



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**SUBKRONİK SODYUM FLORÜR TOKSİSİTESİNİN
RATLARDA HİSTOPATOLOJİK DOKU
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ,
ASETİLKOLİN ESTERAZ, SÜPEROKSİT
DİSMUTAZ VE KATALAZ ENZİM
AKTİVİTELERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

Doktora Tezi

İnci AKYILDIZ

Pedodonti Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**SUBKRONİK SODYUM FLORÜR TOKSİSİTESİNİN RATLARDA
HİSTOPATOLOJİK DOKU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ,
ASETİLKOLİN ESTERAZ, SÜPEROKSİT DİSMUTAZ VE KATALAZ
ENZİM AKTİVİTELERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

İnci AKYILDIZ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ali Rıza ALPÖZ

Pedodonti Anabilim Dalı
Doktora Tezi

İzmir
2019

TEZ ONAY SAYFASI

Kurum Adı : Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Anabilim Dalı : Pedodonti Ana Bilim Dalı
Programı : Doktora
Tez Konusu :
SUBKRONİK SODYUM FLORÜR TOKSİSİTESİNİN RATLARDA HİSTOPATOLOJİK DOKU ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ, ASETİLKOLİN ESTERAZ, SÜPEROKSİT DİSMUTAZ VE KATALAZ ENZİM
AKTİVİTELERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ
Danışman : Prof.Dr. Ali Rıza ALPÖZ

Tezi Hazırlayan : İnci AKYILDIZ

Değerlendirme Kurulu Üyeleri :
Adı Soyadı :
Başkan(Danışman) : Prof.Dr. Ali Rıza ALPÖZ

Üye / İmza : Prof.Dr.Hüseyin TEZEL
Üye / İmza : Prof.Dr. Özant ÖNÇAĞ
Üye / İmza : Prof.Dr. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU
Üye / İmza : Prof. Dr. Işıl SÖNMEZ
Üye / İmza : Doç.Dr. Ebru KÜÇÜKYILMAZ

Tezin Kabul Edildiği Tarih : 13.11.2019



İÇİNDEKİLER

Önsöz.....	I
Özet	III
Abstract.....	IV
Tablolar Dizini	V
Resimler Dizini.....	VI
Grafikler Dizini	VIII
Kısaltmalar Listesi	IX
1. Giriş.....	1
1.1 Araştırmanın Problemi.....	1
1.2 Araştırmanın Sorusu	1
1.3 Araştırmanın Hipotezleri.....	1
1.4 Araştırmanın Varsayımları	2
1.5 Araştırmanın Sınırlılıkları.....	2
1.6 Araştırmanın Amacı	2
2. Genel Bilgiler	3
2.1 Flor.....	3
2.1.1 Flor'un Doğada Bulunuşu	3
2.1.2 Endemik Florozis Bölgeleri.....	4
2.1.2.1 Dünyada Endemik Florozis Bölgeleri	4
2.1.2.2 Türkiye'de Endemik Florozis Bölgeleri	4
2.1.3 Flor Alım Kaynakları	5
2.1.3.1 İçme Suları	5
2.1.3.2 Diğer Kaynaklar	5
2.1.4 Flor Metabolizması	7
2.1.4.1 Plazmada Flor.....	8
2.1.4.2 Flor Eliminasyonu	9
2.2 Flor Toksisitesi.....	10
2.2.1 Akut Flor Toksisitesi.....	10
2.2.2 Kronik Flor Toksisitesi.....	10
2.3 Florun Sert Dokular Üzerine Etkisi.....	11
2.3.1 Dental Florozis	11
2.3.1.1 Dental Florozis'in Klinik Bulguları.....	12
2.3.1.2 Dental Florozis'in Patogenezi	12
2.3.2 İskeletsel Florozis.....	14
2.4 Florun Yumuşak Dokular Üzerine Etkisi	14
2.4.1 Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem	15
3. Gereç ve Yöntem	17
3.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi ve Deney Protokolü.....	17
3.2 Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması	19
3.3. Enzimatik Analizler	20
3.3.1. Homojenizasyon.....	20
3.3.2. Total Protein Tayini.....	20
3.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Tayini	21
3.3.4. Asetilkolin Esteraz (AChE) Enzim Tayini	23

3.3.5. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi Tayini.....	24
3.4 Histopatolojik İnceleme	24
3.4.1 Doku Takip İşlemleri.....	26
3.5 İstatistiksel Analizler	26
4. Bulgular	27
4.1 Histopatolojik Bulgular	27
4.1.1 Karaciğer Bulguları	27
4.1.2 Beyin ve Hipofiz Bezi Bulguları	32
4.1.3 Tiroid Bezi Bulguları.....	41
4.2 Enzimatik Sistem Bulguları	44
4.2.1 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini.....	44
4.2.2 AChE Aktivite Bulguları.....	45
4.2.3 SOD Aktivite Bulguları.....	47
4.2.4 Katalaz (CAT) Aktivite Bulguları	48
4.3.4.1 Tüm Grup ve Organlardaki Katalaz Aktivitesinin Karşılaştırılması	52
5.Tartışma	56
6. Sonuç ve Öneriler	72
7. Kaynaklar.....	74
8. Ekler	88
8.1 Ek-1: Etik Kurul Onay Belgesi	88
Teşekkür.....	89
Özgeçmiş	90

Önsöz

Doğada bileşikler halinde bulunan flor, vücutta olan eser elementlerden biridir. Suda, toprakta, kayalarda, gıdalarda bulunan flor kemik ve dişlerin yapısında da mevcuttur. Jeolojik olaylar, iklim, çevre kayaçların özellikleri topraktaki flor konsantrasyonunu değiştirmektedir. Bu durum içme suyu olarak kullanılan kaynak sularının flor konsantrasyonlarının değişmesine sebep olur. Yeterli flor alımının çürük önleyici ve osteoporoza karşı koruyucu etkisi bulunurken, yüksek doz alımı sert ve yumuşak dokularda bozulmalara sebep olmaktadır. Akut veya kronik flor toksisitesi, insan fizyolojisinde patolojik durumlara sebep olur. Bu patolojik durumlar dişlerde florozis olarak görülürken eklem ve kemik dokuda deformasyonlar olarak izlenir. Günümüzde suların florlanmasına ek olarak endemik florozis bölgelerinde yaşanması, sistemik flor preparatlarının fazla kullanımı ve topikal preparatların yanlış kullanımı sonucu subkronik veya akut toksisite tablolarıyla karşılaşabilmekteyiz. Çalışmamızda içme sularından yüksek doz flor alımının sıçan modeli üzerinde oksidatif stres parametreleri ve yumuşak doku histolojisine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

Doktora eğitimim boyunca bana yardım ve desteğini esirgemeyen, tez çalışmamın belirlenmesi ve yürütülmesinde bilgi ve tecrübeleriyle hep yanımda olan yerini asla dolduramayacağım değerli hocam sayın Prof. Dr. Ali Rıza ALPÖZ'e,

Hayvanlarımla çalıştığım süre boyunca bana hem bilimsel hem de psikolojik desteğin en büyüğünü sağlayan sayın Vet. Hek. F. Emrah SOYLU'ya,

Histopatolojik incelemeler sırasında tüm yoğunluğunun arasında bile benimle ilgilenen ve tüm örnekleri içine sinene kadar tekrar tekrar inceleyen Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Yeşim ERTAN'a, Çalışmamın kurgulanması ve istatistiksel analizlerin uygulanması sürecinde bilgi ve desteğini benden esirgemeyen, her aşamada bana yol gösteren Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU'na

Tez izleme komitemde yer alan ve bilgileri ile çalışmamı yönlendiren sayın Prof. Dr. Hüseyin TEZEL'e ve sayın Prof. Dr. Özant ÖNÇAĞ'a

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşarak pratik ve teorik olarak gelişmeye katkıda bulunan, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine ve anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Fahinur ERTUĞRUL'a

Kısa süre de olsa tez izleme komitemde yer alan, her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum sayın Prof. Dr. Ertuğrul SABAH'a,

Hayatım boyunca her zaman yanımda duran, maddi manevi destek ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, bugün olduğum insan olmamı sağlayan, deneyimleriyle meslek hayatıma hep ışık olan ve çocukları olmaktan gurur duyduğum en büyük şansım babam Prof. Dr. Mahir AKYILDIZ'a, annem Uzm. Dr. Şahizer AKYILDIZ'a ve ablam Derya DEMİR'e

Yoğun çalışma ve yazım sürecinde her zaman yanımda olan ve beni destekleyen başta çok sevgili Uzm. Dt. Cem İREZLİ olmak üzere tüm arkadaşlarıma ve meslektaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 17.09.19

İnci AKYILDIZ

Özet

Subkronik Sodyum Florür Toksisitesinin Ratlarda Histopatolojik Doku Etkilerinin Değerlendirilmesi, Asetilkolin Esteraz, Süperoksit Dizmutaz ve Katalaz Enzim Aktivitelerine Etkisinin İncelenmesi

Flor, kemik ve diş metabolizması için önem teşkil eden ve dışarıdan alınması gereken elementlerden biridir. Koruyucu diş hekimliğinde sistemik veya topikal flor uygulamaları girişimsel olmayan çürük önleme yöntemlerinin başında gelmektedir. Ancak flor alımının, alınan dozdan bağımsız olarak zararlı etkileri olduğuna yönelik yaygın bir algı mevcuttur. Sıçanlar üzerinde yapılan bu çalışmada, yüksek dozda sistemik flor alımının organlardaki etkisini ve oksidatif stres parametreleriyle ilişkisini açıklayıcı bir model oluşturmak amaçlanmaktadır. Çalışmada her grupta 3 erkek ve 3 diş Wistar albino genç erişkin sıçan olacak şekilde 4 grup oluşturulmuş olup, kontrol grubu dışındaki tüm gruplara içme sularına eklenerek 3 ay süreyle değişik konsantrasyonlarda sodyum florür (NaF) verilmiştir (50ppm, 100ppm, 200ppm). 3 ayın sonunda kan, karaciğer, hipofiz bezi, tiroid bezi ve beyin doku biyopsileri alınıp histolojik inceleme yapılmış, oksidatif stres parametrelerinden SOD, CAT ve AChE enzim aktiviteleri değerlendirilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında; histopatolojik olarak tüm dokularda “doza bağlı artan” bir paternde patoloji izlenmiştir. Sistemik alınan flor; yüksek dozlarda oksidatif stres parametrelerinde olumsuz değişikliklere neden olmuştur. Bu durum histopatolojik bulguları desteklemektedir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Sonuç olarak uzun süreli yüksek dozda flor alımının ratlarda oksidatif stres sistemi fizyolojisinde bozulmalara yol açtığı ve yumuşak dokularda hasara sebep olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler; Flor toksisitesi, histopatoloji, SOD, CAT, AChE

Abstract

Evaluation of subchronic sodium fluoride toxicity on the histopathological effects in tissues of rats and the effects on acetylcholine esterase, superoxide dismutase and catalase enzyme activities.

Fluorine is one of the most important elements for bone and tooth metabolism and must be taken from outside. Systemic or topical fluoride applications in preventive dentistry are among the non-invasive caries prevention methods. However, there is a widespread perception that fluoride intake has detrimental effects regardless of dose taken. This study aims to provide an explanatory model of the effect of high dose systemic fluoride intake on organs and its relationship with oxidative stress. In this study, four groups were formed as three male and three female Wistar albino young adult rats in each group and all groups except control group were given sodium fluoride (NaF) at different concentrations (50, 100, 200 ppm) over drinking water for three months. At the end of three months, blood, liver, pituitary gland, thyroid gland and brain tissue biopsies were taken and histological examination was performed. Oxidative stress parameters such as SOD, CAT and AChE enzyme activities were evaluated. In the obtained results; a “dose-dependent increasing” pattern was observed in all tissues, histopathologically. Systemic uptake of fluoride at high doses caused negative changes in oxidative stress parameters. This supports our histopathological findings, but no statistical significance was found ($p>0,05$). As a result, long-term high doses of fluoride intake cause deterioration in oxidative stress system and soft tissue damage.

Keywords; Fluoride toxicity, histopathology, SOD, CAT, AChE

Tablolar Dizini

Tablo 1. Yaygın kullanılan dental ürünlerin flor miktarları	7
Tablo 2. Ratlarda yumuşak doku-plazma flor oranları.....	9
Tablo 3. Kullanılan kimyasallar ve pipetleme miktarları.....	23
Tablo 4. Tüm gruplarda protein konsantrasyon değerleri (mg/ml).....	44
Tablo 5. Dokulardaki AChE miktarı (U/mg protein).....	46
Tablo 6. Doku örnekleri SOD aktivite değerleri (U/mg protein).....	47
Tablo 7. Doku örnekleri süreye bağlı CAT aktiviteleri.....	50

Resimler Dizini

Resim 1. Hayvanların ayrı kafeslerde bakımı, suların sadece araştırmacı tarafından verilmesi sağlandı.....	18
Resim 2. Sakrifasyon öncesi intraperitoneal ketamin uygulaması.....	19
Resim 3. Dekapitasyon sonrası organ alımı.....	20
Resim 4. Doku örneklerinin formaldehitte bekletilmesi.....	24
Resim 5. Karaciğer ve tiroid makro kesitleri.....	25
Resim 6. Beyin makro kesitleri.....	25
Resim 7. Kontrol grubu karaciğer dokusu (x20 büyütme).....	27
Resim 8. Kontrol grubu karaciğer dokusu (x10 büyütme).....	28
Resim 9. 50 ppm karaciğer dokusu konjesyone damarlar (x10 büyütme).....	28
Resim 10. 50 ppm karaciğer dokusu fokal nekroz (x20 büyütme).....	29
Resim 11. 100 ppm karaciğer dokusu portal yangı(ok), balon dejenerasyon(a) ve konjesyone damarlar(b) (x20 büyütme).....	29
Resim 12. 100 ppm karaciğer olağan dokusu(a), portal yangı balon dejenerasyon ve konjesyone damarlar(c) (x20büyütme).....	30
Resim 13. 200ppm karaciğer dokusu çok belirgin balon dejenerasyon(a)(x20 büyütme) artmış fokal nekroz (x20 büyütme).....	30
Resim 14. 200 ppm karaciğer dokusu merkezde artmış fokal nekroz (x20 büyütme)..	31
Resim 15. 200 ppm karaciğer dokusu artmış fokal nekroz (mor alan)(x20 büyütme).	31
Resim 16. Kontrol grubu beyin dokusu (x10 büyütme).....	32
Resim 17. Kontrol grubu beyin dokusu (x20 büyütme).....	33
Resim 18. 50 ppm beyin dokusu konjesyone damarlar (x20 büyütme).....	33
Resim 19. 50 ppm beyin dokusu cerebellum purkinje hücrelerinde az sayıda kırmızı nöronlar (x20 büyütme).....	34
Resim 20. 100 ppm beyin dokusu fokal nekroz alanları (x20 büyütme).....	34
Resim 21. 100 ppm beyin dokusu fokal nekroz alanları (x10 büyütme).....	35
Resim 22. 200 ppm beyin dokusu purkinje hücrelerinde belirgin kırmızı dejenerasyon (x20 büyütme).....	35

Resim 23. 200ppm beyin dokusu çok belirgin kırmızı nöron gruplaşmaları (x10 büyütme).....	36
Resim 24. 200 ppm beyin dokusu sol tarafta olağan doku görünümü(a), sağ tarafta şiddetli nekroz(b) (x10 büyütme).....	36
Resim 25. 200ppm beyin dokusu şiddetli nekroz (x20 büyütme).....	37
Resim 26. Kontrol grubu hipofiz bezi (x10 büyütme).....	37
Resim 27. Kontrol grubu hipofiz bezi (x20 büyütme).....	38
Resim 28. 50 ppm hipofiz bezi olağan görüntü (x10 büyütme).....	38
Resim 29. 100 ppm hipofiz bezi olağan görüntü (x10 büyütme).....	39
Resim 30. 100 ppm hipofiz bezi olağan görüntü (x20 büyütme).....	39
Resim 31. 200 ppm hipofiz bezi olağan görüntü (x10büyütme).....	40
Resim 32. 200 ppm hipofiz bezi olağan görüntü (x20 büyütme).....	40
Resim 33. Kontrol grubu tiroid bezi dokusu (x10 büyütme).....	41
Resim 34. Kontrol grubu tiroid bezi dokusu (x20 büyütme).....	42
Resim 35. 50ppm tiroid bezi dokusu tiroisitlerde yassılaşıma (x10 büyütme).....	42
Resim 36. 100ppm tiroid bezi dokusu küçük nodüller (x10 büyütme).....	43
Resim 37. 200 ppm tiroid bezi dokusu adenomatoid ve sellüler nodül (x10 büyütme).....	43

Grafikler Dizini

Grafik 1. BSA standart grafiği.....	21
Grafik 2. Örnek dokuları total protein miktarı (mg/ml).....	45
Grafik 3. Doku örnekleri AChE aktivitesi grafiği (U/mg protein).....	46
Grafik 4. Doku örnekleri SOD aktivite grafiği (U/mg protein).....	48
Grafik 5. Zamana bağlı beyin dokusu CAT aktivite grafiği.....	50
Grafik 6. Zamana bağlı karaciğer dokusu CAT aktivite grafiği.....	51
Grafik 7. Zamana bağlı kan örneği CAT aktivitesi grafiği.....	51
Grafik 8. Tüm grup ve organların 0.dakika CAT aktivitesi karđılařtırmalı grafiği.....	52
Grafik 9. Tüm grup ve organların 1.dakika CAT aktivitesi karđılařtırmalı grafiği.....	53
Grafik 10. Tüm grup ve organların 2.dakika CAT aktivitesi karđılařtırmalı grafiği.....	53
Grafik 11. Tüm grup ve organların 3.dakika CAT aktivitesi karđılařtırmalı grafiği.....	54
Grafik 12. Tüm grup ve organların 4.dakika CAT aktivitesi karđılařtırmalı grafiği.....	54
Grafik 13. Tüm grup ve organların 5.dakika CAT aktivitesi karđılařtırmalı grafiği.....	55

Kısaltmalar Listesi

ng: nanogram
µM: mikromol
µg: mikrogram
pm: Parts per million
NaF: Sodyum florür
SOD: Süperoksit Dismutaz
CAT: Katalaz
AChE: Asetilkolin Esteraz
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
SnF: Kalay florür
APF: Asidülefosfat Florür
MFP: Monoflorofosfat
GSH-Px: Glutasyon peroksidaz
EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit
DTT: Ditiyotiretiyol
PMSF: Fenilmetilsülfonil
BSA: Bovine Serum Albumin
O₂⁻: Süperoksit radikalleri
PMS: Phenazine methosulfate
NBT: Nitroblue tetrazolium
NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit
DTNB: Ditiobisnitrobenzoikasit
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
PNL: Polimorfnüveli lökosit
HF: Hidrojen florür
MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz
AP-1: Aktivatör protein-1
cyt C: Sitokrom C
ATP: Adenozintrifosfat
ADP: Adenozindifosfat
AMP: Adenozinmonofosfat

GDP:Guanozindifosfat
Pi: İnorganik fosfat
NO: Nitrik oksit
ER: Endoplazmik retikulum
ROS: Reaktif oksidatif ürün
DNA: Deoksiribonükleikasit
IR: Infrared
LPO: Lipid peroksit
BPP: Buffalo pineal proteinleri



1.Giriş

1.1Araştırmanın Problemi

Ağızdan flor alımı, dişleri çürükten korumak ve iskelet sistemini güçlendirmek amacıyla doğum sonrası 6. aydan başlayarak önerilmektedir. Flor minenin demineralizasyonunu inhibe edip remineralizasyonun artmasını sağlamanın yanı sıra ilerleyici şekilde diş minesini ile birleşerek mine dış tabakalarının sertleşmesine, yapı bileşimlerinin değişmesine yol açar. Su kaynaklarında florlama yapılmayan veya içme suyu flor düzeyi 0,7ppm altı olan yerlerde yüksek çürük riskli çocuklarda dışarıdan flor takviyesi önerilmiştir (Brothwell & Limeback, 2003). Ancak dışarıdan alınacak flor dozuna diğer flor rejimlerinin tümünden değerlendirilmesiyle karar verilmelidir.

Son yıllarda yapılan araştırmalarda dişlerin sürmesi öncesinde alınan sistemik flor etkisinin çürük üzerinde topikal alınımıyla karşılaştırıldığında daha az olduğu söylenmektedir. Ancak hala sistemik flor alınımını destekleyen ülkeler mevcuttur (Fomon, Ekstrand, & Ziegler, 2000; Franco ve ark., 2005; Levy ve ark., 2001; Pessan, Silva, & Buzalaf, 2003; Ripa & Leske, 1985; Zohouri & Rugg-Gunn, 2000). Florun toksik etkisinin dokular üzerindeki etkisi araştırılmaktadır. Özellikle karaciğer, beyin, hipofiz bezi ve tiroid gibi tüm sistemi etkileyen organlar değerlendirilmelidir.

1.2 Araştırmanın Sorusu

Sistemik flor alımına bağlı ortaya çıkan subkronik flor toksisite tablosunun karaciğer, beyin, hipofiz bezi ve tiroid dokuları üzerine histopatolojik ve enzimatik etkileri nelerdir?

1.3 Araştırmanın Hipotezleri

Yüksek doz sistemik flor alınımı karaciğer, beyin, hipofiz bezi ve tiroid dokuları üzerine toksik etki yaratır. Hipofiz bezinde kalsifikasyonlara yol açar. Oksidatif stresi artırır ve antioksidan sistemde bozukluğa sebep olur.

1.4 Araştırmanın Varsayımları

Tüm canlılarda yüksek dozlarda sistemik flor alınımı dokularda hasara yol açar, sıçanların diş hekimliği çalışmalarında iyi bir deney modeli oluşturmasından yola çıkılarak organlarda histopatolojik değişimlerin incelenmesi söz konusu olduğundan herhangi başka bir yöntem hayvan çalışmasının yerine konulamamaktadır.

Araştırmanın varsayımları, araştırmanın tüm aşamalarında araştırmacının standardize edemediği ve doğruluğundan büyük ölçüde emin olduğu şartlarla ilgili durumları ifade eder.

1.5 Araştırmanın Sınırlılıkları

Hayvan deneyleri toksisite çalışmalarında istenilen koşulların oluşturulmasına olanak sağladığı için önemlidir. Elde edilen bilgiler asıl hedef olan insanlara göre yalnızca yorumlanabildiği için tam gerçekçi sonuçlara ulaşamayabilir.

1.6 Araştırmanın Amacı

Farklı dozlarda sistemik flor alınımının karaciğer, beyin, hipofiz bezi ve tiroid gibi hayati önemdeki organlarda neden olduğu toksik etkiyi ölçmek ve yaşamsal faaliyetin düzgün devam etmesini sağlayan enzimatik sistem üzerine etkisini görmek amaçlanmıştır.

2. Genel Bilgiler

2.1 Flor

Flor, halojenlere ait 9 atom numaralı ve 19 atom ağırlıklı bir elementtir (Fawell, Bailey, Chilton, Dahi, & Magara, 2006). Reaktivitesi ve elektronegativitesi yüksektir (G. M. Whitford, 1990). 1886'da Fransız kimyager Moissan tarafından keşfedilen flor mat yeşil-sarı renkte, koroziv bir gazdır. Bilinen en reaktif elementtir, bu sebeple oksijen ve asal gazlar dışındaki tüm elementlere bileşik oluşturur ve doğada serbest halde bulunamaz (Fejerskov, Larsen, Richards, & Baelum, 1994).

2.1.1 Flor'un Doğada Bulunuşu

Flor yeryüzünün yaklaşık 0,3gr/kg'ını oluşturur; su, toprak, hava, bitki ve hayvanların dokularında farklı miktar ve bileşiklerde bulunur (Doull ve ark., 2006; Harrison, 2005). Yeryüzünün doğal yapısında genelde kriyolit (Na_3AlF_6), florspar (CaF_2) ve florapatit ($Ca_{10}F_2(PO_4)_6$) şeklinde bulunur. Yüzeysel sularında 0,01-0,3 mg/l düzeyindeyken yer altı sularında bu miktar 20-53 mg/l'ye kadar çıkabilmektedir. Sulardaki flor düzeyi çevre kayaların yapısına ve ortamda florlu bileşikler içeren minerallerin varlığına göre değişir. Denizlerdeki flor düzeyi ise 1,2-1,5 mg/l aralığındadır (Natalia Ivanovna Agalakova & Gusev, 2012).

Yeraltı sularının flor düzeyi, florun doğal kaynakları çeşitli kayalar ve volkanik aktivite olmasından dolayı sıcaklığa, çevre toprak ve kayaların asiditesine ve porözitesine ve çevredeki bileşiklerin oranına bağlıdır (Guan ve ark., 1998). Endüstriyel ve volkanik alanlarda suların sıcaklığının artmasına bağlı olarak suların flor oranları 30-50 mg/l'ye kadar çıkabilmektedir (D'Alessandro, 2006). Florun tarımda rodentisit-insektisit amaçlı ve antihelminetik olarak kullanılmasının yanı sıra endüstriyel aktivitelerde özellikle günümüzde gübre, ağır metal, porselen, tuğla, cam ve çimento gibi kollarında kullanılması, yeraltı sularında flor düzeylerinin artmasına neden olmuştur ve flor içeren bileşikler insan sağlığı açısından önemli hale getirmiştir (Ando ve ark., 2001; Fidancı, Salmanoğlu, Maraşlı, & Maraşlı, 1998; Luo, Liu, & Li, 2012).

2.1.2 Endemik Florozis Bölgeleri

2.1.2.1 Dünyada Endemik Florozis Bölgeleri

Dünyanın değişik alanlarında sulardaki flor konsantrasyonu farklılık göstermektedir (Doull ve ark., 2006; Mascarenhas & Mashabi, 2008; Viswanathan, Jaswanth, & Gopalakrishnan, 2009). Yapılan araştırmalar dünyada 25 ırktan yaklaşık 200 milyon kadar insanın florozisten etkilendiğini ortaya koymuştur. 1994 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) içme sularındaki ideal flor miktarının 0,5-1 mg/l olması gerektiğini belirtmiş ve üst sınır 1,5mg/l olarak söylenmiştir. Bu sınırlama baz alındığında Hindistan, Pakistan, Moğolistan, Doğu Afrika, Mısır, Libya, Cezayir, Sudan, Kenya, Tanzania, Türkiye, Irak, İran, Suriye, Afganistan, Meksika, Arjantin, Tayland ve Çin içme suyu flor oranı yüksek olan bölgelerdir (Organization, 2004; Tekle-Haimanot ve ark., 2006).

2.1.2.2 Türkiye’de Endemik Florozis Bölgeleri

Türkiye’de bazı bölgeler insanlar ve hayvanlar açısından endemik florozis bölgeleridir; bu bölgeler genelde volkanik alanlar, flor rezervleri bulunan topraklar ve sanayilerin çevreleridir (Atabey, 2005; Fidancı ve ark., 1998; Oruc, 2008; S. Varol, Davraz, & Varol, 2008). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda Türkiye’de tespit edilen endemik florozis bölgeleri; Kırşehir, Isparta, Edirne-Habiller köyü, Van-Aşağıyılanlı Köyü, Van-Gökçekaynak Köyü, Elazığ, Nevşehir, Kayseri, Uşak- Eşme Köyü, Konya- Seydişehir, Muğla-Yatağan, Samsun-Vezirköprü, Van-Çaldıran, Ağrı-Doğubeyazıt, Aydın-Buharkent, Eskişehir- Beylikova ve Kızılcaören Köyüdür (Oruc, 2008; Oruç, 2005; S. Varol ve ark., 2008).

2.1.3 Flor Alım Kaynakları

2.1.3.1 İçme Suları

İçme suları canlılar için en önemli flor alım kaynaklarından biridir. Uluslararası standartlara göre içme sularında bulunması ideal flor miktarı 0,5-1,5 mg/l arası bir değerdir. Bu değerlerin üzerinde florozis meydana gelebilir (Doull ve ark., 2006; Fawell ve ark., 2006). Hem yeraltı hem yüzey sularında mevcut olan florun konsantrasyonu 0,7 ppm ve daha üzeri olduğunda içme suyu başlıca flor kaynağı olmaktadır, bu durum doğal nedenlerle olabileceği gibi elektronik, cam, demir-çelik endüstrisi gibi sanayi atıklarının deşarjlarından da kaynaklanabilmektedir (Ando ve ark., 2001; Doull ve ark., 2006; Fawell ve ark., 2006; Richter, Kierdorf, Richards, Melcher, & Kierdorf, 2011).

Toplum genelinde sulara 1 ppm kadar flor eklenmesinin çürük prevelansında düşüş sağladığı gösterilmiştir fakat daha sonra WHO florun kümülatif etkisini önlemek amacıyla içme sularında flor konsantrasyonunun 0,5 ppm'de tutulmasını önermiştir (Brambilla, 2001; Edition, 2011). İçme suyundaki flor konsantrasyonu ile dental florozis arasında pozitif bir ilişki olduğu kabul edilmiştir (Doull ve ark., 2006; Maheshwari, 2006; Mandinic ve ark., 2010; Mascarenhas & Mashabi, 2008; B. Wang, Zheng, Zhai, Yu, & Liu, 2004). Çürük prevelansının azalmasıyla birlikte florozis görülme sıklığının artması, içme sularına flor ekleme uygulamasının yeniden değerlendirilmesine yol açmıştır (Parnell, Whelton, & O'mullane, 2009).

2.1.3.2 Diğer Kaynaklar

Flor temelde organizmaya sindirim ve solunumla alınır. Diyetle alınan florun temeli su ve yiyeceklerdir (Fawell ve ark., 2006; Murray & Naylor, 1996). Yiyeceklerde genelde az miktarda flor bulunur. Standart olarak normal bir beslenme ile günde 1-4mg flor vücuda alınır (Organization, 2004). Florlu diş macunları ve diğer diş bakım ürünlerinin kullanımı da bireyin günlük flor alımına katkıda bulunmaktadır (Tablo 1) (Levy, Broffitt, Marshall, Eichenberger-Gilmore, & Warren, 2010; Martínez-Mier, Soto-Rojas, Ureña-Cirett, Stookey, & Dunipace, 2003; Marya, Dhingra, Marya, & Ashokkumar, 2010). Deniz suyunun 1,2-1,5 mg/l oranında flor içermesi dolayısıyla balık ve diğer deniz ürünleri flor açısından oldukça zengin kaynaklardır. Gıdalar

arasında doğal şekilde en çok flor içeren besin balıktır (Natalia Ivanovna Agalakova & Gusev, 2012; Fawell ve ark., 2006). Bitkilerde inorganik-organik bileşikler halinde olan flor en çok çay yapraklarında bulunur. Çay bitkisi toprak ve havadan absorbe ettiği floru yapraklarında biriktirir. Yapılan çalışmalar değişik tür ve ülke çaylarının flor oranının 23,6-550 mg/kg arasında değiştiğini göstermiştir (Natalia Ivanovna Agalakova & Gusev, 2012; Wong, Fung, & Carr, 2003; Yi & Cao, 2008). Florlu dış macunları, ağız gargaraları, flor tabletleri ve damlaları, flor oranı yüksek sularla sulanan sebze ve meyveler, bunlarla hazırlanan yiyecek, içecek ve meyve suları, flor ilave edilmiş sütler, tuz ve bebek mamaları da diğer flor alım kaynakları olarak listelenebilir (Berg ve ark., 2011; Fawell ve ark., 2006; Levy ve ark., 2010; Martínez-Mier ve ark., 2003; Warren ve ark., 2009). Mama ile beslenen bebeklerin flor alımı sadece anne sütü ile beslenenlerden fazladır. Protein bazlı mamalarda süt bazlı mamalara oranla flor miktarı daha yüksektir. Doz aşımını önlemek açısından mamaların düşük flor içeren sularla hazırlanması önerilir (Dean, Arnold, & Elvove, 1942).

3 yaşın altında aşırı flor alımı sonrasında dental florozis görülebilmektedir. 6 yaşından küçük çocuklarda günlük flor alım kaynakları içme suları, meşrubatlar, gıdalar ve yutulan diş macunlarıdır (Do, Levy, & Spencer, 2012; Doull ve ark., 2006).

Ürün	Flor miktarı(ppm)	Kullanılan miktar	Toplam flor dozu(mg)
%2 NaF solüsyon	9100	2-3ml	18-27
%10 SnF solüsyon	24250	2-3ml	49-73
%5 NaF vernik	22600	0,5-1g	11-23
%1,23 APF jel	12300	3-4g	37-49
%9 SnF jel	22500	2g	45
%0,05NaF solüsyon(ev)	226	10ml/gün	2,3
%0,2 NaF solüsyon(ev)	910	10ml/hafta	9,1

%0,5 APF jel(ev)	5000	3-4g/kaşık	15-20
%0,4 SnF(ev)	970	2g/fırça	2
%0,22 NaF(macun)	1000	2g	2
%0,76 MFP(macun)	1000	2g	2
%0,145 NaF + MFP (macun)	1450	2g	2,9

Tablo 1. Yaygın kullanılan dental ürünlerin flor miktarları (Rugg-Gunn, Villa, & Buzalaf, 2011).

2.1.4 Flor Metabolizması

Florun vücuda girişi sindirim yoluyla bağırsaklardan gerçekleşir. İnsanlarda ve hayvanlarda gastrointestinal sistemden basit difüzyon ile hızlı bir şekilde emilir. Emilimden kısa süre sonra kan flor düzeyi hızla artar ve 30-60 dakika içinde maksimum plazma seviyesine ulaşır. Doğada bileşik halinde bulunan florun serbest radikal halinde sindirimi söz konusu değildir, gıdalarla tuz formunda alınması emilimi geciktirir ancak vücuda giren total miktarı değiştirmez. Florun kanda izlenmesi ile birlikte emilim hızı ile ilgili bir fikir yürütülebilir. Oral NaF alımını takriben florun yaklaşık %90'ı duodenum ve üst jejunumdan difüzyon ile emilir. İntestinal emilim mekanizması ve oranı, mide asiditesine ve florun çözünürlüğüne göre değişir. Asidik mide ortamına giren flor genelde iyon haline dönüşerek mukozadan geçer (Murray & Naylor, 1996; Rugg-Gunn ve ark., 2011; G. M. Whitford, 1994).

Kalsiyum, alüminyum ve magnezyum birlikteliğinde alınan florun emilimi azalır. Aç karnına alındığında plazma pik noktasına 30 dakikada gelirken; yemekten 15 dakika sonra alındığında bu süre 60 dakikaya yükselir. Pik süresinin artması yanı sıra, gıdalar ile alındığında pik konsantrasyonu da azalmaktadır (Browne, Whelton, & O'Mullane, 2005; Rugg-Gunn ve ark., 2011; G. M. Whitford, 1994).

Flor metabolizması emilim, dağılım ve eliminasyon olmak üzere 3 aşamadan oluşur. Florlu bileşikler oral yolla alındıktan sonra gastrointestinal sistemden emilir ve plazmaya taşınarak tüm organizmaya yayılır. Plazmada bulunan flor sert ve yumuşak

dokulara dağılır, aynı zamanda alışveriş de söz konusudur. Florun plazmadan eliminasyonu ise temel olarak böbrekler tarafından sağlanmaktadır (Browne ve ark., 2005; Dhar & Bhatnagar, 2009; Murray & Naylor, 1996; Rugg-Gunn ve ark., 2011).

Zamana göre flor metabolizma eğrisi incelenirse flor farmakokinetiğine ait 3 faz tanımlanır.

1. Ani artış

2. Ortalama 60 dakika civarı genel azalış

3. Sonrasında yavaşlayan azalma

Bu fazlar ağızdan alınan florun farmakokinetik modelini oluşturur, emilim ve dağılım oldukça hızlıdır ancak eliminasyon fazı çok yavaştır (Browne ve ark., 2005; Dhar & Bhatnagar, 2009; G. M. Whitford, 1994).

2.1.4.1 Plazmada Flor

Flor plazmada iyonik ve iyonik olmayan olarak iki temel fazda bulunur. Bunların tamamına total plazma floru denir. Sağlıklı bireylerde içme suyu flor oranı ile plazma flor oranı arasında korelasyon bulunur. Plazmada $\mu\text{M/l}$ olarak mevcutken içme suyunda mg/l olarak söylenir. Ağızdan alımından sonra birkaç dakika içinde plazmada değeri artmaya başlar ve 30-60 dakikada en yüksek değerine ulaşır. Plazma flor düzeyi, alınan flor miktarı, flor emilimi ve dağılan hacmi, kemik gelişiminin durumu, kemik çözünürlüğü, iyonun iskelet sisteminden ve böbreklerden eliminasyonu gibi farklı faktörlerden etkilenmektedir (Tablo 2). Ağızdan alınan flor, plazmadan dağılarak kemik ve diş gibi kalsifiye olmuş dokulara geçer ve buralarda birikir. Plazmadaki flor aynı zamanda kemik havuzundan gelen flor miktarı ile de değişebilir. Plazmadaki değer vücuda alınan toplam flor iyonu miktarıyla ilgilidir. Dokulardaki değer homeostaz ile belirlenemez. İçme suyunda 0,1ppm ve daha düşük değerlerde flor içeren bölgelerde ortalama plazma düzeyinin $0,4\mu\text{mol/l}$ ($7,5\mu\text{g/l}$) olduğu tespit edilmiştir. Bu oran 0,9-1,0 ppm civarı olduğunda plazma düzeyi yaklaşık $1\mu\text{mol/l}$ ($19\mu\text{g/l}$) olduğu gözlenmiştir. Florun plazmadaki yarılanma ömrü kişiden kişiye değişmekle birlikte ortalama 2-9 saat kabul edilmektedir (Natalia I Agalakova & Gusev, 2011; Rugg-Gunn ve ark., 2011; Selwitz, Ismail, & Pitts, 2007).

Doku	Doku-plazma flor oranı
Böbrek	4,16
Karaciğer	0,98
Akciğer	0,83
Dil	0,69
Tükürük bezi	0,63
Diyafram	0,61
Kalp	0,46
Deri	0,43
Yağ	0,11
Beyin	0,08

Tablo 2. Ratlarda yumuşak doku-plazma flor oranları (Murray & Naylor, 1996).

2.1.4.2 Flor Eliminasyonu

Vücuda alınan flor ter, dışkı ve idrar yolu ile atılır. En önemli atım şekli idrardır. Günlük alınan florun %40-60 civarı yaklaşık 5 saat içinde idrarla vücuttan atılmaktadır. Tükürük ve anne sütünde de düşük miktarda bulunur. Flor eliminasyonu, içme suyu konsantrasyonu 2 ppm ve daha düşük olduğunda 0,1 mg/saat olarak belirtilmiştir (Mellberg & Ripa, 1983; Organization, 1994; Venkateswarlu, 1990; G. M. Whitford & Ekstrand, 1990). Beslenme şekli, fiziksel aktivite ve rakım gibi faktörler idrar pH'ını değiştirerek flor metabolizmasını da etkilemektedir. İdrarı asidik yapan durumlar vücuttan flor eliminasyonunu azaltırken, bazik yapan durumlar eliminasyonu hızlandırır (Angmar-Månsson & Whitford, 1990; Organization, 1994; G. M. Whitford & Ekstrand, 1990).

2.2 Flor Toksisitesi

Optimal dozlarda uzun süreli flor alımı vücutta herhangi bir hasara yol açmazken tek seferde çok yüksek dozda alındığında “Akut Flor Toksisitesi”, uzun süre optimal dozdan biraz daha yüksek flor alındığında ise “Kronik Flor Toksisitesi” tablosu ortaya çıkar (Ermis ve ark., 2007; Parnell ve ark., 2009; Rugg-Gunn ve ark., 2011; G. M. Whitford, 1990).

2.2.1 Akut Flor Toksisitesi

Tek seferde ve toksik doz kabul edilen 5mg/kg kadar flor alımı akut flor toksisitesine yol açar. 3-5mg/kg flor alımı sonucunda gastrointestinal semptomlar görülür. Bu tablo karın ağrısı, kusma, ishal, hipersalivasyon, hipokalsemi, kas spazmı ile karakterizedir ve nadir görülür (Kundu ve ark., 2015). Hafif seyreden zehirlenme durumlarında semptomlar 24 saat içinde azalarak sonlanır. Aşırı olgularda bunlara ek olarak kardiyak aritmi ve koma gözlenir. Florun sinir dokularına etkisi konvülsiyon, görme bozuklukları, parestezi ve bilinçte bulanma olarak kendisini gösterir. 15-30mg/kg dozuyla meydana gelen zehirlenmeler ölümlle sonuçlanabilir (Hujoel, Zina, Moimaz, & Cunha-Cruz, 2009; Kaminsky, Mahoney, Leach, Melius, & Jo Miller, 1990).

Akut zehirlenmede en ciddi bulgular solunum sisteminde ortaya çıkar. Başlangıçta uyarılan solunum sistemi sonrasında deprese olur. Pulmoner ve laringeal ödem görülebilir. Ani hipokalsemiye bağlı kas fonksiyonları ve pıhtılaşma mekanizmaları bozular. Anaerobik glikoliz enzimlerini, asetilkolinesteraz fonksiyonunu, magnezyum ve çinko içeren enzimleri etkileyerek doku solunumunu bozar. Ca, Mg veya Al tuzlarının uygulanması haricinde tedavisi yoktur (Kundu ve ark., 2015; Mellberg & Ripa, 1983; G. M. Whitford, 1992).

2.2.2 Kronik Flor Toksisitesi

Optimal dozun biraz üzerinde florun uzun süre alınımıyla ortaya çıkar. Dünya genelinde endemik bölgelerde görülür ve insan sağlığı için tehlikelidir (Aoba, 1994;

Berg ve ark., 2011; Bronckers, Lyaruu, & DenBesten, 2009; Browne ve ark., 2005; Mellberg & Ripa, 1983). Endemik bölgelerdeki içme suyu flor konsantrasyonu, buralarda yetişen ve bu sularla sulanan meyve ve sebzelerin tüketilmesi, flor içeren ilaç ve dental ürünlerin hatalı kullanımı sonucu kronik flor toksisitesi oluşur. WHO'nun belirlediği 1,5ppm üzeri flor içeren suların sürekli tüketimiyle sert ve yumuşak dokularda florozisin sonuçları izlenebilir(Darchen, Sivasankar, Prabhakaran, & Bharathi, 2016; Organization, 2004; Warren ve ark., 2009).

Flor sert dokularda birikir, buralardan beyin, karaciğer ve böbrek gibi dokulara yayılarak metabolik bozukluklara yol açar (Guan ve ark., 1998; Guan ve ark., 2000; Gui, Ran, Li, & Guan, 2010; Kaur, Bijarnia, & Nehru, 2009). Sistemik olarak toksik dozda flor alımının vücuttaki en önemli etkisi hücre bazında temel enzim inhibisyonu ile kalsifiye doku üzerinde meydana gelir (Fawell ve ark., 2006). Florun kalsifiye dokular üzerindeki etkisi dental ve iskeletsel florozis olarak ortaya çıkar (Pamela DenBesten & Li, 2011; Ding ve ark., 2011; Marya ve ark., 2010; Mascarenhas & Mashabi, 2008).

2.3 Florun Sert Dokular Üzerine Etkisi

2.3.1 Dental Florozis

Dişlerin gelişim aşamasında optimal doz üzeri flor alımına bağlı, ameloblastlarda mine formasyonunda hata sonucu oluşan bir çeşit mine hipoplazisidir (Aoba & Fejerskov, 2002; Mandinic ve ark., 2010; Mascarenhas & Mashabi, 2008; Vieira, Hancock, Eggertsson, Everett, & Grynopas, 2005). Minedeki flora bağlı bu değişiklikler ilk kez 1916'da Black ve Mackay tarafından eser elementlere maruz kalmanın bir sonucu olarak öne sürülmüştür, yapılan bağımsız çalışmalar sonucu bu tarz lekelenmelerin görüldüğü bireylerin yaşadıkları alanlardaki içme sularında yüksek oranda flora rastlanmıştır. Bu çalışmaları takriben 1934'te Dean Florozis İndeksi geliştirmiştir, 1942'de yaptıkları epidemiyolojik çalışmalarla içme suyu flor oranı ve dental florozis derecesi arasında anlamlı bir ilişki tespit etmişlerdir (Dean ve ark., 1942). İlerleyen yıllarda pek çok epidemiyolojik çalışma daha yapılmıştır ve sonuçlar 1942'deki çalışmayla karşılaştırıldığında hafif düzeyde dental florozis görülme sıklığının endemik bölgeler dışında dahi arttığı görülmüştür. Bunun sebebi olarak içme suyu

dışında çok erken macun kullanımı, flor tabletleri kullanımı, uzun süreli bebek maması tüketimi gibi diğer flor alım kaynakları gösterilmiştir (Buzalaf, Damante, Trevizani, & Granjeiro, 2004; PK DenBesten, 1999; Hujoel ve ark., 2009; Levy ve ark., 2010).

Dental florozis temelde mineyi etkiler, dış ve iç mine tabakasında hipomineralizasyon sonucu meydana gelir. 2 yaşından küçük çocuklarda yüksek flor içeren diş macunu kullanımının florozis şiddetini ve prevelansını arttırdığı bildirilmiştir (Mascarenhas, 2000). Florozisin şiddeti, alınan doza ve dişin maruz kalımdaki gelişim evresine bağlıdır. Doğumdan 8 yaşına kadar olan süre en hassas dönem olarak bildirilmiştir (Levy ve ark., 2010).

2.3.1.1 Dental Florozis'in Klinik Bulguları

Klinik şiddet, alınan dozla ilişkili olarak farklılık gösterir. En hafif tipte diş yüzeyi kurutulduğunda minede horizontal beyaz hatlar görülür. Daha şiddetli durumlarda hatlar daha belirgin ve geniş hale gelmiştir. Bu hatlar birleşerek opak beyaz, düzensiz alanlar oluşturur. Şiddet arttıkça diş yüzeyi tebeşirimsi beyaz bir görüntü alır. Çok şiddetli tablolarda mine yüzeyi korozyonlu gibi gözüktür. Morfolojik yapıda bir anomali bulunmamasına rağmen abrazyona karşı dayanıklılık azalmış olduğundan bazı durumlarda şekil anomalilerine rastlanabilir. Florozisten etkilenmiş dişlerde sürme sonrası sarımsı-kahverengi renk değişiklikleri görülebilir, bu durum organik yapının fazla olmasıyla ilgilidir (Ermis ve ark., 2007; Fejerskov ve ark., 1994; Rugg-Gunn ve ark., 2011).

2.3.1.2 Dental Florozis'in Patogenezi

Yapılan çalışmalar flor enjeksiyonları sonrasında salgılanan matriksin daha amorf ve çizgili olduğunu, normal mine matriksi ile karşılaştırıldığında artmış kristaller arası boşluklar olduğunu ve kristallerin daha dağınık yerleştiğini göstermiştir. Şiddetin arttığı vakalarda iç mine dokusunda prizmasız mineye rastlanır. Flor oranı yükseldiğinde prizmatik mine kesintiye uğramış ve prizmasız mine oluşmuştur, florun etkisi geçtikten sonra prizmatik mine oluşumu devam eder (Bronckers ve ark., 2009; Browne ve ark., 2005; Yan, Zhang, Li, & Denbesten, 2007; Y. Zhang, Yan, Li, & DenBesten, 2006). Flor, matriks proteinlerinin çözülmesini engeller ve kristal

büyümesini inhibe edecek mekanizmalar oluşturur. Ameloblastların salgıladığı proteaz enzimini azaltır ve matriks proteinlerinin degradasyonunu düşürür; matriks proteinlerine bağlanan mine kristallerinin absorpsiyon kapasitesini, yüzey alan ve özelliklerini değiştirir. Proteaz aktivitesi için gerekli olan kalsiyum miktarını düşürür, matriks endositozunu ve hücre içi degregasyonu bozar. Aynı zamanda apoptozisi artırır ve göç eden mature ameloblastları stimüle eder. Tüm bu mekanizmalar mature ameloblastların sayısını ve mineralizasyon tamamlama kapasitesini azaltır. Bu değişik faktörlerin florozis oluşumunda etkili olduğu gösterilmiştir ancak temel mekanizmanın hangisi olduğu belirsizdir (Bronckers ve ark., 2009; D. Lyaruu ve ark., 2011; D. Lyaruu, Bervoets, & Bronckers, 2006; D. M. Lyaruu, Bronckers, Santos, Mathias, & DenBesten, 2008; Robinson ve ark., 2004). Çalışmalar flor ve kalsiyum arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Yüksek amelogenin sentezinin kalsiyum miktarına bağlı olması ve kalsiyum varlığının depolanan mine tabakasındaki kristalize büyüme için mineral iyonları sağlaması bunu açıklar (Tanimoto ve ark., 2008).

Kalsiyumun etkisi üç farklı hipotezle açıklanır. Başlangıçtaki mineralizasyonda ortamda hızlı tüketime bağlı kalsiyum eksilmesi matrikste yeni kristaller oluşmasını engeller. Düşük florlu ortamda sekresyon fazındaki ameloblastların yapısı, ortamdaki kalsiyum eksikliğinden daha az etkilenmektedir. Bu durum da flor etkisine bağlı hipokalseminin daha etkili olduğunu gösterir. Bir diğer hipotezde amelogeninler flora bağlanır ve kristallerdeki flor etkisi tamponlanır. Amelogeninlere direkt olarak bağlanamayacağı için bu etki yönlendirilmiş kalsiyum bağlanması ile ortaya çıkar. Son hipotez ise amelogeninlerin florun mine formasyonunu arttırdığı alanlardaki pH'ı düzenlemesi ile florun direkt birikimini engellemesi, yüksek kalsiyum fosfat miktarı ile hidroksiapatit oktakalsiyum fosfat hidrolizini tetikleyerek mine kristallerinin büyüme oranını çoğaltması esasına dayanır. Bu işlemler sonucu asidik bir matriks ortamı meydana gelir ve matriks hücre etkileşimi tamamen değişir (Browne ve ark., 2005).

Apatit kristalleri oluşurken ortamda protonlar yoğunlaşır ve nötralize edilmeleri gerekir. Amelogenin tamponlama sistemi yetersizse flora bağlı pH düşmesinin amelogeninin fonksiyonunu etkileyeceği öne sürülmektedir. Amelogenin tarafından nötral pH'ta nano büyüklükte küreler oluşturulur, bu küreler sekresyon fazında kristal alanları kaplar ve kristaller arası molekül şeklinde davranır. Kaplanan alanlar kristallerin C aksı boyunca uzunlamasına büyümesini sağlar. Bu kürecikler aynı

zamanda pH 6-8 arasındaki değişimlere çok hassastır. Nötr pH'ta büyük çökeltiler oluştururken 6'ya düştüğü durumlarda parçalara ayrılır ve matris sıvısını oluşturur. Bu sebeple hipermineralizasyon ve sonrasında ortamın flora bağlı asidikleşmesiyle amelogenin etkilenir, hipomineralizasyon meydana gelir (Bronckers ve ark., 2009; Sharma, Tsuchiya, Skobe, Tannous, & Bartlett, 2010). Plazma flor düzeyinin düşük olduğu durumlarda bu etkiler de küçük olur. Erken sekresyon safhasında amelogenin sentezi çok azdır ve aprizmatik mine oluşur. Flor varlığında bu alanlar daha çok mineralize olur ve ortam daha hızlı asidikleşir. Benzer şekilde geç sekresyon safhasında da amelogenin hidrolizi sırasında kalsiyum ve flor poröz mineye hızla difüze olur. Her iki dönemde de düşük amelogenin, protonların tamponlanması için uygun bir ortam oluşturamaz (Akdoğan ve ark., 2002; Bronckers ve ark., 2009).

2.3.2 İskeletsel Florozis

Kronik yüksek doz flor alımına bağlı, şiddetli kemik deformite tablolarıyla karakterizedir (E. Varol & Varol, 2010). Florun özellikle büyüme ve gelişme dönemlerinde kronik alımı, iskeletsel dokularda flor tutulumuna ve patolojik formasyonlara yol açmaktadır (Rugg-Gunn ve ark., 2011). Gelişmekte olan kalsifiye dokularda flor tutulumunun başlaması intrauterin hayatta olur. Kemik öncül dokusu çok vaskülarizedir ve flor doku sıvısıyla kolayca taşınır. Florozisten en yüksek oranda etkilenen kemikler, metabolik aktivitesi yüksek olan, hızlı büyüyen kemiklerdir; flor alımının en yüksek olduğu dönem aktif kemik formasyonu dönemidir. Osteopeni, osteoskleroz ve osteoporoz gibi bulgular, deformiteler, spinal kord kompresyonu, eklemlerde hipertrofi ve artirit ile karakterize bir tablo oluşturur (Tamer ve ark., 2007).

2.4 Florun Yumuşak Dokular Üzerine Etkisi

Uzun dönem flora maruz kalınmasının, akut veya kronik fark etmeksizin organizmada pek çok sistem üzerine etkili olduğu ortaya konmuştur (P Mahaboob Basha, Puja Rai, & Shabana Begum, 2011; Bouaziz, Croute, Boudawara, Soleilhavoup, & Zeghal, 2007; Kobayashi ve ark., 2009; Tao, Xu, & Wang, 2006; A. Wang ve ark., 2005; Xu, Zhou, Zhang, Lu, & Li, 2010).

2.4.1 Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

Oksijen molekülü yaşam için vazgeçilmezdir ancak metabolizasyonu sırasında serbest radikaller olarak bilinen son derece reaktif ara ürünler oluşur. Reaktif metabolitler olarak da anılan bu moleküller protein, lipid ve DNA gibi hücrelere ait bileşenlere zararlıdır (P Mahaboob Basha ve ark., 2011; Mittal & Flora, 2006; Surh, 2005). Bu zararlardan korunmak adına hücreler reaktif metabolitleri nötralize eden antioksidanlar üretir. Reaktif metabolitlerin oluşma hızı ve nötralize olma hızı arasında bir denge olması gereklidir; böylece hücre olumsuz etkilerden korunur. Bu denge reaktif metabolitlerden yana bozulursa hücre içinde miktarları artar. Bu artışın hücre fonksiyonları üzerindeki olumsuz etkiye ve hasara “Oksidatif Stres” adı verilir, besinlerin enerjiye dönüştürülmesi sırasında meydana gelen moleküller sebebiyle oluşur (Shanthakumari, Srinivasalu, & Subramanian, 2004; Surh, 2005).

Ultraviyole ışınlar, kimyasallar, ilaçlar, radyasyon, stres, sigara, alkol gibi pek çok sebepten reaktif metabolitler oluşabilir. Bu reaktif metabolitler ateroskleroz, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet, serebrovasküler hastalıklar, renal yetmezlik, anfizem, karaciğer yetmezliği ve yaşlanmaya bağlı dejeneratif bozukluklar gibi pek çok patolojinin oluşmasına neden olur (Mittal & Flora, 2006, 2007).

Reaktif metabolitler ultraviyole ışınlar, radyasyon, uyuşturucu, alkol, yiyeceklerde bulunan toksik maddeler, pestisitler, anestezi maddeler, sigara, stres ve elektromanyetik alanlar gibi eksojen kaynaklardan oluşabildiği gibi mitokondrial elektron transport sistemi, küçük moleküllerin oto-oksidasyonu, ketokolaminler, flavinler, antibiyotikler, sitokrom p-450, fagositik hücre aktivasyonu, peroksizomların enzimleri, prostoglandin sentetaz ve lipid peroksidasyonu gibi endojen kaynaklı da olabilir (Jakob & Reichmann, 2013).

Reaktif metabolitleri nötralize eden başlıca antioksidan enzimler katalaz, süperoksit dismutaz ve GSH-Px'tir (Guan ve ark., 1998). Glikoprotein yapısında bir hemoprotein olan katalaz enzimi yüksek konsantrasyonlarda hidrojen peroksit içeren ortamlarda etkilidir, ortamdaki hidrojen peroksidi suya dönüştürür. Daha düşük oranda hidrojen peroksit içeren ortamlarda ise GSH-Px gibi diğer antioksidan enzimler devreye girer. Etkileri benzer olmasına karşın katalaz, peroksizomlarda daha etkin iken GSH-Px genelde sitozol ve mitokondrilerde daha etkindir (Shanthakumari ve ark., 2004).

Süperoksit dismutaz metaloenzim grubundan, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite dönüşmesini sağlayan bir enzim grubudur. Radikal metabolitlerin zararlı etkilerinden hücreyi koruyan en önemli enzimdir (Surh, 2005).

Bileşik formda florun kan-beyin bariyerini geçtiği ve uzun dönem yüksek dozda flora maruz bırakılan sıçanların beyin dokularında biriktiği tespit edilmiştir (Basha & Madhusudhan, 2010; P Mahaboob Basha ve ark., 2011). Flor beyin dokusunda nikotinic asetilkolin reseptörlerinde azalma, oksidatif stres ve DNA hasarı gibi nörotoksik sonuçlara yol açabilir (Gui ve ark., 2010; Y.-J. Liu, Gao, Wu, & Guan, 2010).

NaF şeklinde alınan flor midede hidroflorik asite dönüşüp gastrik mukozada irritasyona sebep olur; karın ağrısı, bulantı ve kusma gibi bulgular verir. Mukozada meydana gelen hasar doku iyonlarının konsantrasyonuna bağlıdır. 1,0-5,0 mmol/l arası flor konsantrasyonlarının 15 dakika mide mukozasına penetrasyonunun etki eşik değeri olduğu kabul edilmektedir (Rugg-Gunn ve ark., 2011).

Kardiyovasküler sistem üzerinde temeldeki etki florun kalsiyuma bağlanarak hipokalsemiye sebep olması ve hipokalseminin dolaylı yoldan tetani, kardiyovasküler kollaps ve baskılanmış miyokard kontraktilitesine sebep olmasıdır (Gessner, Beller, Middaugh, & Whitford, 1994; Peters & Miethchen, 1996).

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi ve Deney Protokolü

Bu çalışma Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 24.01.2018 tarih ve 2018-012 sayılı etik kurul onayı alındıktan sonra Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Araştırma ve Uygulama merkezinde, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda ve Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde gerçekleştirildi.

Çalışmada yaklaşık 180-240 gram ağırlıkta Wistar albino cinsi 12 erkek, 12 dişi olmak üzere toplam 24 rat kullanıldı. Ratlar Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi ve bakımları burada gerçekleştirildi. Ratlar her birinde 3 dişi ve 3 erkek olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

Hayvanların tümü, süreç boyunca standart laboratuvar diyeti ile beslendi, oda sıcaklığı 24 ± 1 °C derecede tutuldu, deney süresince uygun şekilde ışık almaları sağlanan bir ortamda 12 saat aydınlık-karanlık siklusu içinde ve günde bir kez temizlenen talaş altlıklı kafeslerde ayrı ayrı olarak barındırıldı. Yem ve suları ad libitum olarak verildi (Resim 1).

İçme suyu olarak deney süresi olan 3 ay boyunca içeriğindeki flor oranı bilinen ve piyasadaki en düşük oranlardan biri olan ($<0,02$ ppm) Erikli Su (Türkiye) tercih edildi. 50 ppm'lik çözelti hazırlanırken 2 lt'lik balon jöje içerisine hassas tartılan 0,442 g NaF katısı eklendi. 100 ppm'lik çözelti hazırlanırken 2 lt'lik balon jöje içerisine 0, 884 g NaF katısı eklendi. 200ppm'lik çözelti hazırlanırken de 1,768 g NaF katısı 2 lt Erikli su içerisine balon jöjede eklenerek karıştırıldı. Tüm bu solüsyonlar Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Analitik Kimya Bölümü öğretim üyelerinden destek alınarak fakülte laboratuvarında hazırlandı.

Grup I: Kontrol grubu içeriğindeki flor oranı bilinen (<0,02 ppm) içme suyu (Erikli, Türkiye) ad libitum verildi.

Grup II: Günlük 50 ppm flor alacak şekilde NaF içeren içme suyu verildi.

Grup III: Günlük 100 ppm flor alacak şekilde NaF içeren içme suyu verildi.

Grup IV: Günlük 200 ppm flor alacak şekilde NaF içeren içme suyu verildi.



Resim 1. Hayvanların ayrı kafeslerde bakımı, suların sadece araştırmacı tarafından verilmesi sağlandı.

Kontrol grubu dışındaki gruplarda suyun erken bitmesi durumunda Erikli Su ad libitum verildi. Çalışmanın tüm sürecinde 1983 Helsinki deklarasyonunda bildirilen hayvanlarda bilimsel çalışmalar için etik kurallara uygun davranıldı. 3 ayın sonunda tüm hayvanlara genel anestezik olarak Ketamin; 80 mg/kg intraperitoneal, Xylazine 10 mg/kg intraperitoneal yoldan verildi (Resim 2). Servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.



Resim 2. Sakrifasyon öncesi intraperitoneal ketamin uygulaması

3.2 Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması

Hayvanlardan kan örnekleri kalpten alındı ve heparinli tüplere konularak 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan serum, enzim analizleri için ependorf tüplerine yerleştirilip çalışma gününe kadar -80 °C'de saklandı.

Sonrasında karaciğer, hipofiz bezi, tiroid bezi ve beyin doku biyopsileri alındı (Resim 3). Beyin ve karaciğer biyopsilerinin bir kısmı ayrılarak ependorf tüpler içinde enzim çalışması için yine -80 °C'de bekletildi. Geri kalan örnekler %4'lük formol çözeltisinde fikse edildi.



Resim 3. Dekapitasyon sonrası organ alımı

3.3. Enzimatik Analizler

3.3.1. Homojenizasyon

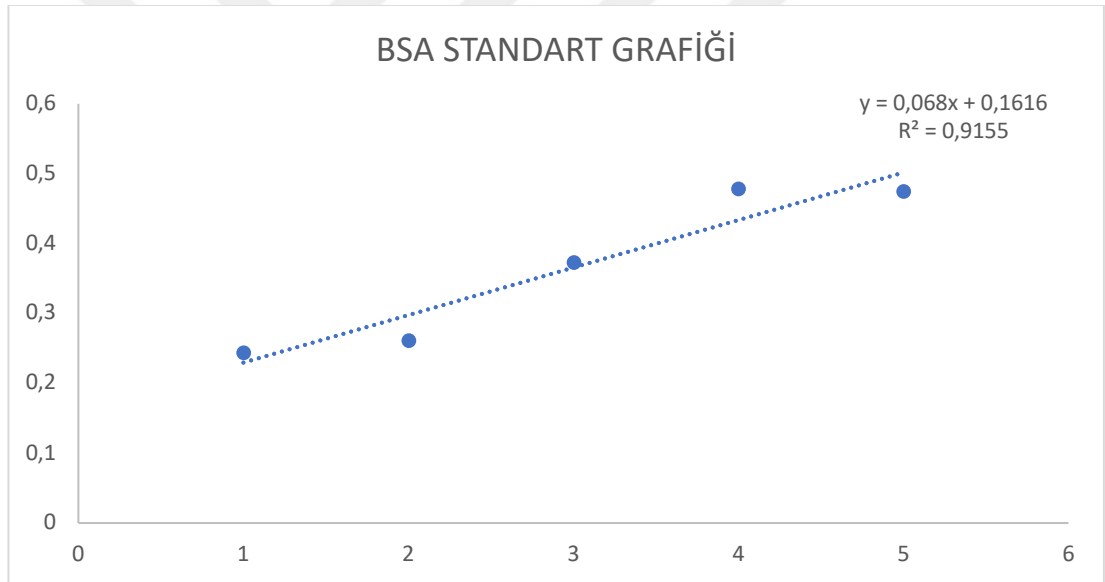
-80’de bekletilen tüpler çözdürüldü ve tartıldı. 12,5 ml 100mM fosfat tamponu, 2,5 ml 10mM EDTA, 0,0255 gram magnezyum klorür, 125 µl DTT, 125 µl PMSF ve 9,75 ml dH₂O karıştırılarak homojenizasyon tamponu elde edildi. Her 1 gram örnek için 3ml homojenizasyon tamponu eklendi. Kuru buz içerisinde homojenizatör ile parçalanmış örnekler başka ependorflara kondu ve +4 °C’de 15 dakika 15000 g’de santrifüjlendi. Elde edilen süpernatant, enzimatik analizler için alikvatlara ayrıldı ve testler yapılana kadar -80°C’de saklandı.

3.3.2. Total Protein Tayini

Örneklerin total protein tayini hassasiyeti yüksek Coomassie Blue yöntemi ile yapıldı (Gessner ve ark., 1994). Yöntem, proteinlerin asidik-bazik gruplarının boyalarla etkileşmesi sonucu oluşan renk değişimlerinin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Homojenize edilen örnekler 1/100 oranında seyreltildi. Microplate kuyucuklarına 12,5’şer µl örnek ve standart eklendi. Bradford standartlarında 2mg/ml

stok için 0,002 BSA tartıldı ve 1ml distile su ile seyreltildi. 0,02 mg/ml standart: 2 µl stok + 198 µl distile su, 0,04 mg/ml standart: 4µl stok + 196 µl distile su, 0,08 mg/ml standart, 8 µl stok + 192 µl distile su, 0,16 mg/ml standart: 16 µl stok + 184 µl distile su, 0,20 mg/ml standart: 20 µl stok + 180 µl distile su kullanılarak standartlar elde edildi (Grafik 1). Kör için yine 12,5 µl distile su kullanıldı.

Bradford reagent hazırlanması için 0,04 gram Coomassie Brilliant Blue (G250) tartıldı ve 50 ml %99'luk etanol ile çözdürüldükten sonra üzerine %85'lik fosforik asit eklenerek karıştırıldı. 800 ml distile su eklenip Whatman no:1 filtresi ile süzüldü ve distile su ile 1 litreye tamamlandıktan sonra tüm kuyucuklara 237,5 µl eklendi. 250 µl'a tamamlanan örnekler oda sıcaklığında 10 dakika karanlıkta inkübe edilmesinin ardından 595 nm dalga boyunda Microplate Reader'da okutuldu.



Grafik 1. BSA standart grafiği

3.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Tayini

Süperoksit dismutaz 1968 yılında oksijenli solunum yapan canlılarda belirlenmiştir. Bu enzim; süperoksitin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler. Hidrojen peroksit daha sonra glutatyon peroksidaz ve katalaz enzimi aracılığı ile etkisiz hale getirilmektedir. Hücre bölünmelerindeki süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol oynar (Rabinowitch & Fridovich, 1983).

Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda fazladır ve doku pO₂ artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde hücre içi süperoksit düzeyi düşük tutulur. SOD'nin hücre dışı aktivitesi çok düşüktür.

SOD, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin (O₂-) hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır.

Kullanılan yöntem ile SOD aktivitesinin belirlenmesi nitroblue tetrazolium (NBT)'nin indirgenmesi prensibine dayanır. Phenazine methosulfate (PMS)'nin konsantrasyonu değiştikçe NBT'nin indirgenme oranı değişecektir. NBT'nin başlangıca göre indirgenme oranı da SOD aktivitesi ile ilişkilidir. Örnekler için SOD aktivitesi, NBT konsantrasyonunu başlangıç konsantrasyonuna göre %50 indiren konsantrasyon olarak sunuldu (IC₅₀).

Analiz anına kadar -80°C'de saklanan doku homojenatları çözdürüldü ve buz üzerinde +4°C'de çalışılarak mikrolate içerisine aşağıda belirtilen hacimler pipetlenerek deneme gerçekleştirildi (Tablo 3). PMS, EDTA ve Fosfat Tamponu reaksiyonu başlatan karışım olduğu için taze hazırlanması gerekti, kör içerisinde PMS mevcut değildi. Örnek kuyucuklarına aşağıda belirtilen hacimler ile örnek pipetlendi kör kuyucuğuna ise fosfat tamponu pipetlendi. NBT'nin indirgenme zamanı 5 dakika olduğundan pipetleme işleminin ardından 5 dakika inkübasyon sonrasında okumalar spektrofotometre kullanılarak 560 nm'de absorbanlar ölçüldü ve enzim spesifik aktivitesi hesaplandı.

Kimyasal Maddeler	Örnek (μ l)	Kör (μ l)
1 mM EDTA	20	20
0,62 mM NBT	20	20
0,98 mM NADH	20	20
50 mM Fosfat Tamponu	140	165
Örnek	25	0
0,33 mM PMS	2,5	0
50 mM Fosfat tamponu	20	22,5
1 mM EDTA	2,5	2,5

Tablo 3. Kullanılan kimyasallar ve pipetleme miktarları

3.3.4. Asetilkolin Esteraz (AChE) Enzim Tayini

Sinir uyarılarının iletilmesinde rol oynayan AChE sıklıkla nörotoksisite indikatörü olarak kullanılır (Muir ve ark., 1992). AChE enzim aktivitesi Ellman yöntemi ile ölçüldü (Ellman, Courtney, Andres Jr, & Featherstone, 1961). Beyin dokusundan asetilkolin esteraz tayini için spektrofotometrik bir ölçüm kullanıldı. Açıltilkolinler, kolinesteraz tarafından yağ asitleri ve tiokoline hidrolizlendi. Tiokolinin oluşum oranı, sarı anyon oluşturan 5,5'-ditiobis-(2- nitro-benzoik asit)- DTNB-, 5-tio-2-nitrobenzoat ve diğer ürünlerden oluşan tiol grubunun sürekli reaksiyonuyla ölçüldü. Sarı anyonun oluşum oranı 405 nm'de spektrofotometrik olarak izlendi.

150 ml saf su içinde 1,919 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0,348 gr. KH_2PO_4 çözüldü, 200 ml'ye tamamlanıp pH kontrolü yapıldı. 100 ml tampon çözeltisinde 0,0107 gram DTNB çözüldü ve tamponlanmış Ellman's reaktifi elde edildi.

100 ml distile su içinde 0,0155 gram asetilkolin klorür çözüldü ve hazırlanan tüm solüsyonlar -80°C 'den çıkartılan ve çözdürülen doku homojenatlarıyla birlikte mikrolatelere yüklendi. 405 nm'de 5'er dakika aralıklarla 0 dakika, 5 dakika ve 10 dakika olarak ELISA plate reader ile 3 okuma yapıldı.

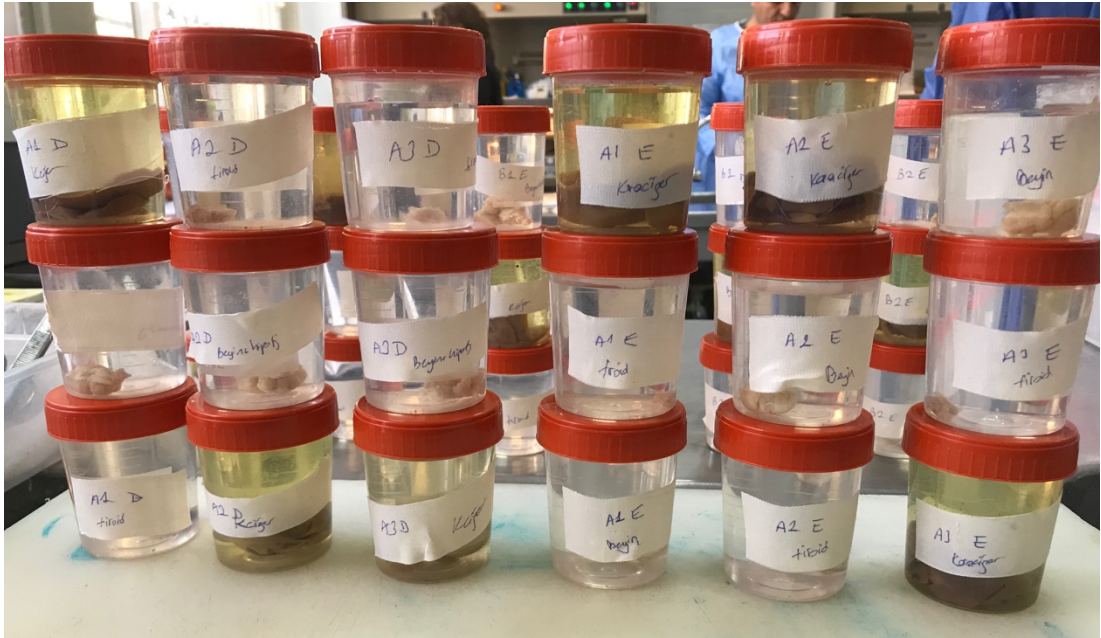
3.3.5. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesi Tayini

Enzimatik antioksidan savunma sistemindeki rolü nedeniyle önemli bir oksidatif stres belirteçidir (Livingstone, 2001). 0,5M dibazik sodyum fosfat elde etmek için 0,071 gram tartıldı ve 100 ml'ye tamamlandı. 0,5M monobazik sodyum fosfat elde etmek için 0,069 gram tartıldı ve 100 ml'ye tamamlandı. İki çözelti birbirine titre edildi ve pH 7.0 olarak ayarlandı. Sonrasında 0,001M EDTA bulunması için yeni solüsyonun hacmine göre tartıldı, %3'lük hidrojen peroksit, 9125 µl tampon ve 875 µl stok hidrojen peroksit ile karıştırıldı.

Örnekler 240 nm'de kuvars küvetlerde kinetik olarak 180 saniye boyunca okutuldu.

3.4 Histopatolojik İnceleme

Dokular 72 saat %4'lük formaldehit içerisinde bekletildikten sonra (Resim 4) makrokesitleri alındı (Resim 5, Resim 6) ve aşağıdaki doku takip işlemleri uygulandı.



Resim 4. Dokü örneklerinin formaldehitte bekletilmesi



Resim 5. Karaciğer ve tiroid makro kesitleri



Resim 6. Beyin makro kesitleri

3.4.1 Doku Takip İşlemleri

- Akan suda yıkama (4 saat)
- Dehidratasyon işlemi; örnekler sırasıyla %70'lik alkolde 1gece, %80'lik alkolde 1 saat, %96'lık alkolde 1 saat, yenilenen %96'lık alkolde 1 saat, %100'lük alkolde 1 saat ve yenilenen %100'lük alkolde 1 saat bekletildi.
- Şeffaflaştırma işlemi; örnekler ksilende 2 kez 10 dakika bekletildi.
- İnfiltrasyon işlemi; örnekler 60°C'lik etüvde sırasıyla ksilen+boncuk parafin içinde 1 saat, boncuk parafinde 1 saat ve sonrasında yine boncuk parafinde 2 saat bekletildi.
- Dokuların parafin bloklara gömülmesi
- Blokların kesilmesi; parafin bloklardan mikrotom bıçağı ile 5µm'lik seri kesitler alındı.
- Hematoksilen ve eosin boyama işlemi; örnekler deparafinizasyon işlemi sonrasında ksilolde önce 20 dakika sonra 10 dakika bekletildi. İki ayrı %96'lık alkol serisinde 5 dakika bekletildi. Sonrasında %80'lik alkolde 10 dakika bekletildi ve boyamadan önce akan suda yıkandı. Hematoksilen boyasında 1 dakika bekletilerek asit-alkol karışımına batırılıp çıkarıldı. Bu kez eosin solüsyonunda 1 dakika bekletildi ve suda 1 dakika yıkandı. Tekrar %80'lik alkolde 10 dakika ve iki ayrı %96'lık alkol serisinde 20 dakika bekletildi. Son olarak ksilol serilerinde 20 dakika bekletildi ve entellan ile kapatma işlemi gerçekleştirildi.

3.5 İstatistiksel Analizler

“SPSS for Windows” bilgisayar programı ile enzimatik bulguların analizleri yapıldı. Grup ortalamaları arasında anlamlılık Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi. $P < 0.05$ ve altı anlamlı kabul edildi. İnkorelasyon analizleri Pearson Two-Tailed testi ile gerçekleştirildi.

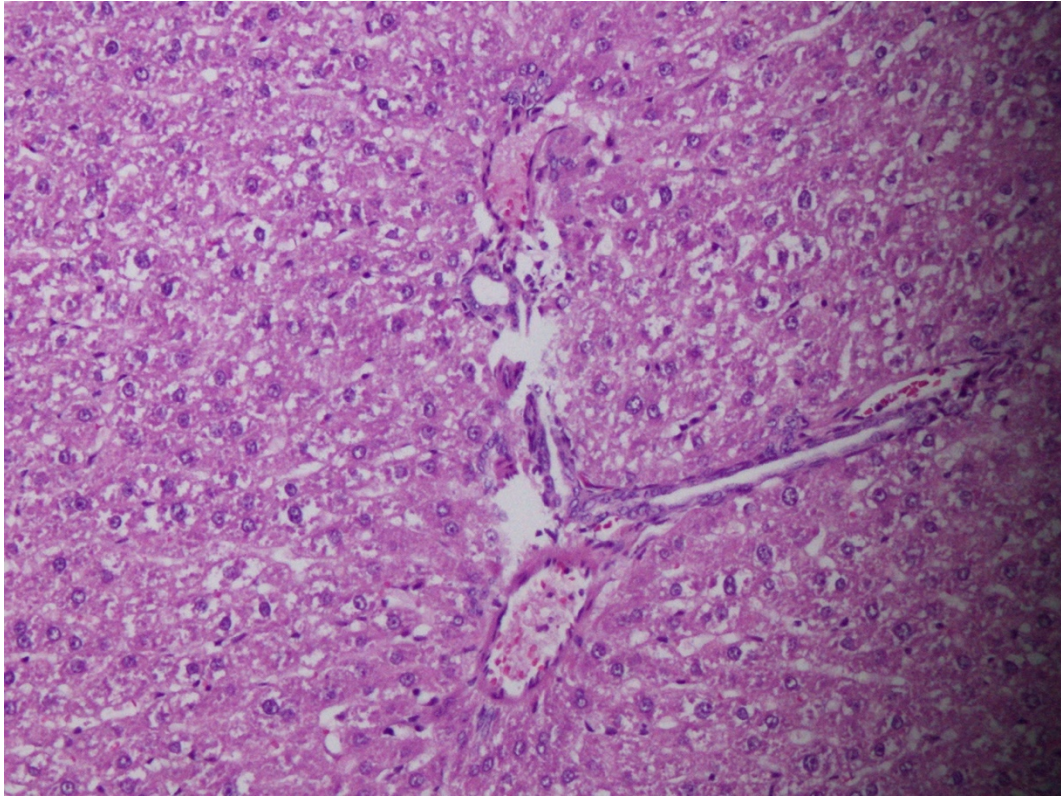
4. Bulgular

4.1 Histopatolojik Bulgular

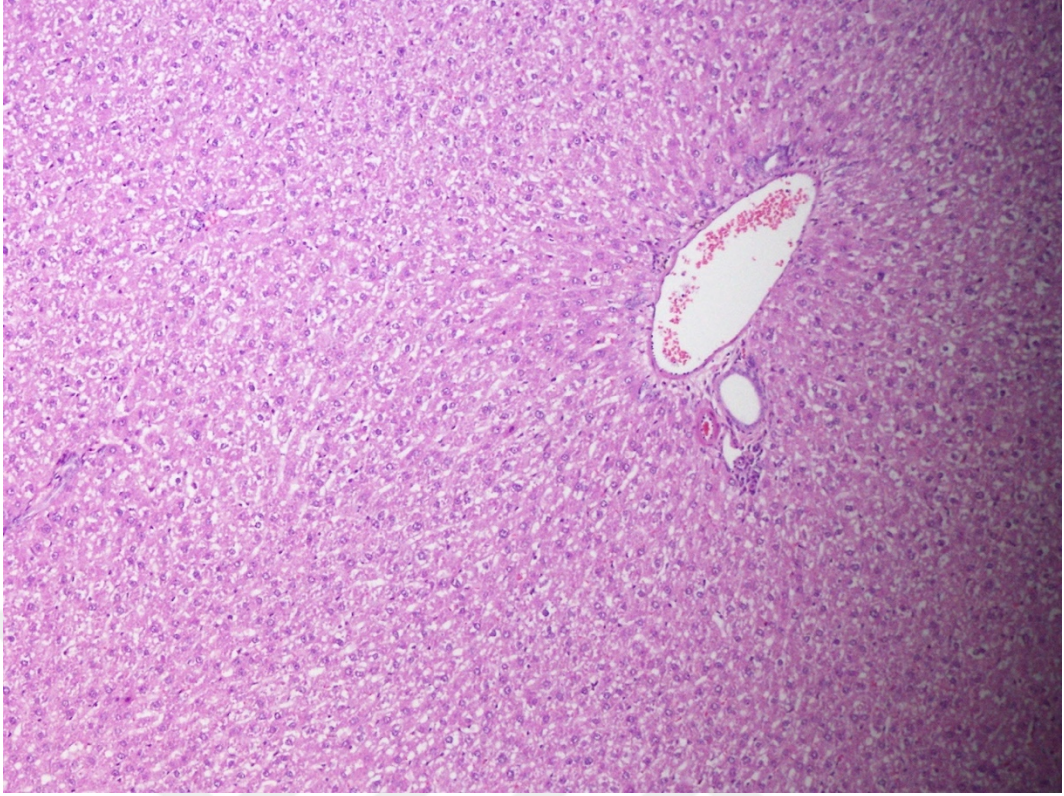
4.1.1 Karaciğer Bulguları

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Resim 7, Resim 8) 50 ve 100ppm flor alan deney gruplarında tüm hayvanlarda karaciğerde konjesyon ve hafif portal yangı ile polimorf nüveli lökosit (PNL) infiltrasyonu gözlenmiştir. Yaygın balon dejenerasyon ve bazı alanlarda fokal nekrozlar görülmüştür (Resim 9, Resim 10, Resim 11, Resim 12).

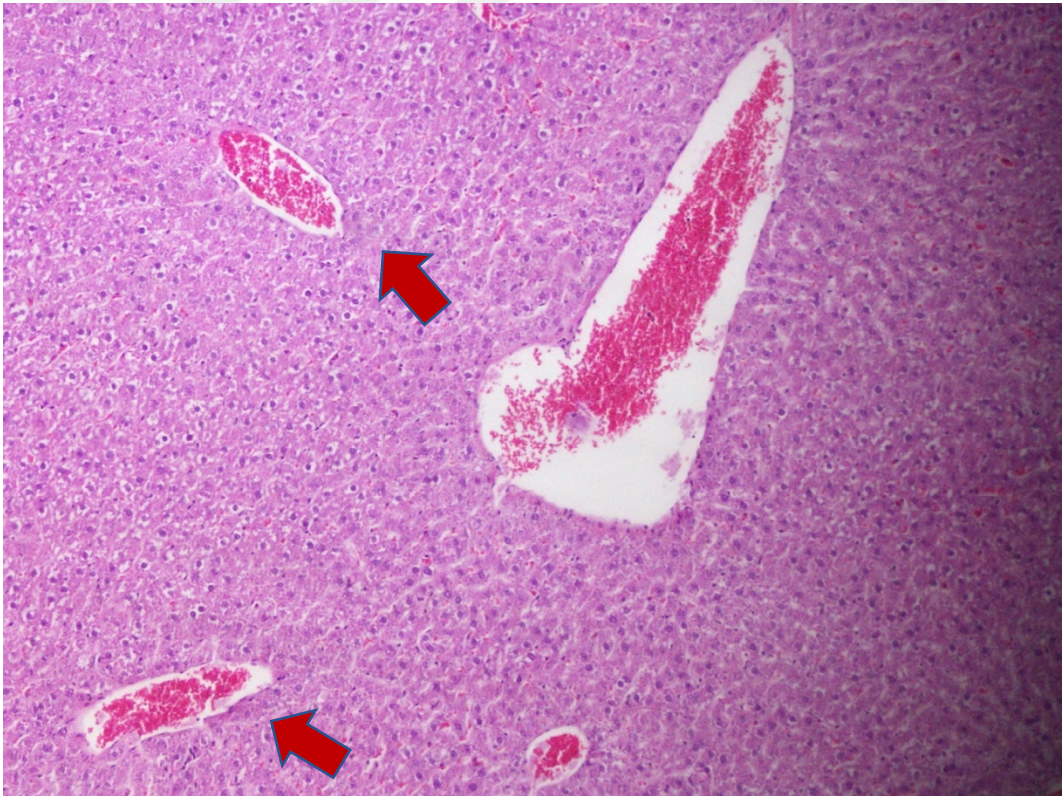
200 ppm flor alan deney grubundaki tüm hayvanlarda aynı patolojik bulgular artmış şekilde mevcuttur (Resim 13, Resim 14, Resim 15).



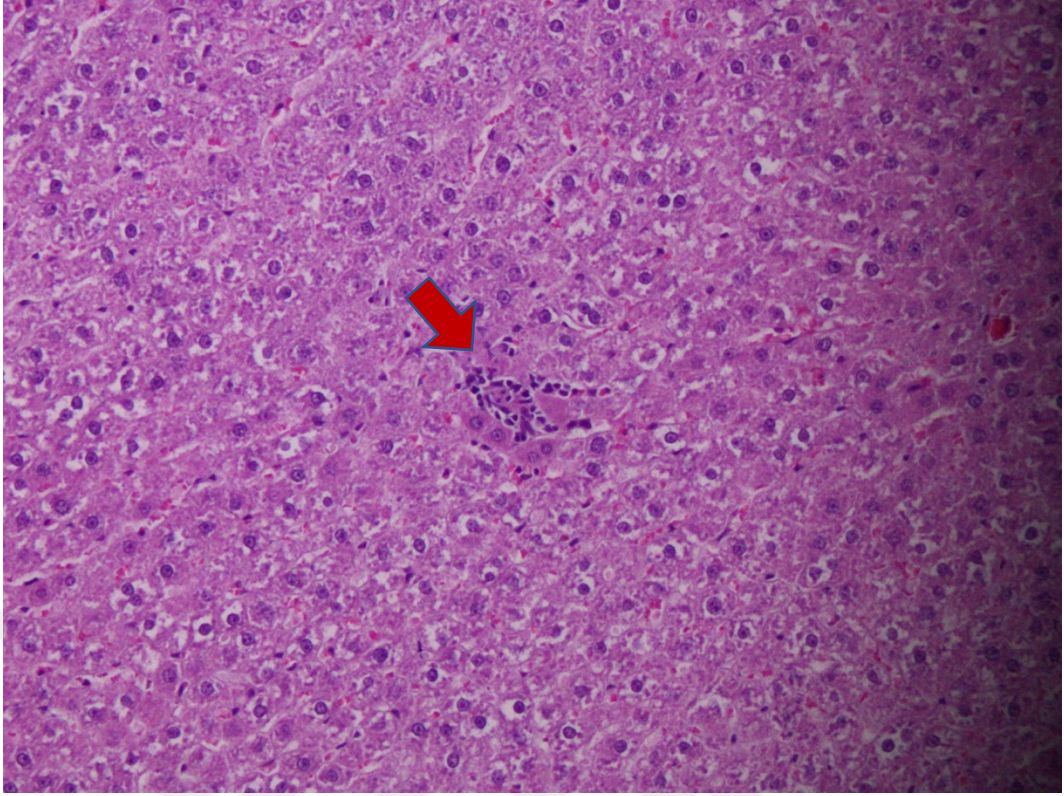
Resim 7. Kontrol grubu karaciğer dokusu (x20 büyütme)



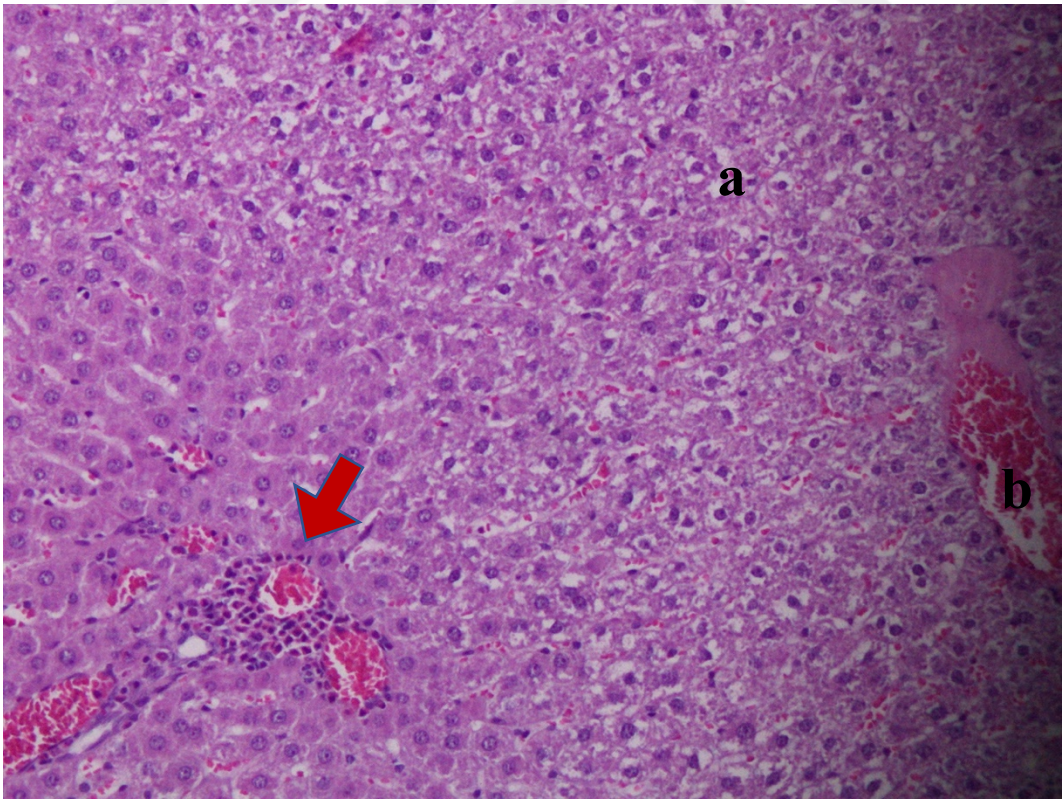
Resim 8. Kontrol grubu karaciğer dokusu (x10 büyütme)



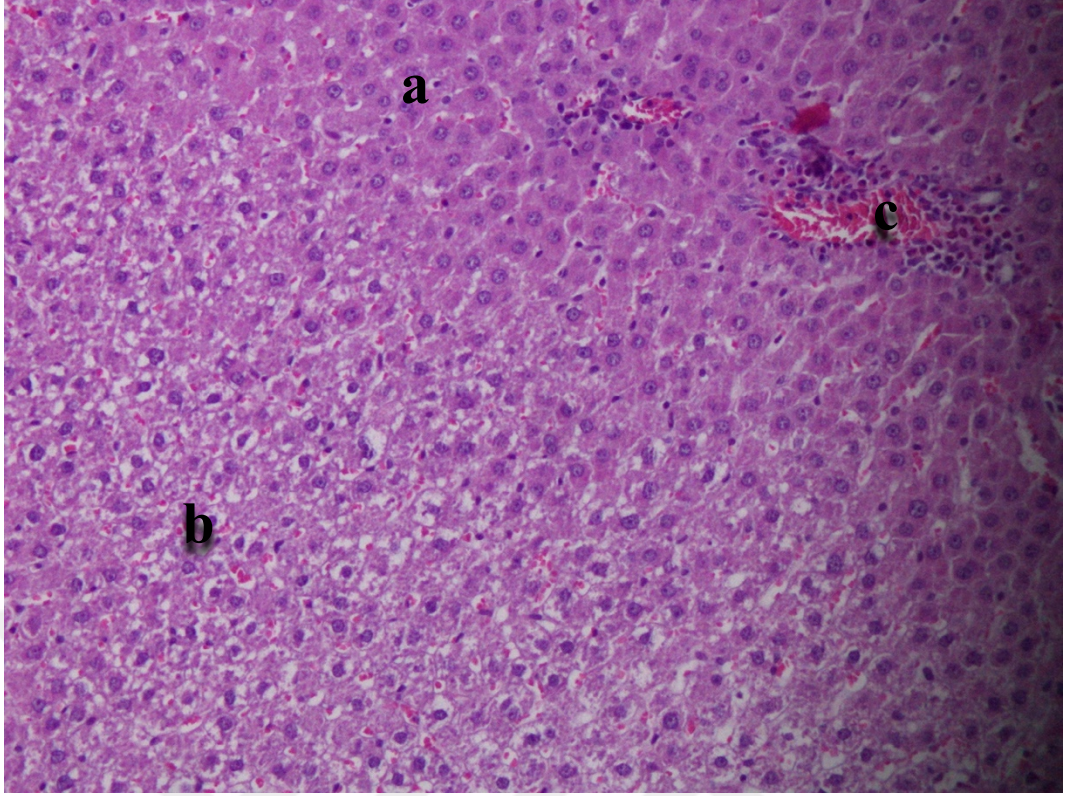
Resim 9. 50 ppm karaciğer dokusu konjesyone damarlar (x10 büyütme)



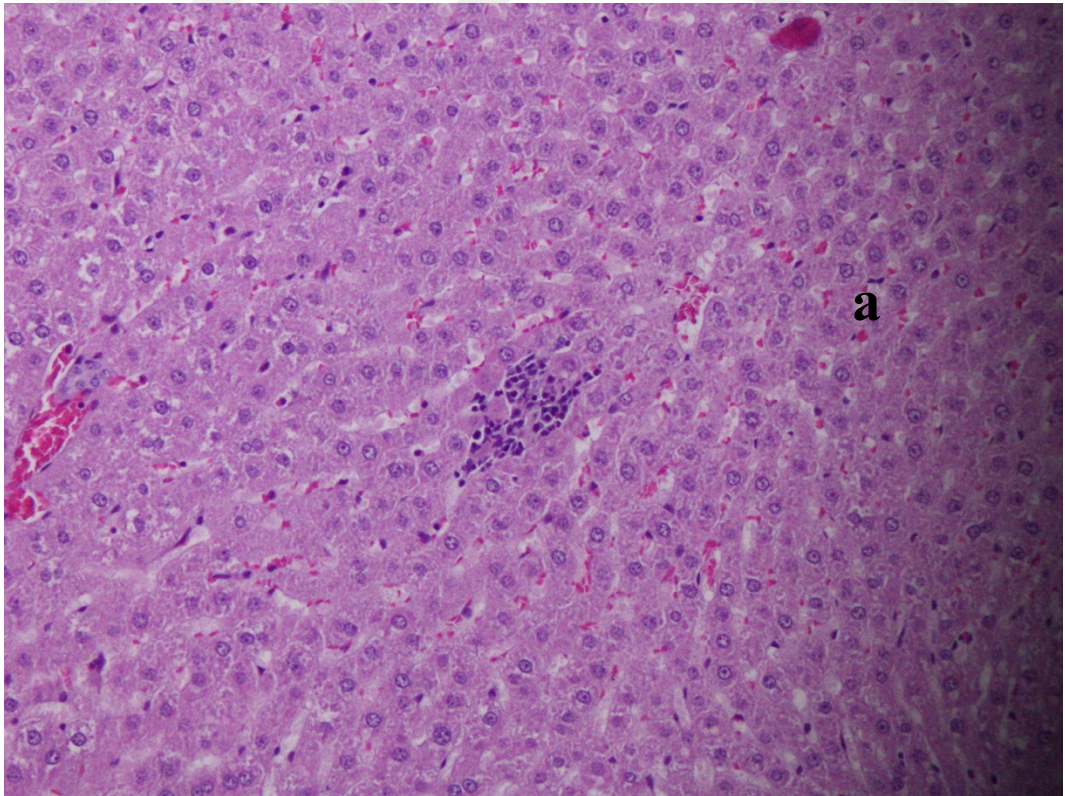
Resim 10. 50 ppm karaciğer dokusu fokal nekroz (x20 büyütme)



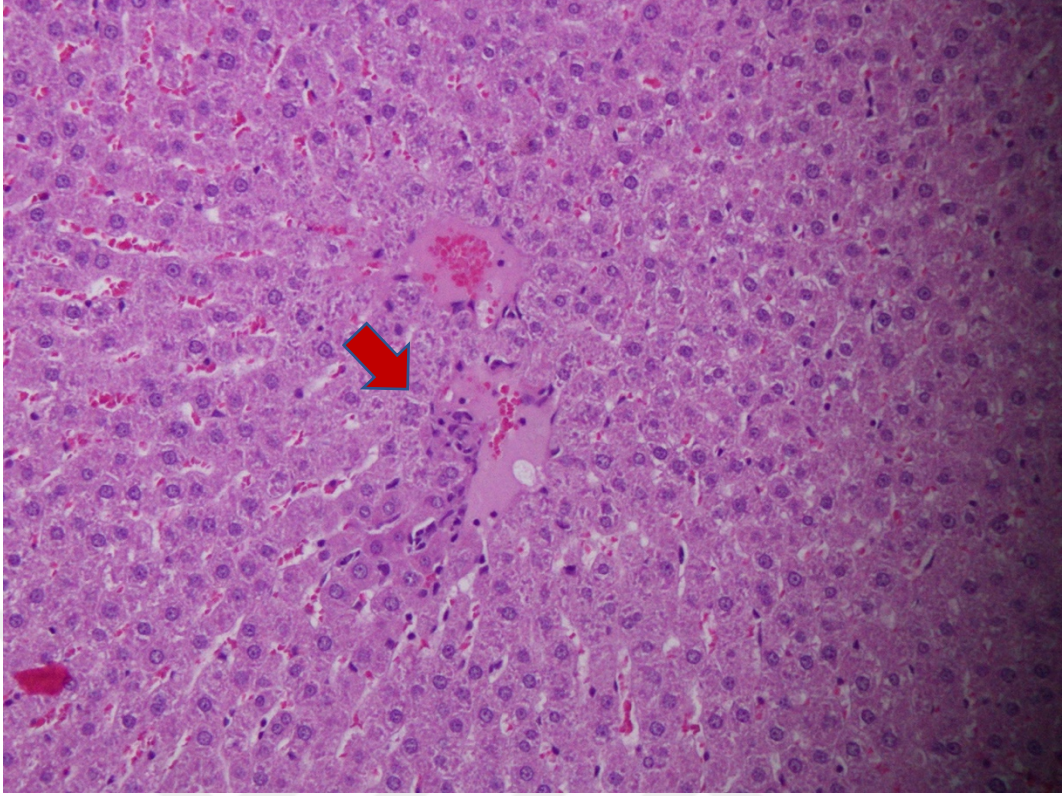
Resim 11. 100 ppm karaciğer dokusu portal yangı(ok), balon dejenerasyon(a) ve konjesyone damarlar(b) (x20 büyütme)



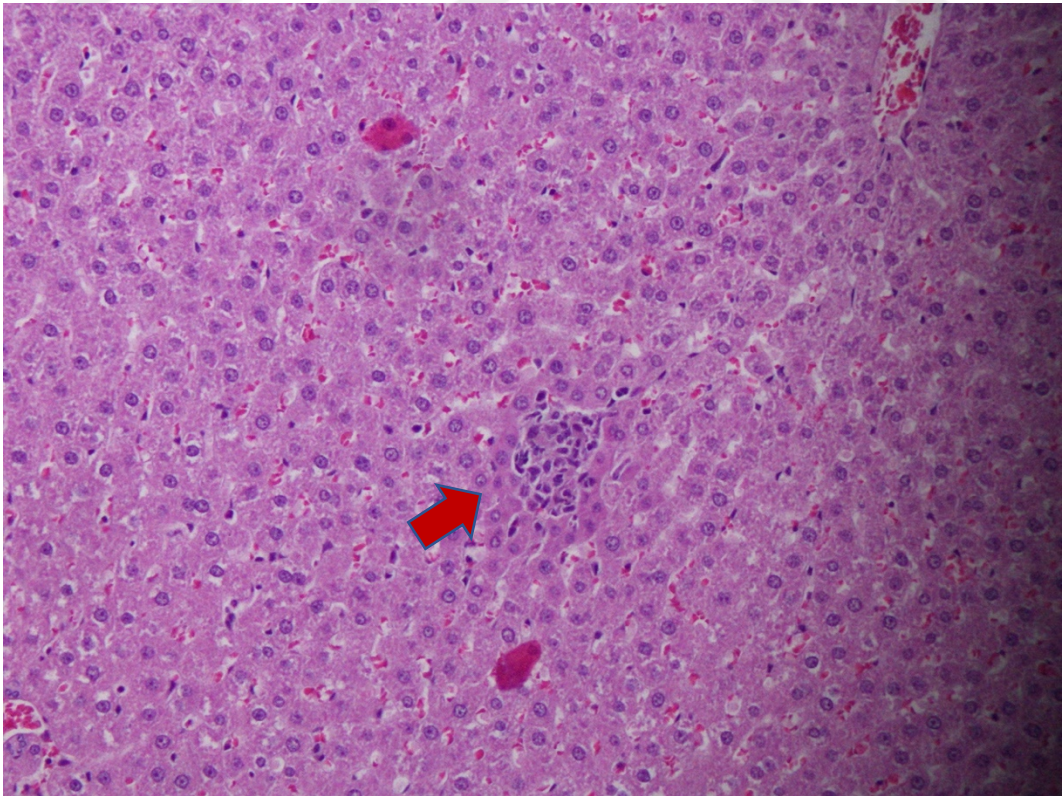
Resim 12. 100 ppm karaciğer olağan dokusu(a), portal yangı balon dejenerasyon(b) ve konjesyone damarlar(c) (x20büyütme)



Resim 13.200ppm karaciğer dokusu çok belirgin balon dejenerasyon(a)(x20 büyütm)



Resim 14. 200 ppm karaciğer dokusu merkezde artmış fokal nekroz (x20 büyütme)



Resim 15. 200 ppm karaciğer dokusu artmış fokal nekroz (x20 büyütme)

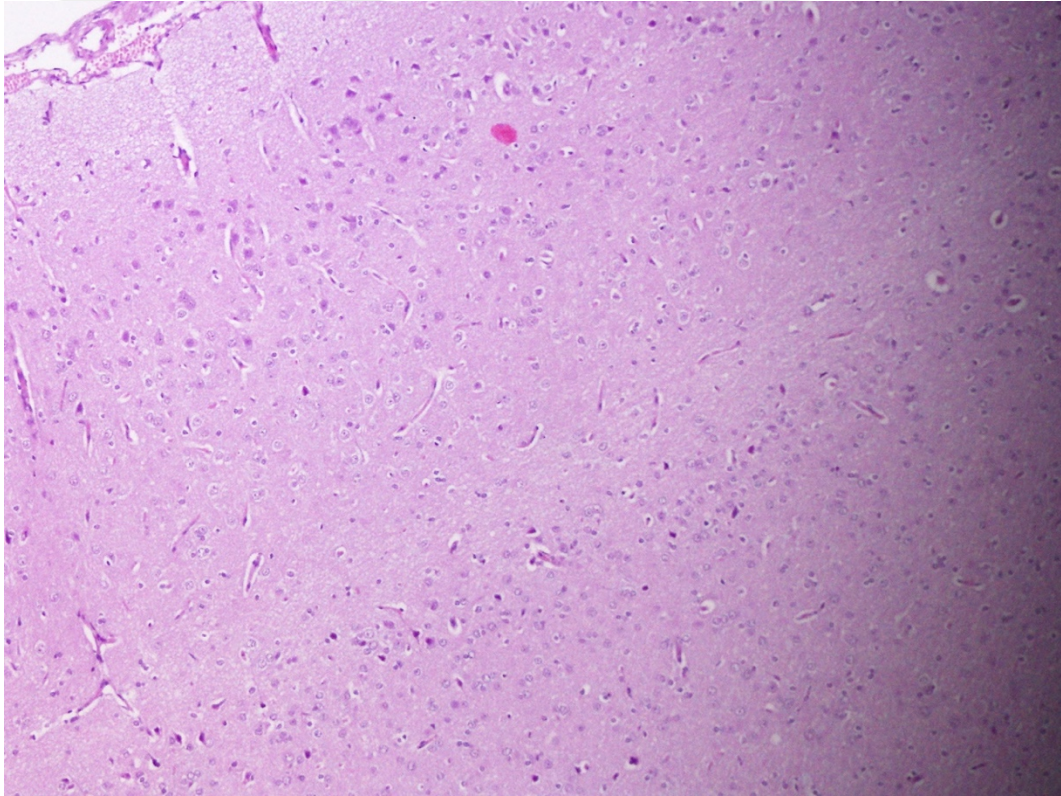
4.1.2 Beyin ve Hipofiz Bezi Bulguları

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Resim 16, Resim 17); 50 ppm flor alan deney grubunda beyinde konjesyone damarlar ve kırmızı nöronlar izlenmiştir. Cerebellumda purkinje hücrelerinde hipoksik değişikliklere rastlanmıştır. Granüler hücre tabakasında nekroz ve sayıca azalma mevcuttur. Koroid plexus olağandır (Resim 18, Resim 19).

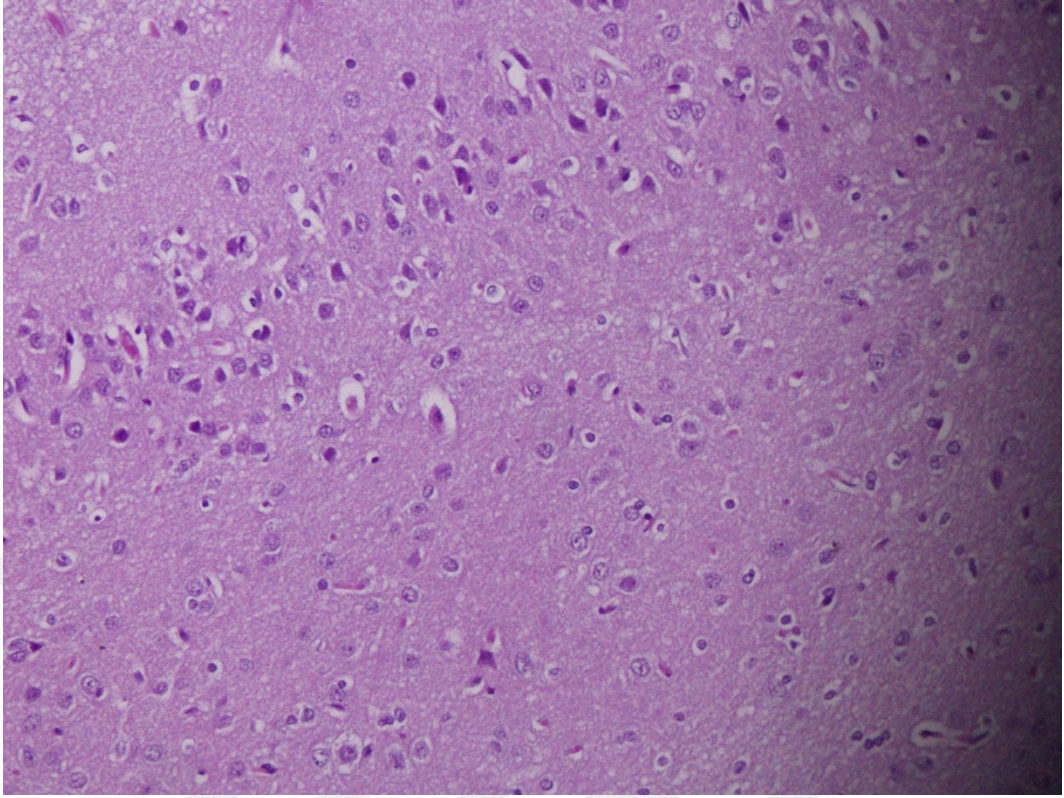
100 ppm flor alan deney grubunda tüm bu bulguların artmış olarak izlenmesine ek koroid plexus hücrelerinde hiperplazi, beyin parankiminde mikroskobik odaklar şeklinde fokal infarkt alanları ve nekroz tespit edilmiştir. Granüler hücre yapısında belirgin anomali görülmüştür (Resim 20, Resim 21).

200 ppm flor alan deney grubunda tüm bulgular oldukça artmış şekilde izlenmektedir. Ek olarak fokal gliozis alanları, meningotelial hücre proliferasyonu ve gruplar oluşturmuş kırmızı nöronlara rastlanmıştır (Resim 22, Resim 23).

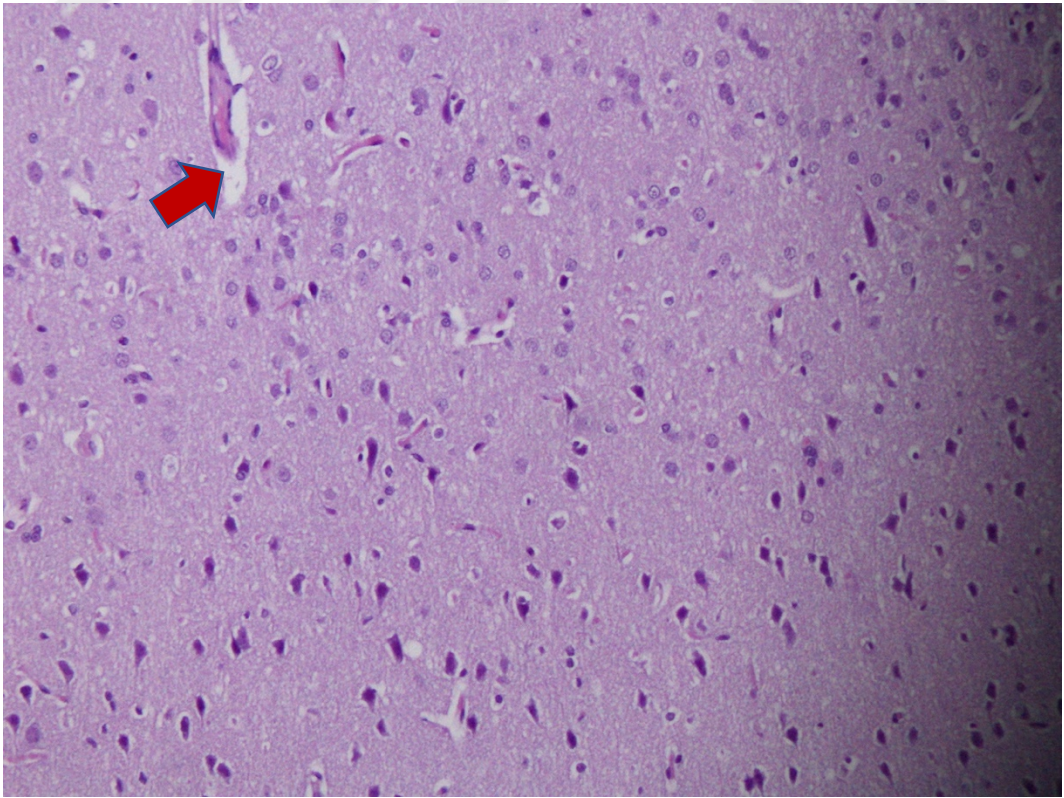
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (Resim 26, Resim 27) tüm gruplarda hipofiz bezi olağandır, hiçbir patoloji saptanmamıştır (Resim 28, Resim 29, Resim 30, Resim 31, Resim 32).



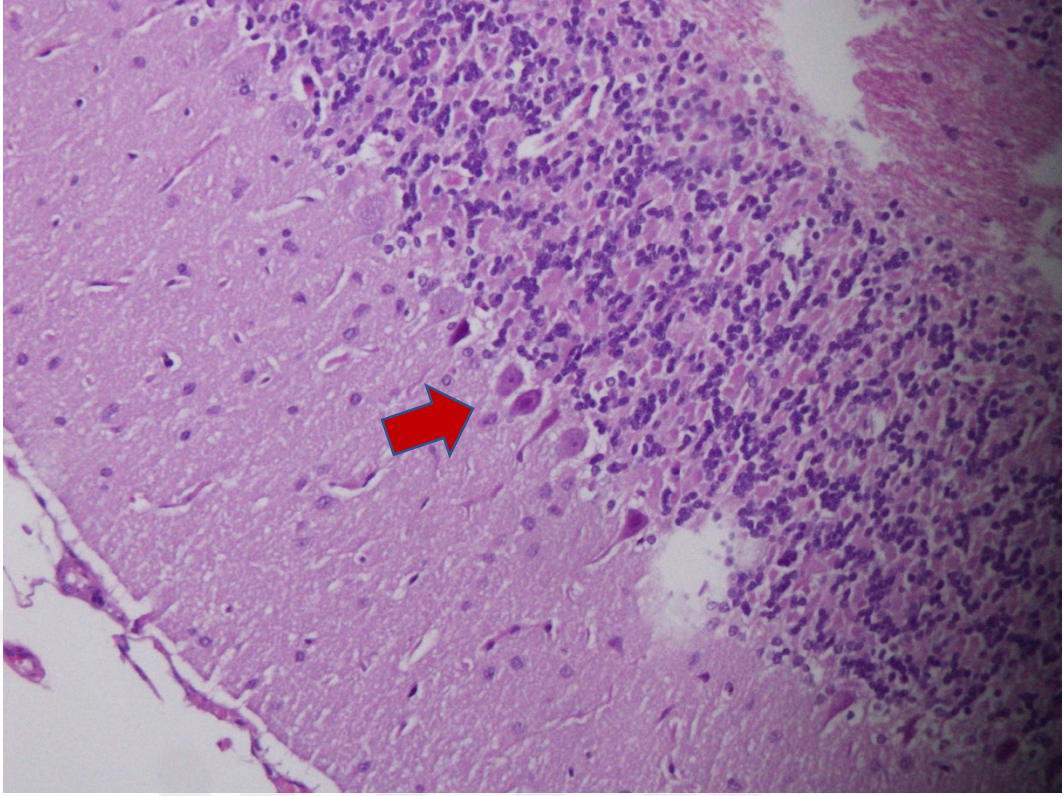
Resim 16. Kontrol grubu beyin dokusu (x10 büyütme)



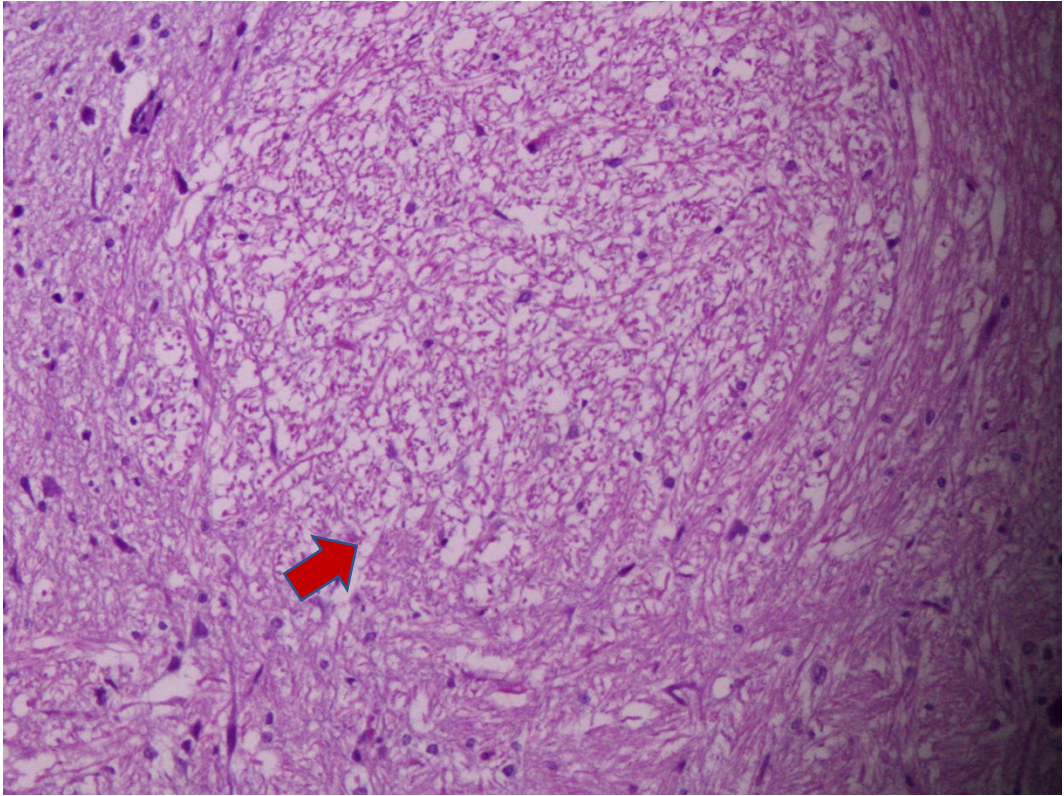
Resim 17. Kontrol grubu beyin dokusu (x20 büyütme)



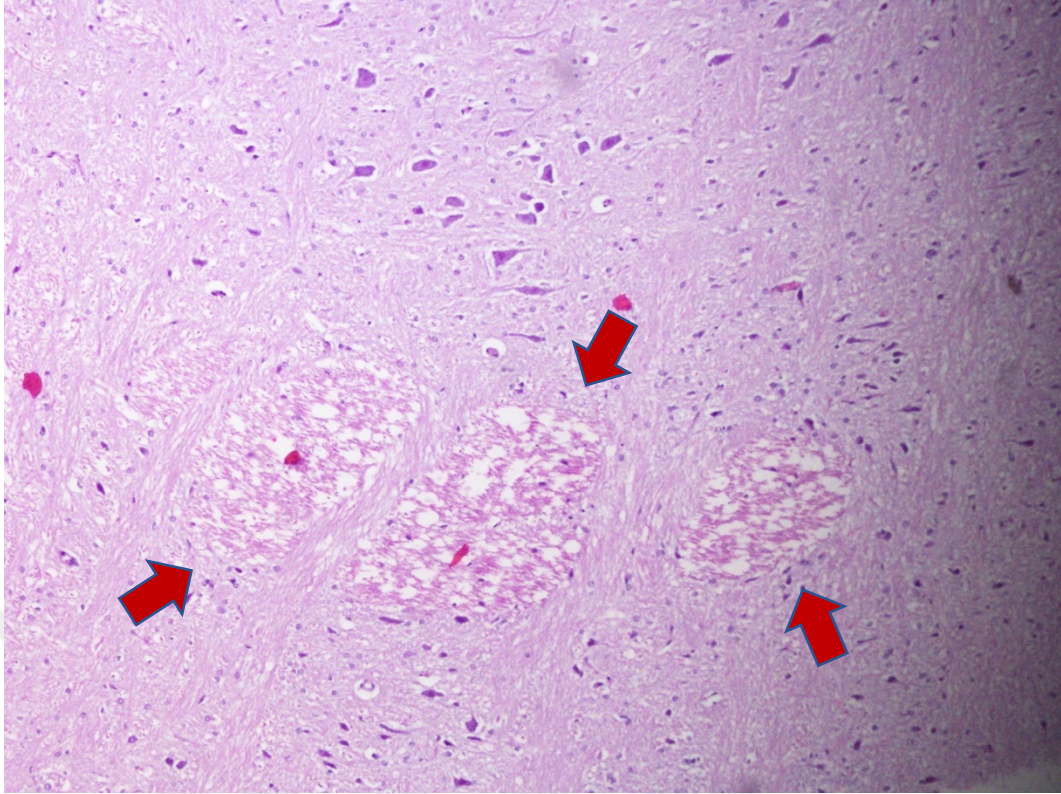
Resim 18. 50 ppm beyin dokusu konjesyone damarlar (x20 büyütme)



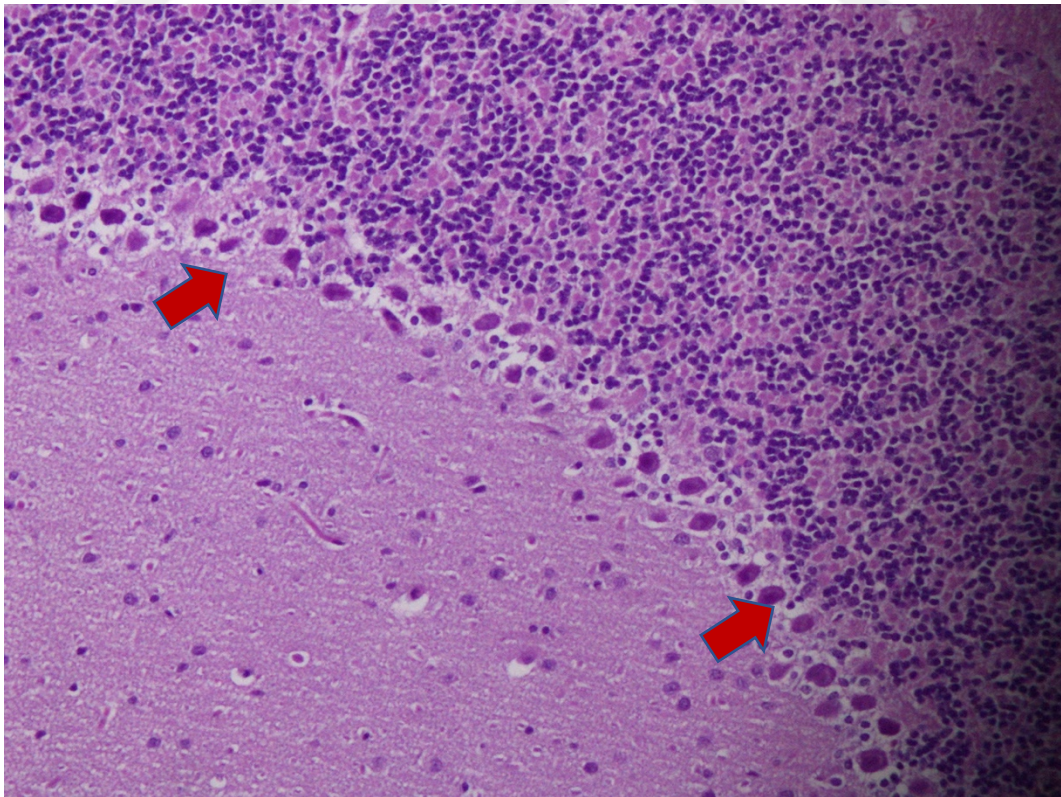
Resim 19. 50 ppm beyin dokusu cerebellum purkinje hücrelerinde az sayıda kırmızı nöronlar (x20 büyütme)



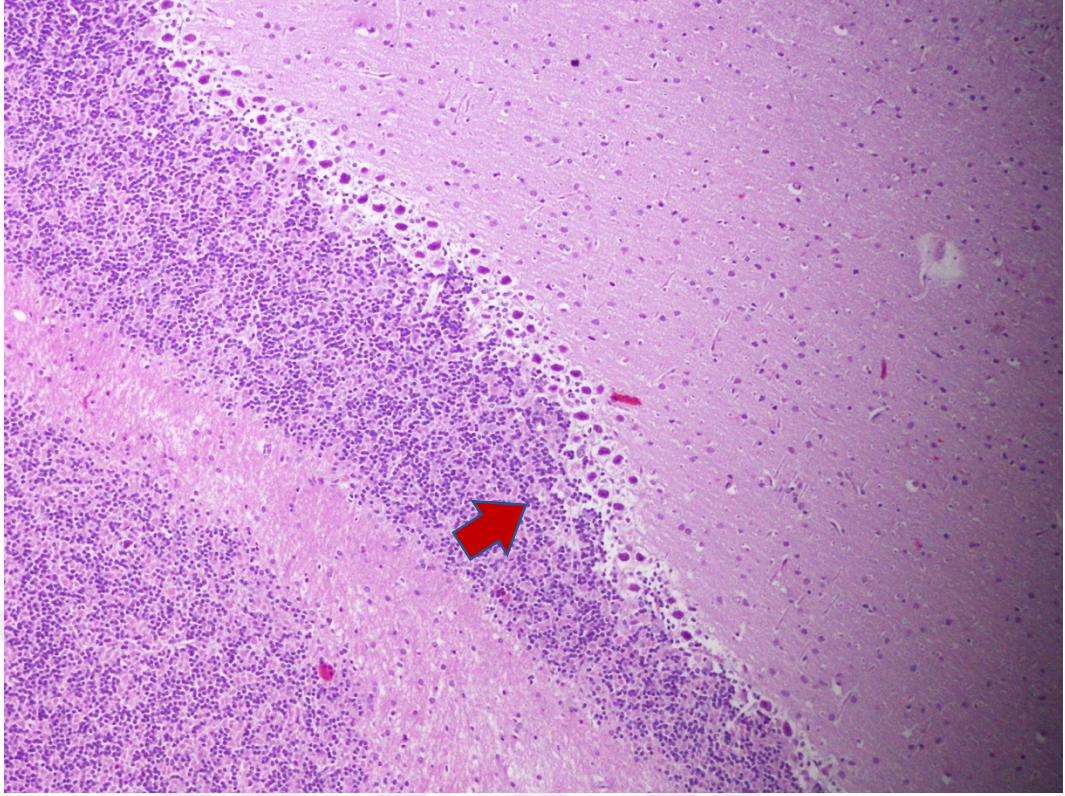
Resim 20. 100 ppm beyin dokusu fokal nekroz alanları (x20 büyütme)



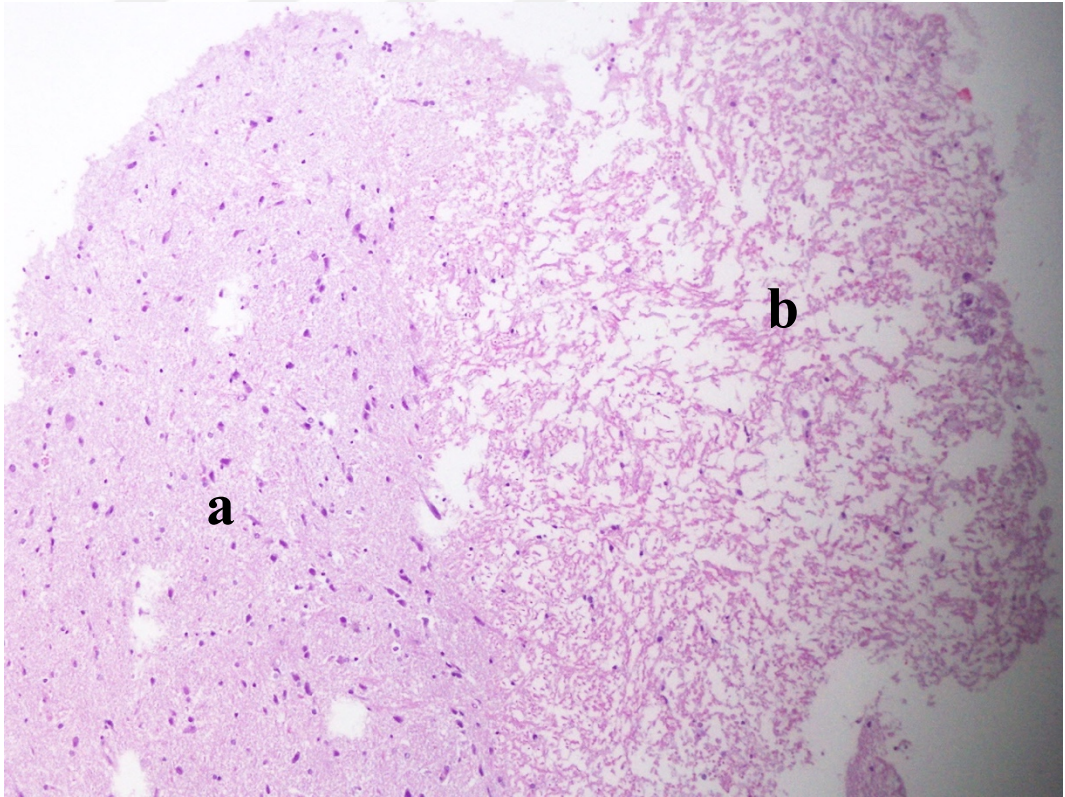
Resim 21. 100 ppm beyin dokusu fokal nekroz alanları (x10 büyütme)



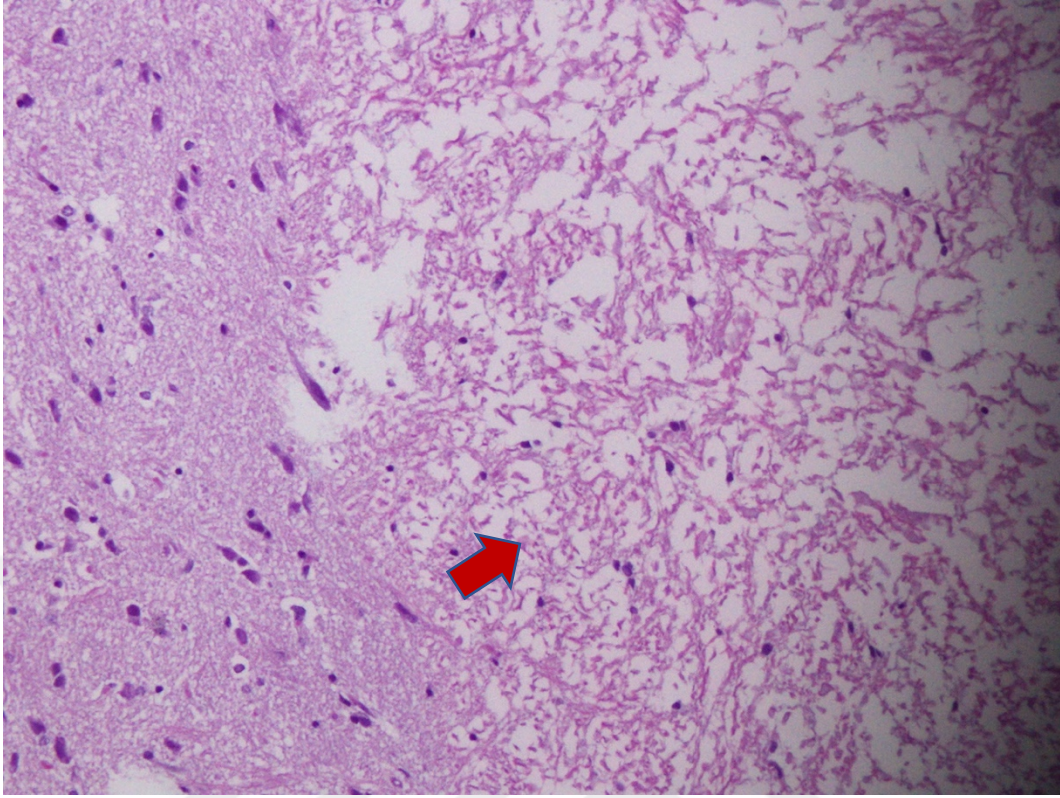
Resim 22. 200 ppm beyin dokusu purkinje hücrelerinde belirgin kırmızı dejenerasyon (x20 büyütme)



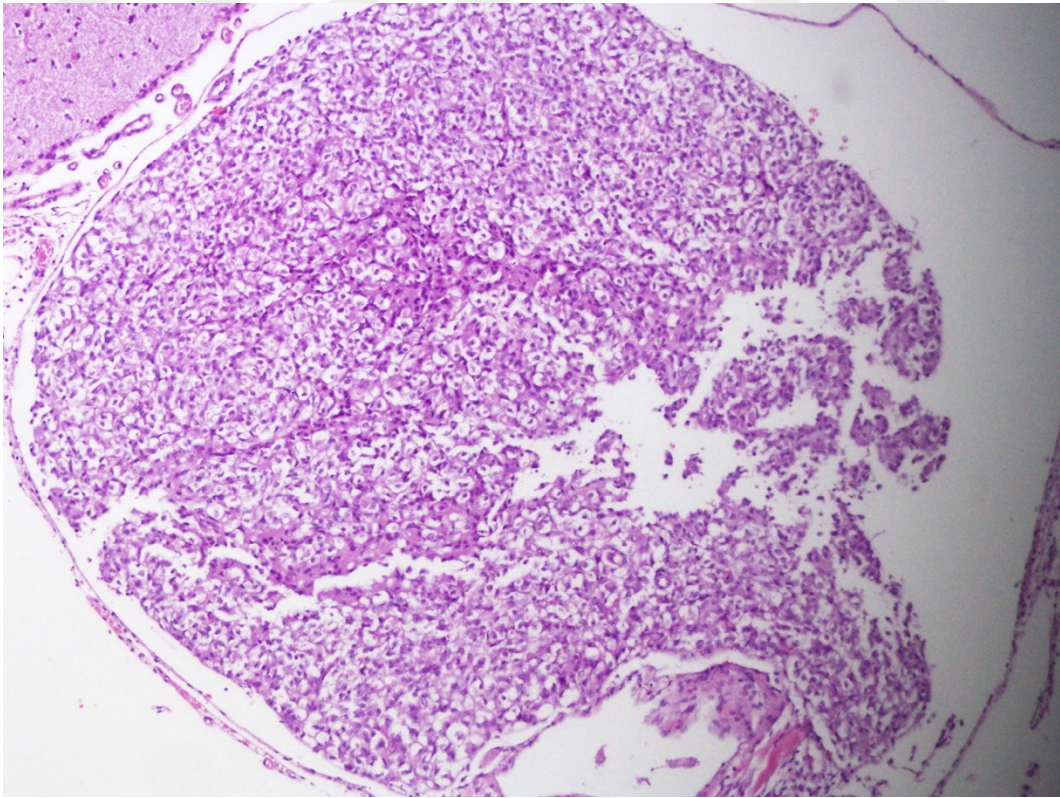
Resim 23. 200ppm beyin dokusu çok belirgin kırmızı nöron gruplaşmaları (x10 büyütme)



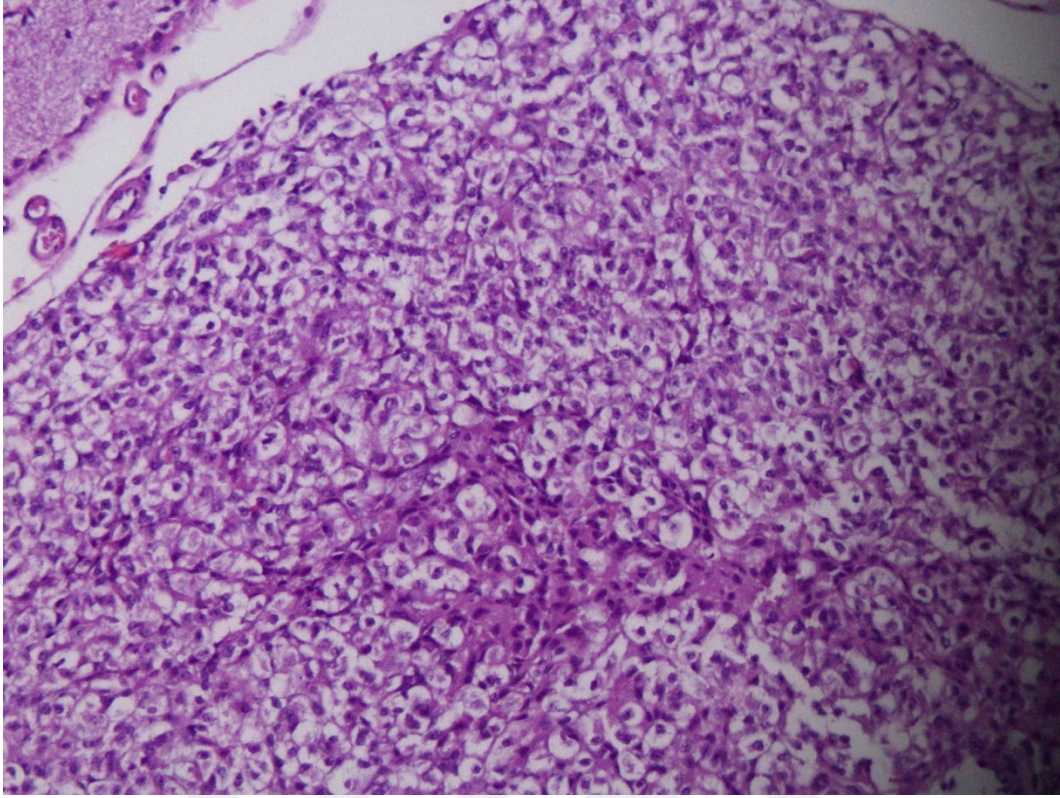
Resim 24. 200 ppm beyin dokusu sol tarafta olağan doku görünümü(a), sağ tarafta şiddetli nekroz(b) (x10 büyütme)



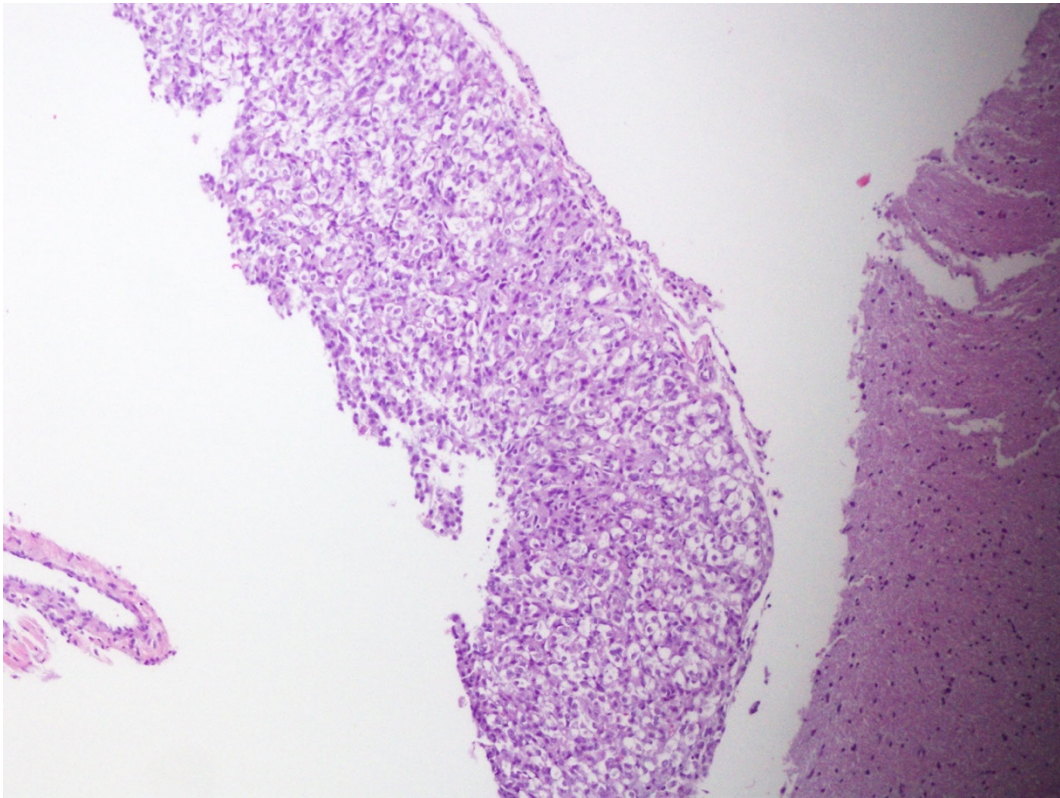
Resim 25. 200ppm beyin dokusu şiddetli nekroz (x20 büyütme)



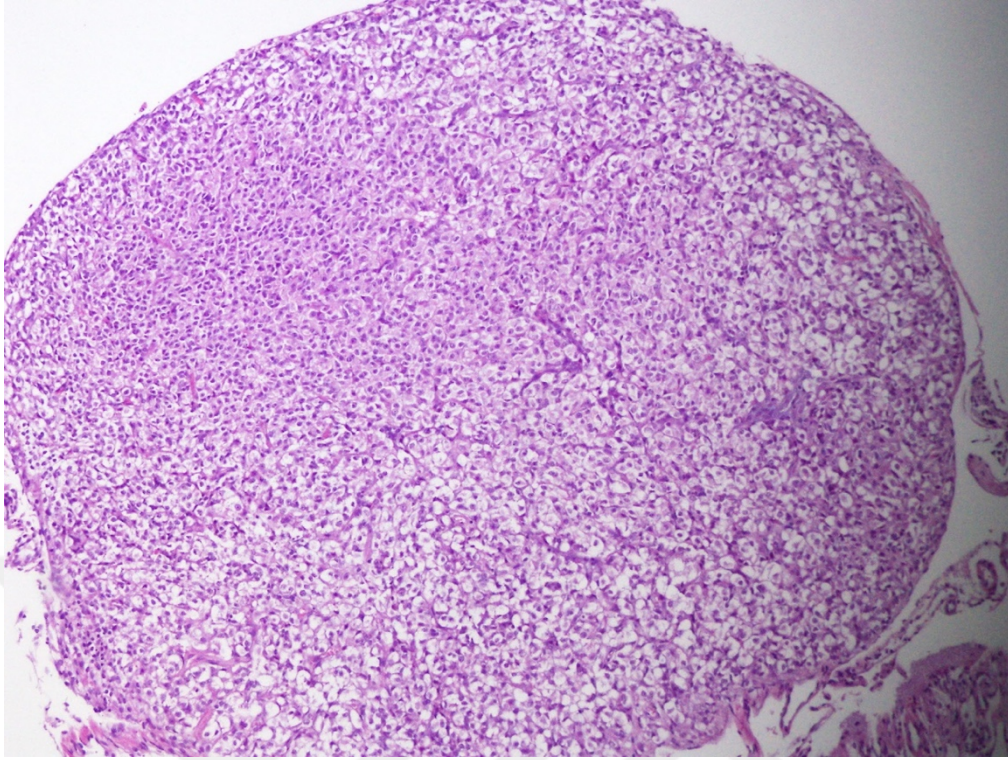
Resim 26. Kontrol grubu hipofiz bezi (x10 büyütme)



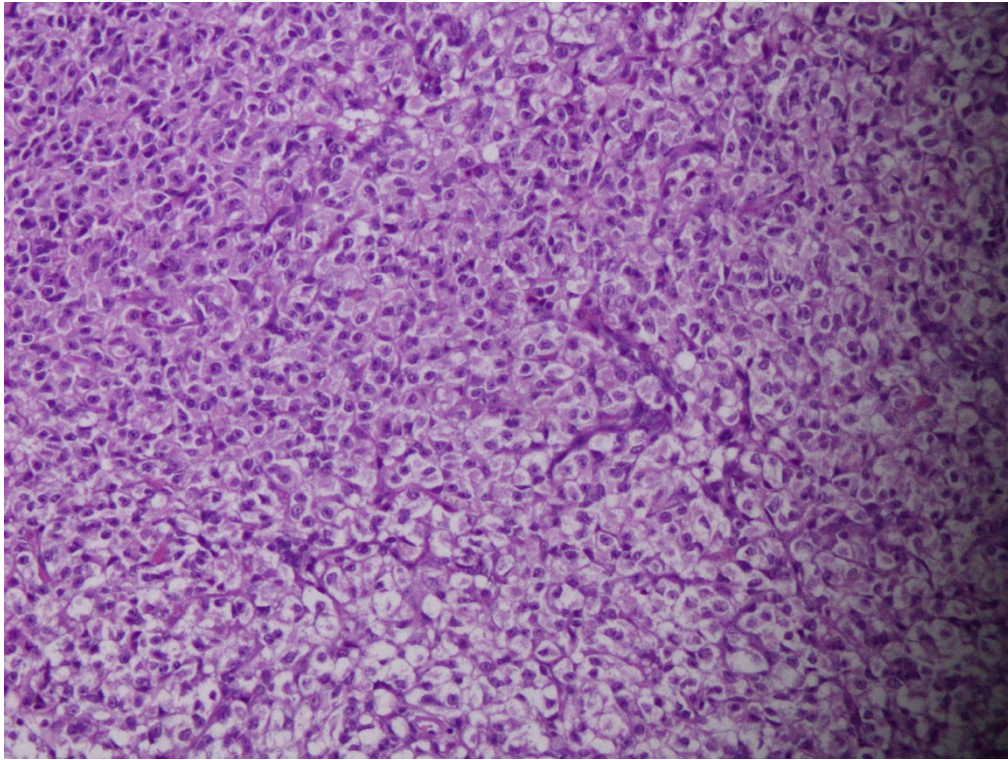
Resim 27. Kontrol grubu hipofiz bezi (x20 büyütme)



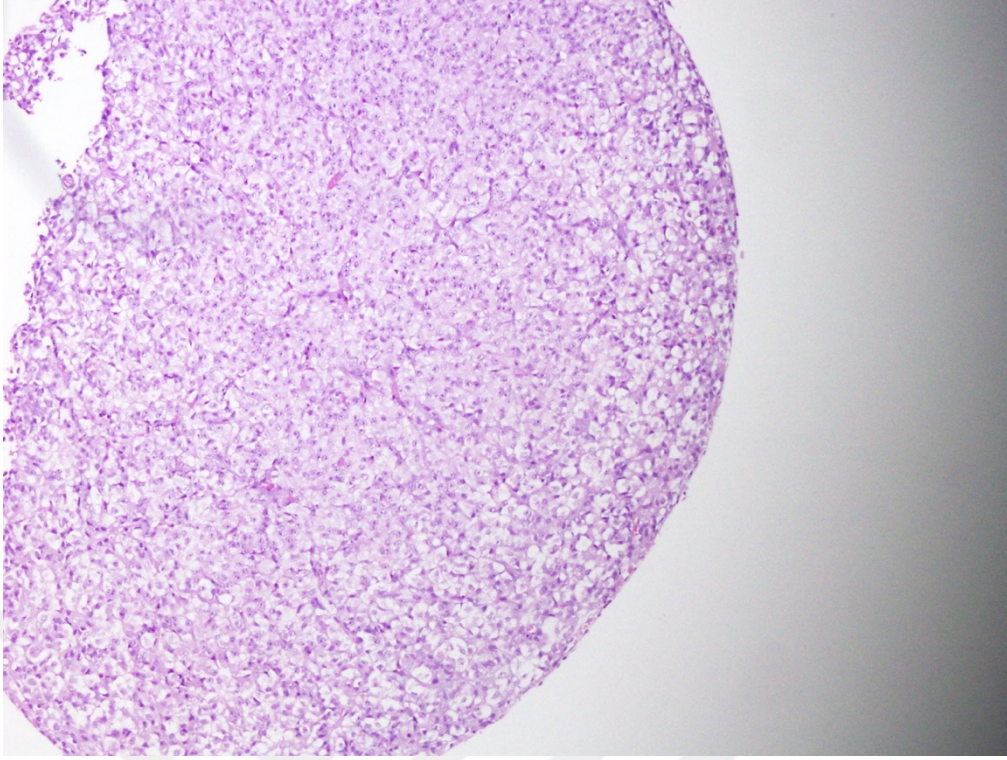
Resim 28. 50 ppm hipofiz bezi olağan görüntü (x10 büyütme)



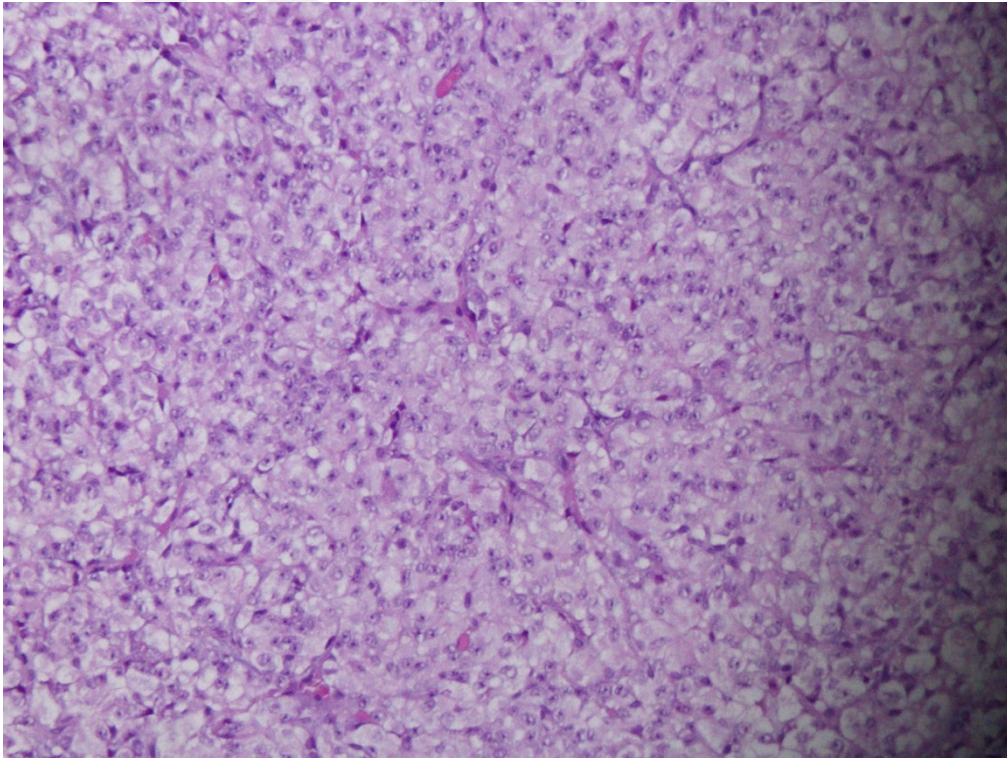
Resim 29. 100 ppm hipofiz bezi olağan gorunt (x10 büyütme)



Resim 30. 100 ppm hipofiz bezi olağan gorunt (x20 büyütme)



Resim 31. 200 ppm hipofiz bezi olağan gorunt (x10bytme)



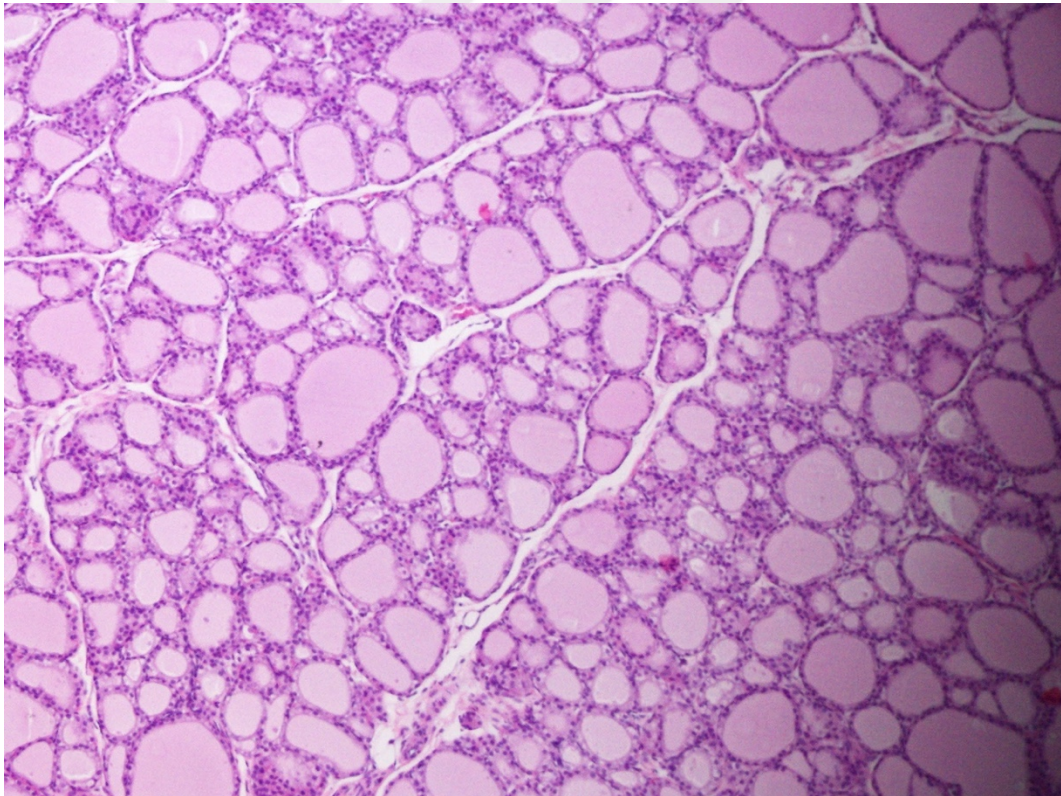
Resim 32. 200 ppm hipofiz bezi olağan gorunt (x20 büyütme)

4.1.3 Tiroid Bezi Bulguları

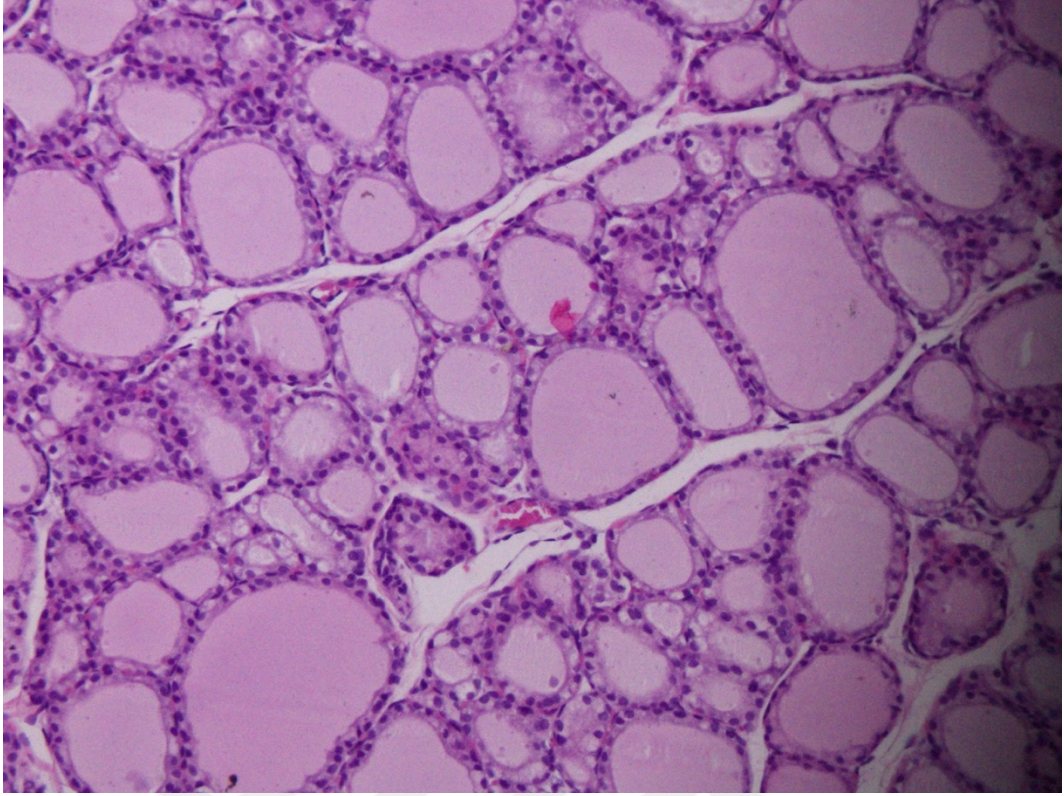
Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında (Resim 33, Resim 34) 50 ppm flor alan deney grubu tiroid bezi dokusunda foliküllerde şekil ve boyut farklılıkları tespit edilmiştir. Tirositlerde yassılaşıma görülmüştür. Herhangi bir nodül izlenmemiştir (Resim 35).

100 ppm flor alan deney grubunda tiroid dokusu hiperplaziktir, tüm bulguların artmış şekilde görülmesi yanı sıra küçük nodüller de izlenmiştir (Resim 36).

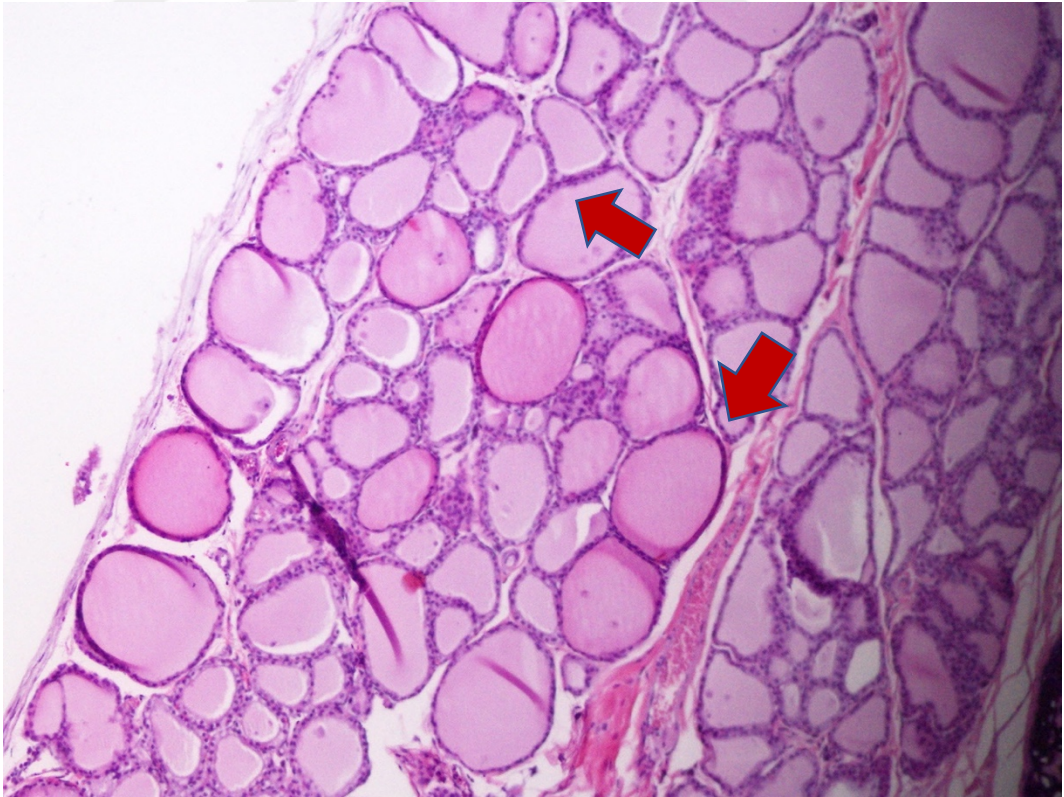
200 ppm F deney grubunda tiroid dokusunda şiddetli hiperplazi, tirositlerde artmış yassılaşıma ve foliküllerde şekil ve boyut farklılıklarının yanı sıra hiperplastik adenomatoid nodüllere rastlanmıştır (Resim 37).



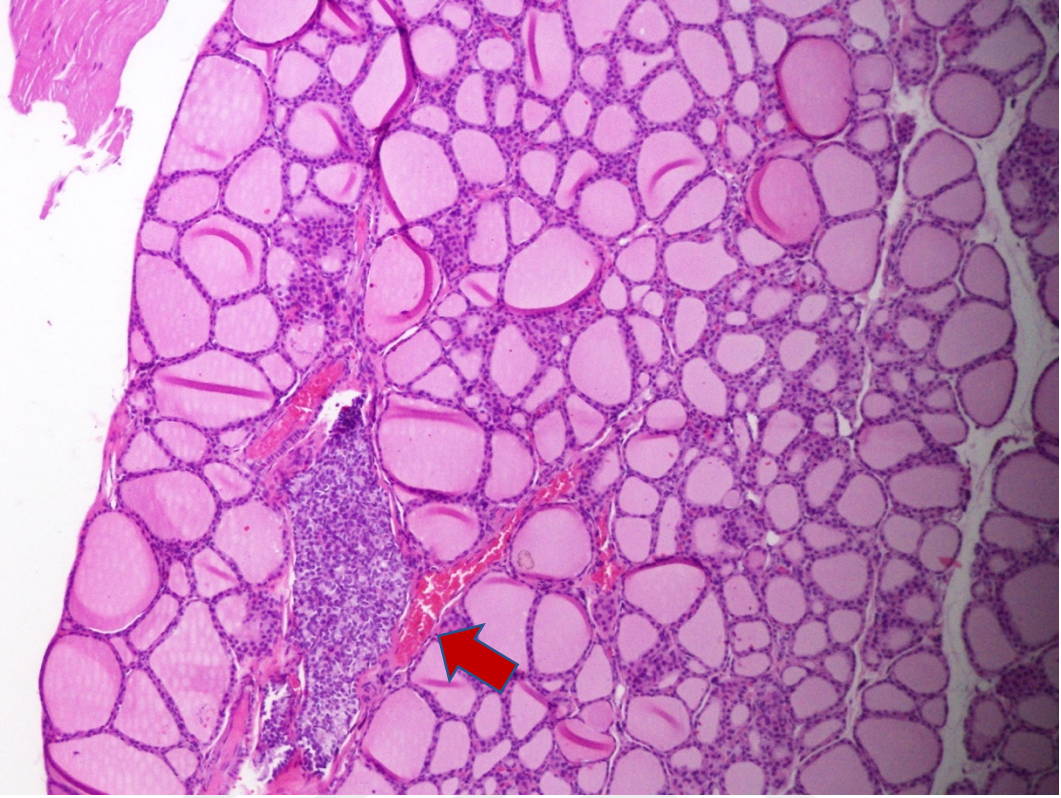
Resim 33. Kontrol grubu tiroid bezi dokusu (x10 büyütme)



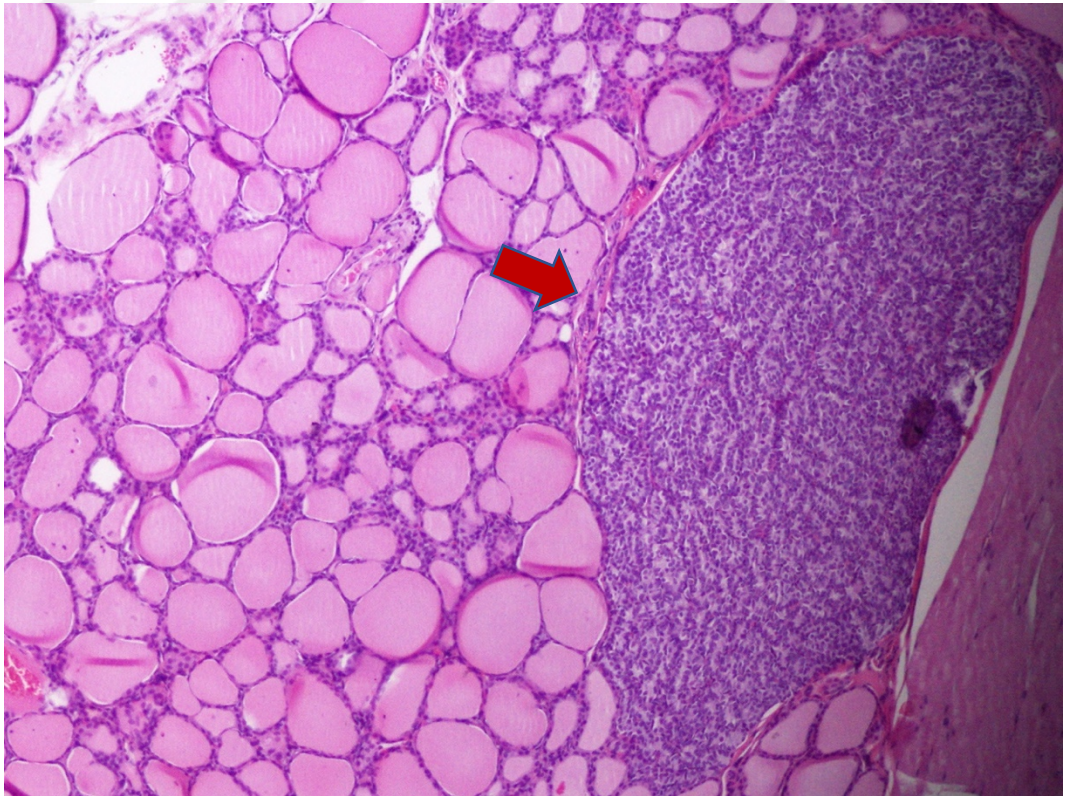
Resim 34. Kontrol grubu tiroid bezi dokusu (x20 büyütme)



Resim 35. 50ppm tiroid bezi dokusu tiroositlerde yassılaşma (x10 büyütme)



Resim 36. 100ppm tiroid bezi dokusu küçük nodüller (x10 büyütme)



Resim 37. 200 ppm tiroid bezi dokusu adenomatoid ve sellüler nodül (x10 büyütme)

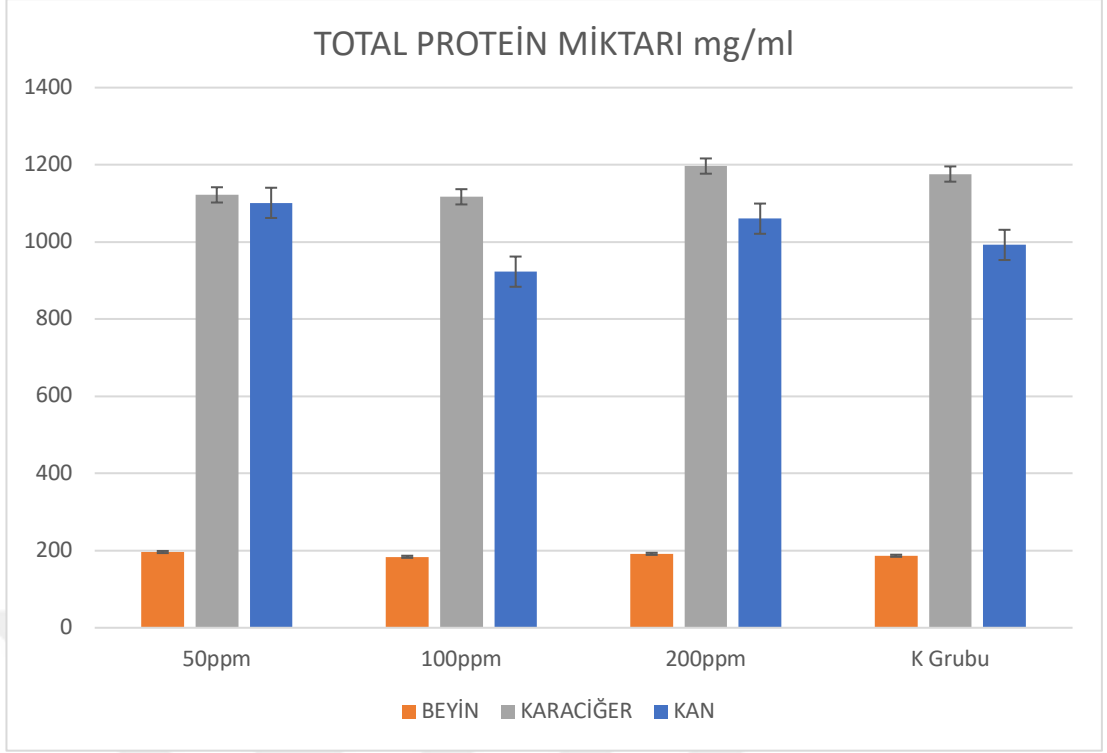
4.2 Enzimatik Sistem Bulguları

4.2.1 Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Dokulardaki toplam protein, yüksek hassasiyetli Coomassie Blue (Gessner ve ark., 1994) yöntemi ile belirlenmiştir. Temel biyokimyasal işlemlerde spesifik aktivite tanımı için biyolojik örneğin protein miktarından yararlanır (aktivite/mg protein). Tüm gruplarda karaciğer dokusundaki toplam protein miktarlarının kan ve beyin dokularına göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ancak tüm uygulama gruplarının incelenen dokularındaki toplam protein miktarları kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir ($p>0,05$) (Tablo 4, Grafik 2).

PROTEİN KONSANTRASYONU (mg/ml) (ort ± SEM)			
GRUPLAR	BEYİN	KARACİĞER	KAN
50ppm	196±0,014	1122±0,011	1101±0,010
100ppm	184±0,018	1117±0,015	923±0,009
200ppm	192±0,019	1197±0,009	1060±0,013
K Grubu	187±0,011	1176±0,017	992±0,008
F	0.209	0.121	0.471
p	0.887	0.945	0.711

Tablo 4. Tüm gruplarda protein konsantrasyon değerleri (mg/ml)



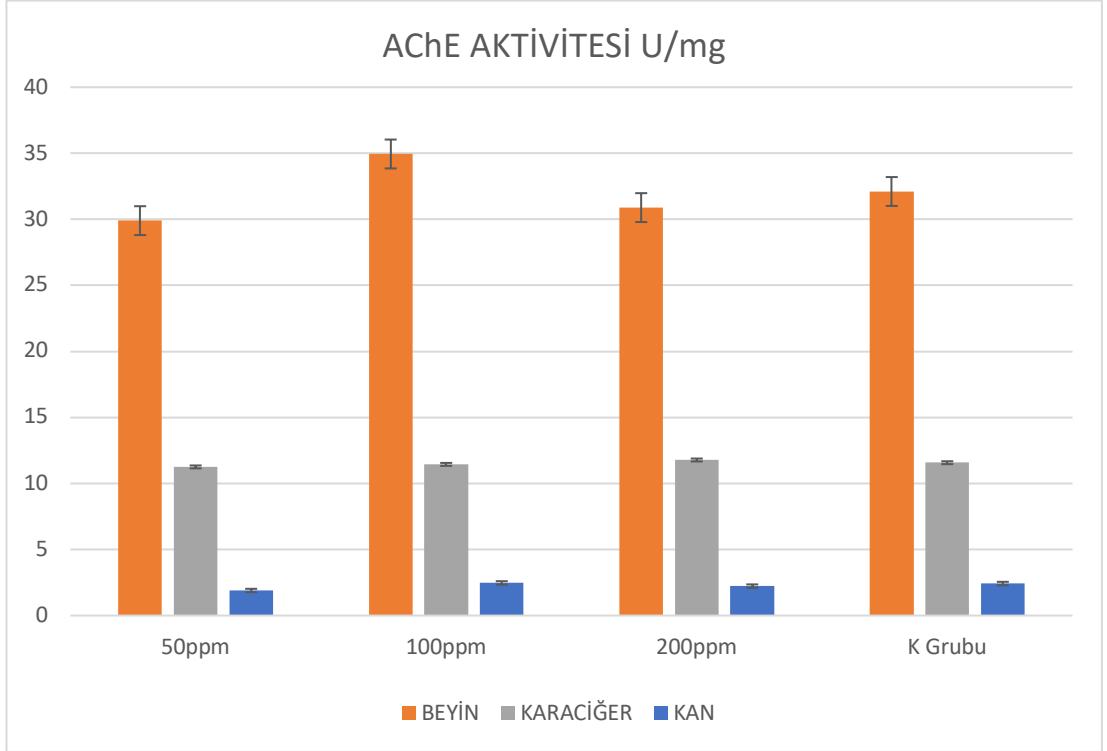
Grafik 2. Örnek dokuları total protein miktarı (mg/ml)

4.2.2 AChE Aktivite Bulguları

Bu enzim temelde karaciğerde eksprese olan bir enzim olmadığından tüm grupların karaciğer dokusunda AChE aktivitesi kontrol grubu ile aynı gözlenmiştir. Kan dokusunda ise kontrol grubuna göre 50 ppm grubunda anlamlı aktivite kaybı gözlenirken, 100 ppm ve 200 ppm grupları kontrole yakın aktivite göstermiştir. Beyin dokusunda 100 ppm grubu kontrole göre aktivite artışı gösterirken, 50 ppm ve 200 ppm grubu ise kontrol grubuna göre anlamlı aktivite kaybı göstermiştir. Bununla birlikte, tüm uygulama gruplarının incelenen dokularındaki AChE miktarları kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir ($p>0,05$) (Tablo 5, Grafik 3).

AChE Aktivitesi (U/mg protein) (ort±SEM)			
GRUPLAR	BEYİN	KARACİĞER	KAN
50ppm	29,898±0,0055	11,253±0,0226	1,894±0,0358
100ppm	34,945±0,0075	11,446±0,0020	2,471±0,0004
200ppm	30,886±0,0074	11,777±0,0027	2,228±0,0004
K Grubu	32,105±0,0089	11,572±0,0037	2,423±0,0030
F	0.220	0.084	0.958
p	0.880	0.967	0.458

Tablo 5. Dokulardaki AChE miktarı (U/mg protein)



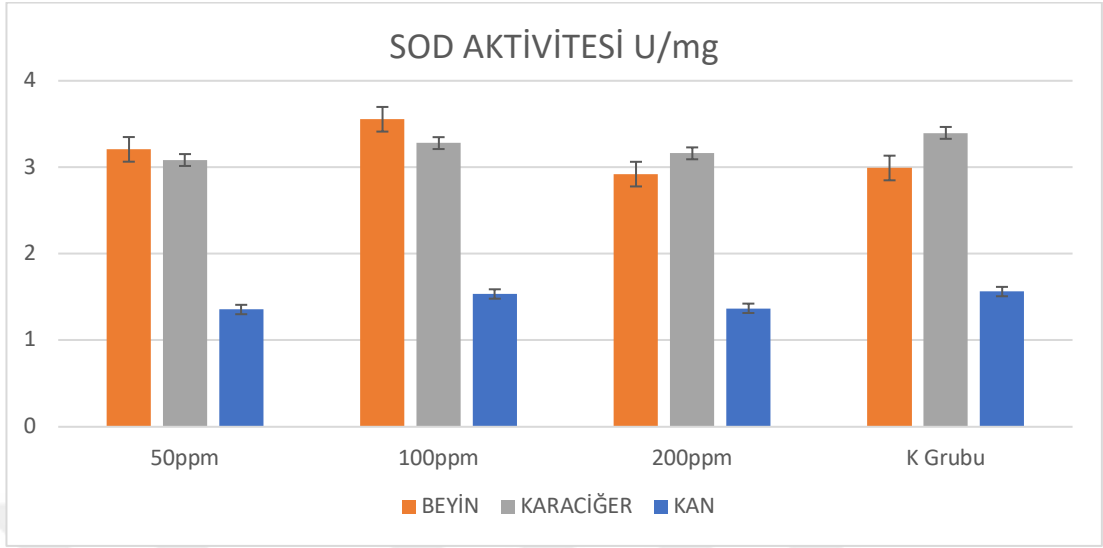
Grafik 3. Doku örnekleri AChE aktivitesi grafiği (U/mg protein)

4.2.3 SOD Aktivite Bulguları

SOD enzim aktivitesi sonuçlarına göre beyin dokusunda 50 ppm ve 100 ppm gruplarında anlamlı artış, 200 ppm grubunda ise enzim aktivite kaybı mevcuttur. Karaciğerde her üç grupta da kontrol grubuna göre anlamlı enzim aktivitesi düşüşü gözlenmektedir bu da harabiyete bağlı enzim aktivite kaybı olduğunun göstergesidir. Kan dokuda ise 50 ppm ve 200 ppm grubunda enzim aktivitesinde düşüş gözlenmekte, 100 ppm grubu aktivitesi kontrole yakın izlenmektedir. Bununla birlikte tüm uygulama gruplarının incelenen dokularındaki SOD aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir ($p>0,05$) (Tablo 6, Grafik 4).

SOD Aktivitesi (U/mg) (ort±SEM)			
GRUPLAR	BEYİN	KARACİĞER	KAN
50ppm	3,207±0,0264	3,084±0,1322	1,356±0,0193
100ppm	3,555±0,0373	3,279±0,0849	1,535±0,0328
200ppm	2,921±0,0018	3,161±0,0899	1,369±0,0497
K Grubu	2,992±0,0064	3,398±0,0667	1,563±0,0325
F	1.704	2.097	1.486
p	0.243	0.179	0.290

Tablo 6. Doku örnekleri SOD aktivite değerleri (U/mg protein)



Grafik 4. Doku örnekleri SOD aktivite grafiği (U/mg protein)

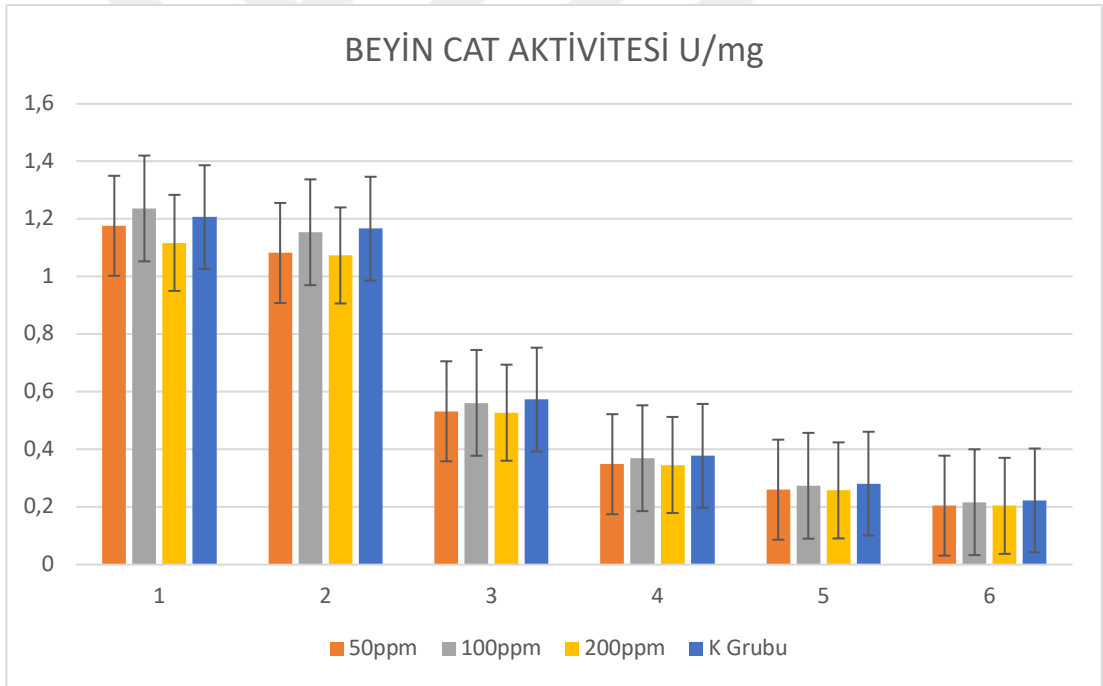
4.2.4 Katalaz (CAT) Aktivite Bulguları

Katalaz enzim aktivitesi tüm dokularda ve tüm gruplarda zamana bağlı olarak düzgün şekilde azalma göstermiştir. Tüm uygulama gruplarının incelenen dokularındaki CAT aktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir ($p>0,05$) (Tablo 7, Grafik 5, Grafik 6, Grafik 7).

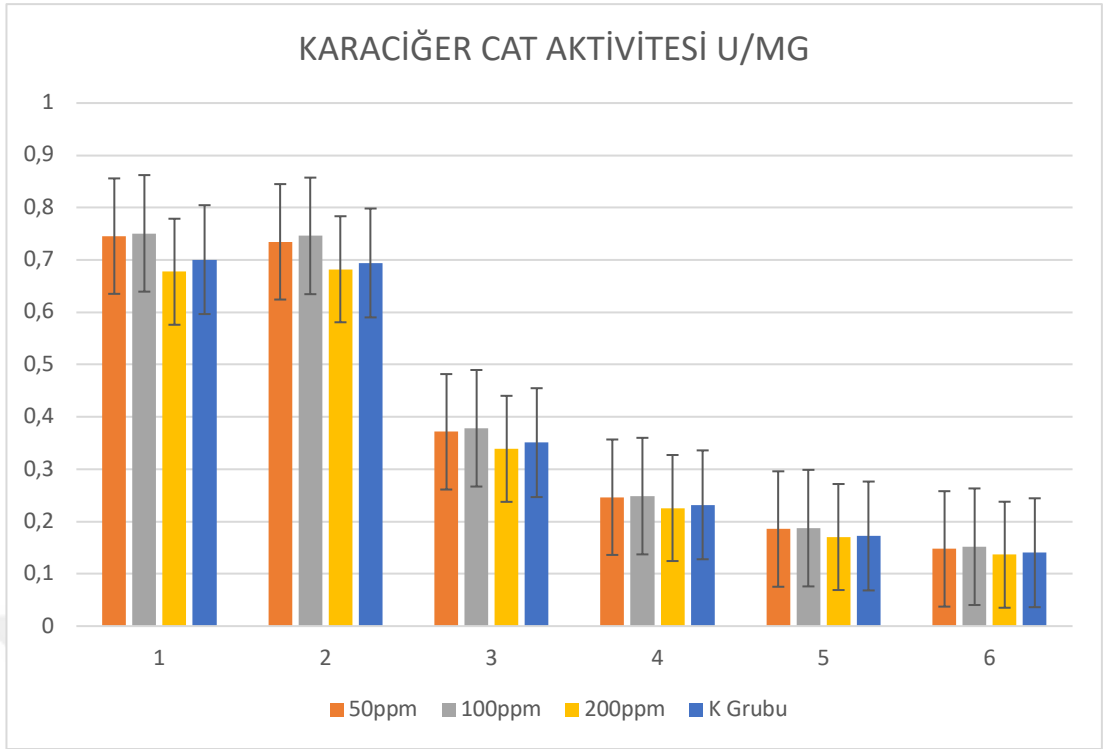
CAT Aktivitesi (U/mg) (ort±SEM) 0.dk.			
GRUPLAR	BEYİN	KARACİĞER	KAN
50ppm	1.1766±0.0708	0.7455±0.0285	0.5346±0.2140
100ppm	1.2368±0.1043	0.7508±0.1047	0.6983±0.1926
200ppm	1.1173±0.0912	0.6774±0.0216	0.6108±0.0899
K Grubu	1.2067±0.0301	0.7006±0.1517	0.6690±0.2300
CAT Aktivitesi (U/mg) (ort±SEM) 1.dk.			
GRUPLAR	BEYİN	KARACİĞER	KAN
50ppm	1.0823±0.0872	0.7346±0.0106	0.5360±0.2359
100ppm	1.1541±0.0929	0.7460±0.0438	0.6997±0.1919
200ppm	1.0737±0.0971	0.6822±0.0408	0.6177±0.0667
K Grubu	1.1667±0.0288	0.6942±0.1122	0.6636±0.2180
CAT Aktivitesi (U/mg) (ort±SEM) 2.dk.			
GRUPLAR	BEYİN	KARACİĞER	KAN
50ppm	0.5325±0.0887	0.3714±0.0555	0.2661±0.1135
100ppm	0.5617±0.0951	0.3782±0.0826	0.3492±0.2057
200ppm	0.5275±0.1003	0.3389±0.0957	0.3108±0.0705
K Grubu	0.5732±0.0294	0.3507±0.0399	0.3308±0.1304
CAT Aktivitesi (U/mg) (ort±SEM) 3.dk.			
GRUPLAR	BEYİN	KARACİĞER	KAN
50ppm	0.3488±0.0855	0.2464±0.1002	0.1768±0.0521
100ppm	0.3695±0.0934	0.2485±0.0686	0.2301±0.0891
200ppm	0.3462±0.1001	0.2257±0.0372	0.2060±0.0591
K Grubu	0.3779±0.0412	0.2318±0.1265	0.2192±0.0230
CAT Aktivitesi (U/mg) (ort±SEM) 4.dk.			
GRUPLAR	BEYİN	KARACİĞER	KAN
50ppm	0.2603±0.0884	0.1855±0.0006	0.1320±0.0506
100ppm	0.2738±0.0939	0.1873±0.1045	0.1721±0.0949
200ppm	0.2577±0.0955	0.1703±0.0904	0.1530±0.0436
K Grubu	0.2813±0.0436	0.1722±0.0564	0.1642±0.0425

CAT Aktivitesi (U/mg) (ort±SEM) 5.dk.			
GRUPLAR	BEYİN	KARACİĞER	KAN
50ppm	0.2048±0.0879	0.1476±0.0047	0.1063±0.0542
100ppm	0.2168±0.0923	0.1517±0.0981	0.1384±0.0208
200ppm	0.2042±0.0972	0.1364±0.0609	0.1229±0.0220
K Grubu	0.2231±0.0358	0.1402±0.0853	0.1310±0.0229

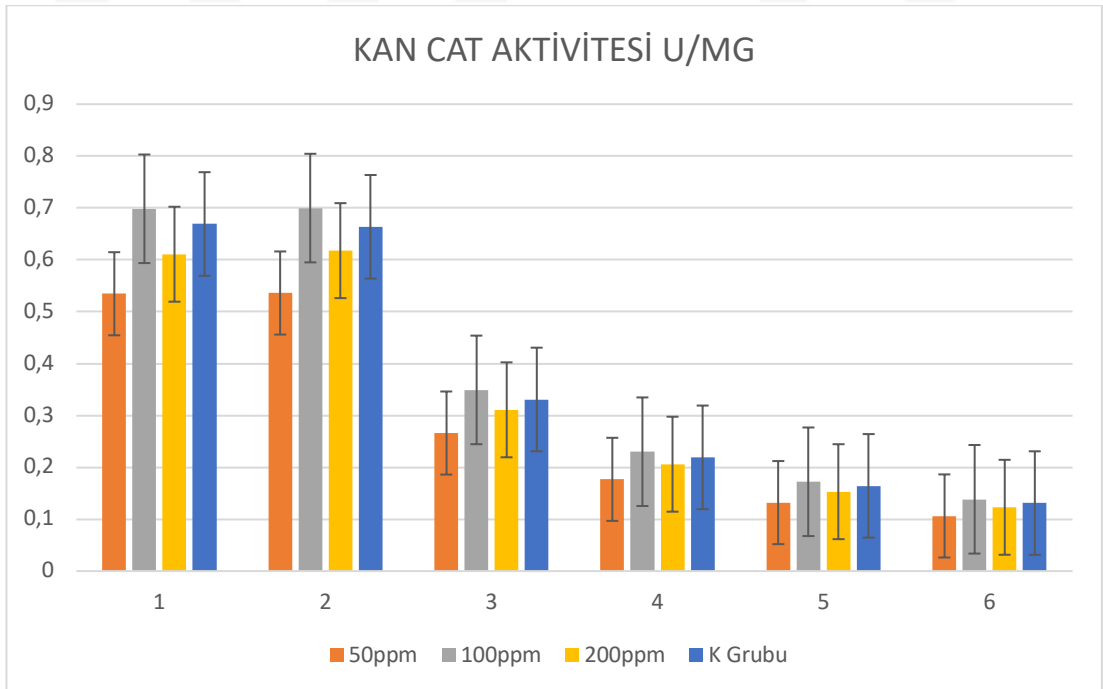
Tablo 7. Doku örnekleri süreye bağlı CAT aktiviteleri



Grafik 5. Zamana bağlı beyin dokusu CAT aktivite grafiği



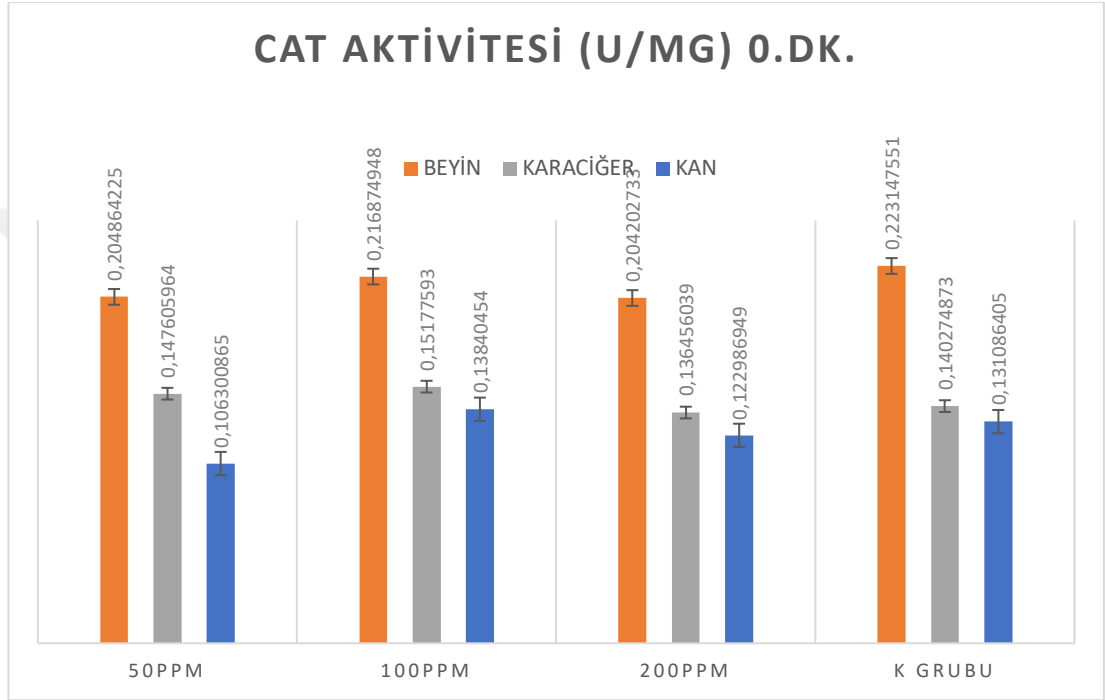
Grafik 6. Zamana bağlı karaciğer dokusu CAT aktivite grafiği



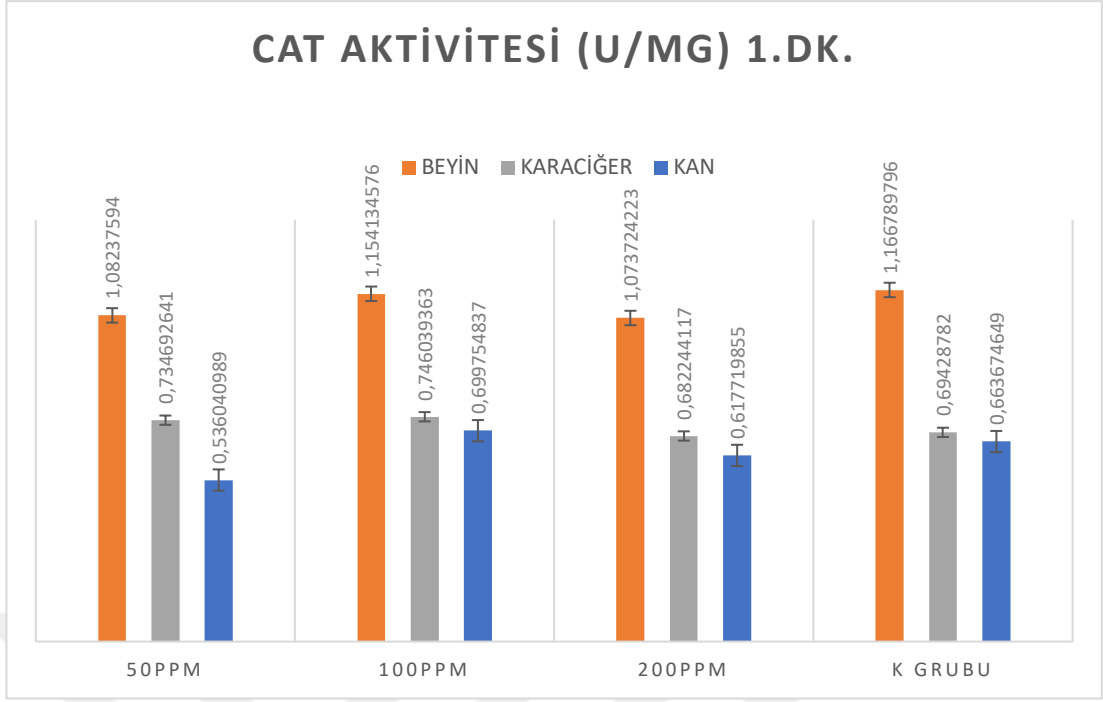
Grafik 7. Zamana bağlı kan örneği CAT aktivitesi grafiği

4.3.4.1 Tüm Grup ve Organlardaki Katalaz Aktivitesinin Karşılaştırılması

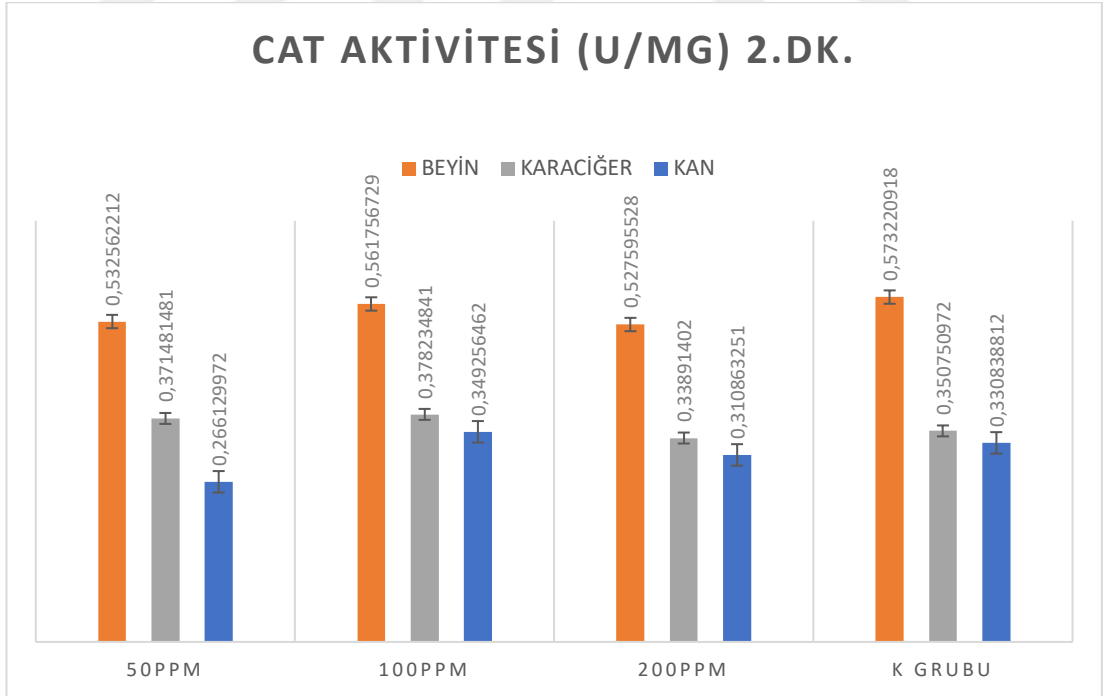
Tüm grup ve organlarda 0. dakika (Grafik 8), 1.dakika (Grafik 9), 2.dakika (Grafik 10), 3.dakika (Grafik 11), 4.dakika (Grafik 12) ve 5.dakika (Grafik 13) CAT aktivite değişimleri karşılaştırılmalı grafikleri aşağıda gösterildiği gibidir.



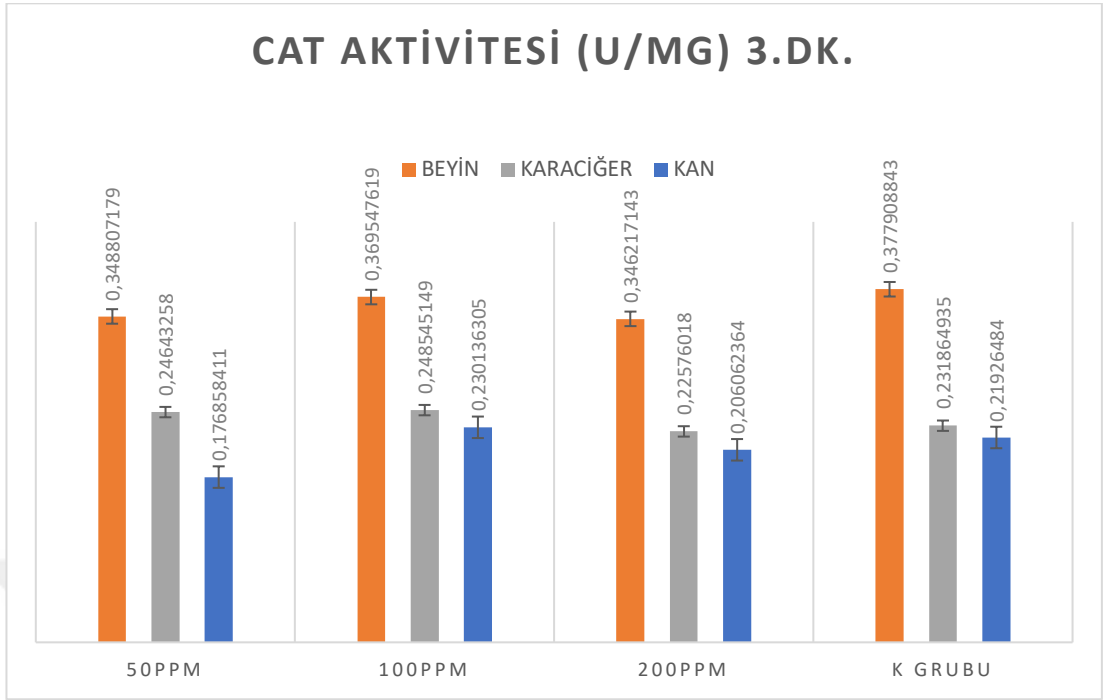
Grafik 8. Tüm grup ve organların 0.dakika CAT aktivitesi karşılaştırmalı grafiği



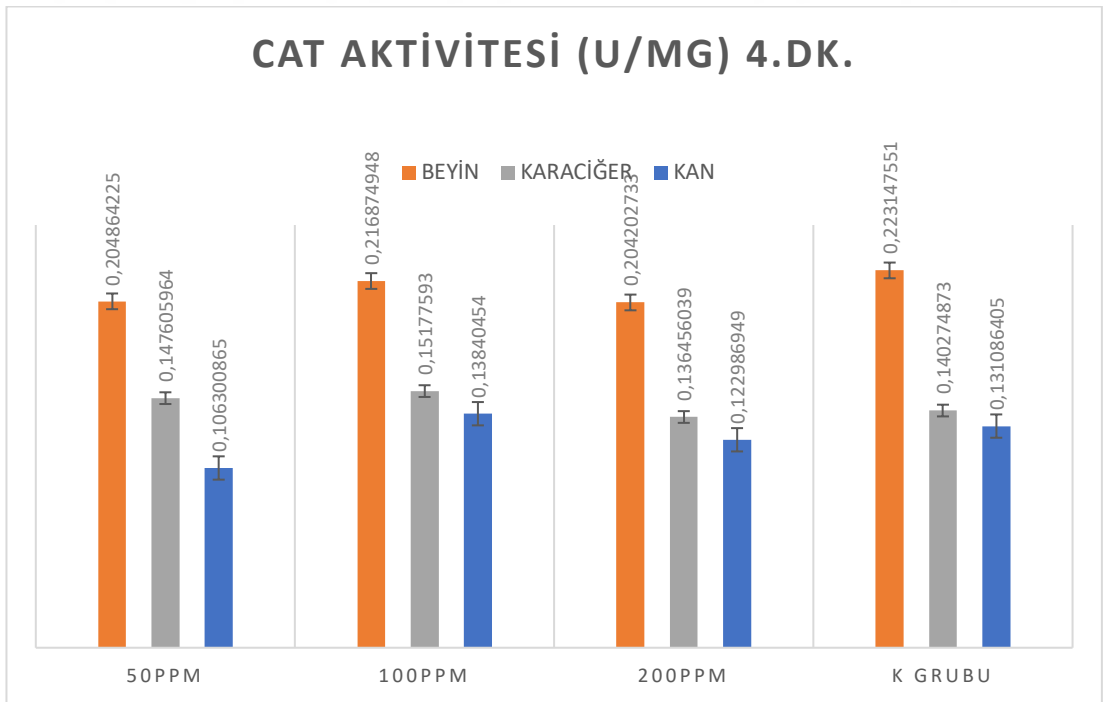
Grafik 9. Tüm grup ve organların 1.dakika CAT aktivitesi karşılaştırmalı grafiği



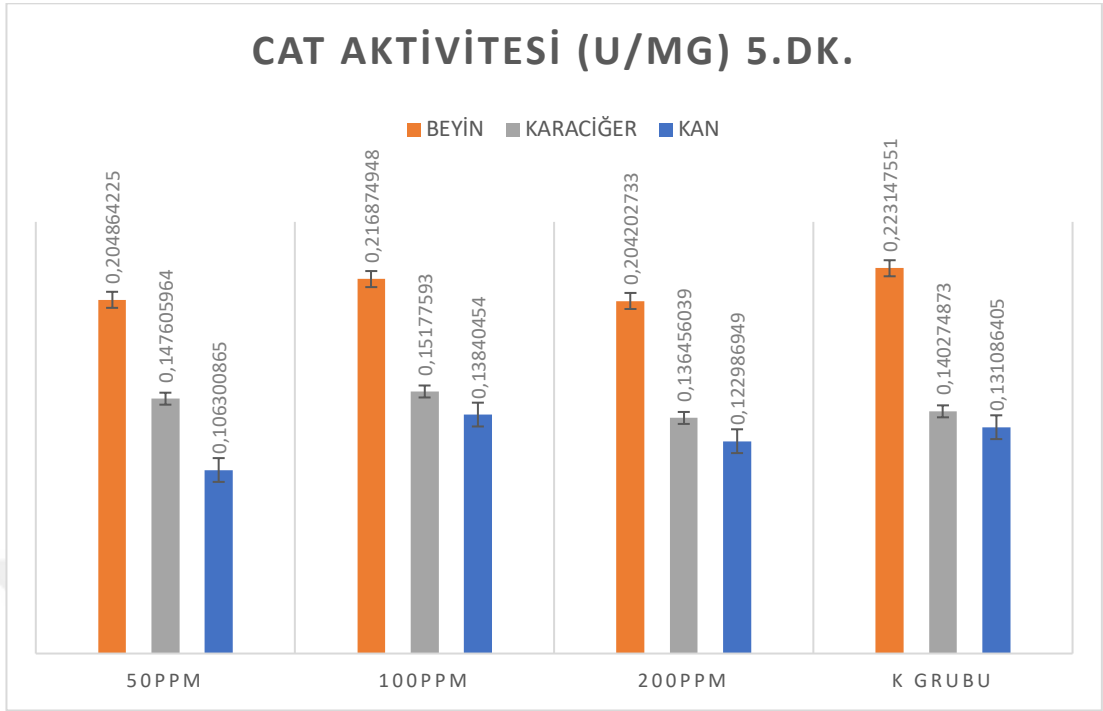
Grafik 10. Tüm grup ve organların 2. dakika CAT aktivitesi karşılaştırmalı grafiği



Grafik 11. Tüm grup ve organların 3.dakika CAT aktivitesi karşılaştırmalı grafiği



Grafik 12. Tüm grup ve organların 4.dakika CAT aktivitesi karşılaştırmalı grafiği



Grafik 13. Tüm grup ve organların 5.dakika CAT aktivitesi karşılaştırmalı grafiği

5.Tartışma

Florun çok elektronegatif olması, negatif bir yük alma eğilimi olduğunu gösterir ve çözeltilerde florür iyonları oluşturduğu anlamına gelir. Midede olduğu gibi asidik şartlarda hidrojen florür'e (HF) dönüştürülür ve ağızdan alınan florun %40'ı bu şekilde mideden emilir. Biyolojik zarlardan florür taşınımı, öncelikle HF' nin iyonik olmayan difüzyonu yoluyla gerçekleşir. Yapay lipit çiftleyiciler ve pH elektrotları ile yapılan klasik çalışmalar, HF' nin, suya benzer bir geçirgenlik katsayısına sahip, yüksek derecede geçirgen bir çözelti olduğunu göstermiştir. HF'nin küçük nötr molekülü, ayrılmış florür iyonundan çok daha hızlı hücre zarlarına nüfuz ediyor gibi görünmektedir, bu da daha fazla belirgin hücre içi alımına neden olmaktadır (G. Whitford ve ark., 1994). HF'ye membran geçirgenliği, florunkinden beş ila yedi kat daha fazladır (Gutknecht & Walter, 1981).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, alınan florun yaklaşık %45'inin bağırsaktan emildiğini, bağırsaktan flor emiliminin pH' a daha az duyarlı olduğunu ve kolaylaştırılmış difüzyon ile meydana gelebileceğini göstermiştir. Bu tür taşıyıcı proteinlerin başka hücrelerin zarlarında da mevcut olup olmadığı bilinmemektedir (He, Ganapathy, Isales, & Whitford, 1998). Ek olarak, hava yolu epitel hücrelerinde anyon kanalları yoluyla flor geçirgenliği gösterilmiştir (Wilk-Blaszczak, French, & Man, 1992) , ancak Gofa ve Davidson, florun osteoblastik hücrelerde potasyum-selektif iyon kanallarının aktivitesini güçlendirdiğini göstermektedir (Gofa & Davidson, 1996). Potasyum ve kalsiyum kanallarının aktivitesi, flora bağlı hücre aktivasyonundaki erken olayların çoğuna aracılık edebilir. Yapılan çalışmalar flor taşınması için pH derecesine bağlı birkaç taşıyıcı aracılı mekanizma olduğunu; bunlardan birinin difüzyonla HF şeklinde flor alımını içerdiğini; diğerinde, flor, içe doğru yönlendirilmiş bir proton gradyan hücrelerinin varlığında bir F-H + ko-taşıyıcısı veya F-OH membran değiştiricisi ile membranı geğtiğini göstermektedir (Gutknecht & Walter, 1981) ; ancak bu konuyu netleştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Alınan flor miktarına kıyasla florla çözünmeyen kompleksler oluşturan yüksek katyon konsantrasyonları, hipokalsemiye, magnezyum ve manganeze bağımlı enzimlerin

inhibisyonuna neden olan gastrointestinal flor Emilimini belirgin şekilde azaltabilir (G. M. Whitford, Pashley, & Garman, 1997).

Flor, hücre zarından kolayca geçebilen kalsiyum iyonları oluşturmak için kalsiyum ile birleşir. Florun etkisi hücre dışı kalsiyuma bağlıdır ve kanal aktivitesinin kuvvetlendirilmesinin, harici kalsiyuma bağlı olduğunu düşündüren kalsiyum kanalı bloke edici maddelerin bir kombinasyonu ile engellenebilir. Kanda emildikten sonra, vücutta kolayca dağılır; kemik ve diş gibi kalsiyumdan zengin bölgelerde birikir. Bebeklerde, emilen florun yaklaşık %80-90'ı birikir, ancak yetişkinlerde bu seviye yaklaşık %60'a düşer (Şireli & Bülbül, 2004).

Flor, öncelikle idrarla atılır. İdrarla flor atılımı, HF konsantrasyonundaki bir düşüşe bağlı olarak idrar pH'ı arttıkça artar. Çeşitli faktörler (örneğin diyet ve ilaçlar) idrar pH'ını etkileyebilir ve bu nedenle flor atılımı ve tutulmasını etkileyebilir (ATSDR, 2000).

Florun kemik ve dişlerin stabilitesini artırması sebebiyle temel iz element olarak görülmesine karşın kronik maruz kalımın toksik etkilere sebep olduğu rapor edilmiştir (T. K. Das & Susheela, 1993; Krishnamachari, 1986).

Flor, zamana, konsantrasyona ve hücre tipine bağlı bir şekilde çeşitli hücrel etkiler gösterir. Florun hücrelerdeki ana toksik etkisi, enzimlerle olan etkileşiminden kaynaklanır. Çoğu durumda, flor bir enzim inhibitörü görevi görür, ancak flor iyonları bazen enzim aktivitesini uyarabilir. Mekanizmalar, etkilenen enzimin türüne bağlıdır (Fluorkowych & Enzymov, 2005). Mikromolar seviyelerdeki flor, etkili bir anabolik ajan olarak kabul edilir; çünkü hücre çoğalmasını artırır, oysa millimolar konsantrasyonların, hem in-vivo hem de in-vitro çalışmalarda fosfataz enzimleri dahil olmak üzere birçok enzimi inhibe ettiği söylenmektedir.(Mendoza-Schulz ve ark., 2009).

Hücre-flor etkileşimi ile ilgili hücre içi yollar hakkında mevcut bilgiler, hücre-flor etkileşimlerinin altında yatan moleküler olayların karmaşıklığı ve çeşitliliği nedeniyle yetersizdir. Bununla birlikte, hücre içi oksidatif düzey, gen ekspresyonu ve flor maruziyetinin protein birikimi/trafik yönleri konusundaki çalışmalardan önemli sonuçlar çıkmaktadır.

Kronik florozisin birçok metabolik, fonksiyonel ve yapısal hasarlara neden olduğu bildirilmiştir. Araştırma verileri, florun protein salgılanmasını ve/veya sentezini inhibe ettiğini ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), p53, aktivatör protein-1 (AP-1) ve nükleer faktör kappa B dahil olmak üzere proliferasyon ve apoptozda yer alan farklı sinyal yollarını etkilediğini söylemektedir (Karube, Nishitai, Inageda, Kurosu, & Matsuoka, 2009; M. Zhang, Wang, Xia, & He, 2008).

Mitokondriler, flor da dahil olmak üzere farklı stres parametreleri için hücre içi anahtar hedeflerdir (Anuradha, Kanno, & Hirano, 2001). Flor, insan böbrek hücresi (Cittanova ve ark., 1996), sıçan karaciğer ve pankreas hücresi (Dabrowska, Balunowska, Letko, & Szynaka, 2004) gibi birçok mitokondri bakımından zengin hücrenin aktivitesini değiştirir. Bununla birlikte, flor kaynaklı mitokondriyal hasarın mekanizması hakkında bilgi azdır.

Flor iyonları, bir enzimin aktif merkezini çevreleyen fonksiyonel amino asit gruplarına bağlanarak glikolitik yolun enzimlerini ve flor tarafından inhibe edilmeye duyarlı olan Krebs siklusunu inhibe edici bir etkiye neden olabilmektedir. Na⁺ / K⁺ -ATPazlar da inhibe edilmektedir, bu durum ATP tükenmesine ve hücre zarı potansiyelinde bozulmaya neden olmaktadır. Bu yüzden flor iyonları hücre solunumları inhibe eder ve ATP üretimini azaltır. Ek olarak, NaF, insan gingival fibroblastlarında ve sitokrom C (cyt C) 'nin mitokondriden sitozole salınımında bir artışa neden olur (Lee ve ark., 2008).

Yüksek dozda flora maruz kalma, ATP üretiminin azalmasına ve dolayısıyla ADP, AMP, GDP ve Pi'nin hücre seviyelerinin artmasına neden olur. Bununla birlikte, cyt C'nin uzun süreli güçlü inhibisyonu, esansiyel ATP gerektiren reaksiyonlar için enerji sağlamak üzere glikolitik ATP üretimini yeterince aktive edemeyen hücrelere toksiktir. Kalıcı inhibisyon; endojen indüksiyon ve nitrik oksidin (NO) aktivasyonu ile sonuçlanır. Öte yandan, NO, cyt C'nin oksijen için görünür afinitesini azaltarak mitokondriyal solunumu inhibe eder. Yüksek dozda flora maruz kalma durumlarında NO indüksiyonu pek çok çalışmada belgelenmiştir (Hassan & Yousef, 2009; G. Liu, Chai, & Cui, 2003).

Mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı değerlendirildiğinde, 1-2mM flora maruz kalan pankreas β -hücrelerinde mitokondriyal hasar gözlenmiştir.

Ayrıca, lineer regresyon analizi, mitokondriyal membran potansiyeli kaybı ile 0.25-3 mM flora maruz kalan hücrelerde süperoksit oluşum artışı arasında anlamlı bir doğrusal ilişki olduğunu ortaya koymuştur (García-Montalvo, Reyes-Pérez, & Del Razo, 2009).

Benzer şekilde, sıçanlarda subkronik flora maruz kalmanın, mitokondriyal fonksiyonlarda bir düşüşe ve spermatozoanın dölleme kabiliyetinde azalmaya neden olduğu söylenmiştir (Izquierdo-Vega, Sánchez-Gutiérrez, & Del Razo, 2008).

Mitokondrinin reaktif oksijen türlerinin üretiminin ana kaynağı olduğu ve flor toksisitesinin reaktif oksidatif ürün indüksiyonu, NO oluşumu ve hücrel antioksidanların oksidatif veri hasarına karşı korunmalarının azalması ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Karube ve ark., 2009) .

Flora maruz kalma, anyon süperoksit (O_2^-) oluşumunu artırır; O_2^- konsantrasyonunun artması sonucu oluşan hidrojen peroksit, peroksinitrit ve hidroksil gibi radikallerin, florun etkilerine aracılık etmesinde özellikle önemli olduğu tespit edilmiştir (García-Montalvo ve ark., 2009; Izquierdo-Vega ve ark., 2008).

Ayrıca, flor NO oluşumunu artırır, peroksinitrit oluşturmak için süperoksitle, nitrosil eklentileri oluşturmak için proteinlerdeki tioller ve metal merkezleriyle reaksiyona girebilir. Disülfid bağ oluşumu ile etkileşime girerek endoplazmik retikulumda (ER) yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine bağlı ER stresine ve reaktif oksidatif ürün (ROS) üretimine neden olduğu gösterilmiştir. ROS üretimi, makromolekül oksidasyonuna, lipid peroksidasyonuna, mitokondriyal membran depolarizasyonuna ve apoptoza yol açmaktadır. Antioksidan tedavisi sürekli olarak flor maruziyetinin neden olduğu lipid peroksidasyonundan hücreleri korur; bu da oksidatif / nitrosatif hasarın florun ana etki şekli olduğunu düşündürmektedir (Hassan & Yousef, 2009; G. Liu ve ark., 2003; ŞİRELİ & Bülbül, 2004).

Florun sitotoksik etkileri tüm hücre tiplerinde ortaya çıkar. Bununla birlikte, zamana ve konsantrasyona bağlı tepkiler hücre tipine göre farklılık gösterir. Nekroz göreceli

olarak yüksek flor konsantrasyonları varlığında birincil hücre ölümü mekanizması olarak gözlenmiştir (Ghosh, Das, Manna, & Sil, 2008).

Flor bileşikleri diş çürüğünden korunmada ve çürüğün kontrolünde önemlidir. 1950’li yıllara kadar florun sistemik alımının en yüksek etkiye sahip olduğu düşünülüyordu ve bu etkinin mine gelişim aşamasında hidroksilapatit kristallerine bağlanması ile gerçekleştiği söylenmekteydi. Çürük oluşumu ve şiddetini azaltmaya odaklanıldığı için florozis ikinci plana atılmıştı (Aoba & Fejerskov, 2002; Bronckers ve ark., 2009; Browne ve ark., 2005; Featherstone, 1999; Fejerskov ve ark., 1994; Fincham, Moradian-Oldak, & Simmer, 1999).

Literatürde hayvan hücreleri üzerinde in-vitro çalışmalarda çarpıcı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin; farelerin pankreas beta hücrelerinin (β TC-6) 12 saat boyunca 1,35 ve 2,5 mM flora maruz bırakıldığı bir çalışmada O_2^- üretiminde artış, SOD aktivitesinde ve mitokondrial membran potansiyelinde azalma tespit edilmiştir, bunun nedeni olarak mitokondriyal disfonksiyonun yüksek ROS üretimini teşvik edebilmesi ve bunun tersinin de kısır bir döngü oluşturması gösterilmiştir. Mitokondrinin, sıçan pankreas da dahil olmak üzere birçok organda flor toksisitesinin ana hedefi olabileceği belirtilmiştir. Flor maruziyetinin ATP üretimini azalttığı, sadece ATP tükenmesine değil aynı zamanda hücrenin membran potansiyelindeki bozulmalara da neden olduğu söylenmiştir, çünkü milimolar konsantrasyonlarda dahi $F^- Na^+ / K^+ -ATP$ azları ve ayrıca heksokinaz, enolaz ve piruvat kinaz gibi glikolitik yollardaki enzimleri inhibe edebilir denmiştir (García-Montalvo ve ark., 2009).

Sıçanların primer hipokampal nöronlarının 24 saat boyunca 1,05, 2,1 ve 4,2 mM flora maruz bırakıldığı bir çalışmada O_2^- üretiminde artış, SOD aktivitesinde azalma görülmüştür. Florun, primer hipokampal nöronlarda 80 ve 160 mg/l NaF’ye maruz kalmasıyla bariz bir “doza bağımlı ilişki” sergileyen hücre ölümünü indüklediği gösterilmiştir. Özellikle 160 mg/l grupta, hücrelerin çoğunlukla öldüğü ve hayatta kalma oranının sadece% 39.8 ± 3.0 olduğu belirtilmiştir, bu yüzden MTT testinin sonuçlarına göre, sonraki deneylerde 20, 40 ve 80 mg/l konsantrasyonlarındaki NaF kullanıldığı belirtilmiştir (M. Zhang ve ark., 2007). Biz de beyin doku örneklerimizde doza bağlı hücre ölümleri ve fokal nekrotik alanlar tespit ettik, bu bulgular çalışmamızı desteklemektedir.

Fare hepatositlerinin 1 saat boyunca 100mM flora maruz bırakıldığı ve arjunolik asidin koruyucu etkisinin incelendiği başka bir çalışma sonucu O₂- üretiminde artış, SOD ve CAT aktivitesinde ise azalma görülmüştür. Bununla birlikte hücrelerin arjunolik asit ile ön tedavisi, hepatositleri bu oksidatif yıkımdan korur denmiştir. Arjunolik asidin flora eşzamanlı olarak eklenmesinde de benzer bir sonuç gözlemlendiği bildirilmiştir (Ghosh ve ark., 2008). Çalışmamızdaki tüm gruplarda CAT aktivitesi ve SOD aktivitesi kaybı bulgularını desteklemektedir.

In-vivo hayvan çalışmaları incelendiğinde; Şireli ve Bülbül 2004'te erkek albino guinepiglere 250mg/kg subkutan NaF uygulamış ve 8 saat sonunda sakrifiye ederek kanda NO üretiminin artmış olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, bu çalışmada, NaF uygulamasından sonra kontrol grubuna göre deney gruplarında görülen hemoglobin ve hematokrit değerleri ve eritrosit sayısında önemli düşümlere ek olarak methemoglobin değerlerinde göreceli artış, anemik hipoksi görüntüsünü göstermektedir. Aynı şekilde, mililitre bazında yapılan ölçümlerle elde edilen bulgular, anemik hipoksinin bulgularıdır. Ek olarak dolaşımdaki kontrolsüz durgunluk, damarlardaki kanın yavaşlaması ve dolaşım nedenlerinden dolayı hipoksi, NO oluşumundan sonra kaçınılmaz nihai zehirlenme bulgularıdır. Bu bağlamda solunum sıkıntısı sonrası kalp yetmezliği ve kalbin iş yükündeki artıştan kaynaklanan miyokard enfarktüsü, flor zehirlenmesi bulguları arasında belirtilmiştir (Şireli & Bülbül, 2004). Biz de özellikle beyin doku örneklerinin histolojik incelemesinde hipoksik değişikliklerle karşılaştık. Bu durum flor toksisitesinin genel bulgularıyla eşleşmektedir.

Izquierda-Vega ve arkadaşlarının 2008'de erkek Wistar sıçanlara oral yoldan günde 5mg/kg flor uygulayarak fertilitenin azalmasını değerlendirdiği çalışmanın sonunda O₂- üretiminde artış, SOD aktivitesinde ve mitokondrial membran potansiyelinde azalma tespit edilmiştir. Flora maruz kalmanın spermatozoa fertilizasyon kapasitesinde bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. Verimlilikteki azalmanın, akrozom reaksiyonundan geçme kabiliyeti membran füzyonuna bağlı olduğundan, toplam membran akışkanlığı ve bütünlüğü kaybına yol açacak olan plazma zarının oksidatif hasarından kaynaklanabileceği söylenmiştir. Bu durum döllenme ile ilişkili membran füzyon olaylarında rekabet edebilecek olan spermatozoa sayısını

azaltacaktır, böylece genel doğurganlık azalacaktır denmiştir (Izquierdo-Vega ve ark., 2008).

2006'da erkek swiss farelerde sulara yaygın olarak birlikte bulunan arsenik ve florun etkisini incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada, 4 hafta boyunca arsenik verilmesini takiben yine 4 hafta boyunca 5mg/kg flor oral yolla verilmiş ve biyokimyasal değişkenler üzerine etkileri incelenmiş; eritrositlerde ROS üretiminde artış, SOD ve CAT aktivitelerinde azalma görülmüştür. Kombine maruz kalma sırasında toksik etkilerin sadece arsenik veya florun etkisine kıyasla daha az belirgin olduğu gözlemlenmiştir. Bazı durumlarda, arsenik ve flora birlikte maruz kalmanın ardından antagonistik etkiler kaydedilmiştir (Mittal & Flora, 2006). Bu bulgular bizim çalışmamızda tüm gruplarımızda tespit ettiğimiz SOD ve CAT aktivite azalmasını destekler niteliktedir.

2007'de çalışma geliştirilmiş, swiss albino erkek farelerde 3 hafta boyunca içme sularından 50mg/l flor ve arsenik verilmesi sonucu ROS üretiminde ve karaciğer CAT aktivitesinde artış, kanda SOD aktivitesinde azalma görülmüştür. Arsenik ve flora birlikte maruz kalma sırasında E vitamini takviyesi, bozulmuş antioksidan enzimlerinde ve ROS seviyesinin azalmasında sadece orta düzeyde bir iyileşme sağlamış, ancak bozulmuş esansiyel metal konsantrasyonu, özellikle kalsiyum seviyesi, E vitamini uygulamasına daha olumlu cevap vermiştir. Arsenik ve florun birlikte alınmasının, bu maddelerin bireysel toksik etkileriyle karşılaştırıldığında, hayvanlar için daha az toksik olduğu ve birlikte alım sırasında E vitamini takviyesinin, bozulmuş biyokimyasal değişkenlerin geri kazanılmasında sadece sınırlı yararı olduğu sonucuna varılmıştır. Pro-oksidan / antioksidan dengeyi korumak ve vücut arsenik deposunu azaltmak ancak esansiyel metal dengesinin korunmasıyla sağlanmaktadır ve E vitamini uygulaması buna yardımcı önemli bir rol oynamaktadır denmiştir (Mittal & Flora, 2007).

2009'da daha da detaylandırılan çalışmada; erkek swiss fareler 10 hafta boyunca içme suyundan 50mg/l flor ve arseniğe maruz bırakılmış; ROS üretiminde artış, SOD ve CAT aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Arsenik ve flora bireysel maruz kalmanın, aşırı ROS üretilmesi sonucu ortaya çıkan beyin biyojenik aminlerini değiştirerek nöronal hasara yol açtığı, bu toksik maddelere birleşik maruz kalmanın her zaman daha

belirgin toksisiteye yol açmadığı ve ilginç bir şekilde bazı antagonistik etkiler gösterdiği öne sürülmüştür. Karbonil grubunun oksijen atomu ve amid grubunun hidrojen atomu, DNA molekülünde, arsenik veya flor tarafından olası bağlanma bölgeleridir; tek tek veya kombinasyon halinde arsenik ve flora maruz kalma durumunda nörolojik bozuklukları ve DNA hasarını geri almak için E vitamini takviyesi önerilebilir denmiştir (Flora, Mittal, & Mishra, 2009).

Albino sıçanlara 4 ay boyunca içme suyundan 100mg/l flor uygulanması sonucu plazmada absorbtik asit seviyesinde artış, ürik asit seviyesinde azalma; eritrositlerde SOD aktivitesinde azalma, beyin ve karaciğerde ise sadece lipid peroksidasyonunda artış gözlenmiştir. Bu enzimlerin aktivitesindeki azalma, flor zehirlenmesi tarafından ortaya çıkan oksidatif strese bağlı olabilir denmiştir. Bu nedenle, yüksek flor içeren içme suyu alımının, doku hasarına ve diğer ikincil komplikasyonlara neden olabilecek serbest radikal oluşumuna yol açabileceği sonucuna varılmıştır (Shanthakumari ve ark., 2004).

Başka bir çalışmada albino erkek sıçanlara farklı flor dozlarının kan ve doku oksidatif stres ve apoptoz üzerindeki etkilerini araştırmak için, 10, 50 ve 100 ppm flor 10 hafta süreyle içme sularından verilmiş; kan, karaciğer, böbrek ve beyinde ROS üretiminde artış tespit edilmiştir. Yumuşak dokularda oksidatif stres kanıtı görülmemiştir. Beklentinin aksine, 50 ve 100 ppm flor maruziyeti yumuşak dokularda daha belirgin bir toksisite üretmemiştir. Bununla birlikte, kanda anlamlı derecede yüksek ROS konsantrasyonu gözlemlenmiştir. Flora maruz kalma herhangi bir apoptoz belirtisi üretmemiştir. Bu biyokimyasal gözlemleri desteklemek ve florun olası etki mekanizmasını belirleyebilmek için beyin dokularının IR spektrumları kaydedilmiş, spektrumların sonuçları, 10 ppm flora maruz kalan hayvanlarda -OH grubunun karakteristik pik noktasında önemli bir kayma olduğunu göstermiş, ancak daha yüksek dozlarda, kayma minimal olarak bulunmuştur. Bu nedenle, flora bağlı toksisitenin, özellikle nispeten düşük bir maruz kalma seviyesinde oksidatif stres yoluyla toksisiteye aracılık ettiği, ancak daha yüksek dozlarda, hareket tarzının hala belirsiz olduğu ve daha fazla araştırma gerektirdiği sonucuna varılmıştır (Chouhan & Flora, 2008).

2010'da bu çalışma geliştirilmiş; yine Wistar albino erkek sıçanlarda farklı flor konsantrasyonlarının biyosentetik yolak, oksidatif stres, nörolojik değişiklikler ve bunların histopatolojik değişiklikler ile korelasyonu üzerindeki etkisini araştırmak için hayvanlara 12 hafta boyunca içme suyundan 1,10,50 ve 100mg/l flor uygulanmış, kanda, karaciğerde böbreklerde ve beyinde ROS üretiminin arttığı gözlenmiştir. Oksidatif strese neden olan serbest radikallerin katılımını düşündüren, 50 ve 100 ppm grubunda kanda ROS seviyesinde önemli bir artış gözlenmiş, ardından yüksek dozda (100 ppm) düşük ROS seviyesi izlenmiştir. Böbrek ve beyinde de, ROS seviyesi, 50 ppm flora göre anlamlı şekilde daha yüksektir, ardından 100 ppm uygulanan grupta marjinal bir tükenme tespit edilmiştir. 100 ppm dozunda florun yumuşak dokularda reaktif oksijen türleri üretmediğini ve vücutta metabolize olabileceğini öne sürmüşlerdir. Daha yüksek dozlarda florun biyomoleküller ile etkileşime girmemiş olması ve dolayısıyla ROS'ta doza bağlı bir artış olmaması da mümkün olabilir denmiştir. Sıçanlarda on iki haftalık flora maruz kalma, beyinde önemli bir nörotransmitter olan AChE 'de belirgin bir artışa neden olmuştur, aynı zamanda yüksek düzeyde flora maruz kalan gruplarda öğrenme ve hafıza kaybına yol açan beyin AChE aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Flora maruz kalan hayvanlarda AChE'nin artan aktivitesi, florun enzim katalizi için gerekli olan iki veya daha fazla hidrojen donörü ile etkileşimi nedeniyle olabilir denmiştir. Beynin hipokampal bölgesi dışındaki tüm doku kesitlerinde hasar, 100 ppm ile tedavi edilen grupta kıyasla, 10 ve 50 ppm flor ile muamele edilmiş gruplarla karşılaştırıldığında daha belirgin bulunmuştur. Histolojik değişikliklerden elde edilen sonuçlar, yüksek konsantrasyonda florun daha fazla toksik etki gösterdiğini ve yumuşak dokulara zarar verdiğini ortaya koymuştur. Bu histopatolojik incelemeler ayrıca yumuşak dokularda flor konsantrasyonuna bağlı biyokimyasal gözlemlerin sonuçlarını da desteklemektedir. (Chouhan, Lomash, & Flora, 2010).

Biz de çalışmamızda beyin SOD enzim aktivitesinde 50 ve 100 ppm flor alan grupta anlamlı bir artış gözlerken 200 ppm flor alan grupta enzim aktivite kaybı olduğunu gördük. SOD, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandıran bir enzim olduğu için bu durum 200 ppm flor alan grupta yaygın nekrozlar görülmesiyle ve hücre faaliyetinin büyük oranda bozulmasıyla ilişkilendirilebilir. Karaciğerde her 3 grupta da kontrol grubuyla karşılaştırıldığında enzim aktivitesinde düşüş gözlenmiştir; bu

durum harabiyete bağlı enzim fonksiyon kaybını gösterir. Kan örnekleri incelendiğinde 50 ve 200 ppm' de enzim aktivite kaybı, 100 ppm' de ise kontrole yakın bir tabloyla karşılaşılmıştır. Bu durum Chouhan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma bulgularıyla benzerdir (Chouhan ve ark., 2010).

Flor eğer nörotoksik bir dozda uygulanırsa AChE enzim aktivitesinin azalması gerekmektedir. Doku rneklerimizde AChE enzim aktivitesini incelediğimizde karaciğer AChE aktivitesi tüm gruplarda kontrol grubuyla aynı bulunmuştur. Bunun sebebi olarak AChE'nin temelde karaciğerde eksprese olan bir enzim olmamasını gösterebiliriz. Kanda ise kontrol grubuna göre 50 ppm grubunda anlamlı aktivite kaybı gözlenirken, 100 ve 200 ppm grupları kontrole yakın aktivite göstermiştir. Beyin dokusunda 100 ppm grubu kontrole göre aktivite artışı gösterirken, 50 ve 200 ppm grubu ise kontrol grubuna göre aktivite kaybı göstermiştir. Flor uygulama gruplarında kontrole göre rakamsal artış ve azalışlar bulunmasına rağmen, istatistiksel açıdan hiç bir farklılık bulunmadığı ortaya çıkmıştır. Belki daha yüksek dozlarda ya da daha uzun süreli uygulama yapılırsaydı anlamlı bir fark bulabilirdik.

2003 yılında farklı jenerasyonlarda yürütülen başka bir çalışmada yetişkin Wistar albino erkek sıçanların ikinci jenerasyonuna 180 gün süreyle 10, 50 ve 100mg/l flor içme suyundan uygulanmış ve akciğer dokusu üzerine etkisi incelenmiş; histolojik bulgular, deney gruplarında alveoler tıkanıklık, alveoler hücreli hiperplazi ve nekroz, belirgin alveolar septal damarlar, epitelyal deskuamasyon ve makrofajlar olduğunu göstermiştir. Ek olarak, peribronşiyal, perivasküler, intraparenşimal ve solunum yolu lümeninde iltihaplı infiltrasyonlar tespit edilmiştir; intraparenkimal hiperalemik damarlar, solunum epitellerinde deskuamasyon ve çoğalma, intraparenkimal kalın kabarık damarlar, parankimal fibroz, bronşiyolit, pnömonik ve fokal amfizematöz alanlar gözlenmiştir. Ayrıca, akciğer parankiminin alveoler mimarisi kaybıyla birlikte bozuk bir görünüme sahip olduğu söylenmiştir. Bu histopatolojik bulgular, 50 ve 100 mg/l flor verilen sıçan grupları için daha belirgin izlenmiştir. Kontrol grubundaki ratlarda anlamlı bir histopatolojik değişiklik gözlenmemiştir. SOD ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin artması ve akciğer dokularında 10 mg/l flor ile CAT aktivitesinin azalması, antioksidan savunma mekanizmasının aktivasyonunu gösterebilir denmiştir (Aydin, iek, Akdoğan, & Gökalp, 2003).

Liu ve arkadaşları 2003'te civcivlere diyetleri yoluyla 50 gün süreyle 100, 250 ve 400 mg/kg flor vermiş ve serum NO düzeyini incelemiş, kontrol grubundaki civcivlerle karşılaştırıldığında, flor uygulanan gruplarda serum NO seviyesi büyük ölçüde artmış, SOD ve CAT aktiviteleri anlamlı olarak azalmıştır. Sonuçlar, florun yüksek NO seviyeleri, antioksidan enzimlerin aktivitelerinin azalması ve lipid peroksidlerin (LPO) birikimi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Florun yumuşak dokulara zarar verme mekanizması; bu dokuların yapısına ve fonksiyonuna ciddi hasar verebilecek aşırı NO, LPO ve oksidatif radikal üretimine neden olmasıyla açıklanabilir demiştir (G. Liu ve ark., 2003). Bulgular tüm gruplarımızdaki CAT ve SOD aktivite kaybını desteklemektedir.

Hassan ve Yousef albino erkek sıçanlara 5 hafta boyunca günde 10,3mg/kg NaF oral yolla vermiş ve hepatotoksisite üzerine karadut suyunun koruyucu etkisini araştırmış; florun NO üretiminde artışa, total antioksidan kapasitesi, SOD ve CAT aktivitesinde azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir. Sonrasında karadut suyunun uygulanmasıyla bu tabloda düzelmeye izlenmiştir. Bu nedenle, mevcut sonuçlar karadut suyunun serbest radikal oluşumunu ve antioksidan savunma mekanizmalarının geliştirilmesini antagonize ederek NaF kaynaklı hepatotoksisiteye karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Hassan & Yousef, 2009). CAT ve SOD aktivite kaybı bulgularımızı desteklemektedir.

Guo ve arkadaşları tarafından dişi ve erkek albino sıçanların 3 ay boyunca içme sularına 50, 100 ve 150mg/l flor eklenmiş ve hepatotoksisite araştırılmış; serum glutamat piruvat transaminaz ve serum glutamat oksalat transaminaz aktivitelerinin önemli ölçüde arttığı ve bunun hepatik hasara işaret ettiği söylenmiştir. SOD aktivitesinde azalma gözlenmesi bu durumu desteklemektedir. Bu nedenle oksidatif strese bağlı oksidatif hasar, flora bağlı hepatotoksisite için önemli bulgu olarak kabul edilmiştir (Guo, Sun, & Sun, 2003). Karaciğer doku örneklerimizde yaptığımız histopatolojik incelemeler sonucu tespit ettiğimiz hepatik hasar bu çalışmanın bulguları desteklemektedir.

Zhan ve arkadaşları genç domuzlarla yaptıkları çalışmada 50 gün boyunca 250 ve 400 mg/kg NaF diyetlerine eklemiş, NO üretiminde artış, tiroid bezi, karaciğer ve böbrek SOD aktivitesinde azalma tespit etmişlerdir. Flor uygulanan hayvanlarda uygulama

süreci ve sakrifikasyon sırasında yorgunluk, sersemlik ve anokreksiya gözlenmiştir. Tiroid, karaciğer ve böbrek doku örneklerinde patolojik lezyonlar izlenmiştir (Zhan, Xu, Li, & Wang, 2005) . Bu veriler elde ettiğimiz histopatolojik bulgularla uyumludur.

Guney ve arkadaşlarının yürüttüğü, dişi sıçanların 60 gün boyunca içme sularından 100mg/l flora maruz bırakıldıkları, C ve E vitamininin endometrial hasar ve oksidatif stres sistemi üzerine etkisinin araştırıldığı başka bir çalışma sonucu sıçan endometriyumlarında SOD ve CAT aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Bu azalma vitamin takviyesinden sonra tersine dönmüştür. Oksidatif endometrial hasarın flor kaynaklı endometrial toksisitede önemli bir rol oynadığı ve oksidatif stresin vitaminlerle modüle edilmesinin hem biyokimyasal hem de histolojik seviyelerde flora bağlı endometrial hasarı azalttığı sonucuna varılmıştır (Guney ve ark., 2007).

Yine dişi albino farelerde yürütülen bir çalışmada flor ve arsenik trioksitin (sırasıyla 5 mg ve 0,5 mg / kg) 30 gün boyunca oral uygulanmasının yumurtalıklarda serbest radikal kaynaklı toksisite üzerine etkileri araştırılmış, uygulamanın kesilmesinden sonra; antioksidan vitaminlerin (C, E) ve kalsiyumun verilmesiyle indüklenen etkilerin tersine çevrilebilirliği de incelenmiştir. Flor ve arsenik trioksitin birlikte uygulanması sonucu SOD ve CAT aktivitesinde azalma tespit edilmiştir. Kombine uygulamanın sonlandırılması, yumurtalıkta kısmen iyileşmeye neden olmuştur; bu iyileşmenin tek başına ve kombinasyon halinde C vitamini, kalsiyum veya E vitamini ile yapılan işlemlerde daha fazla olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla indüklenen toksisite geçici ve geri dönüşümlü olmuştur (Jhala, Chinoy, & Rao, 2008).

Kanbur ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışmada erkek fareler 7 gün boyunca içme sularından 200 mg/l flora maruz bırakılmış ve arı sütünün toksisite üzerine etkisi incelenmiş; SOD ve CAT aktivitesinde azalma tespit edilmiştir. Sonuç olarak, florun farelerde olumsuz etkilere neden olduğu belirlenmiş ve arı sütünün bu hayvanlara uygulanmasının florun olumsuz etkilerini hafiflettiği gösterilmiştir (Kanbur, Eraslan, Silici, & Karabacak, 2009)

2009'da başka bir çalışmada dişi wistar sıçanlar 28 gün boyunca içme sularından 150mg/l flora maruz bırakılmış, buffalo pineal proteinleri ve melatoninin toksisite üzerine etkisi araştırılmış; beyinde SOD ve CAT aktivitelerinde azalma görülmüştür.

Sonrasında pineal protein ve melatonin ayrı ayrı ve birlikte uygulanmıştır ve enzimatik aktivitelere artış sağlanmıştır. Buffalo pineal proteinleri ve melatoninin sıçan beyindeki flor kaynaklı işletim sistemini, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sisteminin geliştirilmesi yoluyla koruyabildiğine dair doğrudan kanıtlar sunulmuştur (Bharti & Srivastava, 2009).

Flor maruziyetinin gebelik sırasında ve gebelik sonrası dönemlerde etkisini, santral sinir sistemindeki oksidan, antioksidan ve makromoleküler değişikliklerin durumunu ve antioksidanların iyileştirici rolünü kontrol etmek amacıyla hamile Wistar albino sıçanların içme suyunda 50 ve 150 ppm flora maruz bırakıldığı ve bunlardan doğan yavruların deney için kullanıldığı bir çalışmada; doğum sonrası yavrulara, günlük olarak seçilen antioksidanlar oral yoldan uygulanmıştır. Doğum sonrası 21. günde yavrular sakrifiye edilmiş ve biyokimyasal parametreler değerlendirilmiştir. Flora maruz kalma sonucu gelişmekte olan santral sinir sistemi protein oksidasyonunda artış gözlenmiştir. Elde edilen bulgular florun antioksidanlar, enzimler ve makromoleküller üzerinde dishemostaza neden olduğunu ve doza bağlı bir şekilde fonksiyonel kayıplara yol açan patofizyolojik olaylara sebep olduğunu göstermiştir. Antioksidanların verilmesinin, aşırı derecede savunmasız yaşam dönemlerinde yüksek flor maruziyetinin neden olduğu sorunları giderdiği söylenmiştir (Basha & Madhusudhan, 2010).

Az sayıda olan In-vivo insan çalışmaları incelendiğinde; Çin endemik florozis bölgesinde yaşayan ve idrar flor konsantrasyonu 2mg F/l olan kişiler üzerinde yapılan bir çalışmada, selenyumun oksidatif hasar üzerine etkisi incelenmiş; Fincoal tip florozisli hastalar değerlendirilmiş ve yerleşim yerlerine göre yüksek flor, yüksek flor+selenyum ve yüksek selenyum olarak gruplara ayrılmıştır. Yüksek flor grubu örneklerde SOD ve CAT enzim aktivitesinde azalma görülmüştür. Yüksek selenyum ihtiva eden bölgede yaşayanlardan alınan örneklerde ise bu enzimsel aktivitelere yüksek flor grubuna oranla anlamlı fazlalık tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2009).

Biz de çalışmamızda CAT enzim aktivitesinde tüm dokularda ve tüm gruplarda zamana bağlı şekilde düzgün bir azalma tespit ettik. Tüm bu çalışmalarda elde edilen veriler bulgularımızı desteklemektedir.

Su konsantrasyonu ortalama 5,53mg F/l olan, Hindistan'da bir endemik florozis bölgesinde yaşayan ve iskeletsel florozisi olan çocuklar üzerinde yürütülen bir çalışmada ise plazmada askorbik asit düzeyinde artış ve eritrositlerde SOD aktivitesinde azalma tespit edilmiştir. Sonuçlar, flor toksisitesinin, oksijensiz radikal toksisitesine karşı daha fazla savunmasızlığa yol açan belirli antioksidanların azalmasını neden olabileceğini göstermiştir (Shivarajashankara, Shivashankara, Rao, & Bhat, 2001) .

Çin'de ve Hindistan'da yapılan çalışmalar çocukların sürekli düşük doz florla karşılaşmasının IQ'da azalmayla ilişkili olduğu belirtilmiştir, güvenilir kanıta dayalı çalışmalar değildir (Kundu ve ark., 2015; Xiang ve ark.).

Jolly ve arkadaşlarının sağlıklı ve florozisli hastalar üzerindeki çalışmaları sonucu yüksek flora maruz kalan hastalarda intervertebral foramende daralma olduğu tespit edilmiştir (Jolly, Singh, Mathur, & Malhotra, 1968).

İçme suyunda yüksek flor içeren bölgelerde yaşayan kişilerin gastrik mukozasında mikrovilus azalması ve mukus kaybı tespit edilmiştir. Bu durumun kusma, ağrı, iştah kaybı, şişkinlik hissi ve aralıklı diyare sonrası konstipasyona neden olduğu söylenmiştir. Yüksek dozda flora maruz kalınmanın tiroid bezinde işlev bozukluğuna neden olduğu gösterilmiştir (T. Das, Susheela, Gupta, Dasarathy, & Tandon, 1994; Dasarathy, Das, Gupta, Susheela, & Tandon, 1996; Susheela, Kumar, Bhatnagar, & Bahadur, 1993).

Florun kimyasal olarak aktif bir iyonize element olduğu ve tüm ana yumuşak dokulara girdiği bilinmektedir. Flora bağlı oksidatif stres; organların zarar görmesine yol açabildiği için, sonuçlarımızı karaciğer, tiroid bezi, hipofiz bezi ve beyindeki histopatolojik gözlemlerle destekledik. Bu dokuların çeşitli bölgelerinde farklı düzeylerde bozulma gözlemledik. Karaciğerde balon dejenerasyon, portal yangı ve konjesyona damarlara ek olarak sitoplazmik dejenerasyon ve bozulmuş hepatositler tespit ettik. Yapılan diğer çalışmalar bu bulgularımızı desteklemektedir

(Chattopadhyay, Podder, Agarwal & Bhattacharya, 2011; Chouhan ve ark., 2010; Patel & Chinoy, 1998; Shashi & Thapar, 2001) .

Beyin örneklerini incelediğimizde nükleer materyalin şiddetli kromatolizi, glial hücrelerin iltihaplanması ve purkinje nöronlarının çoğunun nekrotik olduğunu gördük. Aynı zamanda doz arttıkça gruplanmış kırmızı nöronlar ve artmış fokal nekroz alanları da tespit ettik. Beyin bölgelerinde görülen değişiklikler diğer çalışmalarla benzerlik göstermiştir (Piler Mahaboob Basha, Puja Rai, & Shabana Begum, 2011; Chouhan ve ark., 2010; Reddy, Reddy, & Kumar, 2011; Shivarajashankara, Shivashankara, Bhat, Rao, & Rao, 2002; Varner, Jensen, Horvath, & Isaacson, 1998).

Tiroid bezi örneklerinde dozun artmasıyla çoğalan yassılaştırmış folikül epitel hücreleri, yüksek flor dozlarında ise hiperplastik sellüler ve adenomatoid nodüller izledik. Elde ettiğimiz sonuçlar diğer çalışmaları desteklemektedir (Bouaziz, Soussia, Guermazi, Zeghal, & Tunisia, 2005; Ogilvie, 1953; H. Wang ve ark., 2009). Literatürde tiroid bezi hormonlarının değerlendirildiği çok sayıda çalışma olmasına rağmen histopatolojisinin araştırıldığı çalışmalar yetersizdir.

Hipofiz bezinde tüm dozlarda olağan bir görüntü izledik. Genelde yapılan çalışmalar hipofiz bezi hormonlarının feed-back mekanizmasını incelemek üzerinedir (Luke, 1997), flor toksisitesi histopatolojisinin incelendiği çalışma yoktu. Günümüzde hipofiz bezinde kalsifikasyonlara sebep olduğuna yönelik algı operasyonu düşünüldüğünde çok yüksek dozlarda bile herhangi bir patolojinin saptanmadığı bizim için önemli bir bulgudur. Tabii ki konuyla ilgili daha çok çalışmanın yapılması gerekmektedir.

Tüm bu histolojik değişikliklerden elde ettiğimiz sonuçlar, yüksek konsantrasyonda florun, daha fazla toksik etki ve yumuşak dokularda hasar oluşturduğunu ortaya koymuştur. Bu histopatolojik incelemeler ayrıca yumuşak dokularda flor konsantrasyonuna bağlı biyokimyasal gözlemleri ve sonuçlarını da desteklemektedir.

Bizim çalışmamız da dahil tüm çalışmalarda florun sistemik alımı sonrası toksisitesi değerlendirilmiştir. Eski inanışlara göre çürükten korunmada sistemik flor

takviyesinin elzem olması, yapılan çalışmalar sonucu anlamsız bulunmuştur; topikal uygulamaların çürük önlemedeki etkisi yadsınamazdır (Hellwig & Lennon, 2004). Piyasadaki en yüksek flor oranına sahip (22,500 ppm) Duraphat vernik uygulanması sonrası değişik yař grubu çocukların plazma ve idrar flor konsantrasyonlarının değerlendirildiği bir çalışma sonucunda uygulamanın 2 saat sonrasında plazma flor değerinin en yüksek doza ulaştığı (60-120ng F/ml), bu pik noktasının idrarda 12 saat sonra kaydedildiği, (550-1100µg/F) ancak bu değerlerin toksik sayılan değerlerden çok daha dūřuk olduğu bildirilmiştir (Ekstrand, Koch, & Petersson, 1980). Diř hekimliğinde flor ihtiva eden preparatların doğru şekilde topikal uygulanması sonucu toksik doza ulaşmak mümkün değildir.



6. Sonuç ve Öneriler

Flor hala modern girişimsel olmayan dış çürüğü önleme yöntemlerinin temel taşıdır. Bununla birlikte, florun etki mekanizması, tartışmalara konu olmaya devam etmektedir. Sistemik flor kullanımının yıllar içerisinde yapılan çalışmalar sonucu yerini topikal uygulamalara bırakmasına rağmen; suların yüksek florlu olduğu bölgelerde yaşayan veya genel sağlık sistemi politikası sebebiyle flor takviyesi yapılan popülasyonda ve preparatların yanlış kullanımına (yutulması vs.) bağlı flor toksisitesi görülme ihtimali mevcuttur.

Bu çalışmamızda toksik dozda florun yumuşak dokulara ve oksidatif stres parametrelerine etkisi sıçan modeli üzerinde değerlendirilmiştir.

Histopatolojik olarak tüm dokularda “doza bağlı artan” bir paternde patoloji izlenmiştir. Beyinde kırmızı nöronlar, purkinje hücrelerinde deformasyonlar, hipoksi ve nekrotik alanlar görülmüştür.

Karaciğerde konjesyone damarlar, balon dejenerasyon ve fokal nekroz alanları hepatik hasara işaret eder.

Tiroid bezinde yassılaştırmış tiroisitler ve yüksek dozlarda adematoid sellüler nodüller gözlenmesi ilginçtir.

Hipofiz bezinde tüm gruplarda ve dozlarda hiçbir patolojiye rastlanmamıştır.

Sistemik alınan flor yüksek dozlarda oksidatif stres parametrelerinde olumsuz değişikliklere neden olmuştur.

Oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin temizlenmesinde etkili olan SOD enzim aktivitesinde azalma tespit edilmiştir, rakamsal olan bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Katalaz enzim aktivitesi beklendiği gibi tüm doku ve gruplarda düzgün bir azalma göstermiştir; yine rakamsal olan bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

AChE enzim aktivitesinde azalma tespit edilememiştir ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Vücut için zorunlu bir iz element olmasına rağmen, florun yüksek dozlarda sistemik alımı fizyolojiyi bozacak toksik etkilere sebep olmaktadır. Bu toksisitesinin

değerlendirilmesinde in-vivo çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Hayvan modellerinde yürütülecek çalışmalar insanlara uyarlanabilirliği açısından tartışmalı ancak elzemdir. Daha anlamlı sonuçlar bulunabilmesi açısından daha yüksek dozlarda ve/veya daha uzun süreli flor uygulamalarıyla yapılacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



7. Kaynaklar

- Agalakova, N. I., & Gusev, G. P. (2011). Fluoride-induced death of rat erythrocytes in vitro. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 1609-1618.
- Agalakova, N. I., & Gusev, G. P. (2012). Molecular mechanisms of cytotoxicity and apoptosis induced by inorganic fluoride. *ISRN Cell Biology*, 2012.
- Akdoğan, M., Bilgili, A., Karagöz, E., Gökçimen, A., Eraslan, G., & Ustüner, E. (2002). Flor zehirlenmesi oluşturulmuş tavşanların böbrek dokusunda yapısal ve biyokimyasal değişiklikler. *Turk J Vet Anim Sci*, 26, 71-77.
- Ando, M., Tadano, M., Yamamoto, S., Tamura, K., Asanuma, S., Watanabe, T., . . . Liang, C. (2001). Health effects of fluoride pollution caused by coal burning. *Science of the total environment*, 271(1-3), 107-116.
- Angmar-Månsson, B., & Whitford, G. M. (1990). Environmental and physiological factors affecting dental fluorosis. *Journal of dental research*, 69(2_suppl), 706-713.
- Anuradha, C. D., Kanno, S., & Hirano, S. (2001). Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(3), 367-373.
- Aoba, T. (1994). Strategies for improving the assessment of dental fluorosis: focus on chemical and biochemical aspects. *Advances in Dental Research*, 8(1), 66-74.
- Aoba, T., & Fejerskov, O. (2002). Dental fluorosis: chemistry and biology. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(2), 155-170.
- Atabey, E. (2005). *Tıbbi jeoloji: TMMOB Jeoloji Mühendisleri Odası Yayınları*.
- ATSDR, T. (2000). ATSDR (Agency for toxic substances and disease registry). *Prepared by Clement International Corp., under contract*, 205, 88-0608.
- Aydin, G., Çiçek, E., Akdoğan, M., & Gökalp, O. (2003). Histopathological and biochemical changes in lung tissues of rats following administration of fluoride over several generations. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 23(6), 437-446.
- Basha, P. M., & Madhusudhan, N. (2010). Pre and post natal exposure of fluoride induced oxidative macromolecular alterations in developing central nervous system of rat and amelioration by antioxidants. *Neurochemical research*, 35(7), 1017-1028.

- Basha, P. M., Rai, P., & Begum, S. (2011). Evaluation of fluoride-induced oxidative stress in rat brain: a multigeneration study. *Biological trace element research*, *142*(3), 623-637.
- Basha, P. M., Rai, P., & Begum, S. (2011). Fluoride toxicity and status of serum thyroid hormones, brain histopathology, and learning memory in rats: a multigenerational assessment. *Biological trace element research*, *144*(1-3), 1083-1094.
- Berg, J., Gerweck, C., Hujoel, P. P., King, R., Krol, D. M., Kumar, J., . . . Strock, S. (2011). Evidence-based clinical recommendations regarding fluoride intake from reconstituted infant formula and enamel fluorosis: a report of the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *The Journal of the American Dental Association*, *142*(1), 79-87.
- Bharti, V. K., & Srivastava, R. (2009). Fluoride-induced oxidative stress in rat's brain and its amelioration by buffalo (*Bubalus bubalis*) pineal proteins and melatonin. *Biological trace element research*, *130*(2), 131-140.
- Bouaziz, H., Croute, F., Boudawara, T., Soleilhavoup, J. P., & Zeghal, N. (2007). Oxidative stress induced by fluoride in adult mice and their suckling pups. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *58*(5), 339-349.
- Bouaziz, H., Soussia, L., Guermazi, F., Zeghal, N., & Tunisia, S. (2005). Fluoride-induced thyroid proliferative changes and their reversal in female mice and their pups. *Fluoride*, *38*(3), 185.
- Brambilla, E. (2001). Fluoride—Is It Capable of Fighting Old and New Dental Diseases? *Caries Research*, *35*(Suppl. 1), 6-9.
- Bronckers, A., Lyaruu, D., & DenBesten, P. (2009). The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. *Journal of dental research*, *88*(10), 877-893.
- Brothwell, D., & Limeback, H. (2003). Breastfeeding is protective against dental fluorosis in a nonfluoridated rural area of Ontario, Canada. *Journal of Human Lactation*, *19*(4), 386-390.
- Browne, D., Whelton, H., & O'Mullane, D. (2005). Fluoride metabolism and fluorosis. *Journal of Dentistry*, *33*(3), 177-186.
- Buzalaf, M. A. R., Damante, C. A. A., Trevizani, L. M. M., & Granjeiro, J. M. (2004). Risk of fluorosis associated with infant formulas prepared with bottled water. *Journal of dentistry for children*, *71*(2), 110-113.

- Chattopadhyay, A., Podder, S., Agarwal, S., & Bhattacharya, S. (2011). Fluoride-induced histopathology and synthesis of stress protein in liver and kidney of mice. *Archives of toxicology*, 85(4), 327-335.
- Chen, Q., Wang, Z., Xiong, Y., Xue, W., Kao, X., Gao, Y., . . . Song, D. (2009). Selenium increases expression of HSP70 and antioxidant enzymes to lessen oxidative damage in Fincoal-type fluorosis. *The Journal of toxicological sciences*, 34(4), 399-405.
- Chouhan, S., & Flora, S. (2008). Effects of fluoride on the tissue oxidative stress and apoptosis in rats: biochemical assays supported by IR spectroscopy data. *Toxicology*, 254(1-2), 61-67.
- Chouhan, S., Lomash, V., & Flora, S. (2010). Fluoride-induced changes in haem biosynthesis pathway, neurological variables and tissue histopathology of rats. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 30(1), 63-73.
- Cittanova, M.-L., Lelongt, B., Verpont, M.-C., Geniteau-Legendre, M., Wahbe, F., Prie, D., . . . Ronco, P. M. (1996). Fluoride ion toxicity in human kidney collecting duct cells. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 84(2), 428-435.
- D'Alessandro, W. (2006). Human fluorosis related to volcanic activity: a review. *Environmental Toxicology*, 1, 21-30.
- Dabrowska, E., Balunowska, M., Letko, R., & Szynaka, B. (2004). Ultrastructural study of the mitochondria in the submandibular gland, the pancreas and the liver of young rats, exposed to NaF in drinking water. *Roczniki Akademii Medycznej w Białymstoku (1995)*, 49, 180-181.
- Darchen, A., Sivasankar, V., Prabhakaran, M., & Bharathi, C. B. (2016). Health Effects of Direct or Indirect Fluoride Ingestion. In *Surface Modified Carbons as Scavengers for Fluoride from Water* (pp. 33-62): Springer.
- Das, T., Susheela, A., Gupta, I., Dasarathy, S., & Tandon, R. (1994). Toxic effects of chronic fluoride ingestion on the upper gastrointestinal tract. *Journal of clinical gastroenterology*, 18(3), 194-199.
- Das, T. K., & Susheela, A. (1993). Effect of long-term administration of sodium fluoride on plasma calcium level in relation to intestinal absorption and urinary excretion in rabbits. *Environmental research*, 62(1), 14-18.
- Dasarathy, S., Das, T. K., Gupta, I. P., Susheela, A. K., & Tandon, R. K. (1996). Gastroduodenal manifestations in patients with skeletal fluorosis. *Journal of gastroenterology*, 31(3), 333-337.

- Dean, H. T., Arnold, F. A., & Elvove, E. (1942). Domestic water and dental caries. *Public Health Rep*, 57(32), 1155-1179.
- DenBesten, P. (1999). Biological mechanisms of dental fluorosis relevant to the use of fluoride supplements. *Community dentistry and oral epidemiology*, 27(1), 41-47.
- DenBesten, P., & Li, W. (2011). Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. In *Fluoride and the oral environment* (Vol. 22, pp. 81-96): Karger Publishers.
- Dhar, V., & Bhatnagar, M. (2009). Physiology and toxicity of fluoride. *Indian Journal of Dental Research*, 20(3), 350.
- Ding, Y., Sun, H., Han, H., Wang, W., Ji, X., Liu, X., & Sun, D. (2011). The relationships between low levels of urine fluoride on children's intelligence, dental fluorosis in endemic fluorosis areas in Hulunbuir, Inner Mongolia, China. *Journal of Hazardous materials*, 186(2-3), 1942-1946.
- Do, L. G., Levy, S. M., & Spencer, A. J. (2012). Association between infant formula feeding and dental fluorosis and caries in Australian children. *Journal of public health dentistry*, 72(2), 112-121.
- Doull, J., Boekelheide, K., Farishian, B., Isaacson, R., Klotz, J., Kumar, J., . . . Reed, N. (2006). Fluoride in drinking water: a scientific review of EPA's standards. *National Academies, Washington*, 205-223.
- Edition, F. (2011). Guidelines for drinking-water quality. *WHO chronicle*, 38(4), 104-108.
- Ekstrand, J., Koch, G., & Petersson, L. G. (1980). Plasma fluoride concentration and urinary fluoride excretion in children following application of the fluoride-containing varnish Duraphat®. *Caries Research*, 14(4), 185-189.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Ermis, R. B., De Munck, J., Cardoso, M. V., Coutinho, E., Van Landuyt, K. L., Poitevin, A., . . . Van Meerbeek, B. (2007). Bonding to ground versus unground enamel in fluorosed teeth. *Dental materials*, 23(10), 1250-1255.
- Fawell, J., Bailey, K., Chilton, J., Dahi, E., & Magara, Y. (2006). *Fluoride in drinking-water*: IWA publishing.
- Featherstone, J. D. (1999). Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community dentistry and oral epidemiology*, 27(1), 31-40.

- Fejerskov, O., Larsen, M. J., Richards, A., & Baelum, V. (1994). Dental tissue effects of fluoride. *Advances in Dental Research*, 8(1), 15-31.
- Fidancı, U., Salmanoğlu, B., Maraşlı, Ş., & Maraşlı, N. (1998). İç Anadolu bölgesinde doğal ve endüstriyel florozis ve bunun hayvan sağlığı üzerindeki etkileri. *Turk J Vet Anim Sci*, 22(6), 537-544.
- Fincham, A., Moradian-Oldak, J., & Simmer, J. (1999). The structural biology of the developing dental enamel matrix. *Journal of structural biology*, 126(3), 270-299.
- Flora, S., Mittal, M., & Mishra, D. (2009). Co-exposure to arsenic and fluoride on oxidative stress, glutathione linked enzymes, biogenic amines and DNA damage in mouse brain. *Journal of the neurological sciences*, 285(1-2), 198-205.
- FLUORKOWYCH, W. J., & ENZYMÓW, N. A. (2005). *IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF FLUORIDE IONS ON ENZYME ACTIVITY*. Paper presented at the Annales academiae medicae stetinensis.
- Fomon, S. J., Ekstrand, J., & Ziegler, E. E. (2000). Fluoride intake and prevalence of dental fluorosis: Trends in fluoride intake with special attention to Infants: Review & commentary. *Journal of public health dentistry*, 60(3), 131-139.
- Franco, Á. M., Martignon, S., Saldarriaga, A., González, M. C., Arbeláez, M. I., Ocampo, A., . . . Villa, A. E. (2005). Total fluoride intake in children aged 22–35 months in four Colombian cities. *Community dentistry and oral epidemiology*, 33(1), 1-8.
- García-Montalvo, E. A., Reyes-Pérez, H., & Del Razo, L. M. (2009). Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stress. *Toxicology*, 263(2-3), 75-83.
- Gessner, B. D., Beller, M., Middaugh, J. P., & Whitford, G. M. (1994). Acute fluoride poisoning from a public water system. *New England Journal of Medicine*, 330(2), 95-99.
- Ghosh, J., Das, J., Manna, P., & Sil, P. C. (2008). Cytoprotective effect of arjunolic acid in response to sodium fluoride mediated oxidative stress and cell death via necrotic pathway. *Toxicology in Vitro*, 22(8), 1918-1926.
- Gofa, A., & Davidson, R. (1996). NaF potentiates a K⁺-selective ion channel in G292 osteoblastic cells. *The Journal of membrane biology*, 149(3), 211-219.
- Guan, Z.-Z., Wang, Y.-N., Xiao, K.-Q., Dai, D.-Y., Chen, Y.-H., Liu, J.-L., . . . Dallner, G. (1998). Influence of chronic fluorosis on membrane lipids in rat brain. *Neurotoxicology and Teratology*, 20(5), 537-542.

- Guan, Z.-Z., Xiao, K.-Q., Zeng, X.-Y., Long, Y.-G., Cheng, Y.-H., Jiang, S.-F., & Wang, Y.-N. (2000). Changed cellular membrane lipid composition and lipid peroxidation of kidney in rats with chronic fluorosis. *Archives of toxicology*, 74(10), 602-608.
- Gui, C.-Z., Ran, L.-Y., Li, J.-P., & Guan, Z.-Z. (2010). Changes of learning and memory ability and brain nicotinic receptors of rat offspring with coal burning fluorosis. *Neurotoxicology and Teratology*, 32(5), 536-541.
- Guney, M., Oral, B., Demirin, H., Karahan, N., Mungan, T., & Delibas, N. (2007). Protective effects of vitamins C and E against endometrial damage and oxidative stress in fluoride intoxication. *Clinical and Experimental pharmacology and physiology*, 34(5-6), 467-474.
- Guo, X.-y., Sun, G.-f., & Sun, Y.-c. (2003). Oxidative stress from fluoride-induced hepatotoxicity in rats. *Fluoride*, 36(1), 25-29.
- Gutknecht, J., & Walter, A. (1981). Hydrofluoric and nitric acid transport through lipid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 644(1), 153-156.
- Harrison, P. T. (2005). Fluoride in water: a UK perspective. *Journal of fluorine chemistry*, 126(11-12), 1448-1456.
- Hassan, H. A., & Yousef, M. I. (2009). Mitigating effects of antioxidant properties of black berry juice on sodium fluoride induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2332-2337.
- He, H., Ganapathy, V., Isales, C. M., & Whitford, G. M. (1998). pH-dependent fluoride transport in intestinal brush border membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1372(2), 244-254.
- Hellwig, E., & Lennon, A. (2004). Systemic versus topical fluoride. *Caries Research*, 38(3), 258-262.
- Hujoel, P. P., Zina, L. G., Moimaz, S. A., & Cunha-Cruz, J. (2009). Infant formula and enamel fluorosis: a systematic review. *The Journal of the American Dental Association*, 140(7), 841-854.
- Izquierdo-Vega, J. A., Sánchez-Gutiérrez, M., & Del Razo, L. M. (2008). Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. *Toxicology and applied pharmacology*, 230(3), 352-357.
- Jakob, U., & Reichmann, D. (2013). *Oxidative stress and redox regulation*: Springer.

- Jhala, D. D., Chinoy, N., & Rao, M. (2008). Mitigating effects of some antidotes on fluoride and arsenic induced free radical toxicity in mice ovary. *Food and Chemical Toxicology*, 46(3), 1138-1142.
- Jolly, S., Singh, B., Mathur, O., & Malhotra, K. (1968). Epidemiological, clinical, and biochemical study of endemic dental and skeletal fluorosis in Punjab. *Br Med J*, 4(5628), 427-429.
- Kaminsky, L. S., Mahoney, M. C., Leach, J., Melius, J., & Jo Miller, M. (1990). Fluoride: benefits and risks of exposure. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1(4), 261-281.
- Kanbur, M., Eraslan, G., Silici, S., & Karabacak, M. (2009). Effects of sodium fluoride exposure on some biochemical parameters in mice: Evaluation of the ameliorative effect of royal jelly applications on these parameters. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1184-1189.
- Karube, H., Nishitai, G., Inageda, K., Kurosu, H., & Matsuoka, M. (2009). NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells. *Journal of dental research*, 88(5), 461-465.
- Kaur, T., Bijarnia, R. K., & Nehru, B. (2009). Effect of concurrent chronic exposure of fluoride and aluminum on rat brain. *Drug and chemical toxicology*, 32(3), 215-221.
- Kobayashi, C. A., Leite, A. L., Silva, T. L., Santos, L. D., Nogueira, F. C., Oliveira, R. C., . . . Buzalaf, M. A. (2009). Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. *Chemico-biological interactions*, 180(2), 305-311.
- Krishnamachari, K. (1986). Skeletal fluorosis in humans: a review of recent progress in the understanding of the disease. *Progress in food & nutrition science*, 10(3-4), 279-314.
- Kundu, H., Basavaraj, P., Singla, A., Gupta, R., Singh, K., & Jain, S. (2015). Effect of fluoride in drinking water on children's intelligence in high and low fluoride areas of Delhi. *Journal of Indian Association of Public Health Dentistry*, 13(2), 116.
- Lee, J.-H., Jung, J.-Y., Jeong, Y.-J., Park, J.-H., Yang, K.-H., Choi, N.-K., . . . Kim, W.-J. (2008). 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*, 243(3), 340-347.
- Levy, S. M., Broffitt, B., Marshall, T. A., Eichenberger-Gilmore, J. M., & Warren, J. J. (2010). Associations between fluorosis of permanent incisors and fluoride

intake from infant formula, other dietary sources and dentifrice during early childhood. *The Journal of the American Dental Association*, 141(10), 1190-1201.

- Levy, S. M., Warren, J. J., Davis, C. S., Kirchner, H. L., Kanellis, M. J., & Wefel, J. S. (2001). Patterns of fluoride intake from birth to 36 months. *Journal of public health dentistry*, 61(2), 70-77.
- Liu, G., Chai, C., & Cui, L. (2003). Fluoride causing abnormally elevated serum nitric oxide levels in chicks. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(3), 199-204.
- Liu, Y.-J., Gao, Q., Wu, C.-X., & Guan, Z.-Z. (2010). Alterations of nAChRs and ERK1/2 in the brains of rats with chronic fluorosis and their connections with the decreased capacity of learning and memory. *Toxicology letters*, 192(3), 324-329.
- Livingstone, D. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine pollution bulletin*, 42(8), 656-666.
- Luke, J. A. (1997). *The effect of fluoride on the physiology of the pineal gland*. University of Surrey,
- Luo, K., Liu, Y., & Li, H. (2012). Fluoride content and distribution pattern in groundwater of eastern Yunnan and western Guizhou, China. *Environmental geochemistry and health*, 34(1), 89-101.
- Lyaruu, D., Alberga, J., Kwee, N., Bervoets, T., Bronckers, A., & DenBesten, P. (2011). Fate of fluoride-induced subameloblastic cysts in developing hamster molar tooth germs. *Archives of oral biology*, 56(3), 238-243.
- Lyaruu, D., Bervoets, T., & Bronckers, A. (2006). Short exposure to high levels of fluoride induces stage-dependent structural changes in ameloblasts and enamel mineralization. *European journal of oral sciences*, 114, 111-115.
- Lyaruu, D. M., Bronckers, A. L., Santos, F., Mathias, R., & DenBesten, P. (2008). The effect of fluoride on enamel and dentin formation in the uremic rat incisor. *Pediatric nephrology*, 23(11), 1973.
- Maheshwari, R. (2006). Fluoride in drinking water and its removal. *Journal of Hazardous materials*, 137(1), 456-463.
- Mandinic, Z., Curcic, M., Antonijevic, B., Carevic, M., Mandic, J., Djukic-Cosic, D., & Lekic, C. P. (2010). Fluoride in drinking water and dental fluorosis. *Science of the total environment*, 408(17), 3507-3512.

- Martínez-Mier, E. A., Soto-Rojas, A. E., Ureña-Cirett, J. L., Stookey, G. K., & Dunipace, A. J. (2003). Fluoride intake from foods, beverages and dentifrice by children in Mexico. *Community dentistry and oral epidemiology*, 31(3), 221-230.
- Marya, C. M., Dhingra, S., Marya, V., & Ashokkumar, B. (2010). Relationship of dental caries at different concentrations of fluoride in endemic areas: an epidemiological study. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 35(1), 41-45.
- Mascarenhas, A. K. (2000). Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatric dentistry*, 22(4), 269-277.
- Mascarenhas, A. K., & Mashabi, S. (2008). High fluoride concentration in drinking water may increase the prevalence and severity of dental fluorosis, and decrease occurrence of caries. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, 8(1), 15-16.
- Mellberg, J. R., & Ripa, L. W. (1983). *Fluoride in preventive dentistry: theory and clinical applications*: Quintessence Pub Co.
- Mendoza-Schulz, A., Solano-Agama, C., Arreola-Mendoza, L., Reyes-Márquez, B., Barbier, O., Del Razo, L., & Mendoza-Garrido, M. (2009). The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells. *Toxicology letters*, 190(2), 179-186.
- Mittal, M., & Flora, S. (2006). Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice. *Chemico-biological interactions*, 162(2), 128-139.
- Mittal, M., & Flora, S. (2007). Vitamin E supplementation protects oxidative stress during arsenic and fluoride antagonism in male mice. *Drug and chemical toxicology*, 30(3), 263-281.
- Muir, D. C., Wagemann, R., Hargrave, B., Thomas, D. J., Peakall, D., & Norstrom, R. (1992). Arctic marine ecosystem contamination. *Science of the total environment*, 122(1-2), 75-134.
- Murray, J. J., & Naylor, M. (1996). Fluorides and dental caries. *The prevention of oral disease*, 3, 32-67.
- Ogilvie, A. L. (1953). Histologic findings in the kidney, liver, pancreas, adrenal, and thyroid glands of the rat following sodium fluoride administration. *Journal of dental research*, 32(3), 386-397.
- Organization, W. H. (1994). Fluorides and oral health: report of a WHO Expert Committee on Oral Health Status and Fluoride Use [meeting held in Geneva from 22 to 28 November 1993].

- Organization, W. H. (2004). *Guidelines for drinking-water quality* (Vol. 1): World Health Organization.
- Oruc, N. (2008). Occurrence and problems of high fluoride waters in Turkey: an overview. *Environmental geochemistry and health*, 30(4), 315-323.
- Oruç, N. (2005). Türkiye’de yüksek düzeyde fluorür içeren kaynak suları ve sağlık açısından önemi. *I. Tıbbi Jeoloji Sempozyumu, 1-3 Aralık, Ankara*, 48-51.
- Parnell, C., Whelton, H., & O’Mullane, D. (2009). Water fluoridation. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 10(3), 141-148.
- Patel, P., & Chinoy, N. (1998). Influence of fluoride on biological free radical reactions in ovary of mice and its reversal. *Fluoride*, 31, S27-S27.
- Pessan, J. P., Silva, S. M. B. d., & Buzalaf, M. A. R. (2003). Evaluation of the total fluoride intake of 4-7-year-old children from diet and dentifrice. *Journal of Applied Oral Science*, 11(2), 150-156.
- Peters, D., & Miethchen, R. (1996). Symptoms and treatment of hydrogen fluoride injuries. *Journal of fluorine chemistry*, 79(2), 161-165.
- Rabinowitch, H. D., & Fridovich, I. (1983). Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants. *Photochemistry and Photobiology*, 37(6), 679-690.
- Reddy, P. Y., Reddy, K. P., & Kumar, K. P. (2011). Neurodegenerative changes in different regions of brain, spinal cord and sciatic nerve of rats treated with sodium fluoride. *Journal of Medical & Allied Sciences*, 1(1), 30.
- Richter, H., Kierdorf, U., Richards, A., Melcher, F., & Kierdorf, H. (2011). Fluoride concentration in dentine as a biomarker of fluoride intake in European roe deer (*Capreolus capreolus*)—An electron-microprobe study. *Archives of oral biology*, 56(8), 785-792.
- Ripa, J. R. M. L. W., & Leske, G. S. (1985). *Fluoride In Preventive Dentistry: Theory And Clinical Applications*.
- Robinson, C., Connell, S., Kirkham, J., Brookes, S., Shore, R., & Smith, A. (2004). The effect of fluoride on the developing tooth. *Caries Research*, 38(3), 268-276.
- Rugg-Gunn, A. J., Villa, A. E., & Buzalaf, M. R. A. (2011). Contemporary biological markers of exposure to fluoride. In *Fluoride and the oral environment* (Vol. 22, pp. 37-51): Karger Publishers.

- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *The Lancet*, 369(9555), 51-59.
- Shanthakumari, D., Srinivasalu, S., & Subramanian, S. (2004). Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats. *Toxicology*, 204(2-3), 219-228.
- Sharma, R., Tsuchiya, M., Skobe, Z., Tannous, B. A., & Bartlett, J. D. (2010). The acid test of fluoride: how pH modulates toxicity. *PloS one*, 5(5), e10895.
- Shashi, A., & Thapar, S. (2001). Histopathology of fluoride-induced hepatotoxicity in rabbits. *Fluoride*, 34(1), 34-42.
- Shivarajashankara, Y., Shivashankara, A., Bhat, P. G., Rao, S. M., & Rao, S. H. (2002). Histological changes in the brain of young fluoride-intoxicated rats. *Fluoride*, 35(1), 12-21.
- Shivarajashankara, Y., Shivashankara, A., Rao, S. H., & Bhat, P. G. (2001). Oxidative stress in children with endemic skeletal fluorosis. *Fluoride*, 34(2), 103-107.
- Surh, Y.-J. (2005). *Oxidative stress, inflammation, and health*: CRC press.
- Susheela, A., Kumar, A., Bhatnagar, M., & Bahadur, R. (1993). Prevalence of endemic fluorosis with gastrointestinal manifestations in people living in some north-Indian villages. *Fluoride*, 26(2), 97-104.
- ŞİRELİ, M., & Bülbül, A. (2004). The effect of acute fluoride poisoning on nitric oxide and methemoglobin formation in the Guinea pig. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(3), 591-595.
- Tamer, M. N., Köroğlu, B. K., Arslan, Ç., Akdoğan, M., Köroğlu, M., Çam, H., & Yildiz, M. (2007). Osteosclerosis due to endemic fluorosis. *Science of the total environment*, 373(1), 43-48.
- Tanimoto, K., Le, T., Zhu, L., Chen, J., Featherstone, J., Li, W., & DenBesten, P. (2008). Effects of fluoride on the interactions between amelogenin and apatite crystals. *Journal of dental research*, 87(1), 39-44.
- Tao, X., Xu, Z. R., & Wang, Y. Z. (2006). Effects of dietary fluoride levels on growth, serum indexes and antioxidant systems in growing pigs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30(1), 65-70.
- Tekle-Haimanot, R., Melaku, Z., Kloos, H., Reimann, C., Fantaye, W., Zerihun, L., & Bjorvatn, K. (2006). The geographic distribution of fluoride in surface and groundwater in Ethiopia with an emphasis on the Rift Valley. *Science of the total environment*, 367(1), 182-190.

- Varner, J. A., Jensen, K. F., Horvath, W., & Isaacson, R. L. (1998). Chronic administration of aluminum–fluoride or sodium–fluoride to rats in drinking water: alterations in neuronal and cerebrovascular integrity. *Brain research*, 784(1-2), 284-298.
- Varol, E., & Varol, S. (2010). Çevresel bir hastalık olarak florozis ve insan sağlığı üzerine etkisi. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 9(3), 233-238.
- Varol, S., Davraz, A., & Varol, E. (2008). Yeraltı suyu kimyası ve sağlığa etkisinin tıbbi jeoloji açısından değerlendirilmesi. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 7(4), 351-356.
- Venkateswarlu, P. (1990). Evaluation of analytical methods for fluorine in biological and related materials. *Journal of dental research*, 69(2_suppl), 514-521.
- Vieira, A., Hanocock, R., Eggertsson, H., Everett, E., & Grynepas, M. (2005). Tooth Quality in Dental Fluorosis. *Calcified tissue international*, 76(1), 17-25.
- Viswanathan, G., Jaswanth, A., & Gopalakrishnan, S. (2009). Mapping of fluoride endemic areas and assessment of fluoride exposure. *Science of the total environment*, 407(5), 1579-1587.
- Wang, A., Chu, Q., He, W., Xia, T., Liu, J., Zhang, M., . . . Yang, K. (2005). Effects on protein and mRNA expression levels of p53 induced by fluoride in human embryonic hepatocytes. *Toxicology letters*, 158(2), 158-163.
- Wang, B., Zheng, B., Zhai, C., Yu, G., & Liu, X. (2004). Relationship between fluorine in drinking water and dental health of residents in some large cities in China. *Environment international*, 30(8), 1067-1073.
- Wang, H., Yang, Z., Zhou, B., Gao, H., Yan, X., & Wang, J. (2009). Fluoride-induced thyroid dysfunction in rats: roles of dietary protein and calcium level. *Toxicology and industrial health*, 25(1), 49-57.
- Warren, J. J., Levy, S. M., Broffitt, B., Cavanaugh, J. E., Kanellis, M. J., & Weber-Gasparoni, K. (2009). Considerations on optimal fluoride intake using dental fluorosis and dental caries outcomes—a longitudinal study. *Journal of public health dentistry*, 69(2), 111-115.
- Whitford, G., Bawden, J., Bowen, W., Brown, L., Ciardi, J., & Clarkson, T. (1994). PB Imrey, M. Kleerekoper, TM Marthaler, S. McGuire, RH Ophaug. C. Robinson. JS Schultz, GK Stookey, MS Tochman. P. Venkateswarlu. DT Zero. Report for Working Group I: strategies for improving the assessment of fluoride accumulation in body fluids and tissues. *Adv. Dent. Res*, 8, 113-115.
- Whitford, G. M. (1990). The physiological and toxicological characteristics of fluoride. *Journal of dental research*, 69(2_suppl), 539-549.

- Whitford, G. M. (1992). Acute and chronic fluoride toxicity. *Journal of dental research*, 71(5), 1249-1254.
- Whitford, G. M. (1994). Intake and metabolism of fluoride. *Advances in Dental Research*, 8(1), 5-14.
- Whitford, G. M., & Ekstrand, J. (1990). Summary of Session I: Metabolism of fluoride. *Journal of dental research*, 69(2_suppl), 513-513.
- Whitford, G. M., Pashley, D. H., & Garman, R. H. (1997). Effects of fluoride on structure and function of canine gastric mucosa. *Digestive diseases and sciences*, 42(10), 2146-2155.
- Wilk-Blaszczak, M. A., French, A. S., & Man, S. P. (1992). Halide permeation through 10 pS and 20 pS anion channels in human airway epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1104(1), 160-166.
- Wong, M. H., Fung, K., & Carr, H. (2003). Aluminium and fluoride contents of tea, with emphasis on brick tea and their health implications. *Toxicology letters*, 137(1-2), 111-120.
- Xiang, Q., Liang, Y., Chen, L., Wang, C., Chen, B., Chen, X., & Zhou, M. EFFECT OF FLUORIDE IN DRINKING WATER ON CHILDREN'S INTELLIGENCE.
- Xu, H., Zhou, Y.-l., Zhang, X.-y., Lu, P., & Li, G.-s. (2010). Activation of PERK signaling through fluoride-mediated endoplasmic reticulum stress in OS732 cells. *Toxicology*, 277(1-3), 1-5.
- Yan, Q., Zhang, Y., Li, W., & Denbesten, P. (2007). Micromolar fluoride alters ameloblast lineage cells in vitro. *Journal of dental research*, 86(4), 336-340.
- Yi, J., & Cao, J. (2008). Tea and fluorosis. *Journal of fluorine chemistry*, 129(2), 76-81.
- Zhan, X.-a., Xu, Z.-r., Li, J.-x., & Wang, M. (2005). Effects of fluorosis on lipid peroxidation and antioxidant systems in young pigs. *Fluoride*, 38(2), 157-161.
- Zhang, M., Wang, A., He, W., He, P., Xu, B., Xia, T., . . . Yang, K. (2007). Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons. *Toxicology*, 236(3), 208-216.
- Zhang, M., Wang, A., Xia, T., & He, P. (2008). Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF- κ B in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicology letters*, 179(1), 1-5.

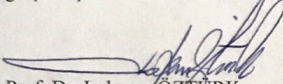
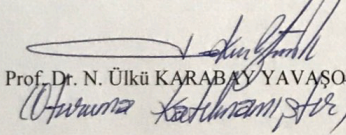
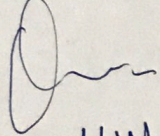
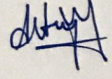
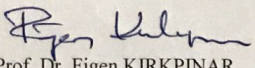
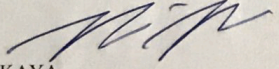

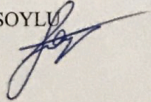
Zhang, Y., Yan, Q., Li, W., & DenBesten, P. K. (2006). Fluoride down-regulates the expression of matrix metalloproteinase-20 in human fetal tooth ameloblast-lineage cells in vitro. *European journal of oral sciences*, 114, 105-110.

Zohouri, F., & Rugg-Gunn, A. J. (2000). Total fluoride intake and urinary excretion in 4-year-old Iranian children residing in low-fluoride areas. *British Journal of Nutrition*, 83(1), 15-25.



8. Ekler

8.1 Ek-1: Etik Kurul Onay Belgesi

EGE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU	
SAYI: 2018-012 KONU: Onay	27.08.2019
Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda "SUBKRONİK SODYUM FLORÜR TOKSİSİTESİNİN RATLARDA HİSTOPATOLOJİK DOKU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ, ASETİLKOLİN ESTERAZ, SÜPEROKSİT DİSMUTAZ VE KATALAZ ENZİM AKTİVİTELERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ" isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.	
Yürütücü: Prof. Dr. Ali Rıza ALPÖZ, EÜ Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti AD Dr. İnci AKYILDIZ, EÜ Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti AD Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU, EÜ Fen Fak. Biyoloji Böl. Doç. Dr. Yeşim ERTAN, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD.	
Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.	
 Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK (E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)	
 Prof. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU (Araştırma Katılmamıştır)	Prof. Dr. Aytül ÖNAL 
Prof. Dr. Hüseyin TEZEL KATILMADI	Prof. Dr. Altuğ YAVAŞOĞLU 
Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN KATILMADI	Prof. Dr. Figen KIRKPINAR 
Prof. Dr. Uğur KAYA 	Dr. Öğr. Üyesi Sumru SÖZER KARADAĞLI 
Öğr. Gör. Dr. M. Ayberk OKTAY KATILMADI	Vet. Hek. F. Emrah SOYLU 
Özcan NALBANTOĞLU KATILMADI	

Teşekkür

Çalışma süresince enzim testlerimin yürütülmesinde gece gündüz demeden tüm içtenlikleri ile bana yardımcı olan Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü asistanları Cem GÜLER'e ve Ceyda ALDAĞ'a

Başta Dr. Dt. Ece TURAN, Dr. Dt. Hazal Ezgi GERİHAN, Dt. Merve ÇITAK, Dt. Alp Abidin ATEŞÇİ, Dt. Burç PEKPINARLI, Dt. İrem ÇÖTERT ve Dt. Elif Ezgi KAYA olmak üzere tüm canım arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, Eylül 2019

İnci AKYILDIZ

Özgeçmiş

12.04.1991 tarihinde İzmir’de doğdum. İlköğrenimimi Salih İşgören İlköğretim Okulu’nda okudum. Lise öğrenimimi Bornova Anadolu Lisesi’nde tamamladıktan sonra 2010’da Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’ni kazandım. 2015 yılında mezun olduktan sonra Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’ne bağlı olarak Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı’nda doktora programına başladım.

İletişim: inciakyildizz@gmail.com