hücre ölümünün nasıl gerçekleştiğini açıklığa kavuşturmak için yapılan bir çalışmada, NaF uygulanan sıçanların ekzokrin pankreas hücrelerindeki morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler araştırılmıştır. İntrasisternal granül, aşırı otofaji ve ribozomal degranülasyon flora maruz kalan hücrelerde, bazen nekrotik değişiklikler de gözlenmiştir. Özet olarak; sıçan ekzokrin pankreas hücrelerinde, flor tedavisi intrasisternal granül birikiminden kaynaklanan otofajiye neden olur. Aşırı otofaji, apoptozdan farklı bir programlanmış hücre ölümünü teşvik eder (Ito ve ark, 2009).

Bu tez çalışmasının planlanmasında ana çıkış noktası, flor kaynaklı NRK-52 hücre ölümlerindeki moleküler mekanizmaların aydınlatılmasıydı. Nitekim farklı doku ve hücre tiplerinde yapılan çalışmalarda, florun hücre proliferasyonunu inhibe edebildiği, apoptoz ve otofajiyi indüklediği görülmüştür ve daha ileri analizlerde, MAPK/JNK bağımlı otofajinin flor kaynaklı apoptoziste koruyucu olabileceği de ortaya konulmuştur (Wei ve ark, 2014). Flor, endoplazmik retikulum stresi ve oksidatif stres dahil olmak üzere hücre stresini indükler, bu da diş minesinin oluşumundan sorumlu ameloblastların bozulmasına yol açmaktadır (Suzuki ve ark, 2015). Sıçan hepatositlerinde flor tarafından indüklenen oksidatif stres, DNA hasarı ve apoptozis ile olası bir bağlantı olduğunu bildirmiştir (Campos-Pereira ve ark., 2017).

Bu tez çalışmasında, farklı doz ve sürelerde NaF uygulamasının böbrek hücre hattında neden olduğu hücre ölümlerinin moleküler mekanizmaları araştırılmış ve 3. saatte intrinsik apoptotik yolak aracılığı ile apoptoza girdikleri, 12. saatte tamamen otofajik yolağın aktifleştiği, 24. saatte ise otofajide duramayan hücrelerde nekrotik sinyalin kuvvetli hale geldiği saptanmıştır. Sonuç olarak, bu hücre hattında NaF bağımlı hücre ölümlerinde moleküler mekanizmaların zamana bağlı olarak aktivite gösterdiği, NaF eklendikten sonraki 3. saatten itibaren sitotoksik etki mekanizmalarının harekete geçtiği ve 12 ve 24. saatlerde farklı mekanizmaların hücre ölümlerini hızlandırdığı sonucuna varılmıştır.

## ÖZET

**Urut F. Sodyum Florürün (NaF) böbrek hücre serilerindeki sitotoksik etkisinin araştırılması. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2018.** Bu çalışma, farklı dozlarda ve zamanlarda alınan hücre örneklerinde, NaF uygulanması ile belirli düzeylerde sitotoksisite olduğu belirlenen NRK-52 böbrek hücre serisinde, sitotoksisitenin meydana gelmesinde, apoptotik, otofajik ve nekrotik mekanizmaların olası rollerinin araştırılması amacıyla planlandı. Hücreler, *in vitro* koşullarda düzenli geçişlerde çoğaltıldı. NaF'nin IC<sub>50</sub> değeri MTT ile belirlendi. Hücre numuneleri, hücrelerin IC<sub>50</sub> değerlerine göre hazırlanan örneklerden 3, 12 ve 24 saat sonra alındı. Biyokimyasal analizler için, hücreler tripsinizasyon ile toplandı ve donma / çözme metodu ile lize edildi. MRNA manuel yöntemle izole edildi. Apoptotik, otofajik ve nekrotik genler için cDNA elde edildi ve hedef gen DNA, gerçek zamanlı PCR yöntemi ile amplifiye edildi. Bu seçilmiş genlerin ekspresyonu değerlendirilmiş ve NaF kaynaklı moleküler yollarda zamana bağlı olarak önemli değişiklikler tespit edilmiştir. Üçüncü saatte hücrelerin apoptotik yolağı kullanarak apoptoza girdikleri, 12. saatteki ölümlerin tamamen otofajik yolak kaynaklı olduğu ve 24. saatte ise, otofajide duramayan hücrelerde nekrotik sinyal ve apoptozis yolaklarındaki genler vasıtasıyla, hücre ölümünün tamamlandığı tespit edildi. Sonuç olarak, NRK-52 böbrek hücre serisinde NaF bağımlı hücre ölümlerinde, moleküler mekanizmaların zamana bağlı olarak aktivite gösterdiği belirlendi. NaF eklendikten sonraki 3. Saatten itibaren sitotoksik etki mekanizmalarının harekete geçtiği ve 12 ve 24. Saatlerde farklı mekanizmaların hücre ölümlerini hızlandırdığı kanısına varıldı.

**Anahtar kelimeler:** NaF, böbrek, sitotoksisite, hücre kültürü

## SUMMARY

**Urut F. The Investigation of Cytotoxic Effect of Sodium Fluoride (NaF) in Renal Cell Line. Van Yüzüncü Yıl University, Institute of Health Sciences, MSci. Thesis, Department of Biochemistry, Van, 2018.** This study was planned to investigate the possible roles of apoptotic, autophagic and necrotic mechanisms for cytotoxicity by NaF administration in the NRK-52 renal cell line, at different doses and times. Cells were replicated in regular passages *in vitro* conditions. The IC<sub>50</sub> value of NaF was determined with MTT. Cell samples were taken at 3, 12 and 24 hours from samples prepared according to the IC<sub>50</sub> values of the cells. For biochemical assays, cells were harvested by trypsinization and lysed by freeze / thaw method. MRNA was isolated by manual method. cDNA was obtained for apoptotic, autophagic and necrotic genes and the target gene DNA was amplified by real time-PCR method. These selected genes' expression were evaluated and determined important changes of depends on time in NaF induced molecular pathways. Apoptosis was induced by using apoptotic pathway of cells at 3 h, complete death of autophagic pathway at At the 3rd hour, cells were seen to enter apoptosis using apoptosis. The 12th hour deaths were completely autophagic. At the 24th hour, cell death was found to be complete by means of genes in the necrotic signal and apoptosis pathways in non-autophagous cells. As a result, it was determined that the molecular mechanisms of the NRF-52 renal cell lineage showed activity in NaF dependent cell deaths. It was concluded that the mechanisms of cytotoxic action were activated from the 3rd hour after the addition of NaF and different mechanisms accelerated cell death at 12th and 24th hours.

**Key words:** NaF, kidney, cytotoxicity, cell culture



## KAYNAKLAR

- Adrain C, Martin SJ (2001). The mitochondrial apoptosome a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*, 2:390-397.
- Alhusaini AM, Faddah LM, El Orabi NF, Hasan IH (2018). Role of some natural antioxidants in the modulation of some proteins expressions against sodium fluoride-induced renal injury. *Biomed Res Int*, 2018:5614803.
- Agalakova NI, Gusev GP (2012). Molecular mechanisms of cytotoxicity and apoptosis induced by inorganic fluoride. *ISRN Cell Biology*, ID 403835.
- Anonim 1, (2012) Kimya Teknolojisi 7a Grubu Elementleri. 524k10265. T.C. Millî Eğitim Bakanlığı, Ankara
- Anonim 2. <http://www.longlonglife.org/en/uncategorized/autophagy-mild-cellular-stress-makes-live-longer-healthier/>
- Anonim 3. <https://www.shutterstock.com/image-vector/necrosis-pathologic-cell-death-injury-which-548498674>
- Avcı B, Uğur Baysal S, Gökçay G, (2009). Çocuklarda flor kullanımının yarar ve zararlarının değerlendirilmesi. *Çocuk Derg*, 9(1):8-15
- Campos-Pereira FD, Lopes-Aguiar L, Renosto FL, Nogueira GA, Costa EF, Barbieri Pulz R, Silva-Zacarin EC, Oliveira CA, Pigoso AA, Severi-Aguiar GD (2017). Genotoxic effect and rat hepatocyte death occurred after oxidative stress induction and antioxidant gene downregulation caused by long term fluoride exposure. *Chem Biol Interact*, 264:25-33.
- Comba B, (2013). Hayvanlarda florozis, teşhis, tedavi ve koruma. *YYU Vet Fak Derg*, 24(1): 41-44.
- Çoşkun G, Özgür H, (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv*, 20: 145.
- Danial NN, Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 11, 205-219.
- Deng H, Kuang P, Cui H, Luo Q, Liu H, Lu Y, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L (2017). Sodium fluoride induces apoptosis in mouse splenocytes by activating ROS-dependent NF- $\kappa$ B signaling. *Oncotarget*, 8(70):114428-114441.
- Eğri M, Çetinkaya F (1998). Diş hekimleri va flor kullanımı, *Turgut Özal Tıp Merkezi Derg*, 5(1):60-63.
- Elmore S (2007). Apoptosis: A review o f programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35: 495-516.
- Erdoğan BB (2003). Apoptozis mekanizmaları tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. *Akciğer Araş*, 4:165-174.
- Ergin E, Eden E (2017). Florun insan sağlığına olumsuz etkisi var mı? *Ege Üniv Diş Hek Derg*, 38(1):13-20.

Feng Z, Liang C, Manthari RK, Wang C, Zhang J (2018). Effects of fluoride on autophagy in mouse sertoli cells. *Biol Trace Elem Res*, 2018 Jun 19. doi: 10.1007/s12011-018-1405-z. [Epub ahead of print].

Gewies A (2003). Introduction to apoptosis. *Apo Review*, 5:1-26.

Güney M, Oral B, Demirin H, Karahan N, Mungan T, Delibas N (2007a). Protective effects of vitamins C and E against endometrial damage and oxidative stress in fluoride intoxication. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34:5-6:467-74

Güleş Ö, Eren Ü (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *YYÜ Vet Fak Derg*, 22:2:73-78.

Gu X, Han D, Chen W, Zhang L, Lin Q, Gao J, Fanning S, Han B (2016). SIRT1-mediated FoxOs pathways protect against apoptosis by promoting autophagy in osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to sodium fluoride. *Oncotarget*, 7(40):65218-65230.

Ito M, Nakagawa H, Okada T, Miyazaki S, Matsuo S (2009). ER-stress caused by accumulated intracisternal granules activates autophagy through a different signal pathway from unfolded protein response in exocrine pancreas cells of rats exposed to fluoride. *Arch Toxicol*, 83(2):151-159.

Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C ve ark. (2000). Cell death apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol*, 21(1):165-170.

Kannan K, Jain SK (2000). Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*, 7(3):153-163.

Kaufman SH, Earnshaw WC (2000). Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*, 256(1):42-49.

Kerr JF, Winterford CM (1994). Apoptosis its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73:2013-2026.

Kroemer G, Galluzi L, Brenner C (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 87:99-163.

Kuang P, Deng H, Liu H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L (2018). Sodium fluoride induces splenocyte autophagy via the mammalian targets of rapamycin (mTOR) signaling pathway in growing mice. *Aging (Albany NY)*. 2018. doi: 10.18632/aging.101499. [Epub ahead of print]

Kurtdede E, Pekcan M, Karagül H, (2017). Türkiye’de florozis sorunu ve florun biyokimyasal etkileşimi. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg*, 12(3):320-326

Lei S, Zhang Y, Zhang K, Li J, Liu L (2015). Effects of fluoride on the expression of Beclin1 and mTOR in ameloblasts. *Cells Tissues Organs*, 200(6):405-412.

Lei S, Zhang Y, Zhang KQ, Li J (2016). *In vivo* and *in vitro* experimental study on the effect of fluoride-induced autophagy in rat HAT-7 cell line. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*, 25(4):426-430.

Liao Q, Zhang R, Wang X, Nian W, Ke L, Ouyang W, Zhang Z (2017). Effect of fluoride exposure on mRNA expression of cav1.2 and calcium signal pathway apoptosis regulators in PC12 cells. *Environ Toxicol Pharmacol*, 54:74-79.

Liman N, Suna D-C, (2017). Hücre koruyucu bir mekanizma: Otofaji. *Erciyes Üniv Sağ Bil Derg*, 26:275-281

Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjänen K (1994). Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer*, 30A(14):2068-2073.

Luo Q, Cui H, Deng H, Kuang P, Liu H, Lu Y, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L (2017)a. Sodium fluoride induces renal inflammatory responses by activating NF- $\kappa$ B signaling pathway and reducing anti-inflammatory cytokine expression in mice. *Oncotarget*, 8(46):80192-80207.

Luo Q, Cui H, Deng H, Kuang P, Liu H, Lu Y, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L (2017b). Histopathological findings of renal tissue induced by oxidative stress due to different concentrations of fluoride. *Oncotarget*, 8(31):50430-50446.

Martı Akgün Ö, Görgülü Ş, Altun C, (2012). Diş çürüğüne karşı koruyucu flor uygulamaları. *Smyrna Tıp Derg*, 82.

Nicholson DW (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6:1028-1042.

Niu Q, Chen J, Xia T, Li P, Zhou G, Xu C, Zhao Q, Dong L, Zhang S, Wang A (2018). Excessive ER stress and the resulting autophagic flux dysfunction contribute to fluoride-induced neurotoxicity. *Environ Pollut*, 233:889-899.

Ökte Z, (2008). Florozis ve diş sağlığı. *Uluslararası Katılımlı Tıbbi Jeoloji Sempozyumu Kitabı*, 978-975-7946-33-5: 106-108

Öktem S, Özhan MH, Özol D (2001). Apoptozisin önemi. *Toraks Derg*, 2(1): 91-92.

Öz Arslan D, Korkmaz G, Gözüaçık D, (2011). Otofaji: Bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Acıbadem Üniv Sağ Bil Derg*, 2:4

Perera T, Ranasinghe S, Alles N, Waduge R (2018). Effect of fluoride on major organs with the different time of exposure in rats. *Environ Health Prev Med*, 23(1):17.

Quadri JA, Sarwar S, Sinha A, Kalaivani M, Dinda AK, Bagga A, Roy TS, Das TK, Shariff A (2018). Fluoride-associated ultrastructural changes and apoptosis in human renal tubule: a pilot study. *Hum Exp Toxicol*, 960327118755257.

Ribeiro DA, Cardoso CM, Yujra VQ, DE Barros Viana M, Aguiar O Jr, Pisani LP, Oshima CTF (2017). Fluoride induces apoptosis in mammalian cells: *in vitro* and *in vivo* studies. *Anticancer Res*, 37(9):4767-4777.

Sana S, Ghosh S, Das N, Sarkar S, Mandal AK (2017). Vesicular melatonin efficiently downregulates sodium fluoride-induced rat hepato- and broncho-TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  expressions, and associated oxidative injury: a comparative study of liposomal and nanoencapsulated forms. *Int J Nanomed*, 12:4059-4071.

Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E (2004). Tissue distribution of the death ligand trail and its receptors. *J Histochem Cytochem*, 52,6, 821-831.

Suzuki M, Bandoski C, Bartlett JD (2015). Fluoride induces oxidative damage and SIRT1/autophagy through ROS-mediated JNK signaling. *Free Radic Biol Med*, 89:369-78.

Suzuki M, Bartlett JD (2014). Sirtuin1 and autophagy protect cells from fluoride-induced cell stress. *Biochim Biophys Acta*, 1842(2):245-55.

Suzuki M, Everett ET, Whitford GM, Bartlett JD (2017). 4-phenylbutyrate mitigates fluoride-induced cytotoxicity in ALC cells. *Front Physiol*, 8:302.

Tan H, Qurashi A, Poidevin M, Nelson DL, Li H, Jin P (2012). Retrotransposon activation contributes to fragile X premutation rCGG-mediated neurodegeneration. *Hum Mol Genet* 21(1):57-65.

Tan PP, Zhou BH, Zhao WP, Jia LS, Liu J, Wang HW (2018). Mitochondria-mediated pathway regulates C2C12 cell apoptosis induced by fluoride. *Biol Trace Elem Res*, doi: 10.1007/s12011-018-1265-6. [Epub ahead of print].

Tang S, Zhang S, Chen W, Quan C, Duan P, Huang W, Wang A, Yang K (2017). Effects of fluoride on autophagy level in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Wei Sheng Yan Jiu*, 46(3):472-480.

Tomatır AG (2003). Apoptoz programlı hücre ölümü. *Turk Klin J Med Sci*, 2:499-508.

Tu W, Zhang Q, Liu Y, Han L, Wang Q, Chen P, Zhang S, Wang A, Zhou X (2018). Fluoride induces apoptosis via inhibiting SIRT1 activity to activate mitochondrial p53 pathway in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 347:60-69.

Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T (2002). Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J Nutr*, 132(5):897-900.

- Ulukaya E (2007). Apoptozis ders notları. Erişim <http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisders notu.pdf>, erişim tarihi: 04.05.2017
- Vaux DL, Haecker G, Strasser A (1994). An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, 76:777-779.
- Wei M, Duan D, Liu Y, Wang Z, Li Z (2014). Autophagy may protect MC3T3-E1 cells from fluoride-induced apoptosis. *Mol Med Rep*, 9(6):2309-2315.
- WHO, Fluorine and Fluorides in Environmental Health Criteria, (36) 25-26, World Health Organization, Geneva, (1984)
- Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH (2004). Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*, 279(38):39925-39932.
- Xu S, Yang Y, Han S, Wu Z (2014). ZIP1 and zinc inhibits fluoride-induced apoptosis in MC3T3-E1 cells. *Biol Trace Elem Res*, 159(1-3):399-409.
- Ying Z, Lin M, Jian L, Ming Z, Kaiqiang Z, Hefeng G (2014). Excessive fluoride inducing calcium overload and apoptosis of ameloblasts. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 32(6):542-546.
- Yur F, Mert N, Dede S, Değer Y, Ertekin A, Mert H, Yaşar S, Doğan I, Işık A (2013). Evaluation of serum lipid fractions and tissue antioxidant levels in sheep with fluorosis. *Fluoride*, 46(2):90–96.
- Yüksek V, Dede S, Taşpınar M, Çetin S (2017). The effects of vitamins A,D, E, and C on apoptosis and DNA damage in sodium fluoride-treated renal and osteoblast cell lines. *Fluoride*, 50(3):300–313.
- Zhang J, Zhu Y, Shi Y, Han Y, Liang C, Feng Z, Zheng H, Eng M, Wang J (2017). Fluoride-induced autophagy via the regulation of phosphorylation of mammalian targets of rapamycin in mice leydig cells. *J Agric Food Chem*, 65(40):8966-8976.
- Zhang S, Niu Q, Gao H, Ma R, Lei R, Zhang C, Xia T, Li P, Xu C, Wang C, Chen J, Dong L, Zhao Q, Wang A (2016). Excessive apoptosis and defective autophagy contribute to developmental testicular toxicity induced by fluoride. *Environ Pollut*, 212:97-104.
- Zhang YL, Luo Q, Deng Q, Li T, Li Y, Zhang ZL, Zhong JJ (2015). Genes associated with sodium fluoride-induced human osteoblast apoptosis. *Int J Clin Exp Med*, 8(8):13171-8.
- Zhao Y, Li Y, Gao Y, Yuan M, Manthari RK, Wang J, Wang J (2018). TGF-β1 acts as mediator in fluoride-induced autophagy in the mouse osteoblast cells. *Food Chem Toxicol*, 115:26-33.

Zhou BH, Tan P P, Jia LS, Zhao WP, Wang JC, Wang HW (2018). PI3K/AKT signaling pathway involvement in fluoride-induced apoptosis in C2C12 cells. *Chemosphere*, 199:297-302.



## ÖZGEÇMİŞ

Ferit URUT 1991 yılında Van'da doğdu. İlk ve Orta öğretimini Ferit Melen ilk ve orta öğretim okulunda, liseyi de Mehmet Akif Lisesi'nde tamamladı. 2010-2014 yılları arasında eğitim gördüğü Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulun'dan Hemşire olarak mezun oldu. Çatak Devlet Hastanesi'e 2015 yılında hemşire olarak atandı ve halen görevini sürdürmektedir. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı yüksek lisans programında 2016 yılında eğitimine başladı ve halen eğitime devam etmektedir.

## Ek-1. Etik Kurul Yazısı

Evrak Tarih ve Sayısı: 04/04/2017-E.23801



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

Sayı : 27552122-604.01.02-E.23801  
Konu : Prof. Dr. Semiha DEDE'ye ait Onay  
Gerektirmeyen Belge

04/04/2017

Sayın Prof. Dr. Semiha DEDE

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 30.03.2017 tarih ve 03 sayılı kararı gereğince; Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "Sodyum Florürün (NaF) böbrek hücre serilerindeki sitotoksik etkisinin araştırılması" adlı çalışma ile ilgili, 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 sayı ile yayınladığı 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)

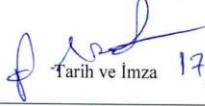

Adres: Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Zeve  
Kampüsü 65080 Tuşba / Van  
Telefon: +90 432 2251701-04 / +90 4445065 Faks: +90 432 4865413  
e-Posta: yuhadyek@yyu.edu.tr Elektronik Ağ: http://www.yyu.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için iribat: Mehmet Şah OĞUZ  
Unvan: Bilgisayar İşletmeni  
Dahili No: 22007

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



## Ek 2. Tez Orijinallik Raporu

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU	
<b>Tarih:</b> 17/08/2018	
<b>Tez Başlığı / Konusu:</b> Sodyum Florürün (NaF) böbrek hücre serilerindeki sitotoksik etkisinin araştırılması.	
Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 30 sayfalık kısmına ilişkin, 17/08/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından <b>Turnitin</b> intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı <b>%17 (onyeddi)</b> 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)	
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.	
 Tarih ve İmza 17/08/2018	
Adı Soyadı: Ferit URUT Öğrenci No: 159301025 Anabilim Dalı: Biyokimya Program: Biyokimya (Veteriner) Statüsü: Y.Lisans <input checked="" type="checkbox"/> Doktora <input type="checkbox"/>	
<b>DANIŞMAN ONAYI</b> UYGUNDUR  Prof. Dr. Semiha DEDE (Unvan, Ad Soyad, İmza) 	<b>ENSTİTÜ ONAYI</b> UYGUNDUR  GÜLER (Unvan, Ad Soyad, İmza) 