

T.C
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RENAL VE OSTEOLAST HÜCRE HATLARINDA SODYUM
FLORÜR (NaF) UYGULAMASI, BAZI MİNERALLERİN
APOPTOZİS VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Veteriner Hekim Sedat ÇETİN
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Fatmagül YUR

İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR

VAN-2017

T.C
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RENAL VE OSTEOLAST HÜCRE HATLARINDA SODYUM
FLORÜR (NaF) UYGULAMASI, BAZI MİNERALLERİN
APOPTOZİS VE DNA HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Veteriner Hekim Sedat ÇETİN
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Fatmagül YUR

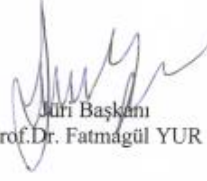
İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR


Bu araştırma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı
tarafından 2015-SBE-D200 nolu proje olarak desteklenmiştir.

T.C
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RENAL ve OSTEOLAST HÜCRE HATLARINDA SODYUM
FLORÜR (NaF) UYGULAMASI, BAZI MİNERALLERİN
APOPTOZİS ve DNA HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Veteriner Hekim Sedat ÇETİN
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ


Jüri Başkanı
Prof. Dr. Fatmagül YUR


Üye
Prof. Dr. Semiha DEDE


Üye
Doç. Dr. Tahir KAHRAMAN


Üye
Doç. Dr. Mehmet TASPINAR


Üye
Yrd. Doç. Dr. Serkan YILDIRIM

TEZ KABUL TARİHİ

10/02/2017

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sırasında yoğun çalıőmalarına rağmen maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, özveriyle her konuda bana destek olan danışman hocam Prof. Dr. Fatmagül YUR'a, ikinci danışman hocam Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR'a bilimsel desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyelerine, tezimin laboratuvar çalışmasında desteklerini esirgemeyen Öğr. Gör. Veysel YÜKSEK'e, çalıőmalarına katkısından dolayı Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ufuk KÖMÜROĞLU'na, ve tezimin istatistiklerini yapan Prof. Dr. Semiha DEDE'ye, teşekkür ederim. Yaőamımın her aşamasında beni destekleyen, ilgisi ve hoőgörüsü için değerli eőim Menekőe ÇETİN'e, ve sevgi kaynağım oğlum Ahmet Berkant etin'e sonsuz teşekkür ederim. Ayrıca bu araştırmanın gerçekleşmesi için maddi destek sağlayan, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY BELGESİ	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
TABLolar LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİLLER LİSTESİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Flor (F) Elementinin Genel Özellikleri.....	2
2.2. Flor Kaynakları	2
2.3. Florür Metabolizması.....	3
2.4. Florürün Organizmada Birikimi ve Atılması.....	4
2.5. Florun Dokulara ve Hürelere Etkisi	5
2.5.1. Florun kemik dokusuna etkisi (iskelet florozi)	5
2.5.2. Florun böbrek dokusuna etkisi.....	7
2.5.3. Florun hürelere etkisi	8
2.6. Florozis	9
2.6.1. Akut florozi	9
2.6.2. Kronik florozi	10
2.6.3. Florozisin radyolojik bulguları	11
2.6.4. Floroziste ayırıcı tanı	11
2.7. Floroziste Tedavi ve Korunma	11
2.8. Floroziste Mineral Madde Metabolizması.....	12
2.8.1. Selenyum	12
2.8.2. Magnezyum	14
2.8.3. Alüminyum	15
2.8.4. Kalsiyum.....	16
2.9. DNA Hasarı ve Nedenleri.....	17
2.9.1. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG).....	18
2.9.2. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin oluşumunun nedeni ve klinik önemi	18
2.10. Oksidatif Stres.....	19

2.10.1. Oksidatif stres ve florür ilişkisi.....	19
2.11. Apoptozis	20
2.11.1. Apoptozis ve flor ilişkisi.....	21
2.11.2. Kaspazlar	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Gereçler.....	24
3.1.1. Kullanılan hücre serileri.....	24
3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler	25
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler	28
3.2.Yöntem.....	31
3.2.1. NaF ve mineral solüsyonlarının hazırlanması	31
3.2.2. Hücre kültürü	32
3.2.3.Hücre pasajlama.....	32
3.2.4.Sitotoksisite (MTT hücre canlılık) testi	33
3.2.5.Biyokimyasal analizler için doz gruplarının hazırlanması	34
3.2.6. Biyokimyasal analiz için numunelerin hazırlanması	36
3.2.7. Biyokimyasal analizler	36
3.2.8.RNA izolasyonu.....	42
3.2.9. Komplementer DNA (cDNA) izolasyonu	44
3.2.10. Real time-PCR	45
3.3. İstatistik Analiz	45
4. BULGULAR.....	47
4.1. Sitotoksisite Analizi ve Hücre Görüntüleri.....	47
4.2. ELISA Sonuçları.....	57
4.3. Real Time-PCR Sonuçları	64
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	69
ÖZET	80
SUMMARY	81
KAYNAKLAR	82
ÖZGEÇMİŞ	93
EK-1 ETİK KURUL ONAY BELGESİ.....	94
EK-2 TEZ ORJİNALLİK RAPORU	95

SİMGELER VE KISALTMALAR

F	: Flor
NaF	: Sodyum florür
8-OHdG	: 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin
Bad	: Bcl-2-bağlantılı ölüm promatör
Bax	: Bcl-2-bağlantılı X proteini
Bcl-2	: B-hücre lenfoma gen-2
BMP-2	: Kemik morfogenetik protein-2
BMP-3	: Kemik morfogenetik protein-3
Mg	: Magnezyum
Se	: Selenyum
Al	: Aluminyum
Ca	: Kalsiyum
cDNA	: Komplementer deosiribonükleik asit
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
Zn	: Çinko
CO ₂	: Karbondioksit
DEPC	: Dietil pirokarbonat
DMEM	: Dulbeko modifiye edilmiş medyum
DMSO	: Dimetil sülfoksit
pH	: Hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
AlCl ₃	: Aluminyum klorür
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
FBS	: Fetal bovin serum
RT-PCR	: Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonları
Na ₂ SeO ₃	: Sodyum selenit
SeMet	: Seleno methiyonin
HF	: Hidrojen florür
Al-F	: Aluminyum florür
ERS	: Endoplazmik retikulum stres

hFOB 1.19	: İnsan osteoblast hücre hattı
c-AMP	: Siklik adenzin monofosfat
PTH	: Paratiroid hormon
IU/L	: İnternasyonel ünite/litre
AIDS	: Edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu
MAPK	: Mitojenle uyarılmış protein kinaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
ATPaz	: Adenzin tri fosfataz
TBE	: Tris borik EDTA çözeltisi
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör alfa
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
WHO	: Dünya sağlık örgütü
NRK-52E	: Sıçan böbrek epitelyal hücre hattı
OD	: Optik dansite
p53	: DNA tamir proteini
DNA	: Deosiribonükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
Ca ⁺² -ATPaz	: Kalsiyum-adenzin tri fosfataz
Na-K-ATP	: Sodyum-Potasyum adenzin tri fosfat
ppm	: Milyonda bir
kg	: Kilogram
g	: Gram
nm	: Nanometre
mg/kg	: Miligram/kilogram
mg/l	: Miligram/litre
mg	: Miligram
rpm	: Dakika başına dönüş
μ mol/l	: Mikromol/litre
μ g/ml	: Mikrogram/mililitre
μ M	: Mikromolar

TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. NRK-52E hücre hattının genel özellikleri.....	24
Tablo 2. hFOB 1.19 hücre hattının genel özellikleri.....	25
Tablo 3. Ekspresyon analizinde kullanılan primerler	31
Tablo 4. Renal hücreler için uygulanan doz gruplarının miktarları.....	35
Tablo 5. Osteoblast hücreler için uygulanan doz gruplarının miktarları.....	35
Tablo 6. Real time PCR için reaksiyon içeriği.....	45
Tablo 7. NRK-52E hücre hattında MTT % canlılık sonuçları.....	50
Tablo 8. hFOB 1.19 hücre hattında MTT % canlılık sonuçları.....	53
Tablo 9. NRK-52E hücre hattına ait ELISA sonuçları	57
Tablo 10. NRK-52E hücre hattındaki parametreler arasındaki korelasyon.....	57
Tablo 11. hFOB 1.19 hücre hattına ait ELISA sonuçları.....	60
Tablo 12. hFOB 1.19 hücre hattında parametreler arasındaki korelasyon.....	59
Tablo 13. Real time PCR sonuçlarına göre NRK-52E hücre hattına ait ekspresyonlar...	64
Tablo 14. Real time PCR sonuçlarına göre hFOB 1.19 hücre hattına ait ekspresyonlar..	66

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Florun absorpsiyonu, dağılımı ve vücuttan atılması .	5
Şekil 2. Manda, buzağı ve koyunlarda dental ve iskelet florozis olgusu	6
Şekil 3. İnek ve mandada kronik dental florozisi	11
Şekil 4. NRK-52E hücre hattına ait kaspaz-3 standart grafiği	37
Şekil 5. hFOB 1.19 hücre hattına ait kaspaz-3 standart grafiği	37
Şekil 6. NRK-52E hücre hattına ait kaspaz-8 standart grafiği	38
Şekil 7. hFOB 1.19 hücre hattına ait kaspaz-8 standart grafiği	38
Şekil 8. NRK-52E hücre hattına ait kaspaz-9 standart grafiği	39
Şekil 9. hFOB 1.19 hücre hattına ait kaspaz-9 standart grafiği	40
Şekil 10. NRK-52E hücre hattına ait M30 standart grafiği	41
Şekil 11. hFOB 1.19 hücre hattına ait M30 standart grafiği	41
Şekil 12. NRK-52E hücre hattına ait 8-OHdG standart grafiği	42
Şekil 13. hFOB 1.19 hücre hattına ait 8-OHdG standart grafiği	42
Şekil 14. Farklı örneklere ait total RNA eldesine ait 3 adet agaroz jel görüntüsü	44
Şekil 15. NRK-52E hücre hattında çalışma gruplarına ait örnek görüntüler	48
Şekil 16. Osteoblast hücre hattında çalışma gruplarına ait örnek görüntüler	49
Şekil 17. NRK-52E hücre hattına ait NaF, NaF+100 µM MgCl ₂ MTT grafiği	50
Şekil 18. NRK-52E hücre hattına ait NaF, NaF+0,005 µM Na ₂ SeO ₃ MTT grafiği	51
Şekil 19. NRK-52E hücre hattına ait NaF, NaF+50 µM AlCl ₃ MTT grafiği	52
Şekil 20. NRK-52E hücre hattına ait NaF, NaF+500 µM CaCl ₂ MTT grafiği	52
Şekil 21. hFOB 1.19 hücre hattına ait NaF, NaF+100 µM MgCl ₂ MTT grafiği	54
Şekil 22. hFOB 1.19 hücre hattına ait NaF, NaF+0,005µM Na ₂ SeO ₃ MTT grafiği	54
Şekil 23. hFOB 1.19 hücre hattına ait NaF, NaF+50 µM AlCl ₃ MTT grafiği	55
Şekil 24. hFOB 1.19 hücre hattına ait NaF, NaF+500 µM CaCl ₂ MTT grafiği	56
Şekil 25. NRK-52E hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre M30 grafiği	58
Şekil 26. NRK-52E hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre kaspaz-9 grafiği	58
Şekil 27. NRK-52E hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre kaspaz-8 grafiği	59
Şekil 28. NRK-52E hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre kaspaz-3 grafiği	59
Şekil 29. NRK-52E hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre 8-OHdG grafiği	60

Şekil 30. hFOB 1.19 hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre M30 grafiği.	61
Şekil 31. hFOB 1.19 hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre kaspaz-9 grafiği.	62
Şekil 32. hFOB 1.19 hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre kaspaz-8 grafiği.	62
Şekil 33. hFOB 1.19 hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre kaspaz-3 grafiği.	63
Şekil 34. hFOB 1.19 hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre 8-OHdG grafiği.	63
Şekil 35. NRK -52E hücre hattına ait kaspaz-9 ekspresyon grafiği.	64
Şekil 36. NRK -52E hücre hattına ait kaspaz-8 ekspresyon grafiği.	65
Şekil 37. NRK-52E hücre hattına ait kaspaz -3 ekspresyon grafiği.	65
Şekil 38. hFOB 1.19 hücre hattına ait kaspaz -9 ekspresyon grafiği.	66
Şekil 39. hFOB 1.19 hücre hattına ait kaspaz -8 ekspresyon grafiği.	67
Şekil 40. hFOB 1.19 hücre hattına ait kaspaz-3 ekspresyon grafiği.	67

1. GİRİŞ

Mineral maddeler, normal metabolizma ve yaşamsal faaliyetlerin sürdürülmesi için insan ve hayvan vücudunda bulunması gereken inorganik maddelerdir. Mineraller birçok önemli enzim fonksiyonunu düzenlenmesinde, biyolojik aktivatörler ve inhibitörler olarak hareket ederler. Bağlanma sahaları için proteinler ve diğer bileşiklerle rekabet ederler, biyolojik sistemlerde membran geçirgenliğini etkileyerek birçok mekanizma aracılığıyla sağlık ve beslenme açısından önemli bir rol oynamaktadır. Vücudumuzun enerji üretebilmesi, büyüme gelişmesi ve düzenli çalışması için gerekli olan maddelerdir. Mineral maddelerin eksikliği veya fazlalık durumları ciddi klinik bozukluklara ve ekonomik kayıplara neden olurlar (Güngör, 2003; Sözbilir ve Bayşu, 2008).

Flor, insanlar için düşük dozlarda diş çürüğünü önleyen ve vücut için gerekli bir eser elementtir (Heller ve ark., 1997). Fakat uzun bir süre ve aşırı miktarda florür alımı ciddi sağlık problemlerine neden olabilir ve günlük alımı 20 mg aşarsa florozis zehirlenmesi meydana gelebilir. Florozis, tüm kıtalara yayılmış ve milyonlarca insanı etkileyen ciddi bir küresel hastalık olarak kabul edilmektedir. Florozis hastalığı dişlerde lekelerin oluşması, iskeletsel belirtiler olarak tanımlanabilir (Grynpras, 1990; Mousny ve ark., 2008).

Türkiye’de özellikle, Van ve Ağrı iline bağlı ilçelerde florozis yaygın şekilde görülmektedir. Endemik florozis insan ve hayvan sağlığını önemli ölçüde tehdit etmekte ve çoğu kez sağlık sorunlarının yanı sıra özellikle hayvanlarda önemli verim düşüklüğü ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Şendil ve Bayşu, 1974; Ergun ve ark., 1987; Altıntaş ve ark., 2000).

Yurdumuzda florozis konusunda *in vitro* çalışmaları mevcut değildir. Bu çalışmada, flor metabolizmasında yer alan ve toksikasyondan en fazla etkilenen renal ve osteoblast hücre hatlarında NaF uygulamasında, oluşması muhtemel hücre hasarı ve bu mekanizmaların önlenmesinde, bazı minerallerin rollerinin araştırılması amacıyla planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Flor (F) Elementinin Genel Özellikleri

Flor halojenler arasında en hafif, elektronegatifliği en yüksek, kimyasal olarak en aktif, organik ve inorganik maddelerle hemen birleşebilen bir iz elementtir (Sözbilir ve Bayşu, 2008). Flor elementinin atom numarası 9 olup, F harfi ile sembolize edilen periyodik cetvelde VII A grubunda bulunan halojenler grubunun ilk elementidir. Atom ağırlığı 18.99, moleküler ağırlığı 38, donma sıcaklığı -219.6°C , kaynama sıcaklığı $+188.14^{\circ}\text{C}$ 'dir. Dış yörüngesinde 7 elektronu olduğu için oktetini 8'e tamamlama eylimindedir ve daima bir elektron almaya meyillidir. Bu özellik flor elementine yüksek elektronegatiflik özelliği kazandırmaktadır (Uslu, 1982; Atabey, 2005).

Flor, elektronegatifliği yüksek olduğu için doğada serbest halde bulunmaz ve diğer elementlerle çabuk reaksiyona girerek genelde birleşik tuz halinde bulunurlar. Flor elementinin diğer elementlerle yaptıkları tuzlar "Florid" olarak tanımlanmaktadır. Bu tuzlar sodyum florür (NaF), kalsiyum florür (CaF_2), floroapait ($\text{CaF}_2\cdot 3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), Kriyolit (NaAlF_6)'dir (Küçükeşmen ve Sönmez, 2008). Flor sarı renkte, keskin kokulu sıvı ve gaz halinde bulunmaktadır. Elektronegatif bir element olduğu için yalnız bakır veya platin kaplar içinde muhafaza edilebilmektedir (Ulusoy ve Breusch, 1981).

Flor bir enzim inhibitörüdür. Fosfodiesteraz, enolaz, fosfoglukomutaz, piruvat kinaz, kolinesteraz gibi enzimleri inhibe eder. İntermedier karbonhidrat metabolizmasını magnezyum-florid-fosfat kompleksi oluşturarak, sitrat metabolizmasını ve c-AMP yoluyla da oksidatif fosforilasyonu inhibe eder (Sözbilir ve Bayşu, 2008).

2.2. Flor Kaynakları

Temel florür kaynakları, gıda ürünlerindeki doğal florür ile sudaki florürü kapsamaktadır. Buna örnek olarak florürlü su (genellikle 1 mg/l), florürlü destek ürünleri (florür tabletleri gibi), florürlü diş macunları (ortalama 1000 mg/kg) ve profesyonel olarak uygulanan florür jeli (ortalama 5000 mg/kg) verilebilir. İnsanlar için ana florür kaynağı, jeolojik kaynaklar tarafından kirletilmiş zemin suyudur (maksimum konsantrasyonlar 30-50 mg/l civarına kadar ulaşır). Florür kirliliğinin düzeyi, kayaların doğası ve florür barındıran zemin suyuna maruz kalma seviyesine bağlıdır. Sudaki

florür konsantrasyonları florür çözünürlüğü ile kısıtlıdır, bu nedenle çözünür kalsiyum yokluğunda yüksek florür çözünürlüğü, florür barındıran minerallerin olduğu zemin suyu bölgelerinde beklenebilir (Edmunds ve Smedley, 1996).

Temel florür kaynakları dışında gıda maddelerinde (en çok çay ve balıkta), atmosferde, volkanik bölgelerde özellikle pH'ı yüksek oranda bulunan yeraltı su kaynaklarında yüksek oranda floroid bulunmaktadır. Toplam insan vücudunda 2-3 g flor bulunmaktadır. Ayrıca gübre, çimento, petro-kimya, alüminyum, demir çelik gibi sanayi kollarında faaliyet gösteren fabrikalar, atmosferde bulunan flor miktarını artırarak ciddi sağlık sorunlarına yol açmaktadır (Susheela, 2001; Dabrowska ve ark., 2005).

2.3. Florür Metabolizması

Ağız yoluyla alınan florür hem midede hem de bağırsak mukozasında emilebilir. Flor mideye ulaştığı zaman düşük pH'da yüksek oranda yayılabilen hidrojen flor (HF)'un oluşumunu desteklediği için midede emilim çok hızlı gerçekleşir (Whitford ve Pashley, 1984). Bu yüzden yüksek gastrit asitlik durumları florür emilimini desteklerken alkalilik durumu florür emilimini düşürür (Whitford, 1996).

Florür, HF'nin iyonik olmayan difüzyonları aracılığıyla öncelikle biyolojik zar aracılığıyla hareket eder. HF'nin sudaki geçirgenlik katsayısı ile aynı oranda yüksek geçirgen bir madde olduğunu göstermektedir. HF'nin küçük nötr molekülü, hücre zarlarından, ayrışık florür iyonuna göre çok daha hızlı geçmektedir ve bu da daha belirgin bir hücre içi geçişe yol açmaktadır. Sindirilen florürün ortalama %45'i bağırsakta emilir ve bağırsaktaki florür emilimi taşıyıcılar aracılığıyla sağlanabildiği gibi pH'a da daha az duyarlı olur (örn. Kolaylaştırılmış difüzyon). Florür aç halinde alındığı zaman florür emilimin etkinliği %100 iken yiyecek mevcudiyeti ile florür emilimini %50-80 oranına düşürmektedir (Whitford ve ark., 1994). Sindirilen florür miktarıyla ilgili olarak, florür ile çözülmeyen kompleks biçimindeki yüksek katyon konsantrasyonları (örn. kalsiyum, magnezyum ve alüminyum), bağırsaktaki florür emilimini önemli ölçüde azaltır ve hipokalsemiye neden olarak magnezyum ve manganze bağımlı enzimlerin durdurulmasına neden olur (Whitford ve ark., 1997).

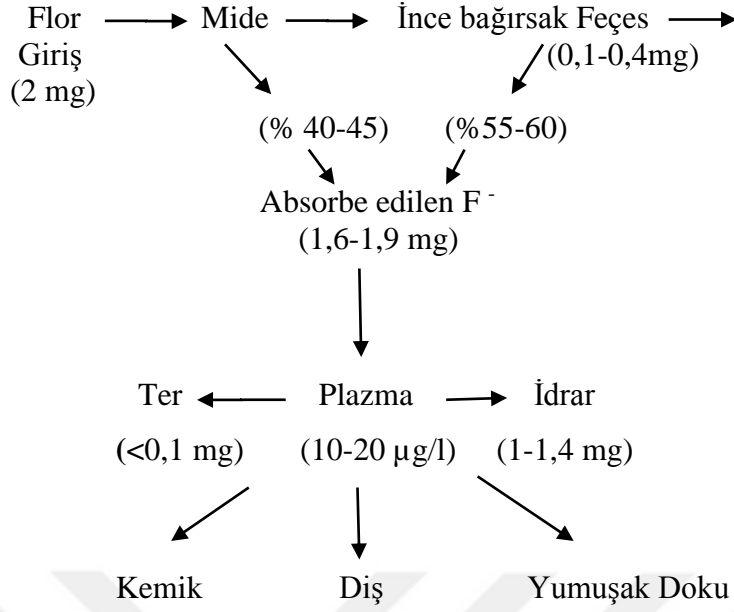
Florür, hücre zarından geçirgenliği arttırmak için kalsiyum iyonosferleri oluşturacak şekilde kalsiyum ile birleşir (Şireli ve Bulbul, 2004). Florürün etkisi hücre

dışı kalsiyuma bağılıdır ve kanal etkinliğinin güçlü bir şekilde arttırılmasının dış kalsiyuma bağılı olduğunu gösterecek şekilde bir kalsiyum-kanal engelleyicisinin kombinasyonu ile durdurulabilir. Florür bir kez kana karıştığında, kemik ve dişler gibi kalsiyum bakımından en zengin bölgelere en yüksek miktarlarda olacak şekilde vücuda yayılır. Bebeklerde emilen florürün %80-90'ı muhafaza edilir, fakat yetişkinlerde bu rakam %60 civarına kadar düşer (ATSDR, 2003).

2.4. Florürün Organizmada Birikimi ve Atılması

Flor iyonlarının asıl depolanma yeri kalsiyum iyonuna bağılı yüksek ilgisinden dolayı büyük bir kısmı iskelet sisteminde olmaktadır. Burada biriken flor iyonu hidroksil grubu ile birleşerek ‘‘hidroksifloroapatit’’ şeklinde kemik dokusuna yerleşir (Küçükeşmen ve Sönmez, 2008).

Normal koşullar altında, toplam florür atılımının %90'ı böbrek ve daha sonra idrar yoluyla gerçekleşir (Maheshwari ve ark., 1981). Normal olmayan koşullar dışında ter yoluyla florür kaybının ihmal edilebilir düzeyde olduğu düşünülmektedir (Cerklewski, 1997). Florürün böbreklerde temizlenmesi glomerüler filtrasyon hızı ile doğrusaldır ve filtrelenen florürün %60'ı tekrar emilir (Schiffel ve Binswanger, 1982; Spak ve ark., 1985). Florür tasfiyesi çocuklarda yetişkinlere göre daha düşüktür ve bu da kemikler ve dişlerin hızla büyüdüğü dönemde daha fazla florür tutulmasını sağlar. Kemik büyümesinin sona ermesi idrarla atılan florür oranındaki artışla ilişkilendirilmiştir. Florürün yeniden emiliminin böbrek tübüler sıvısı pH derecesiyle ters orantılı olduğu gösterilmiştir (Whitford, 1996). Bu yüzden asidoz, yüksek oranda yayılabilen hidrojen florür oluşumu yoluyla florür tutulumunu artırırken alkaloz florür tekrar emilimini düşürerek idrar yoluyla florür atılımını yükseltecektir. Fakat, normal bir bireyde bu pH bağımlı olguların önemi tartışmalıdır, çünkü idrarın hafif asidik pH'da florürün %1'inden azı hidrojen florür olarak bulunacaktır (Ekstrand ve ark., 1978; Schiffel ve Binswanger, 1982).



Şekil 1. Florun absorpsiyonu, dağılımı ve vücuttan atılması (Cerklewski, 1997).

2.5. Florun Dokulara ve Hücrelere Etkisi

2.5.1. Florun kemik dokusuna etkisi (iskelet florozi)

Kemik dokusu florun en önemli depolanma yeri olduğu için faydalı ve zararlı etkileri burada gözlenmektedir. Flor iyonları kemikte birikerek kemiğin mineral yapısını bozarak mineral ve kemik matriks proteinlerin bağlanmasını etkilemektedir (Chachra ve ark., 1999).

Uzun sürelerde çok yüksek miktarlarda florüre maruz kalmak akut iskeletsel floroze sebep olabilir. Yaygın ağrılar, kaslarda zayıflık, kronik yorgunluk ve eklemlerde sertlik gibi şüpheler, hareket aralığının azalması ile birlikte en yaygın başlangıç belirtileridir (Arlappa ve ark., 2013). Bu belirtiler işlevsel olarak atlatılabilir fakat tendinöz eklemler ve eklem kapsülleri gibi bağlarda florür hasarı oluşması başlangıç belirtileri olarak görülebilir (Anand ve ark., 1990).

Daha sonraki aşamalarda, kemiklerin yoğun olduğu ve anormal kristal yapı geliştirdiği yerlerde, kemik kireçlenmesi, kemik erimesi ve kemik sertleşmesi gibi bulgular ortaya çıkar. Çok ileri aşamalarda, kemikler ve eklemler zayıflar, hareket zor ve acı verici bir hale gelir. Omurganın pek çok bölgesinde omurga füzyonu gözlemlenir (Arlappa ve ark., 2013). En fazla değişim omurga bölgesinde gerçekleşir, özellikle de boyun bölgesinde. Ağır vakalarda, sinirsel yayların erimesi, omurga kanalında daralma

ve intervertebral foramen ortaya çıkar. Hareket kısıtlaması, aşağı bölgelerde esneklik kontraktürü ve kısıtlanmış göğüs duvarı genişlemesi ile kamburluk ortaya çıkar (Fisher ve ark., 1989). İskeletsel flor zehirlenmesinin ileri aşamalarında ortaya çıkan ‘‘Poker sırt’’ omurgası (kamburluk), tüm kaburganın tek bir devam eden kemik sütunu hâline gelmesidir (Sujay ve ark., 2014). En son aşamada ise hasta sakat kalır (Brindha ve Elango, 2011).



Şekil 2. Manda, buzağı ve koyunlarda dental ve iskelet florozis olgusu (Choubisa ve ark., 2011).

2.5.2. Florun böbrek dokusuna etkisi

Böbreklerin en önemli görevi, plazmadan istenmeyen maddelerin (artık ve fazla) ortadan kaldırılması, suyun, elektrolitlerin ve pH'ın homeostazı gibi birçok işlevi yerine getirir. Böbrekler aynı zamanda endokrinlerin düzenlenmesinde de rol alır (Zhao ve ark., 2009). Böbrek, florürün atılımı ve tutumu ile ilgili ana organ olarak iyi bilinmektedir ve florürün aşırı miktarlarına histopatolojik ve fonksiyonel olarak değişiklik gösteren hassas bir organdır (Xu ve ark., 2005).

Florür vücutta birikme eğilimi gösteren bir zehirli bir maddedir. Ortalama olarak vücut tarafından alınan florürün sadece %50-80'i böbrekler tarafından atılır, geri kalan kısmı ise kemiklerde, pineal bez ve diğer dokularda birikir (Chouhan ve ark., 2008).

İçme suyu yoluyla alınan yüksek florür konsantrasyonuna maruz kalan sıçanlarda renal tubüler hasar gözlenmiştir. Deneysel hayvanlarda aynı zamanda tubüler dejenerasyon, enflamasyon, fibroz, parankimatöz nefrit, bulanık şişme ve sarmal tubüllerin dilatasyonu gibi diğer değişimler de rapor edilmiştir (Kono ve ark., 1987). Florür indüklü nefrotoksisite proksimal, distal ve toplama tubüllerinde patolojik değişikliklere neden olur. Glomerüller fonksiyonları üzerindeki etkileri daha az şiddetlidir, fakat glutatyon S-transferaz ve kreatinin gibi idrar göstergelerinin analizi proksimal tubüler hasarı yansıtır. Tüm bu bulgular, florürün birçok deneysel hayvan modelinde renal tubüler hasara neden olduğunu göstermektedir (Usuda ve ark., 1998).

Florür uygulanmış sıçanlarda hiperglisemi ve bunun yanısıra serum kreatinin ve kan üresi konsantrasyonlarında artış, kanda protein ve kalsiyum düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar, florürün renal bozukluklara neden olduğunu ve renal fonksiyonları bozabileceğini göstermektedir. Birçok toksik element konusunda böbrekler en hassas organlardan biridir ve böbreğin aşırı miktarlarda florüre maruz kalması histopatolojik ve fonksiyonel bozukluklara neden olur. Florüre maruz kaldıktan sonra böbrekler florürün atılımı ve tutulumunu konularında temel mekanizma işlevi görür. Bu yüzden yüksek miktarlarda florüre maruz kalmış hayvan modellerinde çok sayıda böbrek, yapısal, ultra-yapısal ve fonksiyonel değişimlerin olduğu bildirilmiştir (Kono ve ark., 1987; Guan ve ark., 2000; Quadri ve ark., 2016).

Yapılan bir çalışmada, sodyum florüre maruz bırakılan yetişkin dişi sıçanlarda, böbrek ağırlıklarının kontrollere göre karşılaştırılmasında anlamlı bir artış

gözlemlenmişlerdir. Farelerde yüksek miktarlarda florür alımı 24 saatlik idrar çıktısı, serum kreatinin düzeyleri ve kreatinin temizlenme oranı gibi birçok serum ve idrar parametresinde önemli etkiler göstermiştir. Bu olgu, büyük olasılıkla renal proksimal tübüllerde ve henle kulpunda tuz, elektrolit ve suyun yeniden emiliminin baskılanması ve/veya değişimi ve aynı zamanda renal medullada artan kan sirkülasyonu yüzünden oluşmaktadır (Bouaziz ve ark., 2005). Buna ek olarak, deney hayvanlarında florür indüklü patolojik değişimler de proksimal, distal ve toplama tübüllerinde gösterilmiştir. Glomerüler fonksiyonlar üzerindeki florür indüklü etkilerden daha az söz edilmiştir, fakat öte taraftan, deneysel hayvan modellerinde proksimal tübül hasar daha fazla vurgulanmıştır. Florür toksisitesi ve florozis vakalarında renal bozukluğa bağlı olarak florür indüklü sık idrara çıkma oluşur ve bu da florür indüklü lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olabilir (Usuda ve ark., 1998; Cittanova ve ark., 2002).

Xiong ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, içme suyu florür seviyesinin 2.0 mg/l'nin üzerinde olmasının çocuklarda karaciğer ve böbrek hasarına neden olabileceğini ve diş florozisinin karaciğer hasarından bağımsız olduğunu, fakat böbrek hasarından bağımsız olmadığını bildirmişlerdir.

Shashi ve ark. (2002) deneysel olarak florozis oluşturulmuş tavşanlarda böbrek hasarını incelemişler. Yaptıkları histopatoloji sonucunda sarmal tübüllerin bulanık şişkinliği, tübüllerin vakuolizasyonu ve nekrozu, glomerüllerin hipertrofisi ve atrofisi, interstisyel ödem ve interstisyel nefrit şeklinde gözlememişler. Böbreklerdeki bu değişiklikler, kronik florür zehirlenmelerinde böbrek fonksiyonlarında bozulmasını göstermektedir.

2.5.3. Florun hücrelere etkisi

Florür zamana, karışıma ve hücre türüne bağlı olarak çeşitli hücresel etkiler açığa çıkartır. Florürün ana toksik etkisi, enzimleri ile etkileşime giren hücrelerde gerçekleşmektedir. Çoğu durumda florür bir enzim inhibitörü olarak görev yapar, fakat florür iyonları zaman zaman enzim aktivitesini uyarabilir. Mekanizmalar, etkilenen enzimin türüne bağlıdır (Adamek ve ark., 2005).

Mikromol düzeylerde florür etkili bir yapısal ajan olarak düşünülür, çünkü hücre üremesini arttırır ve milimolar karışımlar ile hem canlı hem de cansız fosfatlar gibi

enzimleri durdurur (Mendoza-Schulz ve ark., 2009). Pek çok dokuda kronik flor zehirlenmesine bağlı metabolik, işlevsel ve yapısal hasar oluştuğu bildirilmiştir. Araştırma verileri florürün protein sentezini ve/ya da salgılanmasını engellediğini, ve hücre üremesi ve apoptozun, mitojenle etkileşen protein kinazı (MAPK), p53, aktiveleştirici protein-1 (AP-1) ve nükleer faktör kappa B (NF-B) gibi belli başlı sinyal yollarını etkilediğini, güçlü bir şekilde ileri sürmektedir (Zhang ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2008; Karube ve ark., 2009).

2.6. Florozis

Uzun süreli veya yüksek miktarda florür alımı floroze neden olur. Bu durum genellikle dişlerin beneklenmesi, horizontal sarı-kahverengi çizgiler ve aşınma ile kemiklerde osteoporoz, osteoskleroz, omurga kalça ve dizlerde şekil bozukluğu, artrit, ankiloz gibi iskelet sistemi bozukluklarıyla karakterize progresif dejeneratif hastalıklarla sonuçlanır (Barbier ve ark., 2010).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 1994) içme sularında bulunması gereken flor miktarını alt sınır olarak 0.3 ppm, üst sınır olarak 1.5 ppm olarak bildirmektedir. Sularda bulunan flor içeriği; iklim şartlarına, toprağın yapısına, yağışa ve toprağın flor emme miktarını bağlı olarak değişmektedir (Wang ve ark., 2002, Kahraman ve ark., 2011).

Florozisi etkileyen faktörler arasında; alınan flor miktarı, sindirim süresi, alınan florun eriyebilirliği, yaş, cinsiyet, beslenme durumu, stres faktörü ve bireysel farklılıklar etkilidir (Choubisa, 1999).

2.6.1. Akut floroze

Tek seferde ve yüksek dozda florür alınması sonucu akut flor zehirlenmesi ortaya çıkmaktadır. Kusma, karın ağrısı, diyare, hipersalivasyon, hipokalsemi, pupillar dilatasyon ve kas spazmları ile karakterize bir hastalık tablosudur. Kanda bulunan kalsiyum, flor tarafından kalsiyum floroid halinde bağladığı için sinirlilik durumu, aşırı refleks gibi semptomlar görülmektedir. Bu semptomlar hipokalsemi sonucunda oluşmaktadır. Solunum felci, ventriküler fibrilasyon ve kardiyak arreste (kalp durması)

sebeap olarak ölümlle sonuçlanabilmektedir. Magnezyum, kalsiyum alüminyumu tuzlarından verilmesi haricinde herhangi bir tedavisi yoktur (Whitford, 1992).

2.6.2. Kronik florozis

Optimal dozlardan biraz daha yüksek ve uzun süre flor alınması sonucu kronik florozis tablasu ortaya çıkmaktadır. Florun günlük gereklilikleri (1.5 mg/lst limit) aşan uzun süre sindirimi, dental flor zehirlenmesi ve daha sonra iskelet flor zehirlenmesine neden olabilir (Arlappa ve ark., 2013). Dişlerde flor zehirlenmesinde, hasara uğramış dişler, sarımsıdan kahverengimsiye uzanan çizgiler ve/veya beneklerle karakterize olup, iskelet florozu ise osteoflorozis, osteoskleroz, osteoporoz, osteomalasi, ligamentöz ve tendon kalsifikasyonu ve aşırı kemik deformitesine neden olabilir. Son zamanlarda, artan osteoblast aktivitesinin ve hızlanmış kemik döngüsünün osteoflorozis patogenezinin özellikleri olduğu görüşünü destekleyen kanıtlar artmaktadır. Ancak, bunun altında yatan moleküler mekanizmalar büyük oranda bilinmezliğini korumaktadır (Liu ve ark., 2015).

Kronik florür zehirlenmesi sırasında böbreklerde gözlenen histopatolojik değişimler arasında temel olarak tubüllerin vakulizasyonu ve nekropsisi, glomerüllerin atropisi, bağırsak ödemi ve bağırsak nefriti sayılabilir. Aşırı florür tarafından indüklenen renal lezyonlara neden olan mekanizmaları araştıran araştırmacılar bunların oksidatif stres (Xu ve ark., 2005), apoptoz ve sinyal transdüksiyonu olduğunu belirlemiştir (Murao ve ark., 2000).

İskeletsel florür zehirlenmesinin işaretleri, içme suyunda 10 yıl ya da daha fazla 8-10 ppm florür tüketimi ile belli olur (Pratusha ve ark., 2011). İçecekler ile gerçekleşen alım da önemlidir. Ağır gençlik iskeletsel flor zehirlenmesi, diyetteki yetersiz kalsiyum ile ilişkilendirilebilir (Jarvis ve ark., 2013). Yüksek miktarlarda çay tüketimi (olgun, yüksek florür içeren) de gençlik iskelet flor zehirlenmesi ile ilişkilendirilebilir (Izuora ve ark., 2011; Jarvis ve ark., 2013). Diş macunları, topikal jeller ve gargara gibi florür içeren ürünlerin uzun süre kullanımı ve sindirimi, kronik florür zehirlenmesine yol açabilir. Volkanik gazlardan, endüstri atıklarından ve kömür yakılmasından ortaya çıkan atmosferde bulunan florür tozlarını uzun süre solumak da kronik florür zehirlenmesine yol açmaktadır (Pratusha ve ark., 2011).



Şekil 3. İnek ve Mandada kronik dental florozisi (Choubisa ve ark., 2011).

2.6.3. Florozisin radyolojik bulguları

Dişlerde kemik sertleşmesi, hipersementoz ve periapikal kök emilimi görülebilir. İlk kalıcı alt azı dişlerinde kök emilimi en yüksek olur (Kurdi, 2016). En belirgin değişiklikler, tebeşirimsi beyaz zeminde cam gibi bir görünüm ve kuş gibi bir destek takozu ile sonuçlanan kemik sertleşmesi ve düzensiz osteofitler ile anlaşılan omurga sütununda görülür. Ön koldaki kemikler arası hücre zarında erime görülmesi, florür zehirlenmesinin radyolojik belirtisidir (Reddy, 2009).

2.6.4. Floroziste ayırıcı tanı

Kronik iskeletsel florür zehirlenmesinde ortaya çıkan bazı klinik belirtiler, eklem yangısıdır ve bu klinik aşama kolayca yanlış teşhis edilebilir. İskeletsel florür zehirlenmesinin tek önemli karakteristik özelliği çoklu eklem karışımıdır (Czerwinski ve ark., 1988). İskeletsel florizis kolayca eklem iltihabı, osteoartrit ve seronegatif spondiloartropati ile karıştırılabilir (Kumar ve ark., 2011). Sinir florür zehirlenmesi ve servikal spondiloz arasında pek çok klinik benzerlik bulunmaktadır (Haimanot, 1990).

2.7. Floroziste Tedavi ve Korunma

Akut florozis olaylarındadamar içi kalsiyumun uygulanması iyi sonuçlar vermektedir. Kronik olaylarda ise parenteral yolla kalsiyum enjeksiyonları yapılır. Bu

uygulamaya uzun süre devam edilir. Florun toksik etkisine karşı, ihtiyaç duyulan kalsiyumun normalden fazla verildiği zaman florürün toksik etkisini azaltmaktadır (Ekambaram ve Paul, 2001). Aluminyum sülfat florun absorpsiyonunu engellemektedir. Bunun için yemlere günlük hayvan başına 30 g aluminyum sülfat ilave edilir. Mümkünse hayvanlar florür zehirlenmesine neden olan bölgelerden uzaklaştırılmalıdır (Aslan, 1994).

Sularda bulunan florür içeriği 1.5 ppm'den fazla olan sular tüketilmemelidir (Kahraman ve ark., 2011). Eğer tüketilmesi gerekiyor ise sulardaki flor miktarı yarı yarıya seyreltilmeli veya pH'ı 6.30-7.5 arasında kalsiyum hidroksit, aluminyum sülfat veya magnezyum ile karıştırılarak flor miktarı düşürülmelidir (Şanlı ve Kaya, 1995). Florozis teşhisi yapılan yerleşim yerlerinde rutin olarak yeraltı sularının analizleri yapılarak sağlığa uygun olanların kullanılması gerekmektedir (Bardsen ve ark., 1999).

Ağız yoluyla alınan florür midedeki düşük pH'dan dolayı hızlı bir şekilde emilmektedir. Bağırsaklarda ise yüksek pH'dan (alkali ortam) dolayı emilme hızı daha düşmektedir (Cerklewski, 1997). Kalsiyum karbonat, aluminyum (Al) ve magnezyum (Mg) tuzlarının eklenmesi mide-barsaklarda bulunan floru bağlayarak florozis oluşumunu engellemektedir Aluminyum florürün mide-bağırsak kanalında emilimini Al-F kompleksi oluşturarak etkisini azaltmaktadır (Heifetz ve Horowitz, 1984).

2.8. Floroziste Mineral Madde Metabolizması

2.8.1. Selenyum (Se)

Selenyum (Se) hem ametal hem de metal elementlerin özelliklerine sahip, metalloid bir elementtir. Atom sayısı 34 ve moleküler ağırlığı 78,96 olan element, oksijen, sülfür, polonyum ve terilyum ile birlikte periyodik çizelgede VIA grubunun bir üyesidir. Bu elementler arasında sülfür Se'ye hem kimyasal, hem de fiziki özellikler açısından çok benzer, fakat yine de *in vivo* farklılıklar mevcuttur ve her zaman birbirlerinin yerine kullanılamazlar (Shamberger, 1983).

Selenyumun dört oksidatif hali mevcuttur: Selenür (Se^{-2}), saf selenyum (Se^0), selenit veya selen asidi (Se^{+4} , SeO_3^{-2}), ve selenat veya selenik asit (Se^{+6} , SeO_4^{-2}). Bu birleşik durumlar önemlidir, çünkü bunlar hem selenyumun suda çözünürlüğünü, hem de bağırsaklarda emilimini etkilemektedir (Gowdy, 2004).

Organik ve anorganik Se farklı yollarla metabolize olur, fakat selenyumun özellikle selenoproteine girebilmesi için ikisinin de öncelikle basit selenür yapısına dönüşmesi gerekmektedir. Metiyoninin sınırlı miktarda bulunduğu durumlarda SeMet nonspesifik olarak metionin yerine vücut proteinlerine dahil olur. SeMet katabolizmasının iki yolağı mevcuttur. SeMet, selenositatyon aracılığıyla transsülfürasyon yolağını kullanarak selenosistein üretebilir. Daha sonra bir dekarboksilaz tarafından hidrojen selenite indirgenir (Beilstein ve Whanger, 1992). Diğer yolak ise transaminasyon-dekarboksilasyon içerir (Mitchell and Benevenga, 1978).

Selenat gibi anorganik Se yapıları selenite indirgenir ve seleno diglutatyon ve glutatyon selenopersülfid aracılığıyla hidrojen selenite metabolize edilir (Turner ve ark., 1998). Hidrojen selenit selenoprotein sentezinde kullanılabilir aktif bir yapıda Se sağlama sürecinin öncülüdür. Hidrojen selenitin ileri metabolizması S-adenosil metionin tarafından metilselenol, dimetil-selenit ve bir trietilselenomiyum iyonuna metilasyonu içerir (Sunde ve ark., 1997). Selenit enjekte edilen sıçanlar selenyumunu selenosistein olarak tutar. Vücudun selenyumun anorganik kaynaklarından SeMet sentezleme yolağı bulunmadığından bu selenoamino asit için bitkisel ve mikrobik kaynaklara başvurur. Omurgalılarda SeMet selenosisteinden sentezlenemez (Beilstein ve Whanger, 1992).

İnsanlarda kronik selenyum toksisitesi kronik selenyum zehirlenmesi adı verilen ve saç ve tırnak kaybı ve kırılması, sindirim sistemi sorunları, deri döküntüsü, nefeste sarımsak kokusu ve sinir sistemi anomalileri ile karakterize bir durumla sonuçlanır (Yang ve ark., 1983).

Antioksidan özellikleri bir element olan selenyum birçok enzim ve proteinin önemli bileşenidir. Bazı hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde selenyum ilavesinin rolü son zamanlarda giderek artmaktadır. Yapılan araştırmalar selenyumun sıçanlarda yüksek florür konsantrasyonlarını azalttığını idrar yoluyla florür atılımını teşvik ettiğini ve florozis semptomlarını hafiflettiğini göstermişlerdir (Zhu ve ark., 2009).

Selenoprotein birçok biyokimyasal yolakta, özellikle glutatyon peroksidaz ve tiyoredoksin redüktaz gibi hücre antioksidan sistemlerde anahtar rol oynar (Allan ve ark., 1999). Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda selenyum bileşiklerinin kanser önleyici etkinliği tanımlanmış, aynı zamanda klinik araştırmalar ile en çok prostat

olmak üzere, akciğer ve kolorektal kanserlerde selenyum takviyesinin koruyucu etkisi gösterilmiştir (El-Bayoumy, 2001; Duffield-Lillico ve ark., 2003).

2.8.2. Magnezyum (Mg)

Mg atom numarası 12, toprak alkali metaller sınıfında, kristal yapısı hekzagonal olan, hayati önem taşıyan 11 mineralden birisi (kalsiyum, fosfor, sodyum, potasyum, demir, çinko, bakır, krom, iyot, selenyum, magnezyum), belki de en önemlisidir (Elin, 1988).

Mg vücudumuzdaki her hücrenin ihtiyacı olan ve intrasellüler sıvıda potasyumdan sonra en çok bulunan ikinci katyondur. Mg, hücrelerin enerji üretimi ve birçok enzimin kofaktörü içingerekli olan bir mineraldir. Hücre içerisinde rol oynadığı reaksiyonlar arasında, özellikle enerji metabolizmasını ilgilendiren fosfat gruplarının ve reaksiyonlarının aktive edilmesinin yanında, glikolizis, oksidatif fosforilasyon, DNA transkripsiyonu ve replikasyonu, protein sentezi ve plazma membranlarına bağlanacak moleküllerin seçimi gibi intermedier metabolizmanın düzenlenmesinde görev alır (Özgürtaş ve Kutluay, 2002).

Mg homestazının düzenlenmesinde bağırsaklar, kemik ve böbrekler görev almaktadır. Diyetle alınan magnezyum, mide asidi etkisi ile $MgCl_2$ halinde bağırsaklara gelerek, yaklaşık %30-50'si emilir. Magnezyum alımı azalırsa bu oran %80'e kadar çıkabilmektedir. Emilim başlıca ince barsak ve kolonda olur. Emilimin %80-90'ı epitel hücreler arasındaki boşluklardan pasif difüzyon ile gerçekleşir. Geriye kalan bölümü ise aktif transport ile direkt kana geçmektedir. Atılımı ise gastrointestinal ve idrar ile gerçekleşir (Evrengül ve Mir, 2016).

Vücutta normal Mg düzeyi 22,6 g'dır ve bunun %60-70'i kemiklerde, %30-40 ise yumuşak doku ve vücut sıvılarında bulunur. Kemik iskeletin dansitesi ve gücünü, depolanan magnezyum belirler. Hipomagnezemi durumunda osteoklast aktivitesi artar, osteoblast aktivite azalır ve kemikten magnezyum rezorbsiyonu oluşarak osteoporoz gelişir (Rude ve Gruber, 2004).

Liu ve ark. (1999) arsenik ve floroitin ratlarda karaciğer ve böbreklere etkisini araştırmışlar. Arsenik ile floroid arasında antagonizma sebebiyle, rat karaciğerinde ve Ca ve Mg her ikisinin ayrı ayrı kullanımının etkisinde daha düşük çıktığını bildirmişlerdir.

Arsenik ve florit etkilerinin yanı sıra Zn, Ca, Mg'in karaciğerde; Ca, Mg, Al'nin de böbreklerde olumsuz etkisi olduğunu bildirilmiştir.

2.8.3. Alüminyum (Al)

Alüminyumun (Al) atom numarası 13, atom ağırlığı 26.97, III A grubunda bulunan gümüş renkte bulunan bir metaldir. Al, kullanışlı olmasının nedeni özgül ağırlığının düşük, ısı geçirgenliğinin yüksek olması ve atmosferik korozyona karşı dayanıklı olmasıdır. Alüminyumun yeryüzünde metalik halde oluşmaz. Oksijen, flor ve diğer bileşiklerle birleşmiş halde toprak ve kayalarda bulunur. Alüminyumun yeryüzünde bulunan en çok ikinci elementtir (Tayfur ve ark., 2002).

Alüminyum ve florürün her ikisinde potansiyel çevresel tehlike olarak bilinir. İkisi birlikte yer kabuğunda kriyolit formunda bulunur (Na_3AlF_6) (Chinoy ve Trupti, 1999). Yer kabuğunun %8'ini oluşturan ve doğada bir miktar bulunan alüminyum, yiyecekler, kozmetikler, farmakolojik ajanlar, endüstriyel ürünlerle bol miktarda alınmaktadır. Aynı zamanda havadaki tozlarla da alüminyum partikülleri alınmaktadır. Günlük yiyeceklerle de 2-20 mg/gün alüminyum alınmaktadır. Alınan alüminyum mide mukozası ve ince bağırsaklardan %0.5-1'i emilime uğrar, geri kalan büyük kısmı ise feçesle atılır. Alüminyum emilimi sitrat, paratiroid hormon, vitamin D, böbrek hastalarındaki üremi durumunu artırmaktadır. Emilen Al'nin % 80'i transferin taşıyıcısı proteinine bağlanmakta, serbest kısım ise glomerüllerden filtre edilerek alüminyum sitrat şeklinde atılmaktadır. Alüminyumun en çok depolandığı doku kemik dokusudur (Ott, 1985).

Alüminyum, sinir sistemi ve diğer doku hücrelerinin içinde bir takım süreçlere engel olabilen nörotoksik bir ajandır. Alüminyumun fazlalığı bazı enzimlerin aktivitesini engelleyebilir, zihinsel gelişimi ve kemik mineralleştirilmesini olumsuz yönde etkileyebilir. Normal böbrek fonksiyonlarını gerçekleştiren kişilerde alüminyumun büyük miktarda atılmaktadır. Kronik böbrek yetmezliği olan hastaların son dönemlerinde uzun süren hemodiyaliz uygulaması çeşitli dokularda alüminyum birikmesine neden olmaktadır. Buda nörolojik bozukluklara, diyaliz ensefalopatisi, osteodistrofi, alzheimer hastalığı (AH) ve anemi gibi durumlar gözükmektedir. Ayrıca alüminyumun epilepsi, bilgi işleme bozuklukları, zihinsel fonksiyon bozukluğu ve motor nöron hastalığına sebep olmaktadır (Tayfur ve ark., 2002).

Aluminyum ve florür bağırsaklarda emilim yarışmasında zıt etkiye sahiptir. Aluminyum, florürün bağırsaktan emilimini azalttığı ve boşaltımı artırdığı, böylece toksikliğinin azattığı bilinir, ancak florür aluminyumun sindirimsel emilimini artırır (Allain ve ark., 1996).

Florür ve aluminyum arasındaki etkileşimler alzheimer hastalığı olası bağlantıları ortaya çıkınca çok fazla ilgi çekmiştir. Alzheimer hastalığı insidansı ve içme sularındaki florürün seviyesi arasında ters bir korelasyon vardır. Onun için alzheimer hastalığının oluşmasında katkı sağlayan etkenlerden birisinin aluminyum olması durumunda, yüksek fakat toksik olmayan düzeyde florür içeren suyu tüketilmesi önerilmektedir. Aluminyum uzun zamandan beri alzheimer hastalığının etiopatolojisi ile bağlantı kurulmaktadır ve nörotoksisite çalışmaları asetilkolintransferaz ve dihidropteridin redüktaz enzimleri inhibe ederek, merkezi sinir sistemi, tirozin ve çeşitli nörotransmitter maddelerin aktivitelerini engellemektedir. Nükleik asitler ile birleşerek, aluminyum hücre içi protein metabolizmasını engellemektedir (Isaacson ve ark., 1997; Somova ve ark., 1997; Rondeau ve ark., 2000).

Dai ve ark. (1994) alüminyum ve florürün müşterek etkilerini erkek civcivlerin kanlarında ve kalça kemiğinde toksikliği kötüleştirdiğini ortaya koymuşlardır. Varner ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada ratlarda kronik AlF_3 uygulamasını takiben ratların beyin ve böbrek dokusundaki aluminyum seviyeleri yüksek bulunmuştur. Serebrovasküler ve nöronal yoğunluktaki değişimlerin artışı NaF 'dan ziyade AlF_3 'e maruz kalan hayvanlarda daha yüksek olduğunu bildirmiştir.

2.8.4. Kalsiyum (Ca)

Kalsiyum (Ca) toprak alkali metaller sınıfında yer alan, atom ağırlığı 40,08 olan gümüş renginde bir elementtir. Kalsiyum iskelet mineralizasyonunda ve birçok biyolojik fonksiyonları olan bir elementtir. Bu element vücuda sadece diyet yoluyla alınmaktadır. Normal bir erişkinde 1-1.5 kg kalsiyum mevcuttur ve bunun %99'u kemikte hidroksi apatit kristalleri $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ şeklinde %1'i ise ekstraselüler sıvıda bulunur. Kemikteki kalsiyumun iki görevi vardır. Birinci görevi iskeletin gücünü sağlar, ikincisi ise hücre içi ve hücre dışı kalsiyum havuzların devamının temini için bir depo görevi olarak görev alır (Wang ve ark., 2006).

Besinlerle birlikte organizmaya alınan kalsiyum ilk değişikliğe midede uğrar. Midede bulunan hidroklorik asit, besinlerle alınan Ca'nın çözümlenmesini sağlar. Mideden Ca⁺⁺ iyonları halinde bağırsaklara geçer ve burada serbest yağ asitleri ile birleşir. Bunun etkisiyle oluşan kalsiyum sabunları safra asitlerinin etkisiyle ufak parçalar haline gelerek ince bağırsaktan emilir. Dışkı ve idrarla dışarı atılır. Kalsiyum emilimin, düşük pH, sitrat ve vitamin D etkisiyle artmaktadır. Kan serumunda buluna Ca'nın biri serbest (iyonize) halde %40, diğeride kalsiyum proteinat halinde (albümine bağlı) %60 olmak üzere iki şekilde bulunur (Ası, 1995).

Bir iz element olan flor kemiklerde kalsiyum ve fosfor birikiminde önemli bir rol oynar. Fakat, aşırı florür florozise neden olabilir ve florür zehirlenmesi dünyanın birçok bölgesinde ciddi bir halk sağlığı sorunudur (Aliasgharpour ve Rahnamaye, 2013).

Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişı olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol almakla birlikte apoptozisin gerçekleşmesi için gerekli olan önemli bir iyondur (Lüleyap, 2008).

Florozisin patogenezinde kalsiyumun rolü son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Düşük kalsiyum diyeti ile beslenenlerde, iskelet florozis lezyonlarını daha da kötüleştirirken, kalsiyum açısından zengin bir diyet florür kaynaklı oluşan kemik hasarını hafifletebilir (Yu ve ark, 2008).

2.9. DNA Hasarı ve Nedenleri

DNA hasarı DNA'nın kimyasal yapısında bir değişime neden olur. Bir DNA şeridinde kırılma veya bazın yapısının kimyasal olarak değişimi gibi birçok DNA hasarı türü mevcuttur (Kumari ve ark., 2008). Canlı hücrelerde, oksidatif metabolizma, replikasyon hataları ve ultraviyole ışın, iyonizan radyasyon, kanser tedavisinde uygulanan kemoterapi ve radyasyon terapileri gibi çevresel etkiler sonucunda DNA hasarı oluşabilir (Kai, 2016; Kumari ve ark., 2008). Sigara içme ve diabetes mellitus gibi ateroskleroz ile ilişkili risk faktörlerinin çoğu doğrudan DNA hasarına yol açabilir. Ayrıca DNA hasarı aynı zamanda mitokondrilerde de oluşabilir (Mahmoudi ve ark., 2006).

2.9.1. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)

8-OHdG, ilk olarak 1984'te ısıtılmış şekerin neden olduğu ana bir oksidatif DNA hasarı ürünü olarak bildirilmiştir (Kasai, 1997). Bu yüzden, 8-OHdG bir oksidatif DNA hasarı ürünüdür (Fraga ve ark., 1990). Patojenik olarak oksidatif DNA hasarı kanser, koroner kalp hastalığı ve diyabet gibi birçok yaşlılıkla ilgili dejeneratif hastalıkla ilişkilidir. 8-OHdG bileşiği karaciğer, beyin, böbrek, bağırsak ve testislerden izole edilmiş DNA'da belirlenen yaklaşık 20 oksidatif DNA hasarı ürününden biridir (Fraga ve ark., 1990). 8-OHdG hidroksil radikalleri, tekli oksijen ve doğrudan fotodinamik hareketiyle oluşur. Dokularda, serumda, idrarda ve diğer biyolojik sıvılarda saptanabilir (Kasai ve ark., 1986).

Guanin, DNA bazları içerisinde iyonizasyon yeteneği düşük olduğu için serbest radikallerin (ROS) başlıca hedefidir. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozine, guanin'in 8. karbon atomuna hidroksil atakları sonucu oluşan, oksidatif DNA hasarının en önemli bir göstergesidir (Yokuş ve Çakır, 2002).

2.9.2. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin oluşumunun nedeni ve klinik önemi

8-OHdG, serbest radikal uyarılmış oksidatif lezyonların yaygın bir şeklidir. Bu nedenle, 8-OHdG oksidatif stres ve karsinogenez için biomarker olarak büyük ölçüde kullanılmaktadır. Çalışmalar 8-OHdG farklı kanserler ve dejeneratif hastalıkların riskini değerlendirmede kullanılabilir kabul edilebilir bir biyomarkerdir (Cooke ve ark., 2008; Valavanidis ve ark., 2009). Bu biyomarker, tütün dumanı, asbest lifleri, çok halkalı aromatik hidrokarbonlar ve ağır metaller gibi kansere neden olan unsurlara maruz kaldıktan sonra insanlarda oluşan DNA hasarını tahmin etmekte kullanılmıştır. Yakın zamanlarda, 8-OHdG sadece endojen oksidatif DNA hasarının öngörülmesinde bir biyomarker olarak değil, aynı zamanda kanser de dahil hastalıkların risk faktörlerini belirlemede birçok çalışma alanında geniş biçimde kullanılmıştır (Valavanidis ve ark., 2009). Doku DNA'sında 8-OHdG oluşumu hedef organ karsinogenezinin tahmininde bir gösterge olarak kullanılabilir. Aslında, birçok yeni çalışma hedef organlarda karsinogenez özgülüğünü değerlendirmek için bu yaklaşımı benimsemiştir (Nishimura, 2011).

2.10. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen türlerinin (ROS; serbest radikaller) ve antioksidan savunma mekanizmasının üretimleri arasındaki dengesizlik olarak tanımlanmıştır. Bu dengesizlik doku hasarlarına neden olur ve ürünleri diyabet gibi birçok kronik hastalığın gelişiminde rol oynar (Betteridge, 2000). Oksidatif stres, basit bir şekilde ROS olarak adlandırılan oksijen ve oksijen türevi oksidanların neden olduğu yüksek oranda hücre hasarı ile ilişkilidir (Sikka ve ark., 1995).

Oksidatif stres, farklı mekanizmalar ile lipidler, proteinler ve DNA gibi biyolojik öneme sahip olan bileşiklerin üzerinde değişiklikler yaparak, hücre hasarına neden olduğu bilinmektedir. Reaktif oksijen türleri (ROS), DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonlarına, tek ve çift zincir kırıklarına ve DNA-protein çapraz bağlanmasına sebep olarak hasara yol açtığı bilinmektedir. DNA'da ROS'lar tarafından oluşturulan oksidatif hasar, kanser, immun sistem hastalıkları, kardiyovasküler hastalık, yaşlanma gibi birtakım hastalıkların ana nedeni olarak görülmektedir (Dandona ve ark., 1996).

ROS'lar fizyolojide önemli roller oynar, fakat bunların yüksek oranları oksidatif strese neden olabilir (Radomska-Leśniewska ve ark., 2016). Antioksidan kapasiteyi aşan kontrolsüz ROS üretimi protein oksidasyonuna, lipid peroksidasyonuna veya denatürasyonuna, nükleer asit oksidasyonuna ve birçok diğer makromoleküler değişime neden olur. Bunların sonucunda ciddi hücre hasarı meydana gelir. Gerçekten de, metabolik sendrom, diyabet, kanser, kalp damar hastalıkları ve alzheimer hastalığı gibi birçok hastalıkta ROS ile ilişkili hasarlar belirlenmiştir (Sikka ve ark., 1995; Bansal ve Bilaspuri, 2010; Auberval ve ark., 2015; Zalewska ve ark., 2015). Obezite, hiperglisemi ve hiperlipidemi, büyük olasılıkla artan mitokondri yetmezliği ve yağ birikmesine bağlı süperoksit üretimi sonucunda yüksek miktarda ROS üretimi ile ilişkilendirilmiştir (Auberval ve ark., 2015).

2.10.1. Oksidatif stres ve florür ilişkisi

Aşırı florür birçok organizmanın sağlığı üzerine etkisi geniş anlamda araştırılmış ve floroziseneden olan mekanizma olarak serbest radikaller gösterilmiştir (Wang ve ark., 1997). Böbrek organizmadan florürün detoksifikasyonu ve atılmasından sorumludur ve bu yüzden florun zararlı etkisinden de en fazla zarar görecektir. Yüksek

konsantrasyonlarda florürün genellikle tübüler dejenerasyonu, enflamasyon ve fibröz gibi böbrek hasarına yol açar. Yüksek konsantrasyonlarda florür genellikle tubuler dejenerasyonu, enflamasyon ve fibröz gibi böbrek hasarına yol açar (Shashi ve ark., 2002). Son zamanlarda, aşırı florür tarafından indüklenen reaktif oksijen türlerinin (ROS) DNA hasarında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Rzeusk ve ark., 1998). Florür aynı zamanda endoplazmik retikulum (ER) stresine de yol açabilir ve protein sentezini ve salgılanmasını baskılayabilir (Kubota ve ark., 2005).

Bazı sonuçlar, Na-K-ATPaz pompasının henle döngüsünde florür toksisitesinin ana hedefi olduğu yönündedir. Ayrıca, florürün laktaz dehidrojenaz, sorbitol dehidrojenaz, fruktoz-1,6-difosfat aldolaz ve antioksidan enzimler gibi birçok enzimin inhibitörü veya aktivatörü olduğu bilinmektedir (Cittanova ve ark., 2002). Bir çok gelişmeler sağlanmasına karşın, aşırı florürün oksidatif ve ER streslerine ve bunun sonucunda oluşan apoptozise nasıl neden olduğu henüz bilinmemektedir (Lu ve ark., 2010).

2.11. Apoptozis

Apoptozis, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (Öztürk, 2002). Yaşam süresi hücrenin tipine göre değişmekle birlikte kaza veya travma sonucu oluşan nekrozis dışında ortaya çıkan tüm hücre ölümleri apoptoz denilen programlanmış hücre ölümü ile gerçekleşmektedir. Programlı hücre ölümünün, bütün çok hücreli organizmalarda, gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde vazgeçilmez bir rolü vardır ve organizma için tehlike oluşturan hücrelerin tümüyle ortadan kaldırılmasını sağlayarak önemli bir savunma oluşturur (Lüleyap, 2008).

DNA hasarının oluşması durumunda, hasarın olduğu hücreler kendini apoptoza yönlendirerek bu etkiyi ortadan kaldırır. Bu şekilde DNA yapısında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (Akşit ve Bildik, 2008).

Apoptotik hücreler organizmanın bazı doku ve hücrelerinde sürekli oluşmaktadır ve bu ömür boyu devam etmektedir. Bu şekilde ölüm (apoptoz) ve yapım (mitoz)

dokulardaki homeostaziyi korumak için sürekli birarada tutmaktadır. Bu dengenin apoptozis lehine veya aleyhine bozulması sonucu birçok hastalığın ortaya çıkmasına sebep olur. Apoptozisin hızlandığı zaman ortaya çıkan hastalıklar; AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, arteriosklerozis, hepatit C, insüline bağlı diyabet, örnek verilebilirken; apoptozisin yavaşladığında ortaya çıkan hastalıklara; otoimmün hastalıklar ve kanser örnek olarak verilebilir (Lüleyap, 2008).

Apoptotik hücre ölümünün aşamaları; apoptozis hücre dışından veya içinden gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden bir olaylar zinciri olarak seyreder. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sona erer. Bu aşamalar; a)Apoptozun başlatılması (Sinyal üretici yolar) b)Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu, c)Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması d)Fagositoz, olarak özetlenebilir (Öztürk, 2002).

Apoptozis, tipik olarak morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. Dikkat çeken değişimler, hücre küçülmesi, nüklear kromatinin yoğunlaşması, nükleusun parçalanması ve DNA'nın internukleozomal alandan ayrılmasıdır. Bütün bu olaylar enerji sayesinde gerçekleşir ve bu enerjide mitokondriden sağlanmaktadır. Apoptoz, apoptoz yanlısı ve karşı genler aracılığıyla düzenlenir. Bcl-2 aile üyeleri ve p53 geni apoptozisin düzenlenmesinde merkezi rol oynar. Bcl-2 apoptozu baskılar ve Bax apoptozu destekler ve bunlar mitokondride, çekirdek membranında ve endoplazmik retikulumda çok miktarda bulunur. Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri pro-apoptotik, apoptozisi indükleyici etkiye sahiptir. Diğeri ise antiapoptotik, apoptozisi baskılayıcı etkiye sahiptir. Pro-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom c salıverilmesini baskırlar. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep ve amfipatik α -heliks) bağlıdır (Arnoult ve ark., 2008; Jafari ve ark., 2008).

2.11.1. Apoptozis ve flor ilişkisi

Apoptoz, hücre ölümü ile sonuçlanan bir yoldur ve aşırı apoptoz birçok farklı tür organ hasarına yol açar. Son yıllarda, birçok araştırma florür toksisitesinin, florürün gen ekspresyonunu değiştirmesi ve apoptozu indüklemesinin yanı sıra protein karbonil içeriği indükleme yeteneği yüzünden de olabileceğini göstermiştir (Barbier ve ark.,

2010; Wang ve ark., 2011). Florozis hasarının mekanizması florür indüklü oksidatif stress hasarıyla ilişkilendirilebilir. Hücre apoptozu önemli bağlantılardan birisi olabilir. Florür birikimi, boşaltımı ve toksik etkisi açısından böbrek önemli organlardan biridir (Wu ve ark., 2010).

Florür tarafından modüle edilen genler, stress yanıtını, hücre metabolizmasını, hücre döngüsünü, hücreler arası iletişimi ve sinyal transdüksiyonunu düzenlemekle görevlidir. Bcl-2 protein ailesi apoptotik sinyallerin önemli mitokondriyal yanıt düzenleyicisidir ve mitokondriden proapoptotik proteinlerin (sitokrom c) sitozola salınımını kontrol eder ve hücre ölümünü indükleyen en iyi karakterize edilmiş mekanizmalardan birini temsil eder (Bras ve ark., 2005). Bcl-2 aile üyeleri hem pro-(Bax-Bad proteinlerini), hem de anti-(Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W) apoptotik üyelerini içerir ve apoptotik başlatıcı ve baskılayıcıların arasındaki oran bir hücrenin apoptoza girip girmeyeceğini belirler (Danial, 2007). Bax gibi birden fazla alana etki eden pro-apoptotik proteinler hücre en dış zarının geçirimli hale gelmesinin altında yatan mekanizma için vazgeçilmezdir. Tam tersine, Bcl-2 gibi anti-apoptotik üyeler, pro-apoptotik faktör proteinlere doğrudan bağlanarak bu süreci baskılar ve mitokondriden sitokrom c salgılanmasını engeller (Dejean ve ark., 2010). Lee ve ark. (2008) yaptıkları bir çalışmada, NaF varlığında insan diş eti fibroblastlarında Bcl-2 ekspresyonunun azalttığı, mitokondri sitokrom C salınımının arttırdığı, kaspaz uyarımı ve apoptoz aktivasyonunda etkili olduğunu bildirilmiştir.

Bai ve ark. (2010) tavuklarda yaptıkları çalışmada, diyetlerine yüksek miktarda flor verilmiş ve miktarı akış sitometrisi yöntemiyle florun nefrotoksitesini ölçülmüş. Sonuçta, tavuklarda hücre siklusu ve immün sistem organların gelişimini baskılayan, savunma fonksiyonlarını tahrip eden lenfositlerde apoptozise neden olabileceğini bildirmişlerdir.

2.11.2. Kaspazlar

Kaspazlar apoptozis olayında rol oynayan sistein aspartat spesifik proteaz (Cystein Aspartat Specific Protease=Caspase) olarak tanımlanan bir protein ailesidir (Lüleyap, 2008). Hücrenin stoplazmasında bulunan ve aktif merkesinde sistein bulunduğundan dolayı sistein proteazlar olarak bilinirler ve aspartik asitten sonraki peptit bağı kırarlar (Ulukaya, 2007). Kaspazlar başlangıçta inaktif proenzim (zimojen-

prokaspaz) halinde bulunurlar. Etkin olabilmeleri için aktive edici bir bölünme işleminden geçmeleri gerekir. Bölünme bölgeleri diğer kaspazlar tarafından veya otokatalitik olarak hidrolize edilebilir. Başlatıcı kaspaz bir kez aktive olduktan sonra diğer kaspazların hızlı ve sıralı aktivasyonu ile ölüm programı başlar (Lamkanfi ve ark., 2007).

Kaspazlar, başlatıcı (kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-10), hedef (uygulayıcı) (kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7) ve yangı (kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5, kaspaz-11, kaspaz-12, kaspaz-13 ve kaspaz-14) kaspazları diye gruplandırılabilir. Hedef (uygulayıcı) kaspazlar hücre iskeleti ve nükleer matrix proteinlerini parçalayarak hücre iskeletinin bozulmasına ve nükleus yıkımına yol açarlar. Nükleus içerisinde kaspazlar; transkripsiyon, DNA replikasyonu ve DNA onarımında rol alan proteinleri parçalarlar. Bunlardan özellikle kaspaz-3 karakteristik inter nükleozomal DNA bölünmesine yol açan sitoplazmik bir DNAaz enzimini aktive eder (İnci ve ark., 2009).

M30 yönteminde apoptotik hücreler, sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenirler. Sadece sitokeratin 18'i ekspres eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır (Ulukaya, 2007).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ve Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında mevcut olan hücre kültürü laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan hücre serileri

Çalışmada renal epitelyal (NRK-52E (ATCC® CRL-1571™) ve insan kemik (hFOB 1.19) (ATCC® CRL-11372™) hücreleri kullanılmıştır.

Tablo 1. NRK-52E hücre hattının genel özellikleri

NRK-52E hücre hattının genel özellikleri	
Organizma	Sıçan
Doku	Böbrek epitelyal
Morfoloji	Düzensiz şekilli, genellikle yuvarlak
Yüzey tutulumu	Yapışan hücreler
Tümörjenik	Hayır
Besiyeri	DMEM high glukoz, %10 FBS, %1 L-Glutamin, %1 penisilin/streptomisin
Besiyeri yenileme süresi	Haftada2-3 defa
Pasaj Metodu	%0.25 trypsin, %0.02 EDTA
Ayırma oranı	1:3-1:4
Biyogüvenlik düzeyi	1

Tablo 2. hFOB 1.19 hücre hattının genel özellikleri

hFOB 1.19 hücre hattının genel özellikleri	
Organizma	İnsan
Yaş	Fetus
Doku	Kemik
Morfoloji	Düzensiz şekilli
Yüzey tutulumu	Yapışan hücreler
Tümörjenik	Hayır
Karyotip	Diploid, %43; tetraploid, %57
Besiyeri	Ham's F12, 2,5 mM L-glutamine (Fenol kırmızısı olmadan) %10 FBS, %1 penisilin /streptomisin
Besiyeri yenileme süresi	2-3 günde 1
Pasaj Metodu	%0,25 Tripsin+ %0,1 EDTA
Ayırma oranı	1:4
Katlanma süresi (İki kat)	36 saat
Biyogüvenlik düzeyi	2

3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler

Hücre kültürü için

Alet/malzeme	Marka	Model
Azot tankı	MRC	5 litrelik
Buzdolabı (+4 °C)	Profilo	Profilo
Derin dondurucu (-20 °C)	İndesit	İndesit
Derin dondurucu (-80 °C)	Sanyo	Sanyo
Cryovial tüpler	Corning incorporated	430659 (2 ml'lik)
Falkon tüpler	BIOLOGIX	15, 50 ml' lik
Otomatik Pipetler	Eppendorf	10, 100, 200, 1000 µl'lik
Pipet uçları	BIOLOGIX	10, 100, 200 ve 1000 µl'lik
Eppendorf tüpler	Eppendorf	683965 (1,5 ml'lik)
Soğutmalı santrifüj	Universal	320R

Distile su cihazı	Merck	Millipore Direct-Q 3 UV
Flask	SPL	75, 25 cm ²
Hassas terazi	Radwag	220.R2
Laminar kabin	Biobasafety cabinet	BSC-L300
Kronometre	Elabscience	Elabscience
İnkübatör	ESCO	Cell Culture CO ₂ Incubator
İnverted (ters) mikroskop	Nikon	ECLIPSE TS100
Thoma lamı	MARIENFELD	0,0025mm ² 'lik
Portüp	ISOLAB	Plastik
Su banyosu	MRC	WBO-100

MTT canlılık testi ve doz belirlenmesi için

Alet/malzeme	Marka	Model
ELISA cihazı	Anthos-Zenyth	200 rt
Kültür plakları	Costar 96'lık	3599
Otomatik pipetler	Eppendorf	10, 100, 200, 1000 µl'lik
Pipet uçları	BIOLOGIX	(10, 100, 200 ve 1000 µl'lik)
Eppendorf tüpler	Eppendorf	683965 (1,5 ml)
Falkon tüpler	PPL	15, 50 ml'lik
Soğutmalı santrifüj	Universal	320R
Distile su cihazı	Merck	Millipore Direct-Q 3 UV
Flask	SPL	75, 25 cm ²
Hassas terazi	Radwag	220.R2
Laminar kabin	Biobasafety cabinet	BSC-L300
Kronometre	Elabscience	Elabscience
İnkübatör	ESCO	Cell Culture CO ₂ Incubator
İnverted (ters) mikroskop	Nikon	ECLIPSE TS100
Thoma lamı	MARIENFELD	0,0025mm ² 'lik
Portüp	ISOLAB	Plastik
Fotoğraf makinası	CMEX	DC. 5000C
Karıştırıcı-vorteks	Yellowline	TTS 2

Hücre örneklerinin toplanması için

Alet/malzeme	Marka	Model
Azot tankı	MRC	5 L'lik
Buzdolabı (+4 °C)	Profilo	Profilo
Derin dondurucu (-20 °C)	İndesit	İndesit
Derin dondurucu (-80 °C)	Sanyo	Sanyo
Cryovial tüpler	Corning incorporated	430659 (2 ml'lik)
Otomotik pipetler	Eppendorf	10, 100, 200, 1000 µl'lik
Pipet uçları	BIOLOGIX	10, 100, 200 ve 1000 µl'lik
Eppendorf tüp	Eppendorf	683965 (1,5 µl'lik)
Soğutmalı santrifüj	Universal	320R
Distile su cihazı	Merck	Millipore Direct-Q 3 UV
Flask	SPL	75, 25 cm ²
Hassas terazi	Radwag	220.R2
Laminar kabin	Biobasafety cabinet	BSC-L300
Kronometre	Elabscience	Elabscience
İnkübatör	ESCO	Cell Culture CO ₂ Incubatör
İnverted (ters) mikroskop	Nikon	ECLİPSE TS100
Thoma lamı	MARIENFELD	0,0025mm ² 'lik
Portüp	ISOLAB	Plastik
Su banyosu	MRC	WBO-100
Karıştırıcı-vorteks	Yellowline	TTS 2

Biyokimsal analizler için

Alet/malzeme	Marka	Model
Falkon tüpler	SPL	15, 50 ml'lik
Kültür Plakları	Costar 96'lık	3599
Otomotik Pipetler	Eppendorf	10, 100, 200, 1000 µl'lik
Pipet uçları	BIOLOGIX	10, 100, 200 ve 1000 µl'lik
Eppendorf tüpler	Eppendorf	683965 (1,5 ml'lik)
Soğutmalı santrifüj	Universal	320R

Distile su cihazı	Merck	Millipore direct-Q 3 UV
Hassas terazi	Radwag	220.R2
Kronometre	Elabscience	Elabscience
Karıştırıcı-vorteks	Yellowline	TTS 2

Genetik analizler için

Alet/malzeme	Marka	Model
Otomatik Pipetler	Eppendorf	10, 100, 200, 1000 µl'lik
Pipet uçları	BIOLOGIX	10, 100, 200 ve 1000 µl'lik
Falkon tüpler	SPL	15, 50 ml'lik
Eppendorf tüpler	Eppendorf	683965 (1,5 ml'lik)
Soğutmalı santrifüj	Universal	320R
Kronometre	Elabscience	Elabscience
Karıştırıcı-Vorteks	Yellowline	TTS 2
RT-PCR	Rotor Gene	Rotor Gene
BioDrop		

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Hücre kültürü için

Kimyasal madde	Marka	Katalog no
FBS	Capricorn Scientific	FBS-12B
PBS (pH: 7,4)	Sigma (Ca ⁺⁺ ve Mg ⁺⁺ içermeyen)	P4417
L-Glutamin	Capricorn Scientific (200mM 100ml)	GLN-B
Penisilin-Streptomisin	Capricorn Scientific (100x)	PS-B
Etil alkol (%96)	Sigma	Sigma
Tripsin-EDTA(%0,25 %0,1)	Capricorn Scientific	TRY-1B
DMEM High Glukoz	Capricorn Scientific	DMEM-HA
Ham's F12 with L-glutamin	Capricorn Scientific	HAM-12-A

MTT canlılık testi ve doz belirlenmesi için

Kimyasal madde	Marka	Katalog no
FBS	Capricorn Scientific	FBS-12B
PBS (pH: 7,4)	Sigma	P4417
L-Glutamin	Capricorn Scientific (200mM 100ml)	GLN-B
Penisilin-Streptomisin	Capricorn Scientific (100x)	PS-B
Etil alkol (%96)	Sigma	Sigma
Tripsin-EDTA(%0,25 %0,1)	Capricorn Scientific	TRY-1B
DMEM High Glukoz	Capricorn Scientific	DMEM-HA
Ham's F12 with L-glutamin	Capricorn Scientific	HAM-12-A
Thiazoly Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	Sigma	M56555-1G
CaCl ₂	Sigma-Aldrich	C 1016
MgCl ₂	Sigma-Aldrich	M 8266
Na ₂ SeO ₃	Sigma-Aldrich	214485
AlCl ₃	Sigma-Aldrich	7446

Hücre örneklerinin toplanması için

Kimyasal madde	Marka	Katalog no
FBS	Capricorn Scientific	FBS-12B
PBS (pH: 7,4)	Sigma	P4417
L-Glutamin	Capricorn Scientific (200mM 100ml)	GLN-B
Penisilin-Streptomisin	Capricorn Scientific (100x)	PS-B
Etil alkol (%96)	Sigma	Sigma
Tripsin-EDTA(%0,25 %0,1)	Capricorn Scientific	TRY-1B
DMEM High Glikoz	Capricorn Scientific	DMEM-HA

Biyokimsal analizler için

Kimyasal madde	Marka	Katalog no
Kaspaz 3 ELISA kit	Shangai LZ biotech Co., Ltd	YHB0311Ra
Kaspaz 8ELISA kit	Shangai LZ biotech Co., Ltd	YHB1249Ra

Kaspaz 9 ELISA kit	Shangai LZ biotech Co., Ltd	YHB0312Ra
M30 ELISA kit	Shangai LZ biotech Co., Ltd	M30 ELISA kit
8-OHdG ELISA kit	Elabscience	E-EL-0028

RNA izolasyonu için

Kimyasal madde	Marka	Katalog no
Trizol Reagent	Thermo-Scientific	1029608
PBS	Sigma	P4417-50TAB
Kloroform	Sigma	24216-2,5L,R
İzopropil Alkol	Merck	109634
Etil Alkol (%75,soğuk)	Merck	100986.2500
Diethylpyrocarbonate	Sigma	1609-47-8
DEPC'li su	%0,1 konsantrasyonda 100 ml steril distile su (dH ₂ O)'ya 0,1 ml DEPC eklendi. Bu solüsyon oda sıcaklığında 1 saat bekletildi, ardından otoklanıp (15 dakika, 100°C) soğutularak kullanıldı	

Agaroz jel elektroforezi için

<u>Kimyasal madde</u>	<u>Marka</u>	<u>Katalog no</u>
Borik asit	Vivantis	PR 0607
Tris baz	Vivantis	PR 0612
EDTA	Vivantis	PC 0706
10XTBE solüsyon (pH:7,5)	Tris baz (54 gr), borik asit (27,5) ve 20 ml EDTA (0,5 M) steril distile suda çözülerek 1 litreye tamamlanmıştır.	
Agaroz	Vivantis	PC 0701
% 1'lik agaroz	1 g agaroz, 100 ml 1XTBE içerisinde mikro dalga fırın yardımıyla eritilerek hazırlandı. İçerisine 2,5 µl Etidyum bromür karıştırıldı.	
Etidyum Bromür	İnvitrogen	15585-011
Brom fenol mavisi	Amresco	115-39-9

Komplementer DNA (cDNA) izolasyonu

Kimyasal madde	Marka	Katalog no
cDNA senetiz kiti	GeneAll hyper script first strand syntesis	601-005

Real time-PCR

Reaksiyon tamponu, enzim, dNTP, MgCl₂ karışım halinde Biotium marka Fast-Plus Eva Green master kit kullanılmıştır. Kitin içeriğinde Eva Green boyası ve enzim olarak Cheetah Taq DNA polimeraz bulunmaktadır. Kullanılan ekspresyon primerleri aşağıda tabloda yer almaktadır (Tablo 3).

Tablo 3. Ekspresyon analizinde kullanılan primerler

Primer Kaspaz -3 sıçan	F: ATGGCCCTGAAATACGAAGTC R: GTTCCACTGTCTGTCTCAATACC
Primer Kaspaz -8 sıçan	F: GAAAGCAATCTGTCCTTCCT R: ATGACCCTCTTCTCCATCTC
Primer Kaspaz -9 sıçan	F: GATCCAGAAGCTGTTACACC R: CTCCTACTTTCTGCTCCT
Kontrol Primer (GAPDH) sıçan	F:5'-AAGTCCCTCACCTCCCAAAG R: 5'-AAGCAATGCTGTCACCTTCCC
Primer Kaspaz -3 insan	F: AAGCGAATCAATGGACTCTG R: AAACATCACGCATCAATTCC
Primer Kaspaz -8 insan	F: GAAAGCAATCTGTCCTTCCT R: ATGACCCTCTTCTCCATCTC
Primer Kaspaz -9 insan	F: GGCTCTTCCTTTGTTTCATCTCC R: ATCACCAAATCCTCCAGAACCA
Kontrol Primer (GAPDH) insan	F: 5'-GCACCACACTTTCTACAATGAG R: 5'-GAGGCATACAGGGACAACAC

3.2. Yöntem

3.2.1. NaF ve mineral solüsyonlarının hazırlanması

Çalışmada uygulanacak uygun dozları ve çözünme ortamlarını belirlemek için NaF (Yang ve ark, 2011; Wei ve ark, 2014; He ve ark, 2015), MgCl₂ (Mirmalek ve ark., 2016, Bronckers ve ark., 2017), Na₂SeO₃ (Yang ve ark.,2013; Das ve ark., 2016), AlCl₃

(Lima ve ark., 2007; Lukyanenko ve ark., 2013) ve CaCl₂ (Schirmacher ve ark., 1996; Zhang ve ark., 2016) dozları referans alınarak stok solüsyonlar hazırlandı.

NaF'ın final konsantrasyonları 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM, 2000 µM, 5000 µM, 7500 µM, 10000 µM ve 20000 µM olacak şekilde her iki hücre serisinin kendi medyum ortamında hazırlandı.

MgCl₂ final konsantrasyonları; 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM, 1000 µM ve 2000 µM olacak şekilde her iki hücre serisi için kendi medyum ortamında hazırlandı.

Na₂SeO₃ final konsantrasyonları; 0,001 µM, 0,005 µM, 0,010 µM, 0,050 µM, 0,100 µM, 0,25 µM, 0,50 µM, 0,75 µM, 1 µM, 2 µM, ve 5 µM olacak şekilde her iki hücre serisi için kendi medyum ortamında hazırlandı.

AlCl₃ final konsantrasyonları; 1 µM, 2 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 200 µM ve 250 µM olacak şekilde her iki hücre serisi için kendi medyum ortamında hazırlandı.

CaCl₂ final konsantrasyonları; 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM, 2000 µM ve 5000 µM olacak şekilde her iki hücre serisi için kendi medyum ortamında hazırlandı.

3.2.2. Hücre kültürü

Renal hücreleri; 37°C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda, %10 FBS, %1 L-Glutamin ve %1 penisilin/streptomisin DMEM high glikoz besi yerinde çoğaltılmıştır. Osteoblast hücreleri; 37°C, %5CO₂ ve %95 nem içeren ortamda, %10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin 2 mM L-Glutamin içeren Ham's F12 besi yerinde çoğaltılmıştır.

3.2.3.Hücre pasajlama

Renal ve osteoblast hücreleri, hücre yoğunluğu flask içerisinde %70-80 sıklığa (confluency) ulaşınca pasajlanmıştır. Pasaj işlemi; Tripsin-EDTA (%0,25-%0,1) kullanılarak yapılmıştır. Pasajlama süreci basamakları özetle şu şekilde yapılmıştır. İçerisinde hücre bulunan ve %70-80 hücre yoğunluğuna ulaşan 25cm²'lik flaskın medyumunu pastör pipet yardımıyla atıldı. Flask iç yüzeyi steril PBS (pH: 7,4) (Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺ içermeyen) ile yıkandı ve PBS pastör pipet yardımıyla atıldı. Flask içine

mikropipet yardımıyla 250 µl Tripsin-EDTA bırakıldı. Tripsin-EDTA'nın flaskın tüm yüzeyine ulaşması için flask sağa sola hareket ettirilerek Tripsin-EDTA'nın dağılması sağlandı. Flask 37°C'de CO₂'li etüv içerisinde 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda yapışan hücreler Tripsin-EDTA içerisinde yüzmeye başlayınca üzerine Tripsin-EDTA miktarı kadar FBS içeren kendi medyumuyla tripsinasyon işlemi durduruldu. Ardından flask içerisindeki hücreler, 15ml'lik falkon tüpüne aktarıldı. Bu tüp 1500 rpm'de 5 dakika santrüfjü edildi. Santrifüj sonrasında 15ml'lik falkon tüpünün üst kısmı atıldı ve tüpün içerisine 2-3 ml kadar besiyeri eklendi. Bu karışım pastör pipet yardımıyla karıştırılarak hücrelerin birbirinden ayrılması sağlandı. Bu hücreler thoma lamı kullanılarak sayıldı ve ayırma oranına göre ihtiyaç duyulan miktardaki hücreler yeni flasklara aktarıldı. Bu pasajlama süreci, eşit sayıda hücre içeren deney grupları oluşturulurken de takip edilmiştir.

3.2.4.Sitotoksisite (MTT hücre canlılık) testi

NaF'ın renal ve osteoblast hücrelerindeki sitotoksik olarak etkisini saptamak ve mineraller (MgCl₂, Na₂SeO₃, AlCl₃, CaCl₂)'in renal ve osteoblast hücreleri üzerindeki olumlu etki yapacak uygun dozlarını belirlemek amacıyla MTT testi yapıldı. IC₅₀ ve uygun doz belirlenmesi yapıldı.

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler flask yüzeyini %80 oranında kapladıkları zaman, Tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırıldı. Santrifüj işlemi (1500 rpm, 5 dakika) sonrasında elde edilen hücreler thoma lamı yardımıyla sayıldı. Sayım sonrası 96 kuyucuklu kültür plate'lerinin her bir kuyucuğuna renal ve osteoblast hücreleri için 10.000 hücre ekildi. Hücreler 24 saat, 37°C ve CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, hücrelerin üzerindeki besi yeri alınarak farklı dozlarda ve hücre besi yeri kullanılarak hazırlanan NaF ve mineraller eklendi. Her bir doz için en az 4 kuyucuk kullanılmıştır.

Her bir dozu 4 kuyucuk olacak şekilde NaF ve minerallerin değerini belirlemek için, kuyu başına 100 µl medyum ortamında olmak üzere, farklı dozlarda NaF ve mineral eklendi ve 24 saat sonra her bir kuyucuğa içinde 10 µl MTT solüsyonu olan 100 µl hücre medyumları ilave edildi. Kültür kapları MTT boyasının suda çözünmeyen formazan kristalleri haline dönüştürülebilmesi için, 4 saat 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerinin çözülmesi

için, her bir kuyucuğa 100 µl MTT liziz solüsyonu eklendi ve formazan kristallerinin iyice çözünmesi için pipetaj yapıldı. Sonunda hücrelerin optik yoğunlukları ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutuldu. Elde edilen absorbans değerlerine göre NaF ve minerallerin IC₅₀ değerleri hem Microsoft Office Excel programı hem de Graphad Prism 7 programı kullanarak belirlenmiştir. Hücre canlılık yüzdesi belirlenirken kontrol grubu absorbansı yalnızca MTT çözücü solüsyon içeren hücre ekimi yapılmamış kuyucukların absorbansı çıkarılmış ve kontrol grubunun canlılığı %100 olarak değerlendirilmiştir.

Yukarıda yapılan doz belirleme işleminden sonra NaF IC₅₀, MgCl₂, Na₂SeO₃, AlCl₃ ve CaCl₂'nin uygun dozları belirlendi. NaF'ın IC₅₀ değeri ve minerallerin hücre serileri üzerinde olumlu etki yapacak dozları belirlendikten sonra NaF'ın 100 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM, 2000 µM, 5000 µM, 7500 µM ve 10000 µM dozları ile MgCl₂ 100 µM, Na₂SeO₃ 0,005 µM, AlCl₃ 50 µM ve CaCl₂ 500 µM dozları ile birlikte ve tek başına verildi. Yukarıda yazılan hücre sayısı ve izlenen yol aynı şekilde takip edilerek MTT canlılık testi yapıldı. Minerallerin (MgCl₂, Na₂SeO₃, AlCl₃, CaCl₂) NaF'ın tüm dozları (100 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM, 2000 µM, 5000 µM, 7500 µM ve 10000 µM) üzerine olan etkileri belirlendi.

3.2.5. Biyokimyasal analizler için doz gruplarının hazırlanması

Çalışmada kullanılacak gruplar renal hücresi için NaF (6000 µM), osteoblast için NaF (5000 µM) ve her iki hücre serisi için MgCl₂ (100 µM), Na₂SeO₃ (0,005 µM), AlCl₃ (50 µM) ve CaCl₂ (500 µM) dozda deneme grupları ve bu gruplar arasında çaprazlama olarak hazırlandı (Tablo 4 ve 5).

Tablo 4. Renal hücreler için uygulanan doz gruplarının miktarları

GRUPLAR	UYGULAMA
Kontrol	Kontrol grubu 1 grup olarak ayrıldı.
NaF	6000 $\mu\text{M/L}$ NaF uygulandı.
MgCl₂	100 $\mu\text{M/L}$ MgCl ₂ uygulandı
Na₂SeO₃	0,005 $\mu\text{M/L}$ Na ₂ SeO ₃ uygulandı.
AlCl₃	50 $\mu\text{M/L}$ AlCl ₃ uygulandı.
CaCl₂	500 $\mu\text{M/L}$ CaCl ₂ uygulandı.
NaF+ MgCl₂	6000 $\mu\text{M/L}$ NaF+ 100 μM MgCl ₂ uygulandı.
NaF+ Na₂SeO₃	6000 $\mu\text{M/L}$ NaF+ 0,005 μM Na ₂ SeO ₃ uygulandı.
NaF+ AlCl₃	6000 $\mu\text{M/L}$ NaF+ 50 μM AlCl ₃ uygulandı.
NaF+ CaCl₂	6000 $\mu\text{M/L}$ NaF+ 500 μM CaCl ₂ uygulandı.

Tablo 5. Osteoblast hücreler için uygulanan doz gruplarının miktarları

GRUPLAR	UYGULAMA
Kontrol	Kontrol grubu 1 grup olarak ayrıldı.
NaF	5000 $\mu\text{M/L}$ NaF uygulandı.
MgCl₂	100 $\mu\text{M/L}$ MgCl ₂ uygulandı
Na₂SeO₃	0,005 $\mu\text{M/L}$ Na ₂ SeO ₃ uygulandı.
AlCl₃	50 $\mu\text{M/L}$ AlCl ₃ uygulandı.
CaCl₂	500 $\mu\text{M/L}$ CaCl ₂ uygulandı.
NaF+ MgCl₂	5000 $\mu\text{M/L}$ NaF+ 100 μM MgCl ₂ uygulandı.
NaF+ Na₂SeO₃	5000 $\mu\text{M/L}$ NaF+ 0,005 μM Na ₂ SeO ₃ uygulandı.
NaF+ AlCl₃	5000 $\mu\text{M/L}$ NaF+ 50 μM AlCl ₃ uygulandı.
NaF+ CaCl₂	5000 $\mu\text{M/L}$ NaF+ 500 μM CaCl ₂ uygulandı.

3.2.6. Biyokimyasal analiz için numunelerin hazırlanması

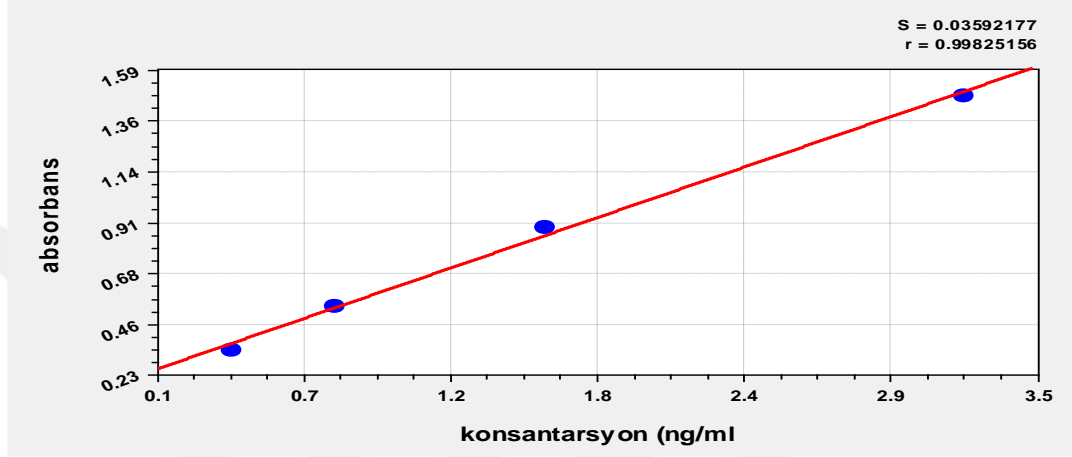
Uygun doz belirlendikten sonra, her iki hücre serisi için 25 cm² flaklara, flask başına 10⁶ hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin yapışması için 24 saat beklendikten sonra üzerindeki medyum alındı. NRK-52E hücreleri için NaF 6000 µM, osteoblast hücreleri için NaF 5000 µM ve free serum medyumdaki konsantrasyonları ile MgCl₂ 100 µM, Na₂SeO₃ 0,005 µM, AlCl₃ 50 µM ve CaCl₂ 500 µM serum free medyum konsantrasyonları, bu mineralleri NaF'ın dozlarıyla olan kombinasyonları yapılarak ve her iki hücre serisinin free serum medyum kontrol grupları olmak üzere toplamda 20 flask olacak şekilde dozlar uygulandı (Tablo 4 ve 5). Daha sonra 24 saat inkübe edildi ve kuyucukların üzerindeki medyumlar kriyoviyal tüplere alındı.

Hücreleri kaldırmak için 200 µl tripsin EDTA uygulandı ve 3-5 dakika, 37°C 'de inkübe edildi. Hücreler kalktıktan sonra tripsin EDTA FBS'li medyum ile bloke edilerek durduruldu. Hücreler 15 ml'lik falkon tüplerine alındı ve 1500 rpm 5 dk santrifüj edildi. Toplanan süpernatant atıldı ve daha önce kriyoviyal tüplere alınan medyuma hücre peletinin üzerine eklenerek vortekslendi. Vorteksten sonra falkonlardaki bütün süspansiyonlar daha önce toplanan kriyoviyal tüplerin üzerine alındı. Kriyoviyal tüpler hücreleri liziz etmek için -80 °C 25 dk ve 37 °C de 10 dk dondur-çöz bekletildi. Bu işlem 3 defa tekrarlandı. Liziz aşamasında sonra süspansiyon falkon tüplere alınarak 3000 rpm 20 dk santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve pelet atıldı.

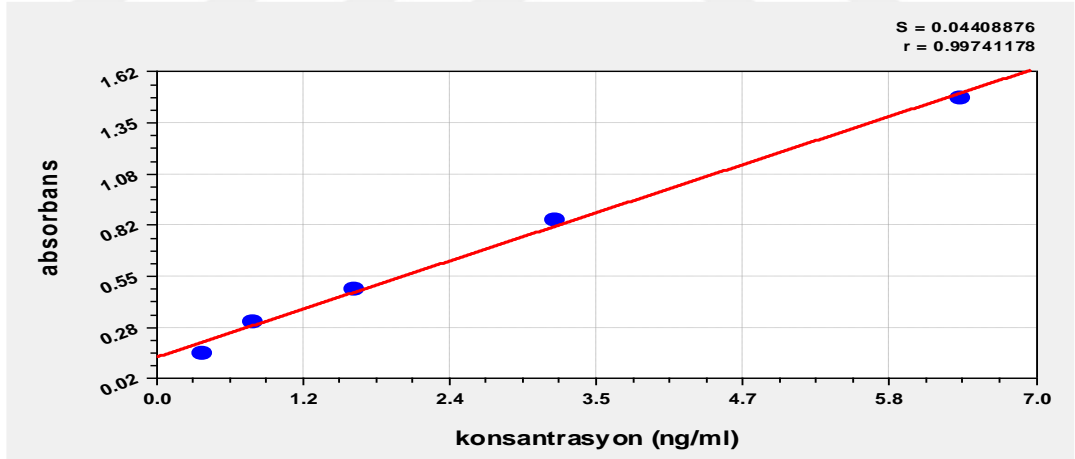
3.2.7. Biyokimyasal analizler

Kaspaz-3 analiz kiti: Bu kit kolometrik ölçüm esasına dayanarak spesifik kaspaz 3 apoptoz protein markırlarının çift biotinli antibadi arasına sıkıştırması teknolojisine dayanan enzim bağımlı immün sorbent assay (ELISA)'i kullanmaktadır. Kaspaz antibadi ile tek tabaka olarak 96 kuyucuklu halinde hazırlanmış plaklaraiki kuyucuk kör olarak boş bırakıldı. Kalan kuyucuklara 50 µl biotin antibadi içeren standart ve 40µl örneklerden konuldu. Sadece örneklerin üzerine 10µl kaspaz 3 antibadi ilave edildi. Kör hariç bütün kuyucuklara 50µl streptavidin-HRP eklenildi. 37°C'de 60 dakika etüvde inkübasyona bırakıldı. Kör dahil bütün kuyucuklar yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa kromojen A ve B solüsyonlarından 50µl ilave edildi.

Renk değişikliği için 37 °C’de 10 dakika etüvde inkübasyona bırakıldı. Her bir kuyucuğa 50µl stop solüsyonu ilave dildi. Kör kuyucuk sıfır kabul edilerek her bir kuyucuk 450 nm dalga boyunda elize okuyucuda okundu. Kit protokolüne göre standart absorbanlarına karşılık gelen kaspaz-3 miktarları esas alınarak standart grafiği curve expert kullanılarak oluşturuldu. Örneklerin kaspaz-3 miktarları standart grafiğine göre hesaplandı (Şekil 4 ve 5).



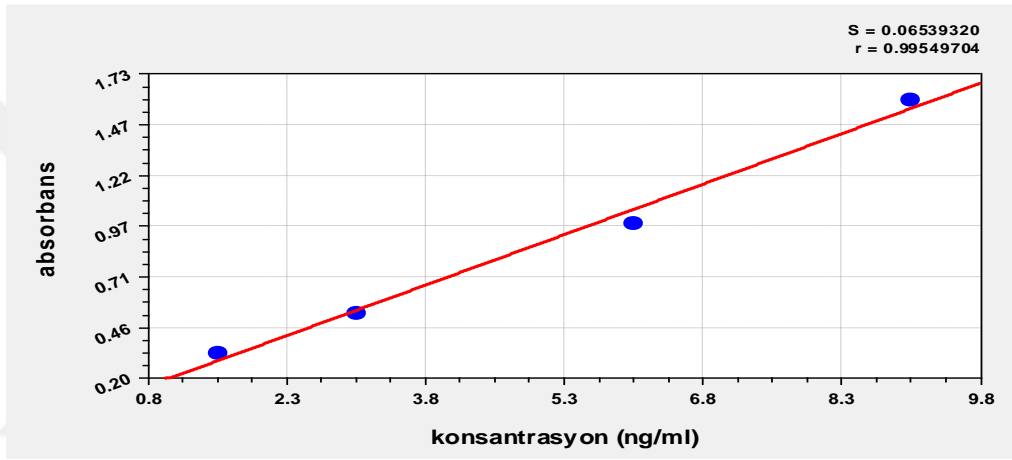
Şekil 4. NRK-52E hücre hattına ait kaspaz-3 standart grafiği.



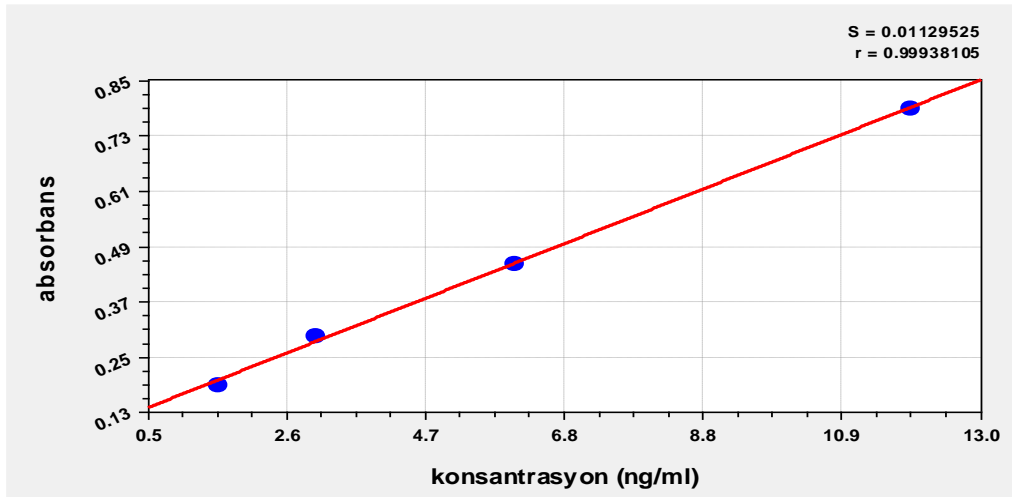
Şekil 5. hFOB 1.19 hücre hattına ait kaspaz-3 standart grafiği

Kaspaz-8 analiz kiti: Bu kit kolometrik ölçüm esasına dayanarak spesifik kaspaz-8 apoptoz protein markırlarının çift biotinli antibodi arasına sıkıştırması teknolojisine dayanan enzim bağımlı ELISA kullanmaktadır. Kaspaz-8 antibadi ile tek tabaka olarak 96 kuyucuklu halinde hazırlanmış plaklara iki kuyucuk kör olarak boş bırakıldı. Kalan kuyucuklara 50 µl biotin antibadi içeren standart ve 40 µl örneklerden konuldu. Sadece örneklerin üzerine 10 µl kaspaz-8 antibadi ilave edildi. Kör hariç bütün

kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklenildi. 37 °C’de 60 dakika etüvde inkübasyona bırakıldı. Blank dahil bütün kuyucuklar yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa kromojen A ve B solüsyonlarından 50 µl ilave edildi. Renk değişikliği için 37 °C’de 10 dakika etüvde inkübasyona bırakıldı. Her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu ilave edildi. Kör kuyucuk sıfır kabul edilerek her bir kuyucuk 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okundu. Kit protokolüne göre standart absorbanslarına karşılık gelen kaspaz-8 miktarları esas alınarak standart grafiği curve expert programı kullanılarak oluşturuldu. Örneklerin kaspaz-8 miktarları standart grafiğine göre hesaplandı (Şekil 6 ve 7).

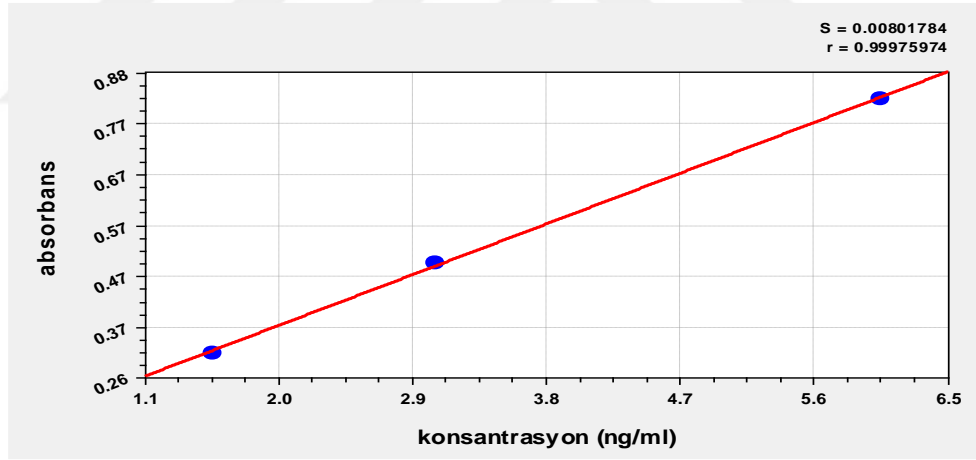


Şekil 6. NRK-52E hücre hattına ait kaspaz-8 standart grafiği.

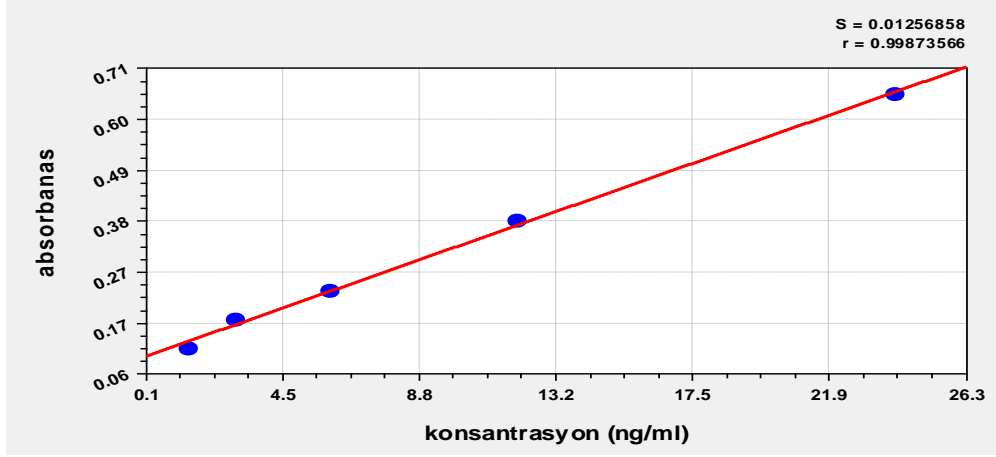


Şekil 7. hFOB 1.19 hücre hattına ait kaspaz-8 standart grafiği.

Kaspaz-9 analiz kiti: Bu kit kolometrik ölçüm esasına dayanarak spesifik kaspaz-9 apoptoz protein markırlarının çift biotinli antibody arasına sıkıştırması teknolojisine dayanan enzim bağımlı ELISA kullanmaktadır. Kaspaz-9 antibadi ile tek tabaka olarak kaplanmış 96'lık kuyucuk halinde hazırlanmış plaklara iki kuyucuk kör olarak boş bırakıldı. Kalan kuyucuklara 50 µl biotin antibadi içeren standart ve 40 µl örneklerden konuldu. Sadece örneklerin üzerine 10 µl kaspaz-9 antibadi ilave edildi. Kör hariç bütün kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklenildi. 37 °C'de 60 dakika etüvde inkübasyona bırakıldı. Kör dahil bütün kuyucuklar yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa kromojen A ve B solüsyonlarından 50 µl ilave edildi. Renk değişikliği için 37 °C'de 10 dakika etüvde inkübasyona bırakıldı. Her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu ilave dildi. Kör kuyucuk sıfır kabul edilerek her bir kuyucuk 450 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda okundu. Kit protokolüne göre standart absorbanlarına karşılık gelen kaspaz-9 miktarları esas alınarak standart grafiği curve expert kullanılarak oluşturuldu. Örneklerin kaspaz-9 miktarları standart grafiğine göre hesaplandı (Şekil 8 ve 9).

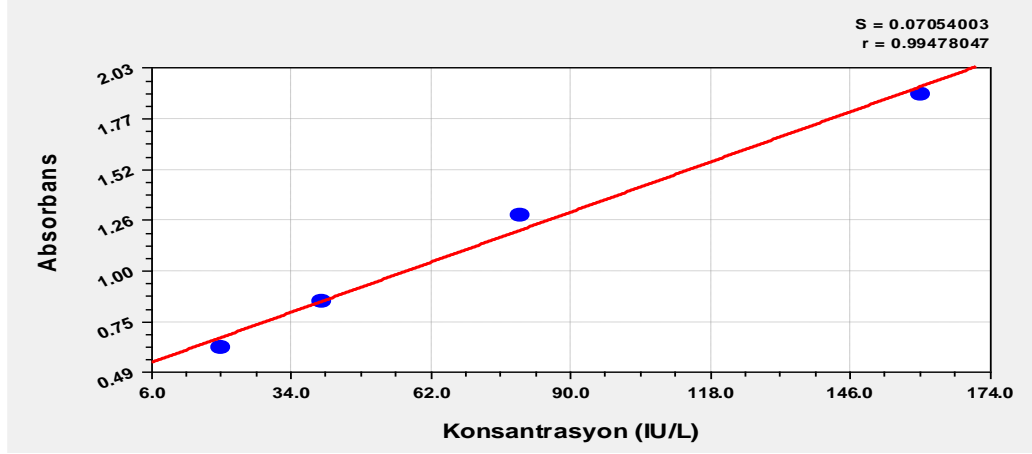


Şekil 8. NRK-52E hücre hattına ait kaspaz-9 standart grafiği.

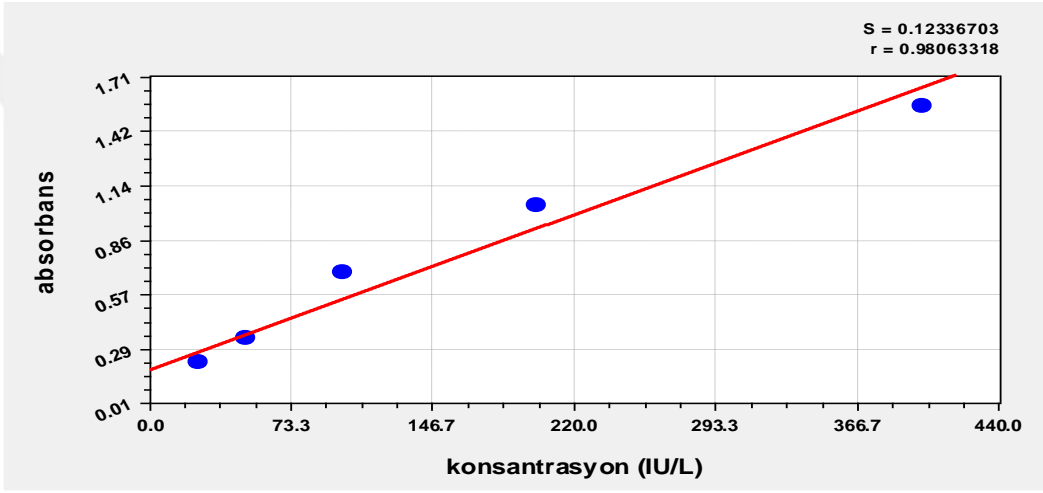


Şekil 9. hFOB 1.19 hücre hattına ait kaspaz-9 standart grafiği.

M30 analiz kiti: Bu kit kolometrik ölçüm esasına dayanarak spesifik M30 apoptoz protein markırlarının çift biotinli antibody arasına sıkıştırması teknolojisine dayanan enzim bağımlı ELISA kullanmaktadır. Kaspaz antibadi ile tek tabaka olarak 96'lık kuyucuk halinde hazırlanmış plaklar iki kuyucuk kör olarak boş bırakıldı. Kalan kuyucuklara 50 µl biotin antibadi içeren standart ve 40 µl örneklerden konuldu. Sadece örneklerin üzerine 10 µl M30 antibadi ilave edildi. Kör hariç bütün kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP eklendi. 37 °C'de 60 dakika etüvde inkübasyona bırakıldı. Kör dahil bütün kuyucuklar yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa kromojen A ve B solüsyonlarından 50 µl ilave edildi. Renk değişikliği için 37 °C'de 10 dakika etüvde inkübasyona bırakıldı. Her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu ilave edildi. Kör kuyucuk sıfır kabul edilerek her bir kuyucuk 450 nm dalga boyunda elize okuyucuda okundu. Kit protokolüne göre standart absorbanalarına karşılık gelen M30 miktarları esas alınarak standart grafiği curve expert programı kullanılarak oluşturuldu. Örneklerin M30 miktarları standart grafiğine göre hesaplandı (Şekil 10 ve 11).



Şekil 10. NRK-52E hücre hattına ait M30 standart grafiği

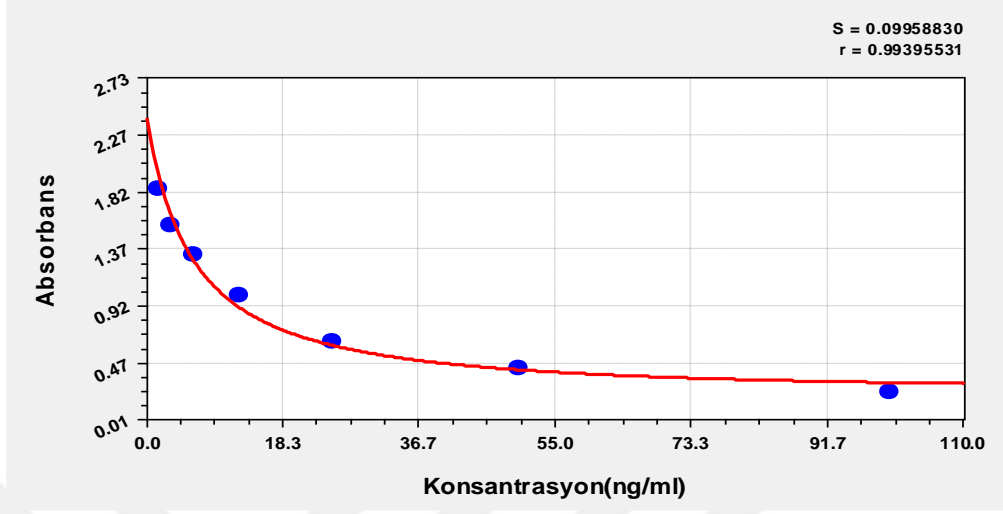


Şekil 11. hFOB 1.19 hücre hattına ait M30 standart grafiği

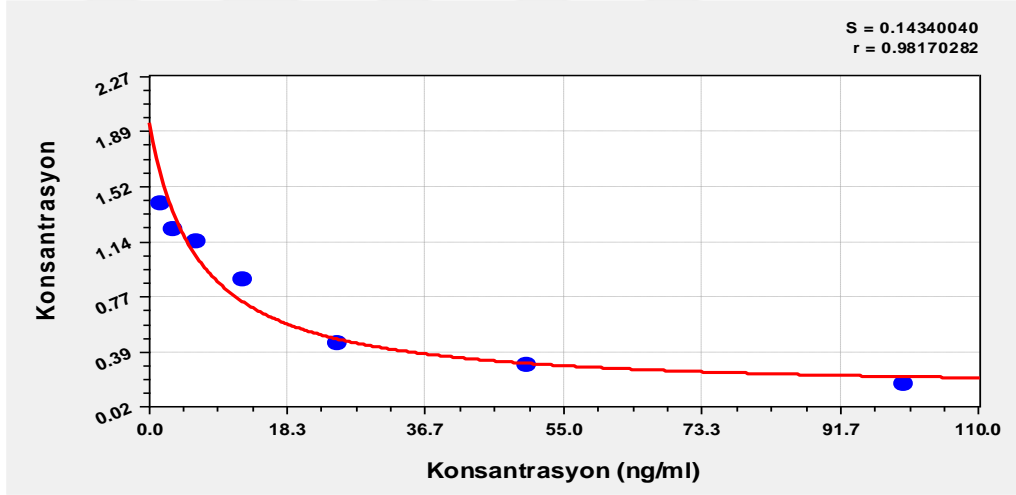
8-OHdG analiz kiti: Hücrelerin 8-OHdG düzeylerinin belirlenmesi için DNA damage ELISA kit (Catalog Number: E-EL-0028) kullanılarak ELISA'da tayin edildi. Çalışma basamakları aşağıda özetlendi:

Hazırlanan numune ve standartlar belirlenen kuyucuklara 50 µl olarak eklendi. Hızlı bir şekilde her bir kuyucuğa 50 µl biyotinlenmiş antikor eklendi. 37 °C' de 45 dk etüvde inkübe edildi. Kuyucukların üstü atıldı ve 3 defa yıkama solüsyonuyla yıkandı. 100 µl HRP konjugat eklendi ve platenin üzeri örtülerek 37 °C'de etüvde 30 dk inkübe edildi. Kuyucukların üstü atıldı ve 5 defa yıkama solüsyonuyla yıkandı. Her bir kuyucuğa 90 µl substrat reagent eklendi. Plak 15 dk 37 °C'de etüvde inkübe edildi. Her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi ve absorbansı 450 nm'de ELISA okuyucuda ölçüldü. 8-OHdG standartlarının optik dansitelerine uygun standart grafiği curve expert

programı kullanılarak oluşturuldu. Bu eğri formülüne göre örneklerdeki 8-OHdG yoğunluğu belirlendi (Şekil 12 ve 13).



Şekil 12. NRK-52E hücre hattına ait 8-HOdG standart grafiği.



Şekil 13. hFOB 1.19 hücre hattına ait 8-OHdG standart grafiği.

3.2.8. RNA izolasyonu

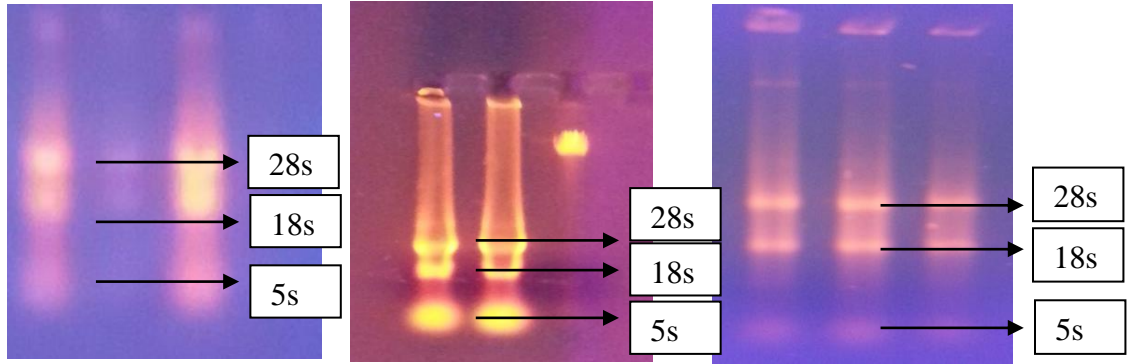
Renal ve osteoblast hücreleri, hücre yoğunluğu flask içerisinde %70-80 sıklığa (confluency) ulaşıncaya kadar önce belirlenen her bir hücre seri için kontrol, NaF, NaF+ mineral ($MgCl_2$, Na_2SeO_3 , $AlCl_3$, $CaCl_2$) kombinasyonları ve sadece mineral ($MgCl_2$, Na_2SeO_3 , $AlCl_3$, $CaCl_2$) dozları uygulanan her bir hücre serisi için 10 adet $25cm^2$ flasklardaki hücreler 12 saat bekledikten sonra daha önceki aşamalarda olduğu gibi tripsinasyon yöntemiyle toplandı, sonra aşağıdaki protokol izlenerek RNA izolasyonu yapılmıştır.

Bu basamaktan sonraki işlemler aksi belirtilmedikçe buz üzerinde devam edilir. Santrifüj edilen hücrelerin üzerindeki medyum pipet yardımıyla atılıp alta kalan hücre lizati üzerine soğuk 1 ml PBS (fosfat buffer solüsyon) eklenerek hücreler mikropipet yardımıyla iyice süspanse edildi. Bu karışım 1.5 ml'lik yeni steril ependorf bir tüpe aktarıldı. Hücre süspansiyonu 300 x g de 5 dakika (dk) santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpün üstü pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Tüpe 1 ml soğuk trizol reagent ilave edilerek hücre lizati pipet yardımıyla iyice homojenize edildi. Bu karışım 5 dk oda sıcaklığında nükleproteinlerin kompleksinin tamamen parçalanması için bekletildi. Bu aşamadan sonra numuneler 3500 rpm 10 dk santrifüj edildi. Üste kalan supernatant kısmı steril 1.5 ml'lik yeni ependorf bir tüpe aktarıldı. Pelet kısmı atıldı.

Yeni tüpe aktarılan numunelerin üzerine her bir tüpe 0.2 ml soğuk kloroform ilave edilerek 15 saniye (sn) şiddetli bir şekilde vortekslendi ve 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra numuneler 12000 x g'den fazla olmayacak şekilde 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj aşaması sonrasında karışım üçfazlı bir yapı halini almakta; alta kloroformlu faz, ortada hafif beyazımsı interfaz ve en üste RNA'nın bulunduğu şeffaf faz. Üste kalan şeffaf faz mikropipet yardımıyla dikkatlice alınarak temiz steril bir 1,5 ml ependorf tüpe aktarıldı. RNA separasyon aşaması için yeni bir tüpe aktarılan üst faz 0,5 ml izopropil alkolle pipet yardımıyla iyice karıştırıldı. 10 dk 15-30 °C'de inkübe edildi ve 12000 x g'den fazla olmayacak şekilde 10 dk 2- 4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpün dibinde jel benzeri bir pelet oluşmakta. Tüpün üstü tamamen atıldıktan sonra jel benzeri pelet olan RNA 1 ml %75'lik etil alkol ile vortekslenerek yıkanır. 7500 x g'den fazla olmayacak şekilde 5 dk 2-8 °C'de santrifüj edilir. Bu yıkama işlemi iki defa tekrarlanır ve santrifüj edilerek üstü atılarak pelet hücre kültürü laminer kabinde 12- 15 dk tüpün ağzı açık bırakılarak kurumaya alındı. Kuruma işlemi takiben RNA 30-50 µl DEPC su ile çözüldü ve agaroz jelde yürütmek için 5-7 µl RNA alındı geri kalanı cDNA aşaması yapılmak üzere hemen -80 °C'ye kaldırıldı.

RNA'nın kalitatif değerlendirilmesi:

Elde edilen RNA'dan ayrılan 3-5 µl RNA etidyum bromür eklenmiş %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Yürütme sonrasında 28S, 18S ve 5S RNA görüntüsü net şekilde gözlenmiştir (Şekil 14).



Şekil 14. Farklı örneklere ait total RNA eldesine ait 3 adet agaroz jel görüntüsü

RNA'nın kantitasyon değerlendirilmesi:

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

RNA miktarı şöyle hesaplandı:

260 nm ve 280 nm' deki değerler arasındaki oran (260/280 OD) belirlenerek RNA'nın saflığı belirlendi.

$RNA (\mu g/ml) = 260 \text{ nm'deki OD} \times \text{sulandırma katsayısı} \times \text{oranı} \times \text{katsayı}$
(40) şeklinde hesaplama yapılarak total RNA miktarı hesaplandı.

3.2.9. Komplementer DNA (cDNA) izolasyonu

RNA elde edilen hücrelerden real time-PCR'da ekspresyon analizi için kullanılmak amacıyla cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bunun için GeneAll Hyper Script First Strand Synthesis kit (Katalog: 601-005) cDNA eldesi için kullanıldı. Bu kitin önerdiği protokol uygulanarak ortalama 100 nanogram (ng) RNA'dan cDNA elde edildi.

Nükleaz free tüp içerisine 1 µl primer (0,5 µl oligo dT + 0,5 µl random heksamer) eklendi. Her bir örnek için 100 ng içeren RNA miktarı eklendi. Reaktifler nükleaz free su ile 14 µl'ye tamamlandı. 200 µl'lik ependorf tüp içerisine sırasıyla dH₂O, heksamer ve RNA konmuştur. Bu karışım önce denatürasyon süresi için ısıtıcı blokta 65°C'de 5 dk bekletildi. Burada sekonder yapılanma gösterebilen RNA'ların

açılması kolaylaştırıldı. En az 1 dk buz üzerinde bekletildi. Tüp içerisine 2 µl 10x revers transkriptaz (RTaz) buffer 0,1 M 2 µl DTT eklendi, 5 saniye santrifüj edildi. 1 µl ters transkriptaz enzimi ve 1 µl Rnaz eklendi. 55 °C 60 dakika ve 85 °C 5 dakika inkübe edildi. Buza alındı ve -20 °C de real time-PCR aşamasına kadar saklandı.

3.2.10. Real time-PCR

Real time-PCR biotium fast-plus evagreen master kit kullanılmıştır. Reaksiyon içerikleri hem hedef hem de kontrol geni (housekeeping) için aynıdır. Real time-PCR yöntemi aşağıdaki şekilde özetlenmiştir.

Tablo 6. Real time-PCR için reaksiyon içeriği

Reaksiyon içeriği	Bir örnek için	Reaksiyon döngüsü
Tampon (2X)	10 µl	* 95°C 5' denatürasyon
Primer (Kaspaz-3, 8, 9 veya GAPDH)	Forward: 0.5 µl Reverse : 0.5µl	* 95°C 15" * 57°C 90" (gene göre 40 döngüdeğişkenlik gösterdi) * 72°C 60"
dH ₂ O	8.4 µl	Melting Curve
cDNA	0.6 µl	Ramp: 50-99 (1'er derece artış)
Toplam	20 µl	90 °C 5"

Kontrol geni olarak gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GAPDH) her iki hücre serisi içinde kullanıldı. Her bir örnek dört bağımsız tekrar ile tekrarlandı. Bir ct (cycle treshold) amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcı itibariyle belirlendi. Kontrol grubunun ct değerlerinin farklılığı ve tekrarlanan gruplar, uygun ekspresyonun belirlenmesinde kullanıldı. Genler olan kaspaz-9, 8 ve 3'ün ürünleri $\Delta\Delta C_t$ ve $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri ile belirlendi. Gruplar arasındaki farklılık kontrol (GAPDH) ekspresyonun artış-azalış kat (fold changes) sayısı ile karşılaştırılıp değerlendirildi.

3.3. İstatistik Analiz

Üzerinde durulan özellikler için tanımlayıcı istatistikler; medyan, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değer olarak ifade edildi. Bu özellikler

bakımından gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemek amacıyla Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Farklı grupları belirlemede, Dunnet çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Hesaplamalarda, istatistik anlamlılık düzeyi %5 olarak alındı ve hesaplamalar için SPSS (ver: 13) istatistik paket programı kullanıldı.



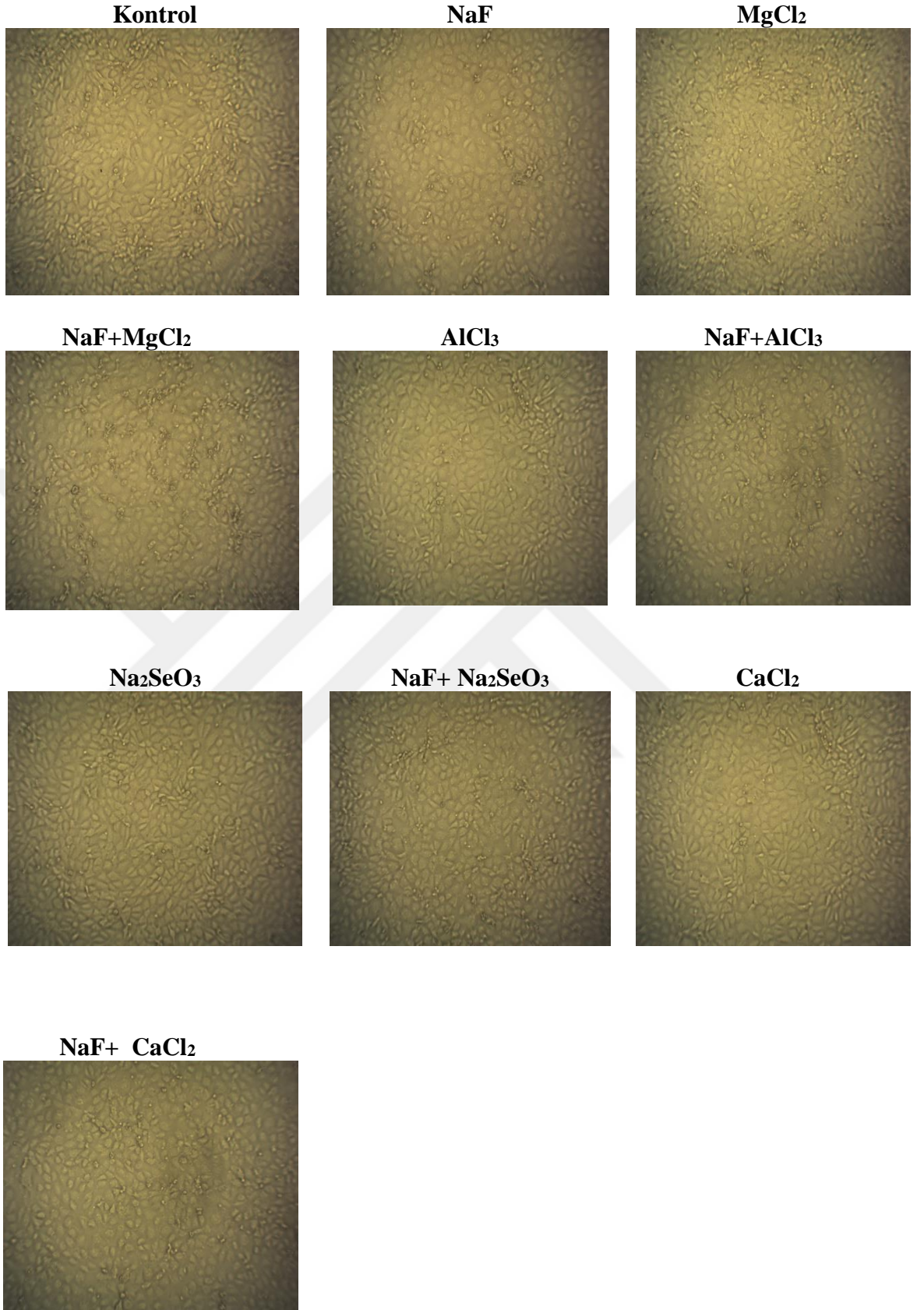
4. BULGULAR

4.1. Sitotoksisite Analizi ve Hücre Görüntüleri

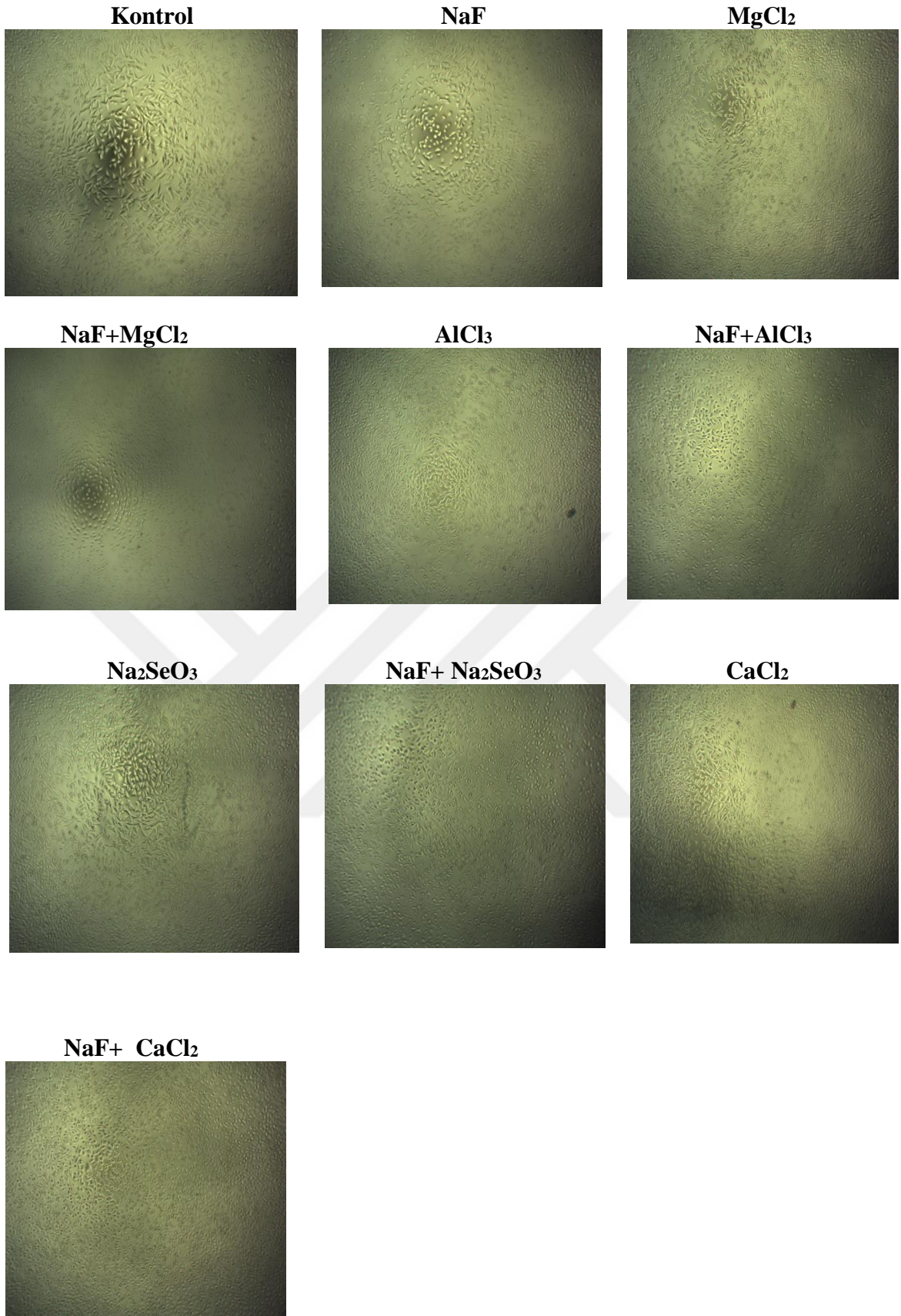
MTT sonuçlarına göre IC₅₀ değeri hFOB 1.19 hücre serisi için 5000 µM, NRK-52E hücreleri için 6000 µM belirlenmiştir. NaF uygulamalarını içeren tüm deneylerde (ELISA, real time-PCR) bu dozlar uygulanarak yapılmıştır. Minerallere ait dozlar belirlenirken IC₅₀ değeri yerine her bir mineral için hücre gruplarında proliferasyonun tetiklendiği en faydalı doz belirlenmiştir. Buna göre, MgCl₂ 100 µM, Na₂SeO₃ 0,005 µM, AlCl₃ 50 µM ve CaCl₂ 500 µM olarak belirlenmiştir. Her bir mineralin NaF ile kombinasyon uygulamasında bu dozlar dikkate alınarak uygulama yapılmıştır.

Hücrelere maddelerin kombinasyon uygulamalarında her bir madde ayrı ayrı değil aynı anda birlikte kombine edilerek uygulanmıştır. Bunun nedeni, minerallerin NaF ile sağanan florozis etki mekanizmasına ve ilgili sürece olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Amacımız, florozis sonrası minerallerin tedavi etkisi değil minerallerin florozis sürecine olan olası inhibisyon ve/veya olası aktivasyon tetiklenmesinin akut olarak saptanmasıdır.

Aşağıda, NaF'ın ve her bir mineralin IC₅₀ değerlerine ait dozları uygulandıktan ve IC₅₀ saptama süresi kadar inkübe edildikten sonraki NRK-52E hücrelerine ait gruptaki hücreler x4, hFOB 1.19 hücrelerine ait gruptaki hücreler x10 büyütülerek görüntüleri alındı. NaF, NaF+mineral ve mineral dozları uygulandıktan sonraki hücrelerin toplanmasından hemen önce hücrelere ait görüntüler aşağıda görüntüleri verilmiştir (Şekil 15 ve 16).



Şekil 15. NRK-52E hücre hattında çalışma gruplarına ait örnek görüntüler

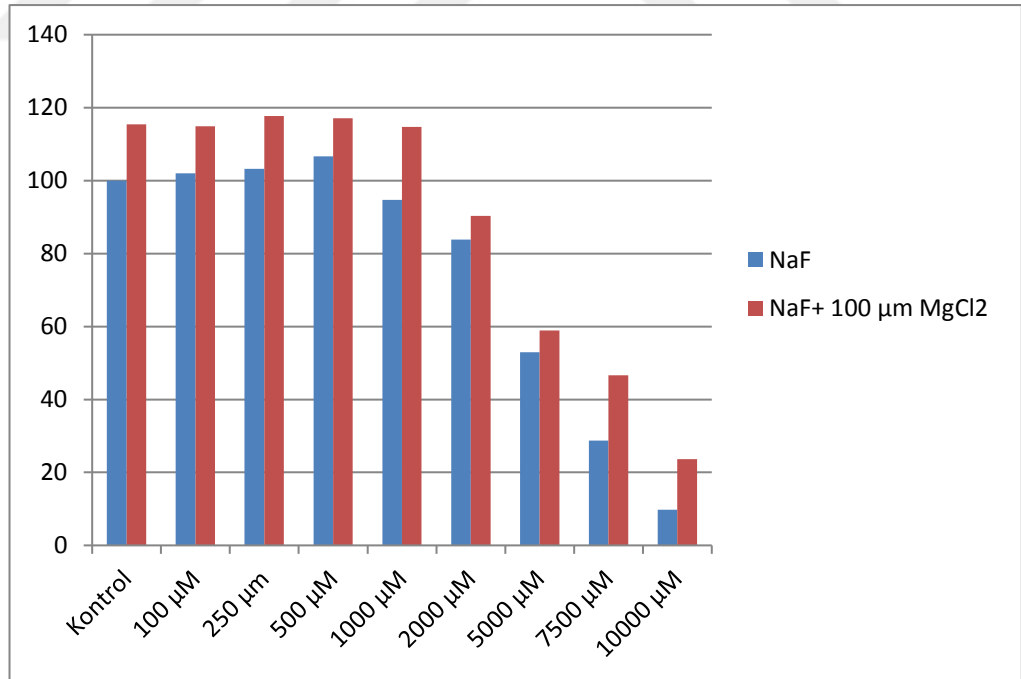


Şekil 16. hFOB hücre hattında çalışma gruplarına ait örnek görüntüler

Tablo 7. NRK-52E hücre hattında MTT % canlılık sonuçları

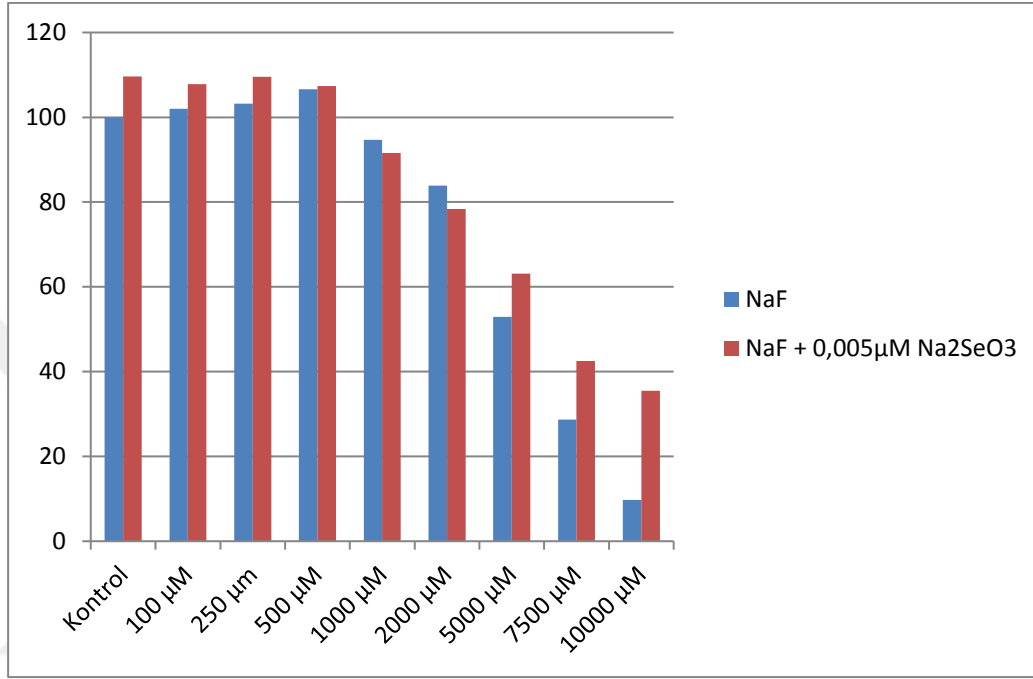
		MgCl ₂	Na ₂ SeO ₃	AlCl ₃	CaCl ₂
Kontrol	100	115,40	109,64	106,64	101,03
NaF (100µM)	101,99	114,93	107,82	125,39	110,16
NaF (250µM)	103,19	117,72	109,57	106,91	112,65
NaF (500µM)	106,64	117,05	107,38	103,49	99,31
NaF (1000µM)	94,70	114,71	91,60	121,28	90,30
NaF (2000µM)	83,85	90,34	78,39	103,02	76,00
NaF (5000µM)	52,96	58,94	63,15	74,57	58,83
NaF (7500µM)	28,72	46,61	42,50	70,95	56,29
NaF (10000µM)	9,77	23,66	35,49	41,15	41,93

Çalışma dozu olarak seçilen NaF konsantrasyonlarında (100 µM, 250 µM, 500 µM, 1000 µM, 2000 µM, 5000 µM, 7500 µM ve 10000 µM) oluşan hücre ölümü üzerinde mineral uygulanmasından sonra, hücre canlılığında en yüksek artış AlCl₃ grubunda tespit edildi.



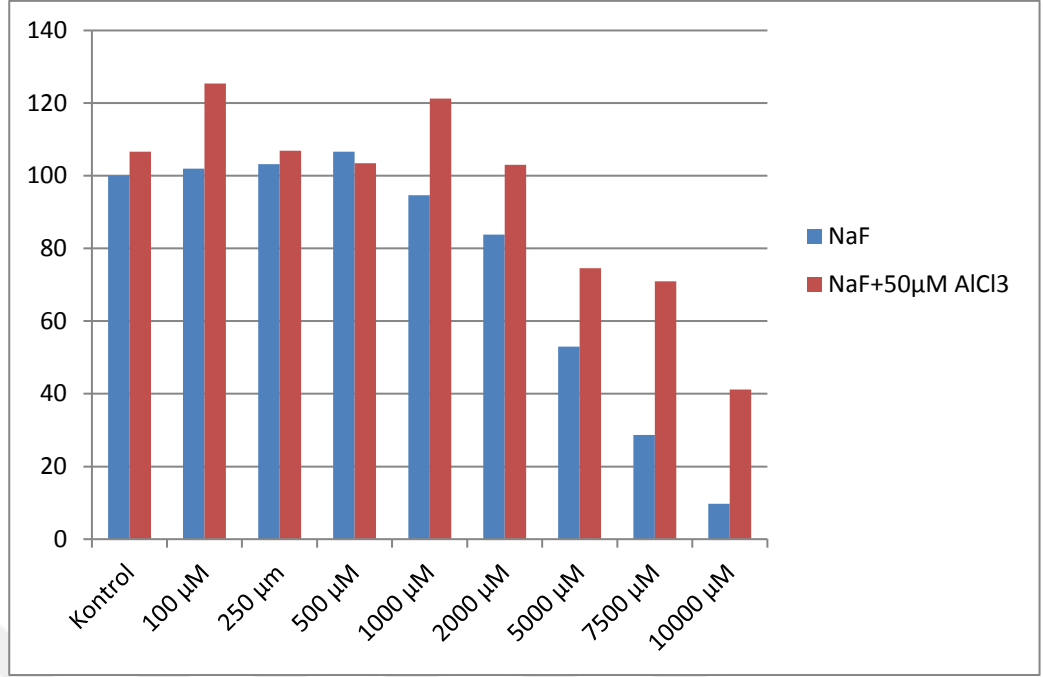
Şekil 17. NRK-52E hücre hattına ait NaF, NaF+100 µM MgCl₂ MTT grafiği

6000 μM NaF uygulanan NRK-52E hücre serileri 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı kontrole göre %52.9 olarak saptanırken 6000 μM NaF ile birlikte 100 μM MgCl_2 uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %58.9 olarak saptanmıştır. 100 μM MgCl_2 uygulamasının NaF toksisitesini 24 saat için %6 oranında inhibe ettiği saptanmıştır.



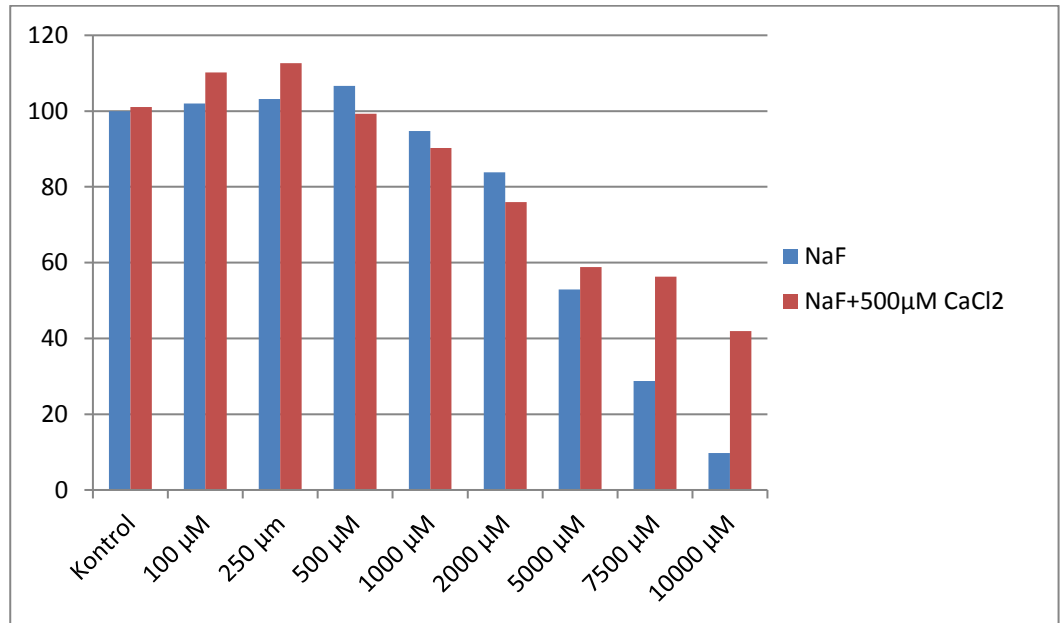
Şekil18. NRK-52E hücre hattına ait NaF, NaF+0,005 μM Na_2SeO_3 MTT grafiği

6000 μM NaF uygulanan NRK-52E hücre serileri 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı kontrole göre %52.9 olarak saptanırken 6000 μM NaF ile birlikte 0.005 μM Na_2SeO_3 uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %63.1 olarak saptanmıştır. 0.005 μM Na_2SeO_3 uygulamasının NaF toksisitesini 24 saat için %10.2 oranında inhibe ettiği saptanmıştır.



Şekil 19. NRK-52E hücre hattına ait NaF, NaF+50 μM AlCl₃ MTT grafiği

6000 μM NaF uygulanan NRK-52E hücre serileri 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı kontrole göre %52.9 olarak saptanırken 6000 μM NaF ile birlikte 50 μM AlCl₃ uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %74,5 olarak saptanmıştır. 50 μM AlCl₃ uygulamasının NaF toksisitesini 24 saat için %21.6 oranında inhibe ettiği saptanmıştır.



Şekil 20. NRK-52E hücre hattına ait NaF, NaF+500 μM CaCl₂ MTT grafiği

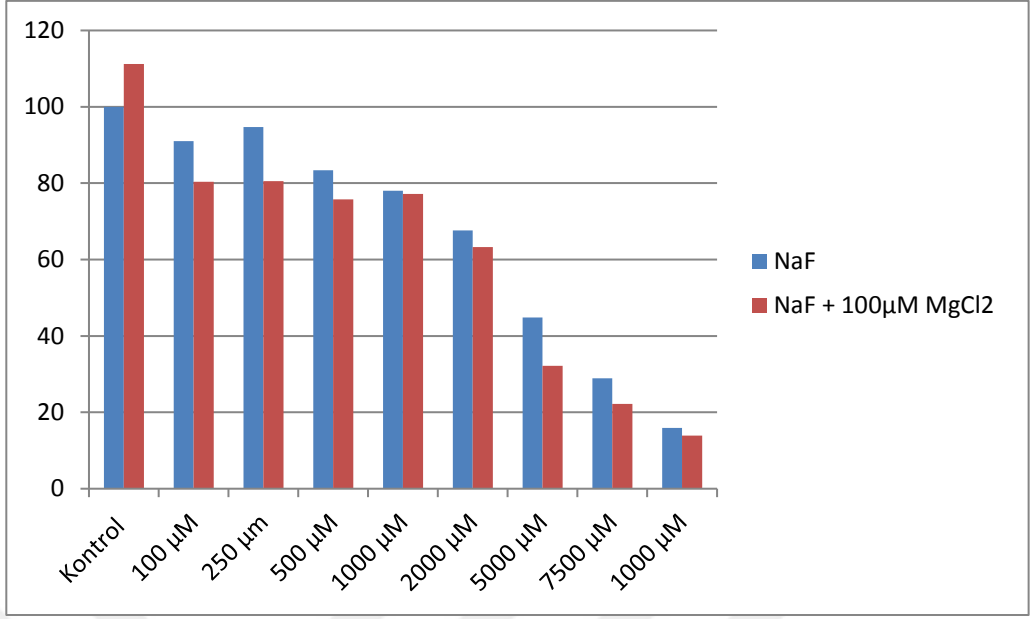
6000 μM NaF uygulanan NRK-52E hücre serileri 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı kontrole göre %52.9 olarak saptanırken 6000 μM NaF ile birlikte 500 μM CaCl_2 uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %58.5 olarak saptamıştır. 500 μM CaCl_2 uygulamasının NaF toksisitesini 24 saat için %5.9 oranında inhibe ettiği saptanmıştır.

NaF, kontrol, NaF+mineraller (MgCl_2 , Na_2SeO_3 , AlCl_3 , CaCl_2) ve sadece mineral madde uygulandıktan (MgCl_2 , Na_2SeO_3 , AlCl_3 , CaCl_2) 24 saat sonra hFOB 1.19 hücre hatlarında kontrol grubunun canlılığı %100 kabul edilerek MTT % canlılık sonuçları tabloda 8’de verilmiştir.

Tablo 8. hFOB 1.19 hücre hattında MTT % canlılık sonuçları

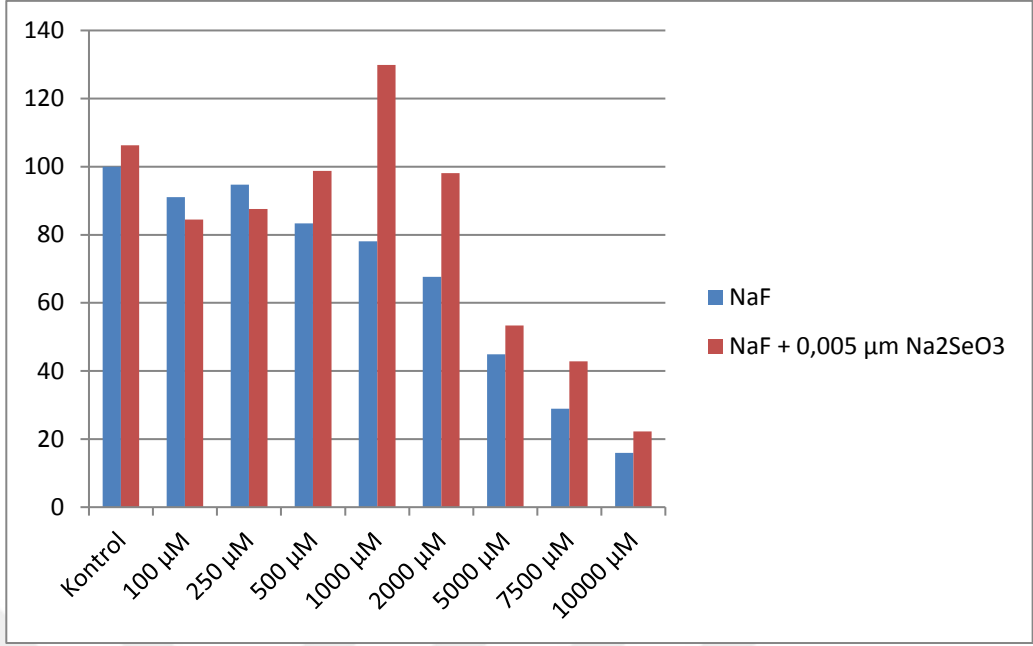
		MgCl_2	Na_2SeO_3	AlCl_3	CaCl_2
Kontrol	100	111,20	106,26	102,44	104,07
NaF (100μM)	94,72	80,38	84,47	83,08	99,40
NaF (250μM)	91,05	80,55	87,60	94,68	93,06
NaF (500μM)	83,38	75,79	98,73	126,86	89,11
NaF (1000μM)	78,06	77,22	125,90	89,87	92,15
NaF (2000μM)	67,65	63,26	98,10	74,35	65,79
NaF (5000μM)	52,06	55,08	53,31	58,03	54,91
NaF (7500μM)	28,89	22,18	42,85	38,84	48,54
NaF (10000μM)	15,90	13,91	22,26	23,02	41,93

Çalışma dozu olarak seçilen NaF konsantrasyonlarında (100 μM , 250 μM , 500 μM , 1000 μM , 2000 μM , 5000 μM , 7500 μM ve 10000 μM) hücre proliferasyonu üzerine mineral uygulanmasından sonra, hücre canlılığında en yüksek artış Na_2SeO_3 ve AlCl_3 grubunda tespit edildi.



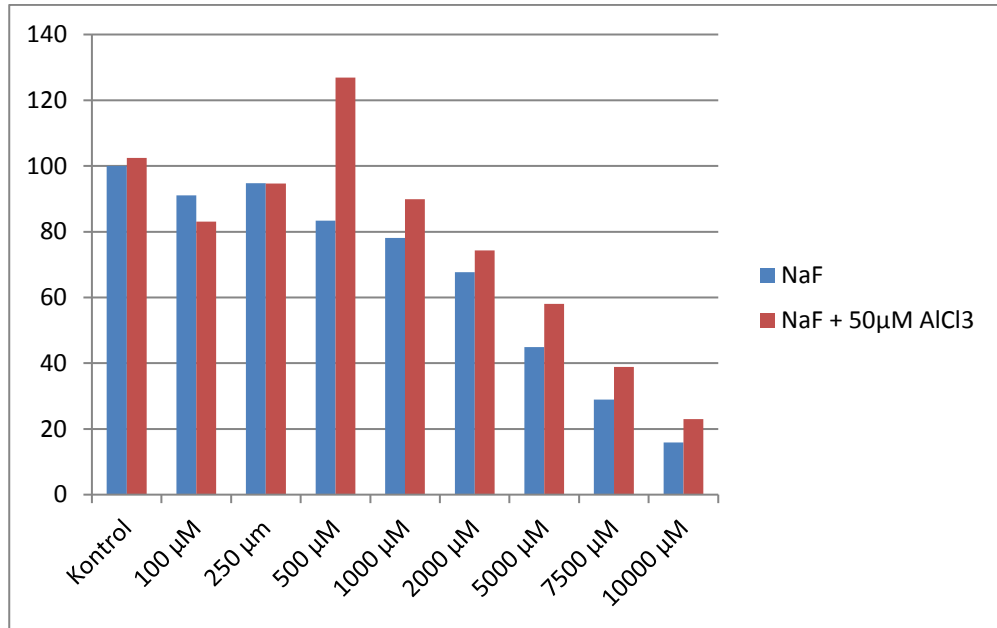
Şekil 21. hFOB 1.19 hücre hattına ait NaF, NaF+100 μM MgCl₂ MTT grafiği.

5000 μM NaF uygulanan hFOB1.19 hücre hatları 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı kontrole göre %52.6 olarak saptanırken 5000 μM NaF ile birlikte 100 μM MgCl₂ uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %55.8 olarak saptamıştır. 100 μM MgCl₂ uygulamasının NaF toksisitesini 24 saat için %3.2 oranında inhibe ettiği saptanmıştır.



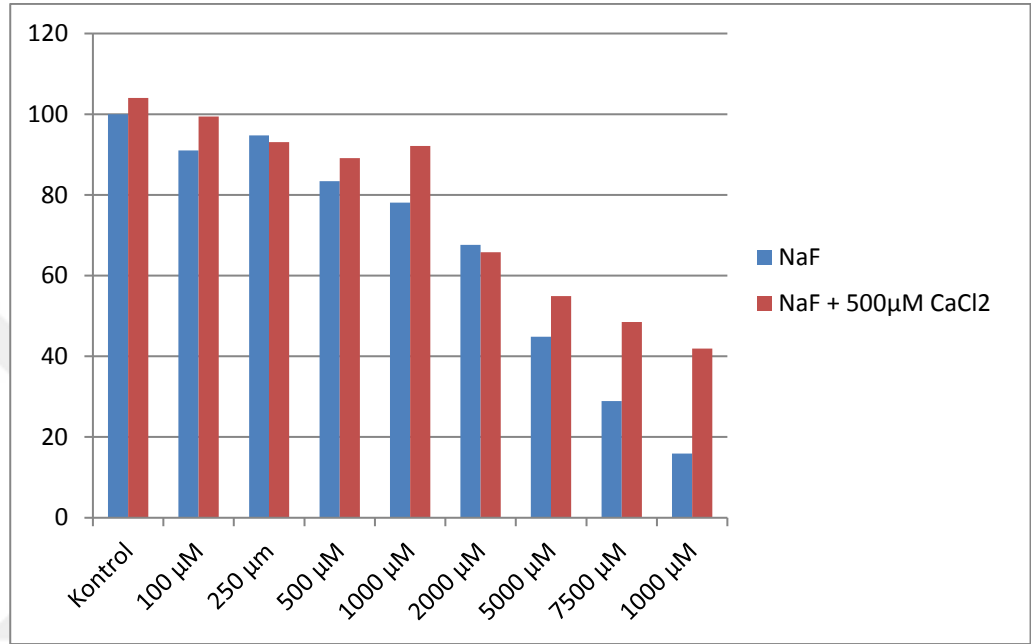
Şekil 22. hFOB 1.19 hücre hattına ait NaF, NaF+0,005 µM Na₂SeO₃ MTT grafiği.

5000 µM NaF uygulanan hFOB1.19 hücre hatları 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı kontrole göre %52.6 olarak saptanırken 5000 µM NaF ile birlikte 0.005 µM Na₂SeO₃ uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %53.3 olarak saptamıştır. 0.005 µM Na₂SeO₃ uygulamasının NaF toksisitesini 24 saat için % 0.7 oranında inhibe ettiği saptandı.



Şekil 23. hFOB 1.19 hücre hattına ait NaF, NaF+50 µM AlCl₃ MTT grafiği

5000 μM NaF uygulanan NRK-52E hücre serileri 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı kontrole göre %52.6 olarak saptanırken 5000 μM NaF ile birlikte 50 μM AlCl_3 uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %58.3 olarak saptamıştır. 50 μM AlCl_3 uygulamasının NaF toksisitesini 24 saat için %5.7 oranında inhibe ettiği saptandı.



Şekil 24. hFOB 1.19 hücre hattına ait NaF, NaF+500 μM CaCl_2 MTT grafiği

5000 μM NaF uygulanan NRK-52E hücre serileri 24 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı kontrole göre %52.6 olarak saptanırken 5000 μM NaF ile birlikte 500 μM CaCl_2 uygulanan hücrelerde hücre canlılığı %58.5 olarak saptamıştır. 500 μM CaCl_2 uygulamasının NaF toksisitesini 24 saat için %2.3 oranında inhibe ettiği saptandı.

4.2. ELISA Sonuçları

Tablo 9. NRK-52E hücre hattına ait ELISA sonuçları

Gruplar	M30 (IU/L)	Kaspaz-3 (ng/ml)	Kaspaz-8 (ng/ml)	Kaspaz-9 (ng/ml)	8-OHdG (ng/ml)
Kontrol	107.52±12.35a	1.73±0.091ab	5.19±0.09a	4.83±0.12ab	17.27±2.43bc
NaF	94.53±7.31a	1.81±0.14ab	5.42±0.39ab	5.05±0.13ab	15.05±2.42bc
MgCl ₂	89.95±21.30a	1.82±0.06ab	6.11±0.32de	5.09±1.13ab	21.10±1.02c
Na ₂ SeO ₃	106.17±14.10a	1.60±0.07a	5.55±0.17abc	5.01±0.34ab	29.71±5.99d
AlCl ₃	114.50±13.95a	2.37±0.52b	6.59±0.30e	5.82±0.80b	1.20±0.07a
CaCl ₂	115.77±7.59a	2.11±0.92ab	5.86±0.16bcd	5.29±0.48ab	14.66±2.09bc
NaF+MgCl ₂	106.32±6.23a	1.64±0.18a	5.26±0.21a	4.72±0.56a	13.99±2.21b
NaF+Na ₂ SeO ₃	117.85±14.49a	1.89±0.20ab	5.47±0.41abc	5.04±0.51ab	14.76±8.43bc
NaF+AlCl ₃	111.12±1.47a	1.90±0.24ab	5.97±0.26cd	5.69±0.27ab	0.64±0.09a
NaF+CaCl ₂	90.03±25.57a	1.75±0.15ab	6.13±0.28de	5.39±0.26ab	11.45±0.42b

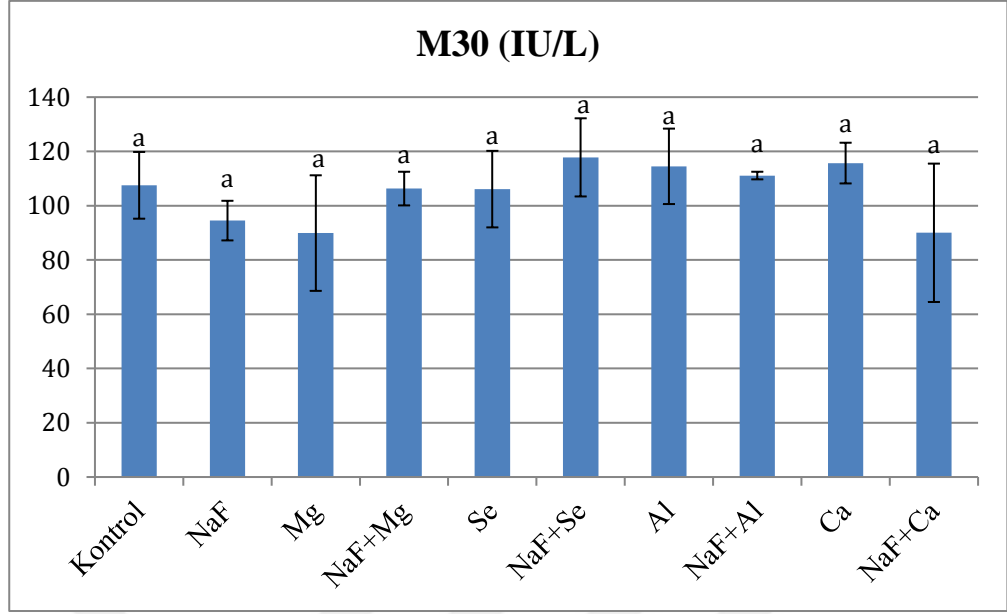
*sütünları arası farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir (p≤0,05).

Tablo 10. NRK-52E hücre hattındaki parametreler arasındaki korelasyon

	M30	Kaspaz-3	Kaspaz-8	Kaspaz-9	8-OHdG
M30	1	0,285	0,160	0,176	-0.161
Kaspaz-3	0,285	1	-0.381*	0,442*	-0.345
Kaspaz-8	0,160	0,381*	1	0.387*	-0.440*
Kaspaz-9	-0.176	0,442*	0.387*	1	-0.337
8-OHdG	-0,161	-0,345	-0.440*	-0.337	1

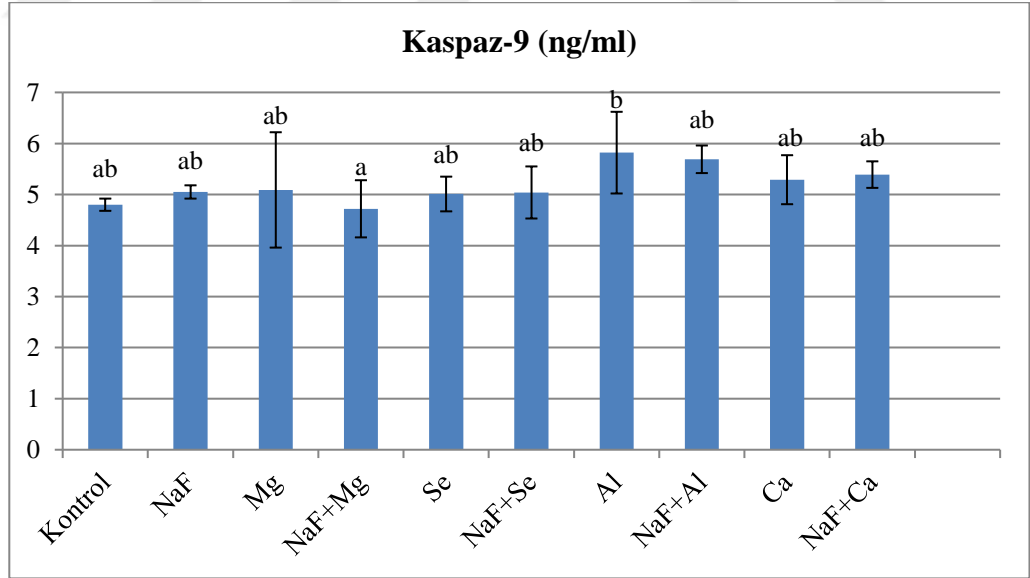
*korelasyon 0,05 seviyesine göre anlamlıdır.

Bütün gruplar göz önüne alınarak parametreler arasında yapılan karşılaştırmada, apoptozis parametreleri arasında ve oksidatif DNA hasarı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi (p≤0.05). Ayrıca oksidatif DNA hasarı ile kaspaz 8 arasında istatistiksel olarak önemli bir fark tespit edildi (p≤0.05).



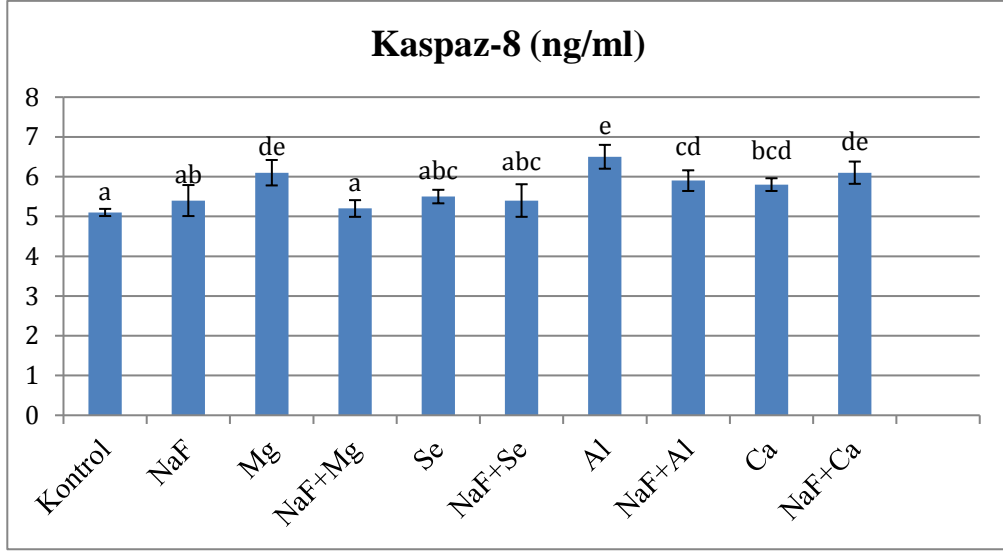
Şekil 25. NRK-52E hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre M30 grafiği.

NRK-52E hücre hattında M30 ölçümleri değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistik açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p \geq 0.05$).



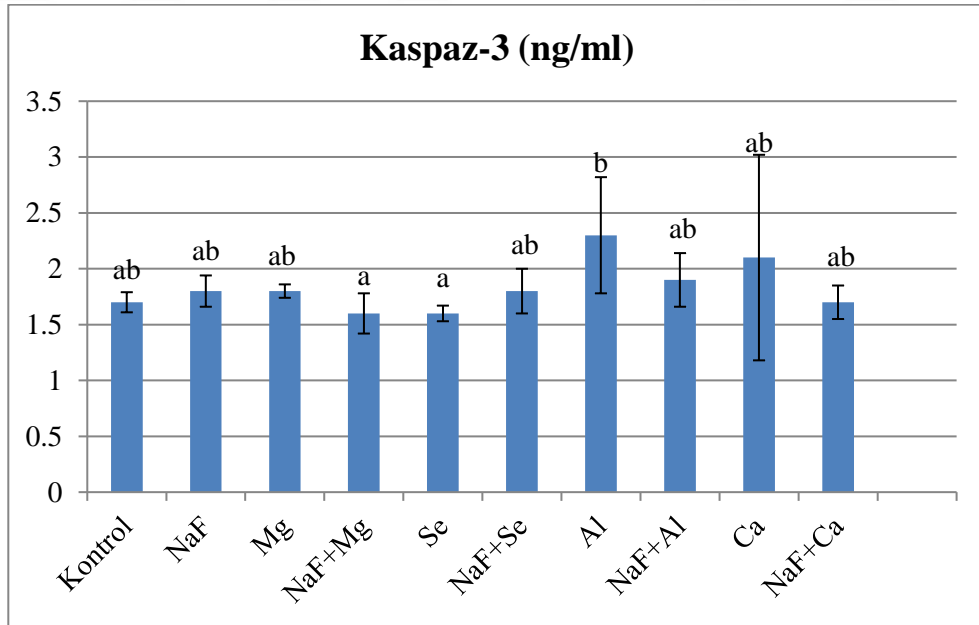
Şekil 26. NRK-52E hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre kaspaz-9 grafiği.

NRK-52E hücre hattında kaspaz-9 ölçümleri değerlendirildiğinde; NaF+MgCl₂ grubu en düşük bulunurken, AlCl₃ grubu en yüksek bulundu. Kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p \geq 0.05$).



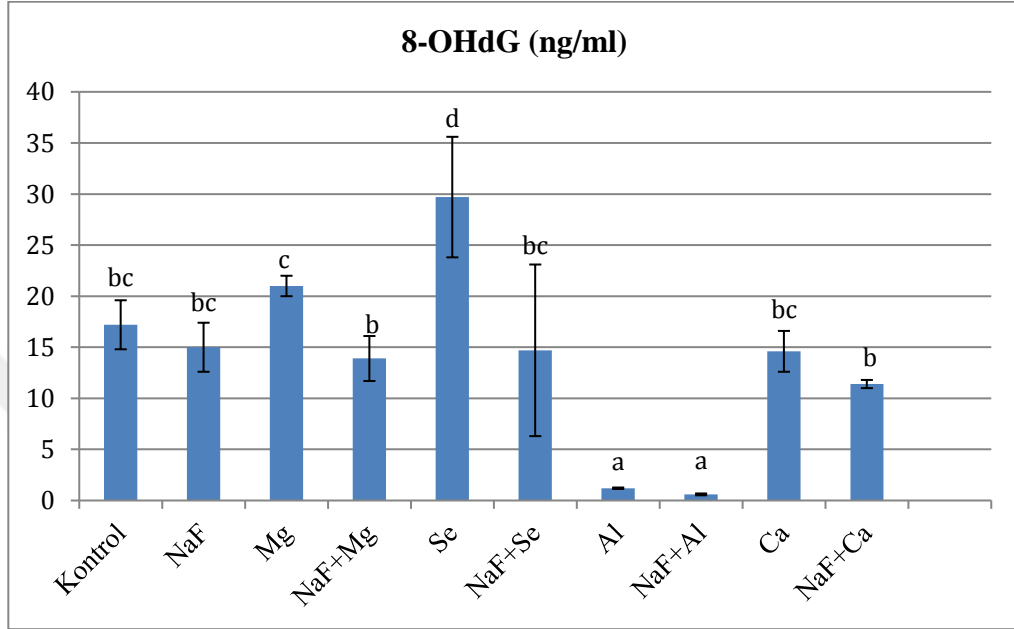
Şekil 27. NRK-52E hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre kaspaz-8 grafiği.

NRK-52E hücre hattında kaspaz-8 ölçümleri değerlendirildiğinde, kontrol ve NaF grupları arasında herhangi fark bulunamadı. Kontrol ile mineral grupları arasında Na_2SeO_3 hariç diğer gruplar arasında istatistiki açıdan önemli bulundu ($p \leq 0.05$). NaF ile mineral grupları arasında sadece MgCl_2 ve AlCl_3 grupları arasında istatistiki açıdan anlamlı fark tespit edildi ($p \leq 0.05$).



Şekil 28. NRK-52E hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre kaspaz-3 grafiği.

NRK-52E hücre hattında kaspaz-3 ölçümleri değerlendirildiğinde, NaF+MgCl₂ ve Na₂SeO₃ grupları en düşük, AlCl₃ grubu en yüksek bulundu. Kontrol grubu ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunamadı (p≥0.05).



Şekil 29. NRK-52E hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre 8-OHdG grafiği

NRK-52E hücre hattında 8-OHdG ölçümleri değerlendirildiğinde; kontrol ve NaF grupları arasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunamadı (p≥0.05). NaF+AlCl₃ ve AlCl₃ gruplar en düşük bulundu. Kontrol ve NaF grubuna göre, Na₂SeO₃ ve AlCl₃ grupları arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edildi (p≤0.05).

Tablo 11. hFOB 1.19 hücre hattına ait ELISA sonuçları

Gruplar	M30 (IU/L)	Kaspaz-3 (ng/ml)	Kaspaz-8 (ng/ml)	Kaspaz-9 (ng/ml)	8-OHdG (ng/ml)
Kontrol	207.49±29.51b	2.10±0.49a	7.70±0.89a	9.98±0.12b	8.19±1.23ab
NaF	184.90±6.27ab	2.61±0.07ab	7.28±0.36a	9.10±1.05ab	7.92±0.77ab
MgCl ₂	198.06±13.03b	2.23±0.47ab	8.15±0.39a	10.13±1.75 b	7.35±0.38ab
Na ₂ SeO ₃	198.15±20.56b	2.45±0.42ab	8.05±0.83a	9.89±1.30ab	9.65±2.82b
AlCl ₃	182.54±19.28ab	2.40±0.36ab	8.38±0.87a	8.67±0.14 ab	7.81±0.51ab
CaCl ₂	154.93±16.62a	2.44±0.10ab	8.27±0.30a	7.77±1.71a	6.45±0.55a
NaF+MgCl ₂	155.88±26.29a	2.73±0.43ab	8.04±1.57a	9.91±1.50ab	6.04±2.34a
NaF+Na ₂ SeO ₃	186.35±35.80ab	2.28±0.09ab	8.35±0.59a	10.33±0.44b	7.99±2.04ab
NaF+AlCl ₃	196.60±8.23b	2.69±0.22ab	7.54±0.57a	8.68±0.88ab	5.98±1.05a
NaF+CaCl ₂	194.34±12.68ab	2.78±0.40b	7.30±0.92a	9.59±0.79ab	7.55±1.44ab

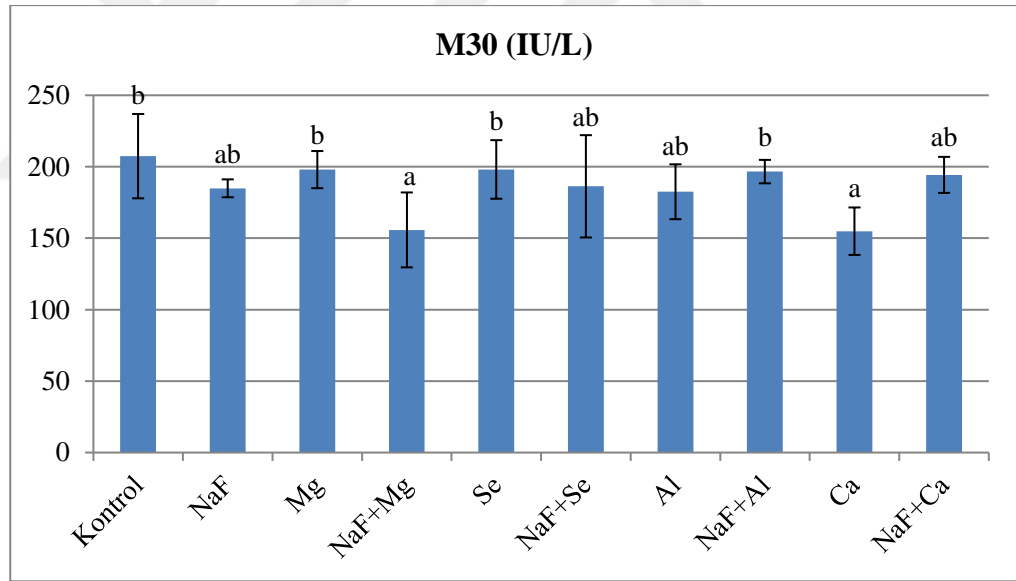
*sütünlar arası farklı harfler istatistiksel olarak önemlidir (p≤0.05).

Tablo 12. hFOB 1.19 hücre hattında parametreler arasındaki korelasyon

	M30	Kaspaz-3	Kaspaz-8	Kaspaz-9	8-OHdG
M30	1	-0,227	-0,107	0,338	0,090
Kaspaz-3	-0,227	1	-0,309	-0,296	-0,339
Kaspaz-8	-0,107	-0,309	1	0,135	0,204
Kaspaz-9	0,338	-0,296	0,135	1	0,087
8-OHdG	0,090	-0,339	0,204	0,087	1

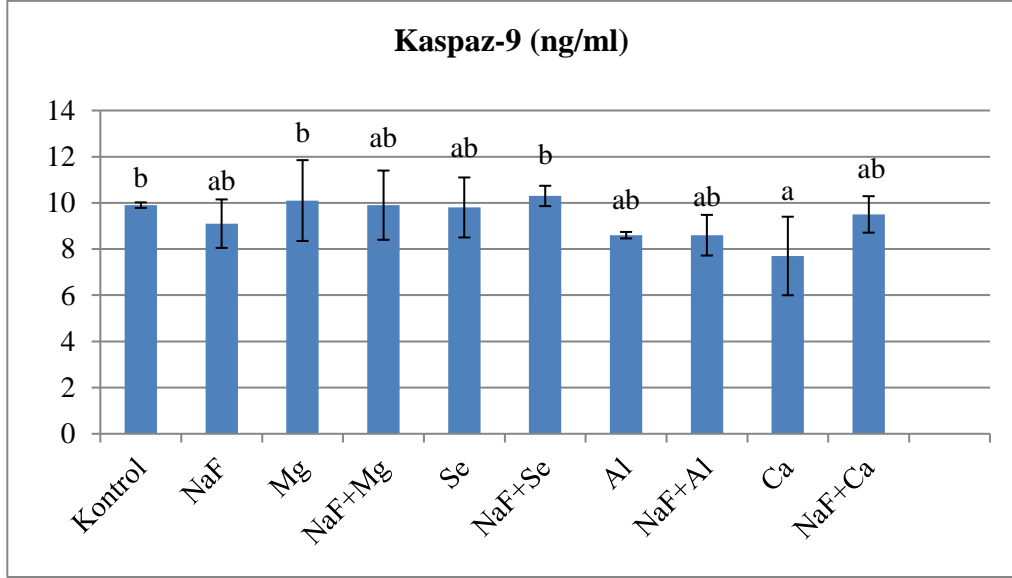
*korelasyon 0,05 seviyesine göre anlamlıdır.

Bütün gruplar göz önüne alınarak parametreler arasında yapılan karşılaştırmada, apoptozis parametreleri ve oksidatif DNA hasarı arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark tespit edilemedi ($p \geq 0.05$).



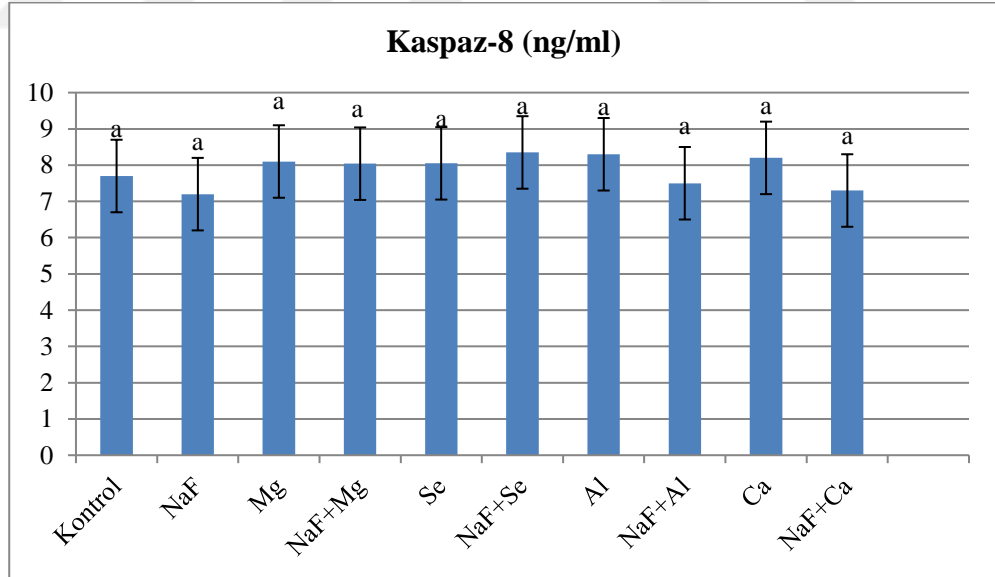
Şekil 30. hFOB 1.19 hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre M30 grafiği.

hFOB 1.19 hücre hattında M30 ölçümleri değerlendirildiğinde; kontrol ve NaF arasında herhangi bir fark tespit edilemedi ($p \geq 0.05$). Kontrol ile NaF+MgCl₂ ve CaCl₂ grubu arasında istatistiksel açıdan önemli fark bulundu ($p \leq 0.05$). Kontrol ile mineral grupları arasında CaCl₂ grubu hariç istatistiksel açıdan önemli fark tespit edilemedi ($p \geq 0.05$).



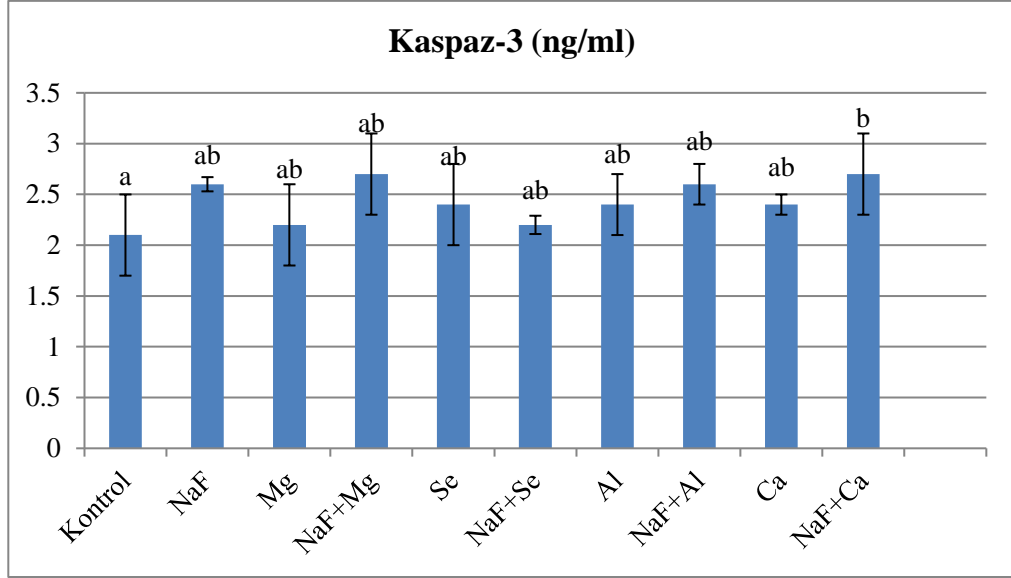
Şekil 31. hFOB 1.19 hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre kaspaz-9 grafiği.

hFOB 1.19 hücre hattında kaspaz-9 ölçümleri değerlendirildiğinde; kontrol ve NaF grupları arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark tespit edilemedi ($p \geq 0.05$). Kontrol grubu ile CaCl_2 grubu arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edildi ($p \leq 0.05$).



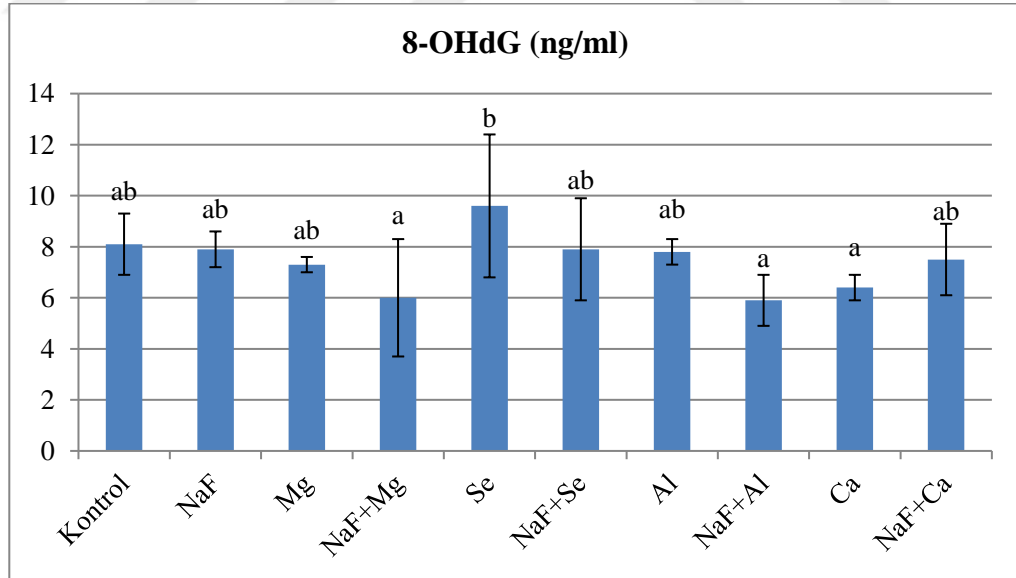
Şekil 32. hFOB 1.19 hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre kaspaz-8 grafiği.

hFOB 1.19 hücre hattına kaspaz-8 ölçümleri değerlendirildiğinde; gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p \geq 0.05$).



Şekil 33. hFOB 1.19 hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre kaspaz-3 grafiği.

hFOB 1.19 hücre hattında kaspaz-3 ölçümleri değerlendirildiğinde; kontrol grubu NaF+CaCl₂ grubu arasında istatistiksel açıdan önemli fark saptandı ($p \leq 0.05$). Diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan herhangi bir fark saptanmadı ($p \geq 0.05$).



Şekil 34. hFOB 1.19 hücre hattına ait ELISA sonuçlarına göre 8-OHdG grafiği.

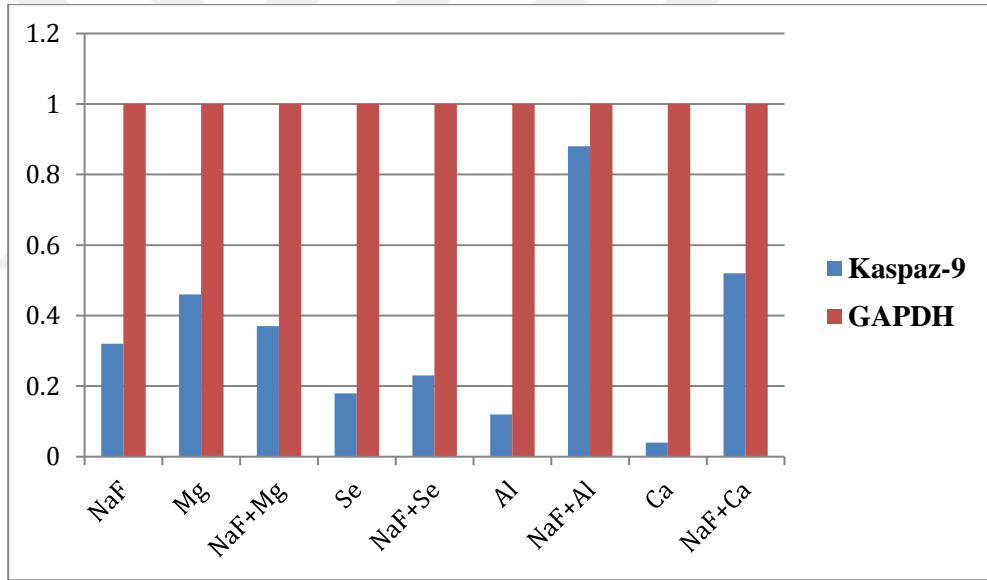
hFOB 1.19 hücre hattında 8-OHdG ölçümleri değerlendirildiğinde; kontrol ve NaF arasında bir fark tespit edilemedi ($p \geq 0.05$). Kontrol ve NaF grubuna göre, Na₂SeO₃ en yüksek, NaF+MgCl₂, NaF+AlCl₃ ve CaCl₂ grupları ise en düşük tespit edildi.

4.3.Real Time-PCR Sonuçları

NRK-52E hücre hattına ait çalışma gruplarının real time-PCR sonucunda kaspaz-3, kaspaz- 8 ve kaspaz -9 ekspresyonların grafikleri aşağıda verilmiştir.

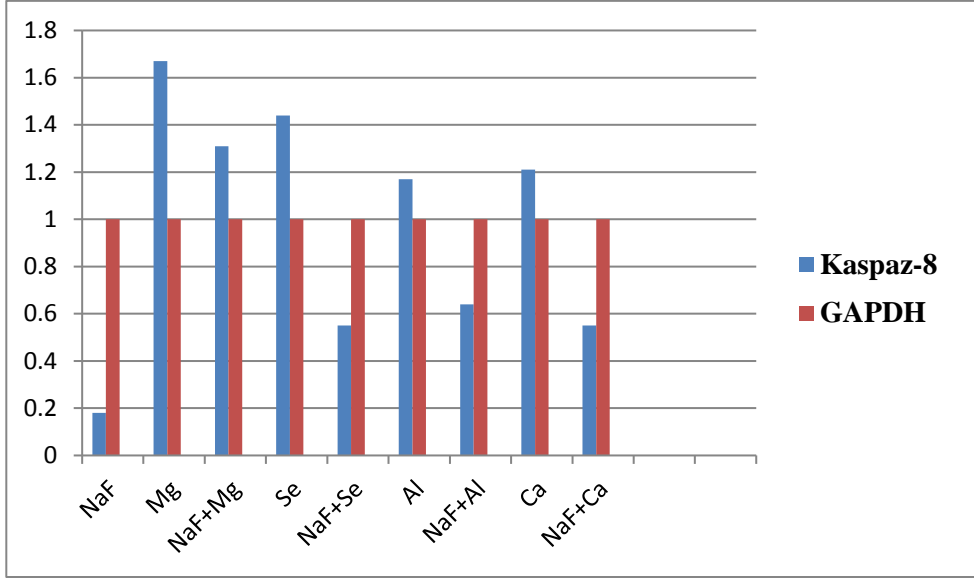
Tablo 13. Real time-PCR sonuçlarına göre NRK-52E hücre hattına ait ekspresyonlar

Gruplar	NaF	Mg	Se	Al	Ca	NaF + Mg	NaF + Se	NaF + Al	NaF + Ca
GAPDH	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Kaspaz-3	0,52	0,95	0,93	0,93	0,90	0,59	0,67	0,63	0,68
Kaspaz-8	0,18	1,67	1,44	1,17	1,21	1,31	0,55	0,64	0,55
Kaspaz-9	0,32	0,46	0,18	0,12	0,04	0,37	0,23	0,88	0,52



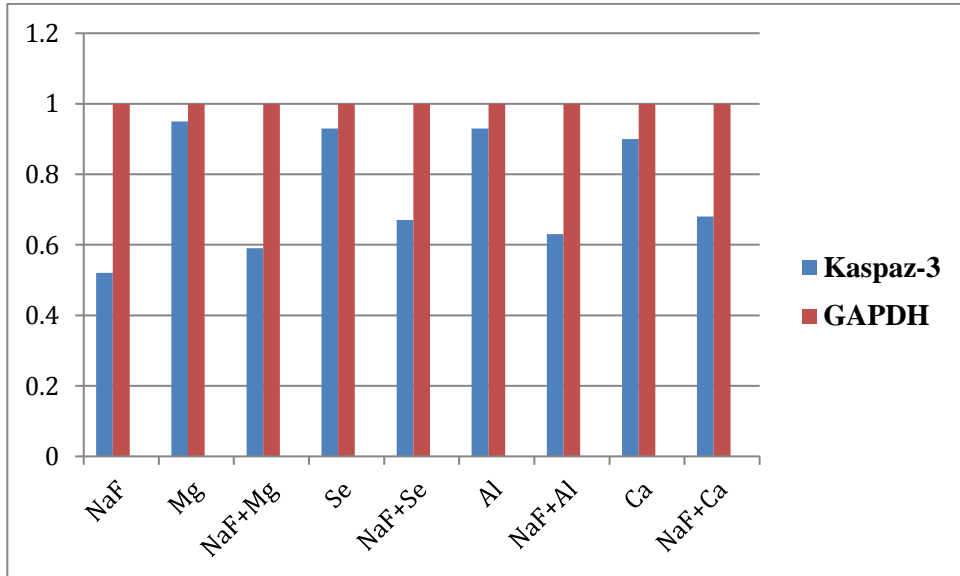
Şekil 35. NRK -52E hücre hattında kaspaz-9 ekspresyon grafiği.

Real time-PCR sonuçlarına göre; kaspaz-9 kontrol grubuna göre NaF 0.7 kat azalmıştır. MgCl₂ grubunda 0.6 kat azalmış, NaF+MgCl₂ grubunda ise 0.7 kat azalma saptanmıştır. Na₂SeO₃ grubunda 0,8 kat azalmış, NaF+Na₂SeO₃ grubunda ise 0.8 kat azalma saptanmıştır. AlCl₃ grubunda 0.9 kat azalmış, NaF+AlCl₃ grubunda ise 0.2 kat azalmıştır. CaCl₂ grubunda 9.5 kat azalmış, NaF+CaCl₂ grubunda ise 0.5 kat azalma saptanmıştır.



Şekil 36. NRK -52E hücre hattında kaspaz-8 ekspresyon grafiği.

Real time-PCR sonuçlarına göre; kaspaz-8, kontrol grubuna göre NaF 0.8 kat azalmıştır. MgCl₂ grubunda ise 1.7 kat arttığı NaF+MgCl₂ grubunda ise 1.3 kat arttığı saptanmıştır. Na₂SeO₃ grubunda 1.4 kat artarken, NaF+Na₂SeO₃ grubunda 0.5 kat azaldığı saptanmıştır. AlCl₃ grubunda ise 1.1 kat artarken NaF+AlCl₃ grubunda 0.4 kat azalma saptanmıştır. CaCl₂ grubunda ise 1.2 kat artarken, NaF+CaCl₂ grubunda ise 0.5 kat azaldığı saptanmıştır.



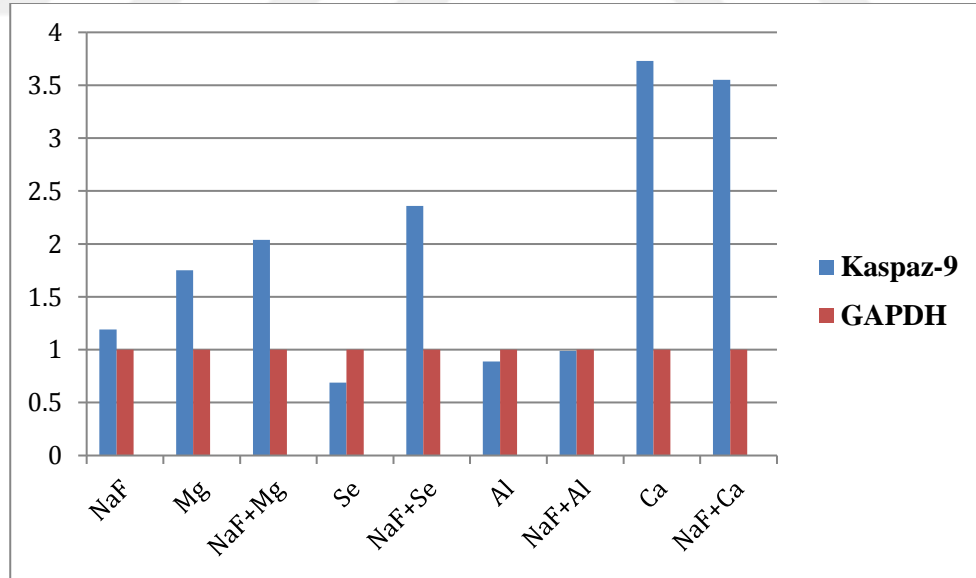
Şekil 37. NRK -52E hücre hattında kaspaz-3 ekspresyon grafiği.

Real time-PCR sonuçlarına göre; kaspaz-3 kontrol grubuna göre NaF 0.5 kat azalmıştır, MgCl₂ grubunda değişiklik yok, NaF+MgCl₂ grubunda ise 0.4 kat azalma saptanmış, Na₂SeO₃ grubunda değişiklik yok, NaF+Na₂SeO₃ grubunda 0.4 kat azalmış, AlCl₃ grubunda değişiklik yok, NaF+AlCl₃ 0.4 kata azalmıştır, CaCl₂ grubunda değişiklik yok, NaF+CaCl₂ grubunda ise 0.3 kat azalmıştır.

hFOB 1.19 hücre hattına ait çalışma gruplarının real time-PCR sonucunda kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 ekspresyonların grafikleri aşağıda verilmiştir.

Tablo 14. Real time-PCR sonuçlarına göre hFOB 1.19 hücre serisine ait ekspresyonlar

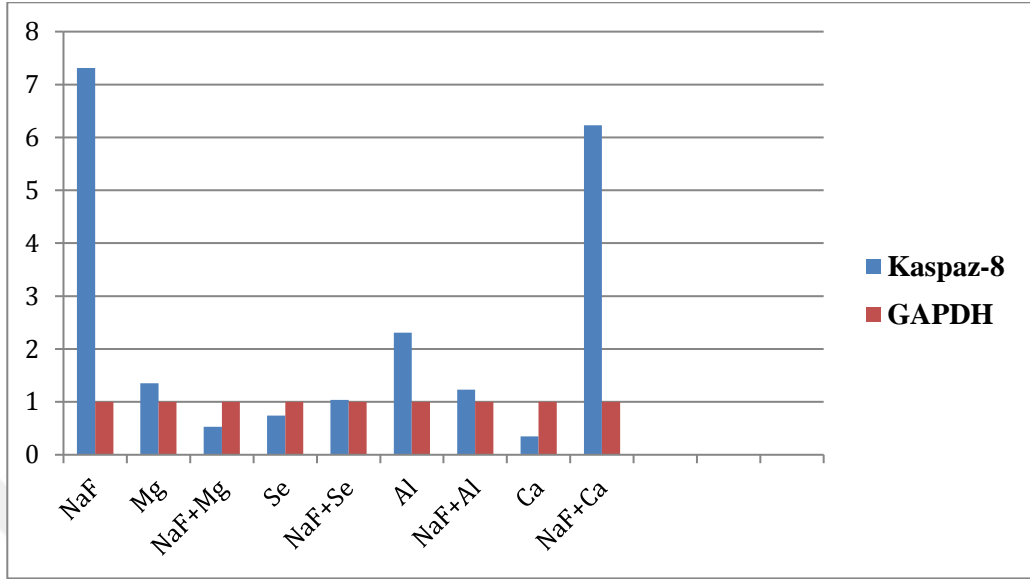
Gruplar	NaF	Mg	Se	Al	Ca	NaF + Mg	NaF + Se	NaF + Al	NaF + Ca
GAPDH	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Kaspaz-3	2,25	3,43	2,51	5,16	3,86	1,61	0,70	0,76	0,60
Kaspaz-8	7,31	1,35	0,74	2,31	0,35	0,53	1,04	1,23	6,23
Kaspaz-9	1,19	1,75	0,69	0,89	3,73	2,04	2,36	0,99	3,55



Şekil 38. hFOB 1.19 hücre hattında kaspaz-9 ekspresyon grafiği.

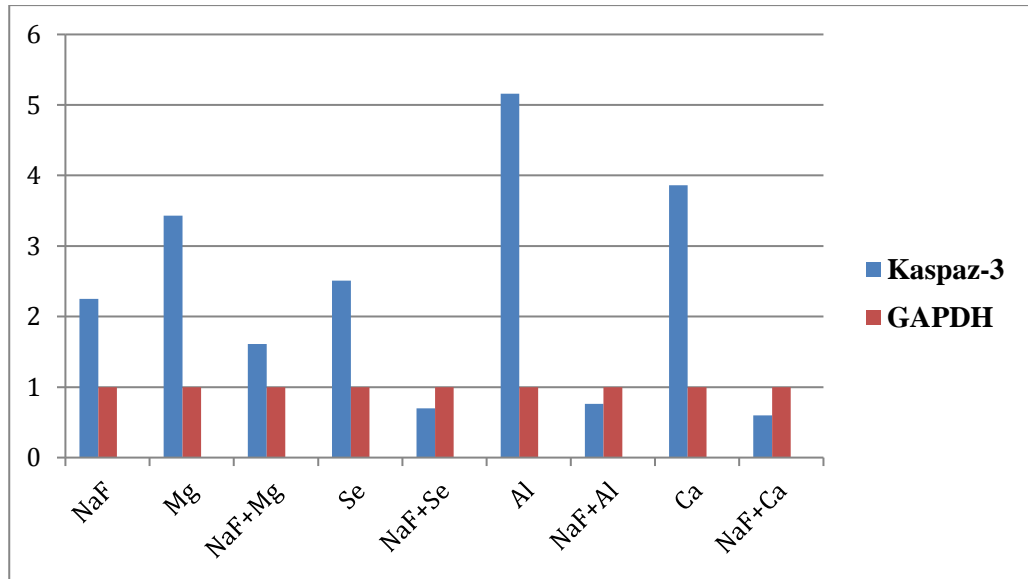
Real time-PCR sonuçlarına göre; kaspaz-9, kontrol grubuna göre NaF 1.2 kat artmış, MgCl₂ grubu 1.7 kat artmıştır. NaF+MgCl₂ grubunda ise 2 kat artma saptanmış. Na₂SeO₃ grubunda ise 0.3 kat azalmış, NaF+Na₂SeO₃ grubunda ise 2.3 kat artmıştır.

$AlCl_3$ grubu 0.1 kat azalmışken, $NaF+AlCl_3$ grubunda herhangi bir değişiklik yoktur. $CaCl_2$ grubu 3.7 kat artmış, $NaF+CaCl_2$ grubu ise 3.5 kat artış saptanmıştır.



Şekil 39. hFOB 1.19 hücre hattında kaspaz-8 ekspresyon grafiği.

Real time-PCR sonuçlarında kaspaz-8, kontrol grubuna göre NaF 7.3 kat artmış, $MgCl_2$ grubu 1.3 kat artmıştır, $NaF+MgCl_2$ grubunda ise 0.4 kat azalma saptanmış, Na_2SeO_3 grubunda değişiklik yok, $NaF+Na_2SeO_3$ grubunda 0.4 kat azalmış, $AlCl_3$ grubunda değişiklik yok, $NaF+AlCl_3$ 0.4 kat azalmıştır, $CaCl_2$ grubunda değişiklik yok, $NaF+CaCl_2$ grubunda ise 0,3 kat azalmıştır.



Şekil 40. hFOB 1.19 hücre hattında kaspaz-3 ekspresyon grafiği.

Real time-PCR sonuçlarında göre, kaspaz-3, kontrol grubuna göre NaF 2.25 kat artmış, MgCl₂ grubu 3.4 kat artmış, NaF+MgCl₂ grubunda ise 1.6 kat artış saptanmış. Na₂SeO₃ grubunda ise 2.5 kat artmış, NaF+Na₂SeO₃ grubunda ise 0.3 kat azalmış. AlCl₃ grubu 5 kat artarken, NaF+AlCl₃ 0.3 kat azalış saptanmıştır. CaCl₂ grubu ise, 3.8 kat artmışken, NaF+CaCl₂ grubu ise 0.4 kat azalmıştır.



TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan sağlığını sistemik olarak etkileyebilen endemik florozis dŸnyanın pek çok yerinde gŸrŸlmektedir. Florozis, yalnızca iskelet dokusu ve dişleri değil, beyin, karaciğer, bŸbrek ve omurilik gibi yumuşak dokulara da zarar verir. Florun (F) DNA'da hasar oluşturabileceği ve kromozom instabilitesine neden olabileceğini gŸsteren çalışmaların yanı sıra (He ve Chen, 2006; Li ve ark., 1995), herhangi bir genotoksik etkisinin saptanmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Ribeiro ve ark., 2006; Leite Ade ve ark., 2007).

Son zamanlarda, bilim insanları florŸr toksisitesinin altında yatan molekŸler mekanizma ile bağlantılı olabilecek florozis tarafından indŸklenmiř apoptoza bŸyŸk Ÿnem vermeye başlamışlardır. Ŗnceki çalışmalarda yŸksek dozlarda florŸrŸn domuz karaciğerinde oksidatif strese yol açabileceği ve oksidatif stres yoluyla mitokondriyal bozukluk ve *in vitro* florŸr indŸklŸ apoptozun kaspaz-3 aktivasyonuna neden olduğu analiz edilmiştir (Anuradha ve ark., 2001).

Sistemik florŸre maruz kaldıklarında bŸbrekler ana hedef organ olduğundan akut ve kronik florŸr zehirlenmesinin ardından renaltoksisite ortaya çıkabilir. Farklı koşullarda yŸksek miktarlarda florŸr almış hayvanların bŸbreklerinde birçok yapısal ve fonksiyonel değişimlerin olduğu bildirilmiştir (Guan ve ark., 2000).

FlorŸre maruz kalma bŸbrek hasarına neden olabilir ve kronik bŸbrek hastalığı ağız sağlığını ve iskelet gelişimini etkileyebilir. Kalsiyum, florŸr iyonlarıyla dŸřŸk ŸzŸnŸrlŸklŸ bir kompleks oluşturur ve bŸylece emilimini azaltır ve kalsiyum iyonlarının kemiklerden ve dişlerden harekete geçirilmesine neden olur (Machoy-Mokrzynska, 1993). Yapılan bir çalışmada florozisli koyunlarda kemik kalsiyum seviyesinde anlamlı bir değişim gŸzlenmemiř ancak yŸksek florŸr alımına uzun sŸre maruz kalındıktan sonra dişlerde ve diş etlerinde Ÿnemli derecede kalsiyum birikimi gŸzlenmiřtir. Kemik, diş ve diş etlerinde fosfor dŸzeylerinde, kontrol grubu ile florlu gruplar arasında hiçbir fark bulunmamıştır (Aydın ve ark., 2014).

FlorŸr doza, hŸcre tŸrŸne ve dokuya bağlı olarak geniş bir yelpazede farklı hŸresel etkiler ortaya çıkarır. YŸksek dozda florŸrŸn endoplazmik retikulum (ER) stresi ve oksidatif stres gibi hŸcre stresine neden olduğu gŸsterilmiřtir (Ito ve ark.,

2009). Florüre maruz kalmanın sonucunda, florür toksisitesine bağlı olarak süperoksit (O_2^-) ve diğer reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi artar. Düşük ve orta düzeyde ROS hücre sinyalizasyon molekülleri olarak fizyolojik öneme sahipken hücrenin temizlenmesini engelleyen yüksek ROS konsantrasyonları hücre ölümü ile sonuçlanabilecek oksidatif strese, mitokondri yetmezliğine ve hücre ve DNA hasarına neden olur (Suzuki ve ark., 2015).

Florür yüksek oranda nüfuz edebilme özelliğini sahiptir ve hücre zarını kolaylıkla aşabilir. Karaciğer, beyin ve böbrek gibi daha derin yumuşak dokulara girebilir ve bu yüzden nefrotoksisite renal tübüllerde inorganik florürün tutulması ve birikimi yüzünden oluşuyor olabilir (Quadri ve ark., 2016).

Jia ve ark. (2008) enzimatik sindirimle izole edilen yeni doğan sıçan böbrek hücrelerinde florür aracılığı ile oluşturulan DNA hasarını araştırmışlar. Bu nedenle hücrelere, 0 Mm, 0,2 Mm, 0,4 Mm, 0,8 Mm ve 1,0 Mm NaF konsantrasyonlarında sodyum florüre 24 saat maruz bırakmışlar. DNA hasarı tek hücre jel elektroforez analizi (Comet testi) ile belirlemişler. DNA zincirlerinin anlamlı kırılımı 0.8 Mm NaF ve üstünde meydana gelmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kuyruklu yıldız kuyruk uzunluğunun önemli derecede arttığı ve bu da yeterli konsantrasyonlarda florürün böbrek hücrelerinde DNA hasarına neden olabileceğini göstermiştir.

Apoptoz, florür ile indüklenen böbrek hasarında önemli bir mekanizma olabilir. Florotik sıçan böbreklerinde apoptozisi önlemek için florozise karşı selenyum müdahalesinin moleküler mekanizması, Bcl-2 ekspresyonunu arttırmış ve Bax ekspresyonunu ise azaltmıştır. Bcl-2 ve Bax ekspresyon düzeyindeki değişiklikler florozisde selenyum müdahalesinin önemli özellikleri olabilir. Florozis tarafından indüklenmiş böbrek hasarı, kompleks bir fizyolojik ve biyokimyasal süreçtir. Apoptoz birçok diğer apoptotik genler tarafından düzenlendiğinden, renal hücre apoptozu sürecinde çeşitli faktörlerin etkileşimleri gelecekteki çalışmalarla belirlenmelidir (Yang ve ark., 2013).

Florürün *in vivo* ve *in vitro* olarak reaktif oksijen türleri (ROS) ve serbest radikallerin oluşumunu artırdığına, aşırı oksidatif stres ve lipit peroksidasyonuna neden olduğuna ve antioksidan enzim aktivitelerini azalttığına dair geniş bir literatür mevcuttur (Lu ve ark., 2010; Varol ve ark., 2013).

Flor doza bağı olarak sitotoksik etki göstermektedir (Ke ve ark., 2016). Bizim bu tez projesinde de NaF'ın doza bağı sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Bu tez projesi sonunda, düşük doz (0-500 μ M) NaF uygulamasında hücre proliferasyonunu hücre tipinden bağımsız tetiklemesine rağmen yüksek dozlarda (>1000 μ M) hücreye toksik etki göstermektedir.

Daha önce yapılan çalışmalarda serbest radikallerin lipid, protein ve DNA hasarı yoluyla vücuttaki birçok sistemi hasara uğrattığı ortaya konmuş, bunun da ya serbest radikaller aşırı üretildiğinde, ya da antioksidan savunma sisteminin bozulduğu durumlarda gerçekleştiği bulunmuştur. Ayrıca, bazı çalışmalar sıçan böbreklerinin yüksek doz florüre maruz kalmasının ardından belirli membran lipid değişikliklerinin ve lipid peroksidasyonunun oluştuğunu bildirmişlerdir (Guan ve ark., 2000).

Lu ve ark. (1994) yaptıkları bir çalışmada fare lösemik L 1210 hücrelerine selenit tedavisinin DNA tek-iplik kırılmalarını indüklediği, bunu takiben DNA çift iplik kırılmalarıyla sonuçlanan endonükleaz aktivasyonuna ve apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olduğunu göstermişlerdir. Kanser hücrelerinde Se ile indüklenen apoptoz kanser önleme aktivitesiyle ilgilidir ve birçok grup tarafından seleno bileşiklerin hücre kültürü sistemlerinde apoptozu indüklediklerini bildirmişlerdir (Cho ve ark., 1999; Shen ve ark., 1999).

Çetin ve Yur (2016) endemik florozis görülen koyunlardan aldıkları kas ve böbrek dokusunda mineral madde seviyelerini araştırmışlar. Kas ve böbrekte mineral metabolizmasını önemli ölçüde değiştirdiğini ve bunun flüorür zehirlenmesinin neden olduğu yüksek düzeyde mineral birikimi ve atılımı ile sonuçlandığını bildirmişlerdir.

Song ve ark. (2014) yaptıkları bir çalışmada, sıçanların böbreklerinde sodyum florürün apoptozu indükleyip indüklediğini araştırmışlar. Bu amaçla, NaF-indüklü apoptozun altında yatan mekanizmaları incelemişler. Elde edilen bulgular, NaF-indüklü renal hücre apoptozunun kaspaz-arabuluculu yollarla ve ölüm reseptör yolları aracılığıyla gerçekleştiğini ve bu süreçte DNA hasarının da rol oynayabileceğini göstermişlerdir. Aynı zamanda sistolik sitokrom C ve kaspaz- 3, 8 ve 9 protein düzeylerinde artış gözlemlendiğini bildirilmiştir.

Wei ve ark. (2014) tarafında yapılan çalışmada, insan osteosarkom MG-63 hücrelerinde, kemik morfogenetik protein ailesinden BMP-2 ve BMP-3 genlerinin

ekspresyonu ve bu genlerin hücre canlılığı üzerindeki olası etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada (Wei ve ark., 2014), sodyum florürün (NaF) doza bağlı olarak proliferasyon arttırıcı etki gösterdiği, 5×10^3 $\mu\text{mol/l}$ konsantrasyonunda proliferasyonun en üst düzeye çıktı. 2×10^4 $\mu\text{mol/l}$ 'de ise NaF hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da, hFOB 1.19 osteoblast hücre serisinde NaF düşük dozlarda hücre proliferasyonunu arttırırken yüksek dozlarda (>1000 μM) proliferasyon inhibe edilmiştir. Doz bağlı sitotoksik etki bu literatürle (Wei ve ark., 2014) uyumlu bulunurken IC_{50} değeri 5000 μM olarak bulunmuştur. Bu sonuç, NaF'ın aynı hücre kökenli olmasına rağmen farklı sitotoksik etki gösterebileceğine işaret etmektedir.

Florozisin dokularda apoptozu indüklediğine ilişkin birçok çalışma bulunmaktadır (Song ve ark., 2014; Wei ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2015). Zhang ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada, osteosarkom Saos-2 hücre dizilerinde NaF'ın doza ve zamana bağlı olarak apoptozisi tetikleyebileceği ve apoptotik yolağın hem mitokondriyal hem de reseptör yolağından olabileceği bildirilmektedir. Yine bu çalışmada (Zhang ve ark. 2015), mitokondriyal yolakta yer alan bazı genlerin ekspresyon ve protein düzeyinde artarken bazılarının azaldığı belirtilmiş ancak bu duruma neden olan moleküler yolak aydınlatılmamış ve NaF aracılı apoptozis yolağın kompleks bir yapısının var olduğu belirtilmiştir. Li ve ark. (2017) tarafından ameloblast hücreleri kullanılarak yapılan çalışmada, 5000 μM NaF'ın 6 saat uygulaması sonucunda hücrelerde kaspaz aktivasyonunun arttığı ve apoptozun tetiklendiği bildirilmiştir. Tamamlanan bu tez çalışması sonucunda da, 5000 μM NaF uygulanan hFOB 1.19 osteoblast ve 6000 μM NaF uygulanan NRK-52E böbrek hücrelerinde apoptozun tetiklendiği saptanmıştır. Elde edilen bulgularımız literatürle uyumludur.

Bu tez çalışmasında, böbrek epitelial hücresi olan NRK-52E hücre hattında yapılan deneysel çalışmada, apoptozis göstergesi olarak M30, kaspaz-3, 8 ve 9 düzeyleri incelendi. M30 düzeyi ELISA sonuçlarından herhangi bir değişiklik olmamıştır.

Kaspaz-3 bakımından, NRK-52E hücre hattında NaF uygulanan grupta kontrole göre önemli bir değişiklik bulunmazken, AlCl_3 verilen grupta kaspaz-3 düzeyleri anlamlı olarak yüksek ve MTT ile uyumludur. Real time-PCR analizinde elde edilen sonuca göre NaF ile birlikte MgCl_2 verilen grupta kaspaz-3 ekspresyonunun azaldığı saptandı. Bu çalışmada kullanılan NaF dozunun hücre ölümünü arttırmasına rağmen

apoptozisi uyarmadığı, mineral verilen gruplardada herhangi bir fark olmadığı tespit edildi.

Kaspaz-8 bakımından, NRK-52E hücre hattında NaF uygulanan grup ile kontrol arasında önemli fark bulunmazken, NaF ile birlikte MgCl₂ verine grupta düşme saptandı. Real time-PCR sonuçlarına göre kaspaz-8 ekspresyonunun NaF grubunda azaldığı tespit edildi. Bunun yanı sıra mineral verilen grupların kaspaz-8 ekspresyonunu artırırken, NaF ile birlikte mineral verilen gruplarda kaspaz-8 ekspresyonu azalmıştır.

Kaspaz-9 bakımından, NRK-52E hücre hatları çalışma gruplarında NaF uygulanan grup ile kontrol arasında önemli fark bulunmazken, NaF ile birlikte verilen MgCl₂ grubunda azalma saptandı. Real time-PCR sonuçlarına göre kaspaz-9 ekspresyonunun CaCl₂ verilen grupta kaspaz-9 ekspresyonunu azaltmıştır.

Sonuç olarak, NRK-52E hücrelerinde iyonların herhangi bir apoptotik etkisi çok yoktur. Aynı zamanda mineraller NaF ile uygulandığında NaF ile birleşerek minerallerin tek başına yapabilecekleri apoptotik etkiyi azaltmaktadır. NRK-52E hücrelerinde NaF uygulamasının Kaspaz-3 ekspresyonu kontrole göre ortalama 2 kat azalmasının nedeni, NaF'ın olası apoptotik etkisinin, bizim RNA elde ettiğimiz saate göre kaynaklanabilir. Ancak bu saate göre sonuç NaF ve diğer mineral gruplarına göre değerlendirildiğinde NaF'den kaynaklanan sitotoksik ölümün apoptotik yoldan dışında yolağı kullandığını gösterebilir. Ayrıca minerallerle NaF kombinasyonlarında elde edilen real time-PCR sonuçları apoptotik genlerin ekspresyonlarının analiz edildiğinde yalnız NaF uygulanan gruplara göre kontrol grubundaki hücrelere yaklaştığı, bununda, NaF'den kaynaklandığı düşünülen toksik ve apoptotik olabilecek yolağın inhibe edildiğini göstermektedir.

Yang ve ark. (2011) MC3T3-E1 osteoblast hücre hatlarında, NaF tarafından indüklenen apoptozun altında yatan hücresel mekanizmayı araştırmak için farklı NaF konsantrasyonlarına 48 saat maruz bırakıldıktan sonra Bcl-2 ve Bax mRNA ekspresyonlarını real time-PCR ile incelemişler. NaF'a maruz bırakıldıktan sonra Bcl-2 mRNA ekspresyonu anlamlı şekilde azalırken, Bax mRNA ekspresyonu anlamlı biçimde artmıştır. Ekspresyon düşük NaF konsantrasyonlarında (10^{-5} ve 5×10^{-5} M) azalırken, yüksek konsantrasyonlar (5×10^{-4} ve 10^{-3} M), Bax ekspresyonunda artışa

neden olmuştur. Ayrıca 5×10^{-5} , 10^{-4} , 5×10^{-4} ve 10^{-3} M konsantrasyonlarında NaF'a maruz kalan hücrelerde Bcl-2/Bax oranı anlamlı bir şekilde azaldığını bildirmişlerdir.

Caverzasio ve ark. (1996) yaptıkları bir çalışmada, F'nin kemik yapıcı hücreler üzerindeki mitojenik etkileri için Al izlerine ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır. F ve Al tarafından indüklenen hücre proliferasyonu değişimi, bir trozin fosfat yolağının değişimi yoluyla sağlanır ve muhtemelen bir MAP protein kinazının aktivasyonunu içerir. Bu iyon kombinasyonunun birincil hedef ve moleküler mekanizmasını anlamak, yeni kemik oluşumunu teşvik edecek ajanlar için yeni hedefler sunar.

Osteoblast morfolojisi apoptozun erken evrelerinde değişebilir. Apoptozun geç evresinde osteoblastların düzenlenmesi hücre ölümüne bağlı olarak gevşeyebilir. Aşırı florürün osteoblastlarda ERS'ye neden olduğunu ve apoptozu indüklediğini göstermiştir. Bu sonuçlar sıçan kemiğinde yüksek flüorür düzeylerinin ERS ve osteoblastapoptozuna neden olabileceğini göstermiştir. Ek olarak, bu çalışmada açıklanan osteofloroz modeli, florürün neden olduğu kemik hasarının mekanizması üzerine daha ileri çalışmalar için bir temel oluşturabilir (Liu ve ark. 2015).

Antioksidan özellikleri bir element olan selenyum birçok enzim ve proteinin önemli bileşenidir. Bazı hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde selenyum ilavesinin rolü son zamanlarda giderek artmaktadır. Yapılan araştırmalar selenyumun sıçanlarda yüksek flor florür konsantrasyonlarını azalttığını idrar yoluyla florür atılımını teşvik ettiğini ve florozis semptomlarını hafiflettiğini göstermişlerdir (Zhu ve ark., 2009).

Osteoblastlar floroid zehirlenmesinde son derece hassas hedef hücrelerdir. *In vitro* sıçan osteoblastlarında 2 mmol/l florun apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir (Zhang ve ark., 2003).

Wang ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada NaF hücre döngüsü gelişiminde apoptozu indükleyerek ve S-fazı tutulumu ile osteoblast canlılığını azalttığını, ayrıca artan apoptoz mekanizmalarının büyük olasılıkla Bcl-2 aile üyelerinin farklılaşmış ekspresyonlarına ve özellikle Bcl-2/Bax oranındaki azalmaya bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. (2006) enzimatik sindirimle izole edilen yeni doğmuş sıçanların primer üst kafatası osteoblastlarında florürün DNA hasarına yol açtığı bildirilmiştir. İzole osteoblast hücrelerine 0, 0,5, 1, 2 ve 3 mmol/l'lik konsantrasyonlarda sodyum

florür 24 saat süreyle verilmiş ve DNA hasarı tek hücre jel elektroforezanalizi (SCGE = Comet testi) ile belirlenmiştir. DNA zincirlerinin kırılması 2 mmol/l NaF ve üstünde meydana gelmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, kuyrukluyıldız kuyruğu uzunluğu belirgin şekilde artmış, bu da yeterli konsantrasyonlarda florürün osteoblast DNA'sında hasara neden olabileceğini ve aşırı alımın ve F birikiminin kemiğin olumsuz gelişimi için ciddi bir risk faktörü olduğunu göstermiştir.

Xu ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, hem düşük doz hem de yüksek doz florürün *in vitro* olarak osteoblastlarda oksidatif stresi aktive ettiği gösterilmiştir. Fakat osteoblast canlılığı üzerindeki değişiklikler, düşük doz ile yüksek dozda florür için farklı sonuçlar vermiştir. Bu sonuçlar, oksidatif stresin muhtemelen iskelet florozisin oluşumu ve gelişiminde bir faktör olduğunu düşündürmektedir.

Ahn ve ark. (1995) tavşanların kesici dişleri, tibia ve sternumlarında bulunan bu elementlerin alımı ve birikiminde, içme suyundaki alüminyumun ve florun çeşitli dozlarda etkisini çalışmışlardır. Sonuçlar, alüminyum ve flor alımındaki engelleyici özelliklerini onaylamaktadır. Ayrıca, tavşanların 50 ppm'e kadar 10 hafta boyunca flora maruz bırakılmaları sonucunda, kemiklerde alüminyum birikimine sebep olmuştur. Osteoblastların incelenmesi sonucunda Al-F kompleksi flor tarafından ortaya çıkan inorganik fosforun (Pi) taşınmasını sağlar ve kompleks de osteoblastlarda Pi geçişi sırasında tirozin fosforilasyonu ile bağlantılı olan G protein ile de ilişkide olduğu hipotezini desteklemektedir.

Hua ve ark. (2003) florürün osteoblast hücre içindeki iyonize kalsiyum $[Ca^{+2}]$ ve kalsiyum kanalı üzerindeki etkilerinin incelemişler. Florürün ortama ilavesi, özellikle 100 ng F/ml grubunda serbest iyonize $[Ca^{+2}]$ hızlı ve anlamlı bir artış sağlamıştır. Kontrol grubu ile 50, 100 ng F/ml gruplar arasında anlamlılıklar bulunmuştur ve 25 ng / ml F, osteoblast hücrelerin kalsiyum kanalının açılmasını uyarabilir. Florür, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kalsiyum akımlarının genliğini önemli ölçüde artırabilir ($P<0.01$), ayrıca aktivasyon, doza bağımlı şekilde gerçekleşmiştir. Florun kalsiyum kanalını açabildiğini ve daha sonra iyonize $[Ca^{+2}]$ konsantrasyonunu artırabildiğini bildirmişlerdir.

Taşçene ve Karagül (2012) köpek böbrek hücrelerine $CaCl_2$ ve $MgSO_4$ vermişler ve bu etkilerini elektron faz kontrast mikroskopu ile görüntülemişler. Kalsiyum eklenen

grupta hücreler tutunmuş halde kalsiyum kristallerinin oluştuğunu, Mg eklenen grupta ise yer yer dejenere olmuş hücrelere rastlamışlardır. Farklı kristallerin aynı hücrelerde farklı değişim ve bozukluğa sebep olduğunu bildirmişlerdir

Van Der Voet ve ark. (1999) alüminyumun nörotoksitesindeki florun rolünü ratların fetusundan hipokampus hücreler elde edilmesi ve bunların NaF ve AlF_3 'e ayrı olarak veya kombine edilerek maruz bırakılması ile belirlemiştir. AlF_3 tek başına uygulandığında, sinir lifleri arası bağlantı oluşumları normal iken, AlF_3NaF ile kombine uygulandığında bu etki artmaktadır. Belirgin olarak alüminyum, sinir hücrelerinde hücre iskeleti metabolizması ile çatışmaktadır ve bu etki flor tarafından arttırılmaktadır. İki elementinde devamlı uygulanması, hipokampal nöronların toplamını oluşturmaktadır. Florun metabolik işlevlerdeki keskin ve iyi bilinen rolü de, sert dokuların mineralizasyonu ve çürüklerin önlenmesi ile ilgilidir. Alüminyum florür alımının, osteomalazi ve osteodistrofiye katkısı bulunan kalsiyum ve magnezyumu modifiye ederek önüne geçtiği kabul edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada osteoblast hattında hücreler arası serbest kalsiyumu Ca^{+2} araştırmışlar ve florürün kalsiyum kanalını açık tuttuğunu ve osteoblast benzeri hücrelerde Ca^{+2} konsantrasyonunu artırdığını göstermişlerdir. Kronik F toksitesinde Ca^{+2} tutulumunun artmasının, muhtemelen bir hücrel Ca^{+2} dışarı sızma mekanizmasının inhibisyonu ile çakıştığını da göstermektedir (Hua ve ark., 2003).

Florozis sırasında renal kalsifikasyonuna PTH'nin (paratiroid hormon) aracılık ettiğini ve Ca^{+2} , Mg^{+2} -ATPaz aktivitesinde belirgin bir düşüşe neden olduğunu bildirmişlerdir (Suketa ve Kanamoto, 1983). Bununla birlikte, NRK-52E hücrelerinde kalsiyum birikiminin PTH mevcut olmadığında NaF eklenmesiyle belirgin şekilde arttığı bildirilmiştir (Murao ve ark., 2000). Ayrıca, kalsiyum birikimi ER-tipi Ca^{+2} -ATPaz (endoplazmik retikulum Ca^{+2} -bağımlı adenozin tri fosfataz) aktivitesinin yükselmesi ile de ilişkilidir. ER zarındaki Ca^{+2} -ATPaz, Ca^{+2} 'nın elektrokimyasal gradyanını korumak için taşıma sistemlerinden biri olan bölme Ca^{+2} pompalamakla görevlidir.

Magnezyum, florür ile birlikte düşük çözünürlüklü kompleksler oluşturur, böylece florürün gastrointestinal sistemden emilimi azalır (Machoy-Mokrzynska, 1995). Florür toksitesisi akut magnezyum eksikliğinde anahtar bir rol oynayabilir.

Aydın ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, florozisli koyunlarda kemik, diş ve diş eti dokularında bazı mineral metabolizmasını araştırmışlar. Kemik magnezyum düzeylerinin değişmediği, ancak florozis grubunda diş ve diş eti magnezyum düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğunu bildirilmiştir. Bu düşüş, florür ile nispeten çözünmeyen kompleksler oluşturduktan sonra azalan magnezyum emilimine bağlı olabileceği bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan osteoblast hücre hattında elde edilen sonuçların değerlendirilmesi sonucunda; NaF ile birlikte Na_2SeO_3 , AlCl_3 ve CaCl_2 ile hücre canlılığının arttığı, MgCl_2 kullanımında ise hücre canlılığını azalttığı tespit edildi.

Hücre canlılığı üzerinde etkili olan mekanizmaların anlaşılması için apoptotik parametreler değerlendirilmiştir. Bu parametreler arasında yer alan, hFOB 1.19 hücrelerinde M30 proteini, NaF verilen grupta değişmezken NaF ile MgCl_2 ve CaCl_2 verilen gruplar hariç kontrolden farklı olmadığı saptandı. Bu durum hücre ölümüne sadece apoptotik yolların değil diğer başka ölüm yollarında neden olabileceğini düşündürmektedir.

Kaspaz-3; osteoblast hücre hattı olan hFOB 1.19 hücrelerinde NaF ile birlikte verilen MgCl_2 ve CaCl_2 grubunda artış, MgCl_2 ve NaF ile birlikte verilen Na_2SeO_3 grubunda bir azalma saptandı. Real time-PCR sonuçlarına göre Kaspaz-3 ekspresyonları NaF ile birlikte verilen Na_2SeO_3 , AlCl_3 ve CaCl_2 haricinde arttığı saptandı.

Kaspaz-8 düzeyi ELISA sonuçları etkilenmezken, real time-PCR sonuçlarında ise NaF grubunda ekspresyonun 7.3 kat arttığı, mineral verilen NaF gruplarında ise NaF grubuna göre azalma olduğu, en fazla azalmanın CaCl_2 grubunda olduğu saptandı.

Kaspaz-9 ELISA analizinde, CaCl_2 verilen grupta azaldığı, NaF+mineral uygulanan gruplarda NaF ile aralarında anlamlı bir değişiklik saptanmadı. Real time-PCR analizinde, NaF'e göre Na_2SeO_3 , AlCl_3 ve NaF ile beraber AlCl_3 gruplarında kaspaz-9 seviyesinde azalma saptanırken diğer gruplarda önemli bir artış saptanmıştır.

Sonuç olarak; NaF osteoblast hücre hattında kaspaz-8 yoluyla yani ekstrinsik yolak üzerinden apoptozisi arttırmıştır. MgCl_2 ise verilen dozda apoptotik etkisini hem instrinstik hem de ekstrinsik yolak üzerinden apoptozisi artırmıştır. Ancak MgCl_2 NaF'in tek başına etkisini ekstrinsik yolağın bloke olmasını sağlayarak apoptozisi engellediği saptandı. Na_2SeO_3 uygulaması NaF'in apoptotik etkisini 7 kat azaltmıştır.

$AlCl_3$ tek başına verildiğinde NaF gibi ekstrinsik yolağı kullanarak apoptozisi tetiklemektedir. Ancak $AlCl_3$ NaF ile kompleks oluşturduğundan dolayı birlikte verildiğinde apoptotik etkisi azalmaktadır. $CaCl_2$ ise mitokondriyal (intrinsic) yolağı kullanarak apoptozisi tetiklemektedir. $CaCl_2$ NaF ile kompleks oluşturarak NaF'in ekstrinsik yolağını inhibe etmektedir.

Sunulan bu tez çalışmasında oksidatif DNA hasar belirteci olan 8-OHdG düzeylerinin; böbrek hücre serisi olan NRK-52E hücrelerinde, NaF+mineral verilen gruplarda kontrol verilen gruba göre anlamlı oranda azaldığı saptandı. Sadece Na_2SeO_3 ve $MgCl_3$ verilen gruplarda oksidatif DNA hasarının arttığı saptandı. Ancak NaF ile birlikte mineral verilen gruplarda azalma saptandı. 8-OHdG düzeylerinin osteoblast hücrelerinde ise kontrol ve NaF diğer mineral gruplarının etkilenmediği görüldü.

Bu tez çalışmasında her hücre hattı ve kullanılan analiz yöntemleri göz önüne alınarak elde edilen sonuçlar değerlendirildi ve aşağıda özetlendiği üzere;

1 M30 apoptotik proteinin, her iki hücre tipinde de önemli bir değişime uğramadığı,

2 NaF için seçilen IC_{50} değerine göre, hücre ölümünde apoptotik yolların hücre türüne göre farklı işlediği,

3 Florosis, hücre içi moleküler mekanizmalara doğrudan ve/veya dolaylı olarak etki gösterebildiği,

4 Florosis, doza ve zamana bağlı olarak etki gösteren multifaktöriyel bir süreç olduğu,

5 Florostik etki, hücre ve doku spesifiktir. Doz, süre ve hücre tipine göre etki biçimi değiştiği,

6 Flor kaynaklı ölüm tipi, apoptotik, otofajik ve nekrotik olabilir. Bu 3 ölüm tipinin de görülmesinin temel nedeni, florun doza bağlı olarak apoptotik markerlarının ekspresyonlarındaki farklılıklar olduğu,

7 Bir takım apoptotik markerların artmamasının nedeni apoptotik sürecin tetiklenmesini takiben hücrede nekroza bağlı ölümün başlaması olabilir. Bu durum kullanılan florun dozuna bağlı olduğu,

8 Flor, otofajiyi indükleyebildiği yine bu sürece ait bilgiler net olarak aydınlatılamadığı,

9 Flor düşük dozlarda kullanıldığında hücrede kısa süreli akut proliferasyon artırıcı etkisi olduğu sonuçlarına varıldı.

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde, NaF+mineral kombinasyonu böbrek ve osteoblast hücrelerindeki olası apoptotik etkileri ilk kez bu tez projesi kapsamında araştırılmıştır. Minerallerin florozisle tetiklenen hücre içi sinyal yollarını inhibisyonda hücre tipine göre etki gösterdiği ilk kez gösterilmiştir. Florozisin etkilerinin inhibisyonunda minerallerin elektronegativitelerinin önemli olduğu ilk kez bu tez projesiyle gösterilmiştir. Elektronegativitesi bir mineralin ne kadar yüksek ise florotik inhibisyonu o kadar daha etkili olabileceği ilk kez gösterilmiştir. Sonuç olarak NaF'a bağlı hücre ölümlerinde minerallerin rollerinin aydınlatılmasında farklı doz, süre ve analiz yöntemlerinin kullanılarak daha ileri çalışmalar planlanarak yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

ÖZET

Çetin S, Renal ve Osteoblast Hücre Hatlarında NaF Uygulaması Bazı Minerallerin Apoptozis ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı (Veteriner), Van, 2017. Bu çalışma, minerallerin ($MgCl_2$, Na_2SeO_3 , $AlCl_3$, $CaCl_2$) IC_{50} oranında NaF uygulanan NRK-52E ve hFOB 1.19 hücre hatlarında, bazı apoptotik markerların ekspresyonu ve transkripsiyonu üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla planlandı. Hücreler *in vitro* koşullarda haftada iki-üç kez düzenli pasajları yapılarak çoğaltıldı. MTT ile NaF'ın IC_{50} değeri ve minerallerin yararlı dozları belirlendi. Hücreler 96'luk kültür pleytlerine 10^5 , flasklara ise 10^6 olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücre hatlarında gruplar ELISA ve real time-PCR için kontrol, NaF ve NaF+mineral olarak belirlendi. MTT % proliferasyon için ise dozlar kontrol, NaF ve NaF+ mineraller olarak belirlendi. Biyokimyasal analizler için hücreler, 24 saat inkubasyonu takiben tripsin işlemi ile hücreler toplandı ve dondur/çöz yöntemiyle parçalanarak analize hazırlandı. mRNA izolasyonu için 12 saat takiben hücreler tripsin yöntemiyle toplandı ve manuel yöntemiyle mRNA izole edildi. M30, kaspaz-3, kaspaz-8, kaspaz-9, 8-OHdG, transkripsiyonları ELISA yöntemiyle belirlendi. Kaspaz-3, Kaspaz-8 ve Kaspaz-9 real time-PCR yöntemiyle cDNA elde edildi. Real time-PCR yöntemiyle hedef gen DNA'ları çoğaltıldı. MTT çalışmalarında NRK-52E hücrelerinde NaF+mineral verilen gruplardaki hücre proliferasyonunun NaF verilen tüm gruplardan daha fazla olduğu tespit edildi. hFOB 1.19 hücrelerinde ise hücre proliferasyonu $MgCl_2$ hariç NaF verilen tüm gruplardan daha fazla olduğu tespit edilmiştir. NRK-52E hücrelerinde NaF uygulamasının kaspaz-3 ekspresyonu kontrole göre ortalama 2 kat azalmasının nedeni, NaF'ın olası apoptotik etkisinin, bizim RNA elde ettiğimiz saate göre kaynaklanabilir. Ancak bu saate göre sonuç NaF ve diğer mineral gruplarına göre değerlendirildiğinde NaF'dan kaynaklanan sitotoksi ölümün apoptotik yoldan dışında yolağı kullandığını gösterebilir. Ayrıca minerallerle NaF kombinasyonlarında elde edilen real time-PCR sonuçları apoptotik genlerin ekspresyonlarının analiz edildiğinde yalnız NaF uygulanan gruplara göre kontrol grubundaki hücelere yaklaştığı, bunda, NaF'tan kaynaklandığı düşünülen toksik ve apoptotik olabilecek yolağın inhibe edildiğini göstermektedir. Sonuç olarak; Minerallerin iyonik özeliğinden NaF ile genelde sinerjistik olarak apoptozisi önleyebildiği düşünülmektedir. NaF'ın hücre tipine bağlı olarak NRK-52E hücrelerinde NaF+ mineral kullanımı hücreyi apoptozu korur. Osteoblastta ise artan apoptozisi inhibe ettiği için yararlı olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Hücre kültürü, NaF, Apoptozis, Mineraller, Real time-PCR

SUMMARY

Çetin S, NaF Application in Renal and Osteoblast Cell Lines. The Effects of Certain Minerals on Apoptosis and DNA Damage. Yuzuncu Yil University, Institute of Health Sciences, PhD Thesis, Department of Biochemistry (Veterinary), Van, 2017. The present study was planned to investigate the effects of minerals ($MgCl_2$, Na_2SeO_3 , $AlCl_3$, $CaCl_2$) on the expression and translocation of certain apoptotic markers in NRK-52E and hFOB 1.19 cell lines, on which NaF was applied at a ratio of IC_{50} . Cells were replicated *in vitro* with 2-3 weekly regular passages. IC_{50} values for MTT and NaF and beneficial doses for minerals were determined. Cells were seeded in 96-well culture plates at 10^5 and in flasks at 10^6 . Controls for the ELISA and real time-PCR groups in cell lines were determined for NaF and NaF+ minerals in the cell lines. Controls for the MTT% proliferation, doses were determined as NaF and NaF + minerals. For biochemical analysis, the cells were collected by trypsin treatment following 24-hour incubation, and the cells were broken up by freeze / thaw method and analyzed. After 12 hours, cells were harvested by trypsin method and mRNA was isolated manually. M30, caspase-3, caspase-8, caspase-9, 8-OHdG, translations were determined with ELISA method caspase-3, caspase-8 and caspase-9 cDNA was obtained by real time-PCR method. Target gene DNAs were reproduced by the real time-PCR method. In MTT studies, it was determined that the cell proliferation in NRK-52E cell NaF + mineral groups was higher than that of all the NaF-treated groups and in hFOB 1.19 cells, cell proliferation was higher than all the NaF-treated groups except $MgCl_2$. The reason why NaF administration in NRK-52E cells resulted in an average of 2-fold decrease in caspase 3 expression compared to the control, could be attributed to the apoptotic effect of NaF based on time that we obtained the RNA. However, based on this time, when the results are assessed with respect to NaF and other mineral groups, it could be indicated that the NaF induced cytotoxic apoptosis could have used a pathway other than the apoptotic pathway. Furthermore, the real time-PCR results obtained in mineral-NaF combinations demonstrated that when expressions of apoptotic genes are analyzed, it was found that they were closer to the cells in the control group when compared to NaF-treated groups, indicating that the toxic and apoptotic pathway was inhibited, probably by NaF. As a result it is considered that minerals could prevent apoptosis, usually synergistically, with NaF due to its ionic character. The use of NaF + minerals in NRK-52E cells, based on the NaF cell type, protects the cell from apoptosis. In osteoblast, on the other hand, it was concluded that it may be useful since it inhibits increased apoptosis.

Keywords: Cell culture, NaF, Apoptosis, Minerals, Real time-PCR.

KAYNAKLAR

- Adamek E, Pawłowska-Goral K, Bober K (2005). In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity. *Ann Acad Med Stetin*, 51, 2, 69–85.
- Ahn HW, Fulton B, Moxon D, Jeffery EH (1995). Interactive effects of fluoride and aluminum uptake and accumulation in bones of rabbits administered both agents in their drinking water. *J Toxicol Environ Health*, 44, 3, 337-350.
- Akşit H, Bildik A (2008). Apoptozis. *Van Vet J*, 19, 1, 55-63.
- Aliasgharpour M, Rahnamaye FM (2013). Trace elements in human nutrition: a review. *Int J Med Invest*, 2, 3, 115–128.
- Allain P, Gauchhard F, Krari N (1996). Enhancement of aluminium digestive absorption by fluoride in rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 91, 2, 225-231.
- Allan CB, Lacourciere GM, Stadtman TC (1999). Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Annu Rev Nutr*, 19, 1–16.
- Altıntaş A, Fidancı UR, Sel T, Duru Ö, Başsatan A (2000). Doğal ve Endüstriyel Florozisli Koyunlarda Böbrek Fonksiyonu ve Serum Protein Elektrofrezisi. *Ankara Ü Vet Fak Derg*, 47, 105-114.
- Anand JK, Roberts JT (1990). Chronic fluorine poisoning in man: A review of literature in English (1946-1989) and indications for research. *Biomed Pharmacother*, 44, 8, 417-420.
- Anuradha CD, 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 Biol Med*, 31, 3, 367–373.
- Arlappa N, Aatif IQ, Srinivas R (2013). Fluorosis in India: An overview. *Int J ResDev Health*, 1, 2, 97-102.
- Arnoult D, Skaletskaya A, Estaquier J, Dufour C, Goldmacher VS (2008). The murine cytomegalovirus cell death suppressor m38.5 binds Bax and blocks Bax mediated mitochondrial outer membrane permeabilization. *Apoptosis*, 13,1100-1110.
- Ası T (1995). Tablolarla Biyokimya Cilt 1. İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul
- Aslan V (1994). Evcil Hayvanların İç Hastalıkları. Mimoza Basım ve Dağıtım A.Ş. Konya.
- Atabey E (2005). Tıbbi Jeoloji. Ankara Jeoloji Mühendisleri Odası Yayınları S. 216.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2003). Toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, September,136-145.
- Auberval N, Dal S, Bietiger W, Seyfritz E, Peluso J, Muller C, Zhao M, Marchioni E, Pinget M, Jeandidier N, Maillard E, Schini-Kerth V, Sigrist S (2015). Oxidative stress type influences the properties of antioxidants containing polyphenols in RINm5F beta cells. *Evid Based Compl Alternat Med*, 859048, 1-11.
- Aydın N, Dede S, Tanrıtanır P (2014). The distribution of minerals in some tissues of sheep with fluorosis. *Fluoride*, 47,1, 43-48.

- Bai C, Chen T, Cui Y, Gong T, Peng X, Cui H (2010). Effect of high fluorine on the cell cycle and apoptosis of renal cells in chickens. *Biol Trace Elem Res*, 138, 173-180.
- Bansal AK, Bilaspuri GS (2010). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int*, 2011, 1-7.
- Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM (2010). Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact*, 188, 2, 319-333.
- Bardsen A, Klock KS, Bjorvatn K (1999). Dental fluorosis among persons exposed to high- and low- fluoride drinking water in Western Norway. *Community Dent Oral Epidemiol*, 27, 4, 259-267.
- Beilstein, MA, Whanger PD (1992). Selenium metabolism and glutathione peroxidase activity in cultured human lymphoblasts. *Biol Trace Elem Res*, 35, 2, 105-118.
- Betteridge DJ (2000). What is oxidative stress? *Metabolism*, 49, 2, 3-8.
- Bouaziz H, Ghorbel H, Ketata S, Guermazi F, Zeghal N, Tunisia S (2005). Toxic effects of fluoride by maternal ingestion on kidney function of adult mice and their suckling pups. *Fluoride*, 38, 1, 23-31.
- Bras M, Queenan B, Susin SA (2005). Programmed cell death via mitochondria: Different modes of dying. *Biochemistry (Mosc)*, 70, 2, 231-239.
- Brindha K, Elango L (2011). Fluoride in ground water: Causes, implications and mitigation measures. In: Monroy SD editor. Fluoride properties, applications and environmental management. India, p. 111-136.
- Bronckers ALJ, Lyaruu DM (2017). Magnesium pH regulation and modulation by Mouse ameloblasts exposed to fluoride. *Bone*, 94, 56-64.
- Caverzasio J, Imai T, Ammann P, Burgener D, Bonjour JP (1996). Aluminum potentiates the effect of fluoride on tyrosine phosphorylation and osteoblast replication in vitro and bone mass in vivo. *J Bone Miner Res*, 11, 1, 46-55.
- Cerklewski FL (1997). Fluoride bioavailability-nutritional and clinical aspects. *Nutrition Res*, 17, 5, 907-929.
- Chachra D, Turner CH, Dunipace AJ, Grynps MD (1999). The effect of fluoride treatment on bone mineral in rabbits. *Calcif Tissue Int*, 64, 4, 345-351.
- Chinoy NJ, Trupti NP (1999). Reversible toxicity of fluoride and aluminium in liver and gastrocnemius muscle of female mice. *Fluoride*, 32, 4, 215-229.
- Cho DY, Jung U, Chung AS (1999). Induction of apoptosis by selenite and selenodiglutathione in HL-60 cells: correlation with cytotoxicity. *Biochem Mol Biol Int*, 47, 5, 781-793.
- Choubisa SL (1999). Some observations on endemic fluorosis in domestic animals in Southern Rajasthan (India). *Vet Res Commun*, 23, 7, 457-465.
- Choubisa SL, Mishra GV, Sheikh Z, Bhardwaj B, Mali P, Jaroli VJ (2011). Food, fluoride, and fluorosis in domestic ruminants in the dungarpur district of Rajasthan, India. *Fluoride*, 44, 2, 70-76.

- Chouhan S, Flora SJ (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.
- Cittanova ML, Estepa L, Bourbouze R, Blanc O, Verpont MC, Wahbe E, Coriat P, Daudon M, Ronco PM (2002). Fluoride ion toxicity in rabbit kidney thick ascending limb cells. *Eur J Anaesthesiol*, 19, 5, 341–349.
- Cooke MS, Olinski R, Loft S (2008). Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 17, 1, 3-14.
- Czerwinski E, Nowak J, Dabrowska D, Skolarczyk A, Kita B, Ksiezyk M. (1988). Bone and joint pathology in fluoride-exposed workers. *Arch Environ Health*, 43, 5, 340–343.
- Çetin S, Yur F (2016). Levels of trace elements in muscle and kidney tissues of sheep with Fluorosis. *Biol Trace Elem Res*, 174, 1, 82-84.
- Dabrowska E, Letko M, Roszkowska-Jakimiec, W, Letko R, Jamiołkowski J (2005). Effect of fluoride preparations on the activity of human salivary cathepsin. *Rocz Akad Med Białymst*, 50,1, 160-162.
- Dai GY, Gai OH, Zhou LY, Wei ZD, Zhang H (1994). Experimental study of combined effect with fluoride and aluminium. Proceedings of the XXth conference of the international society for fluoride research Beijing, China, Abstracts, 0-12:42.
- Dandona P, Thusu K, Cook S, Snyder B, Makowski J, Armstrong D, Nicotera T (1996). Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*, 17, 347, 444-5.
- Danial NN (2007). Bcl-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clin Cancer Res*, 13, 24, 7254-7263.
- Das K, Dupont A, De Pauw-Gillet M-C, Debier C, Siebert U (2016). Absence of selenium protection against methylmercury toxicity in harbour seal leucocytes in vitro. *Marine Pollution Bulletin*, 108 (1-2), 70-76.
- Duffield-Lillico AJ, Dalkin BL, Reid ME, Turnbull BW, Slate EH, Jacobs ET, Marshall JR, Clark LC (2003). Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *BJU Int*, 91, 7, 608–612.
- Dejean LM, Ryu SY, Martinez-Caballero S, Teijido O, Peixoto PM, Kinnally KW (2010). MAC and Bcl-2 family proteins conspire in a deadly plot. *Biochim Biophys Acta*, 1797, 6-7, 1231-1238.
- Edmunds WM, Smedley PL (1996). Groundwater geochemistry and health: an overview, in: Appleton, Fuge, McCall (Eds.), *Environmental Geochemistry and Health*, Geological Society Special Publication, 113, 91–105.
- Ekambaram P, Paul V (2001). Calcium preventing locomotor behavioral and dental toxicities of fluoride by decreasing serum fluoride level in rats. *Environ Toxicol and Pharmacol*, 9, 4, 141–146.
- Ekstrand J, Ehrnebo M, Boreus MD (1978). Fluoride bioavailability after intravenous and oral administration: Importance of renal clearance and urinary flow. *Clin Pharmacol Ther*, 23, 3, 329-337.
- Elin RJ (1988). Magnesium metabolism in health and disease. *Dis Mon*, 34, 4, 166-218.

- El-Bayoumy K (2001). The protective role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutat Res*, 475, 1-2, 123–139.
- Ergun HS, Rüssel HA, Bayşu N, Dündar Y (1987). Studies on the fluoride contents in water and soil, urine, bone and teeth of sheep, and urine of human from eastern and western parts of Turkey. *Dtsch Tierärztl Wschr*, 94, 7, 416-420.
- Evrengül H, Mir S (2016). Inherited disorders of renal hypomagnesaemia. *Pam Tıp Derg*, 9, 3, 248-253.
- Fisher RL, Medcalf TW, Henderson MC(1989). Endemic fluorosis with spinal cord compression. A case report and review. *Arch Intern Med*, 149, 3, 697-700.
- Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN (1990). Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 12, 4533-4537.
- Grynbas MD (1990). Fluoride effects on bone crystals. *J Bone Miner Res*, 5, 1, 169-175.
- Gowdy, KM (2004). Selenium supplementation and antioxidant protection in broiler chickens. A thesis submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science.
- Guan ZZ, Xiao KQ, Zeng XY, Long YG, Chen YH, Jiang SF, Wang YN (2000). Changed cellular membrane lipid composition and lipid peroxidation of kidney in rats with chronic fluorosis. *Arch Toxicol*, 74, 10, 602-608.
- Güngör K (2003). The important of vitamin and minerals in dentistry. *GÜ Diş Hek Fak Derg*, 20, 1, 51-56.
- Haimanot RT(1990). Neurological complications of endemic skeletal fluorosis, with special emphasis on radiculo-myelopathy. *Paraplegia*, 28, 244-251.
- He H, Wang H, Jiao Y, Ma C, Zhang H, Zhou Z (2015). Effect of sodium fluoride on the proliferation and gene differential expression in human RPMI8226 cells. *Biol Trace Elem Res*, 167, 1, 11-17.
- He LF, Chen JG (2006). DNA damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rat oral mucosal cells and hepatocytes. *World J Gastroenterol*, 12,7, 1144-1148.
- Heifetz SB, Horowitz HS (1984).The amounts of fluoride in current fluoride therapies safety considerations for children. *ASDCJ Dent Child*, 51, 4, 257–269.
- Heller KE, Eklund SA,Burt BA (1997). Dental caries and dental fluorosis at varying water fluoride concentrations. *J Public Healty Dent*, 57,3, 136-143.
- Hua K, Zhao H, Huang, M (2003). Effects of fluoride on ionized calcium and calciumchannel in osteoblast-like cell in vitro. *Chin J Appl Physiol*, 19, 2,179–181.
- Isaacson RA, Varner JA, Jensen KF (1997). Toxin-induced blood vessel inclusions caused by the chronic administration of aluminum and sodium fluoride and their implications for dementia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 825, 152-166.
- Ito M, Nakagawa H, Okada T, Miyazaki S, Matsuo S (2009). ER-stress caused by accumulated intracisternal granules activates autophagy through a different signal

- pathway from unfolded protein response in exocrine pancreas cells of rats exposed to fluoride. *Arch Toxicol*, 83, 2, 151–159.
- Izuora K, Twombly JG, Whitford GM, Demertzis J, Pacifici R, Whyte MP (2011). Skeletal fluorosis from brewed tea. *J Clin Endocrinol Metab*, 96, 8, 2318–2324.
- İnci A, Yıldırım A, Yavuz A, Düzlü Ö (2009). Bazı protozoon enfeksiyonlarda apoptozis. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 6, 2, 121-133.
- Jafari AI, Sankian M, Ahmadpour S, Varasteh AR, Haghiri H, (2008). Evaluation of Bcl-2 family gene expression and Caspase-3 activity in hippocampus STZ-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res*, 2008, 638-467.
- Jarvis HG, Heslop P, Kisima J, Gray WK, Ndossi G, Maguire A (2013). Prevalence and aetiology of juvenile skeletal fluorosis in the south-west of the Hai district, Tanzania – A community-based prevalence and case-control study. *Trop Med Int Health*, 18, 2, 222-229.
- Jia L, Zhang Z, Zhai L, Zhang Y, Sun G (2008). DNA damage induced by fluoride in rat kidney cells. *Fluoride*, 41,4, 297–300.
- Kahraman T, Alemdar S, Alişarlı M, Ağaoğlu S (2011). Fluoride levels of drinking water in bitlis province. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17,5,825-829.
- Kai M (2016). Roles of RNA-binding proteins in DNA damage response. *Int J Mol Sci*, 17, 3, 310-319.
- Karube H, Nishitai G, Inageda K, Kurosu H, Matsuoka M (2009). NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells. *J Dent Res*, 88, 5, 461–465.
- Kasai H, Crain PF, Kuchino Y, Nishimura S, Ootsuyama A, Tanooka H (1986). Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*, 7, 11, 1849-1851.
- Kasai H (1997). Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res*, 387, 3, 147-163.
- Ke L, Zheng X, Sun Y, Ouyang W, Zhang Z (2016). Effects of sodium fluoride on lipid peroxidation and PARP, XBP-1 expression in PC12 cell. *Biol Trace Elem Res*, 173, 1, 161-167
- Kono K, Yoshida Y, Yamagata H, Watanabe M, Shibuya Y, Doi K, (1987). Urinary fluoride monitoring of industrial hydrofluoric acid exposure. *Environ Res*, 42, 2, 415-420.
- Kubota K, Lee DH, Tsuchiya M, Young CS, Everett ET, Martinez-Mier EA, Snead ML, Nguyen L, Urano F, Bartlett JD (2005). Fluoride induces endoplasmic reticulum stress in ameloblasts responsible for dental enamel formation. *J Biol Chem*, 280, 24, 23194–23202.
- Kumar S, Kakar A, Gogia A, Byotra SP (2011). Skeletal fluorosis mimicking seronegative spondyloarthritis: A deceptive presentation. *Trop Doct*, 41, 4, 247-248.
- Kumari S, Rastogi RP, Singh KL, Singh SP, Sinha RP (2008). DNA damage: Detection strategies. *EXCLI J*, 7, 44-62.

- Kurdi MS (2016). Chronic fluorosis: The disease and its anaesthetic implications. *India Anesth*, 60, 3, 157-162.
- Küçükşenmen Ç, Sönmez H (2008). Diş hekimliğinde florun, insan vücudu ve dişler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi. *SDÜ Tıp Fak Derg*, 15, 3, 43- 53.
- Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Vanden BT, Vandenabeele P (2007). Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ*, 14, 1, 44-55.
- Lee JH, Jung JY, Jeong YJ, Park JH, Yang KH, Choi NK, Kim SH, Kim WJ (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.
- Leite Ade L, Santiago JF Jr, Levy FM, Maria AG, Fernandes Mda S, Salvadori DM, DA, Buzalaf MA (2007). Absence of DNA damage in multiple organs (blood, liver, kidney, thyroid gland and urinary bladder) after acute fluoride exposure in rat. *Hum Exp Toxicol*, 26,5, 435-440.
- Li Y, Liang CK, Katz BP, Brizendine EJ, Stookey GK (1995). Long-term exposure to fluoride in drinking water and sister chromatid exchange frequency in human blood lymphocytes. *J Dent Res*, 74,8, 1468-1474.
- Li W, Jiang B, Cao X, Xie Y, Huang T (2017). Protective effect of lycopene on fluoride-induced ameloblasts apoptosis and dental fluorosis through oxidative stress-mediated Caspase pathways. *Chem Biol Interact*, 261, 5, 27-34
- Lima PDL, Leite DS, Vasconcellos MC, Cavalcanti BC, Santos RA, Costa-Lotuf LV, Pessoa C, Moraes MO, Burbano RR (2007). Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1154-1159.
- Liu K, Wang G-Q, Ma L-Y, Jang P, Xiao B-Y, Urumqi CZ (1999). Adverse effects of combined arsenic and fluoride on liver and kidney in rats. *Fluoride*, 32, 4, 243-247.
- Liu L, Zhang Y, Gu H, Zhang K, Ma Lin (2015). Fluorosis induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in osteoblasts in vivo. *Biol Trace Elem Res*, 164, 1, 64-71.
- Lu J, Kaeck M, Jiang C, Wilson AC, Thompson HJ (1994). Selenite induction of DNA strand breaks and apoptosis in mouse leukemic L1210 cells. *Biochem Pharmacol* 47, 9, 1531–1535.
- Lu J, Chen H, Xu Q, Zheng J, Liu H, Li J, Chen K, (2010). Comparative proteomics of kidney samples from puffer fish *Takifugu rubripes* exposed to excessive fluoride: an insight into molecular response to fluorosis. *Toxicol Mech Methods*, 20, 6, 345–354.
- Lukyanenko LM, Skarabhatava AS, Slobozhanina EI, Kovaliova SA, Falcioni ML, Falcioni G (2013). In vitro effect of AlCl₃ on human erythrocytes: Changes in membrane morphology and functionality. *J Trace Elements Med Biol*, 27, 160-167.
- Lüleyap H (2008). Moleküler Genetiğin Esasları. Nobel Kitabevi, Adana.
- Machoy-Mokrzynska A, Machoy Z (1993). Another look at the interactions of fluorine with calcium. *Fluoride*, 26, 4, 237-239.

- Maheshwari UR, McDonald JT, Schneider VS, Brunetti AJ, Leybin L, Newbrun E, Hodge HC (1981). Fluoride balance studies in ambulatory healthy men with and without fluoride supplements. *Am J Clin Nutr*, 34, 12, 2679-2684.
- Mahmoudi M, Mercer J, Bennett M (2006). DNA damage and repair in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 71, 2, 259-268.
- Mendoza-Schulz A, Solano-Agama C, Arreola-Mendoza L, Reyes-Marquez B, Barbier O, Del Razo LM, Mendoza-Garrido ME (2009). The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells. *Toxicol Lett*, 190, 2, 179–186.
- Mirmalek SA, Jangholi E, Jafari M, Yadollah-Damavandi S, Javidi MA, Parsa Y, Parsa T, Salimi-Tabatabaee S, Kolagar HG, Jalil SK, Alizadeh-Navaei R (2016). Comparison of in vitro cytotoxicity and apoptogenic activity of magnesium chloride and cisplatin as conventional chemotherapeutic agents in the MCF-7 cell line. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17, 131-134.
- Mitchell, AD, Benevenga NJ (1978). The role of transamination in methionine oxidation in the rat. *J Nutr*, 108, 1, 67-78.
- Mousny M, Omelon S, Wise L, Everett ET, Dumitriu M, Holmyard DP, Banse X, Devogelaer JP, Grtnpas MD (2008). Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics. *Bone*, 43, 6, 1067-1074.
- Murao H, Sakagami N, Iguchi T, Murakami T, Suketa Y (2000). Sodium fluoride increase intracellular calcium in rat renal epithelial cell line NRK-52E. *Biol Pharm Bull* 23, 5, 581–584.
- Nishimura S (2011). 8-Hydroxyguanine: A base for discovery. *DNA Rep (Amst)*, 10, 11, 1078-1083.
- Ott SM (1985). Aluminium accumulation in individuals with normal renal function. *Am J Kidney Dis*, 6, 5, 297-301.
- Özgürtaş T, Kutluay T (2002). Magnezyum metabolizması ve ölçümü. *T Klin Tıp Bilimleri*, 22, 530–534.
- Öztürk F (2002). Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9, 2, 143-148.
- Pratusha NG, Banji OJ, David B, Ragini M, Pavani B (2011). Fluoride toxicity – A harsh reality. *Int Res J Pharm*, 2, 4, 79-85.
- Quadri JA, Alam MM, Sarwar S, Singh S, Shariff A, Das TK (2016). Fluoride induced nephrotoxicity: apoptosis, ultrastructural changes and renal tubular injury in experimental animals. *Ayurveda and Pharma Res*, 4,8, 91-95.
- Radomska-Leśniewska DM, Hevelke A, Skopiński P, Bałan B, Józwiak J, Rokicki D, Skopińska-Różewska E, Białoszevska A (2016). Reactive oxygen species and synthetic antioxidants as angiogenesis modulators: Clinic implication. *Pharmacol Rep*, 68, 2, 462-471.
- Reddy DR (2009). Neurology of endemic skeletal fluorosis. *Neurol India*, 57, 1, 7-12.
- Ribeiro DA, Alves de Lima PL, Marques ME, Salvadori DM (2006). Lack of DNA damage induced by fluoride on mouse lymphoma and human fibroblast cells by single cell gel (comet) assay. *Braz Dent J*, 17,2, 91-94.

- Rondeau V, Commenges D, Jacqmin-Gadda IH, Dartiques JF (2000). Relation between aluminum concentrations in drinking water and Alzheimer's disease: An 8-year follow-up study. *Am J Epidemiol*, 152, 1, 59-66.
- Rude RK, Gruber HE (2004). Magnesium deficiency and osteoporosis: Animal and human observations. *J Nutr Biochem*, 15, 12, 710-716.
- Rzeuski R, Chlubek D, Machoy Z (1998). Interactions between fluoride and biological free radical reactions. *Fluoride*, 1, 43-44.
- Schiffli H, Binswanger U (1982). Renal handling of fluoride in healthy man. *Ren Physiol*, 5, 4, 192-196.
- Shamberger RJ (1983). Selenium deficiency diseases in animals. In: *Biochemistry of Selenium*. Plenum Press, New York, NY 10013, 31-58.
- Schirmacher K, Nonhoff D, Wiemann M, Peterson-Grine E, Brink PR, Bingmann D (1996). Effect of calcium on gap junctions between osteoblast-like cells in culture. *Calcif Tissue Int*, 59, 259-264.
- Shashi A, Singh JP, Thapar SP (2002). Toxic effect of fluoride on rabbit kidney. *Fluoride* 35, 1, 38-50.
- Shen HM, Yang CF, Ong CN (1999). Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Int J Cancer*, 81, 5, 820-828.
- Sikka SC, Rajasekaran M, Hellstrom WJ (1995). Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl*, 16, 6, 464-468.
- Somova LI, Missankov A, Khan MS (1997). Chronic aluminium intoxication in rats: dose-dependent morphological changes. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 19, 9, 599-604.
- Song HG, Gao PJ, Wang FC, Chen YC, Yan YX, Guo M, Wang Y, Huang BF (2014). Sodium fluoride induces apoptosis in the kidney of rats through caspase-mediated pathways and DNA damage. *J Physiol Biochem* 70, 857-868.
- Sözbilir NB, Bayşu N (2008). *Biyokimya. Güneş Tıp Kitabevleri*, Ankara.
- Spak CJ, Berg U, Ekstrand J (1985). Renal clearance of fluoride in children and adolescents. *Pediatrics*, 75, 3, 575-579.
- Sujay M, Madhavi S, Aravind G, Hasan A, Venugopalan VM (2014). Transforaminal sacral approach for spinal anaesthesia in orthopaedic surgery: A novel approach. *Anaesth Essays Res*, 8, 2, 253-255.
- Suketa Y, Kanamoto Y (1983). Arole of thyroid-parathyroid function in elevation of calcium content in kidney of rats after a single large dose of flüoride. *Toxicology*, 26, 335-345.
- Sunde RA, Thompson BM, Palm MD, Weiss SL, Thompson KM, Evenson JK (1997). Selenium regulation of selenium-dependent glutathione peroxidases in animals and transfected CHO cells. *Biomed Environ Sci*, 10, 2-3, 346- 355.
- Susheela AK (2001). Treatise on fluorosis. *Fluoride*, 34, 3, 181-183.

- Suzuki M, Bandoski C, Bartlett JD (2015). Fluoride induces oxidative damage and SIRT1/autophagy through ROS-mediated JNK signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 369-378.
- Şanlı Y, Kaya S (1995). Veteriner Klinik Toksikoloji. Medisan Yayınevi, 80–85.
- Şendil Ç, Bayşu N (1974). İnsan ve Hayvanlarda Ağrı ili Doğubeyazıt İlçesi Köylerinde görülen flor zehirlenmesi ve bunu Van İli Muradiye İlçesi Köylerinde de saptamamızla ilgili ilk tebliğ. *Ankara Ü Vet Fak Derg*, 20, 4, 474-485.
- Şireli M, Bulbul A (2004). The effect of acute fluoride poisoning on nitric oxide and methemoglobin formation in the Guinea pig. *Turk J Vet Anim Sci*, 28, 591–595.
- Taşçene N, Karagül H (2012). Farklı kültür ortamlarının MDCK hücrelerine etkilerinin faz kontrast mikroskop ile gösterilmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 59, 235-239.
- Tayfur M, Ünlüoğlu İ, Bener Ö (2002). Aluminum and healthy. *Gıda*, 27,4, 305-309.
- Turner, RJ, Weiner JH, Taylor DE (1998). Selenium metabolism in escherichia coli. *Biometals*, 11, 3, 223-227.
- Ulukaya E (2007). Apoptozis Ders Notları. Erişim: http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf, Erişim tarihi: 04.10.2016.
- Ulusoy E, Breusch FL (1981). Temel ve Anorganik Kimya, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 2788, 193-195.
- Uslu B (1982). Endemik fluorosis. *Ege Ü Tıp Fak Derg*, 21, 1019-1028.
- Usuda K, Kono K, Dote T, Nishiura K, Miyata K, Nishiura H, Shimahara M, Sugimoto K (1998). Urinary biomarkers monitoring for experimental fluoride nephrotoxicity. *Arch Toxicol*, 72, 2, 104-109.
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 27, 2, 120-139.
- Varol E, İcli A, Aksoy F, Bas HA, Sutcu R, Ersoy IH, Varol S, Özaydin M (2013). Evaluation of total oxidativ estatusand total antioxidant capacity in patients with endemic fluorosis. *Toxicol Ind Health*, 29, 2, 175–180.
- Van Der Voet GB, Schijins O, de Wolff FA (1999). Fluoride enhances the effect of aluminium chloride on interconnections between aggregates of hippocampal neurons. *Arch Physiol Biochem*, 107, 1, 15-21.
- Varner JA, Jensen KF, Horvath W, Isaacson RL (1998). Chronic administration of aluminum-fluoride or sodium-fluoride to rats in drinking water: alterations in neuronal and cerebrovascular integrity. *Brain Res*, 16, 784 (1-2), 284-298.
- Wang YY, Zhao BL, Li XJ, Su Z, Xi WJ (1997). Spin trapping technique studies on active oxygen radicals from human polymorphonuclear leukocytes during fluoride-stimulated respiratory burst. *Fluoride*, 30, 1, 5–15.
- Wang L, Nancollas GH, Henneman ZJ, Klein E, Weiner S (2006). Nanosized particles in bone and dissolution insensitivity of bone mineral. *Biointerphases*, 1, 3, 106-111
- Wang W, Li R, Tan J, Luo K, Yang L, Li H, Li Y (2002). Adsorption and leaching of fluoride in soils of china. *Fluoride*, 35, 2, 122-129.

- Wang Z, Yang X, Yang S, Ren G, Ferreri M, Su Y, Chen L, Han B (2011). Sodium fluoride suppress proliferation and induce apoptosis through decreased insulin-like growth factor I expression and oxidative stress in primary cultured mouse osteoblasts. *Arch Toxicol*, 85, 11, 1407-1417.
- Wei Y, Wu Y, Zeng B, Zhang H (2014). Effect of sodium fluoride treatment in vitro on cell proliferation, BMP-2 and BMP-3 expression in human osteosarcoma MG-63 cells. *Biol Trace Elem Res*, 162, 18-25.
- Whitford GM, Pashley DH (1984). Fluoride absorption: The influence of gastric acidity. *Calcif Tissue Int*, 36, 3, 302-307.
- Whitford GM, Bawden JW, Bowen WH, Brown LJ, Ciardi JE, Clarkson TW, Imrey PB, Kleerekoper M, Marthaler TM, McGuire S, Ophaug RH, Robinson C, Schultz JS, Stookey GK, Tochman MS, Venkateswarlu P, Zero DT (1994). Report for Working Group I: Strategies for improving the assessment of fluoride accumulation in body fluids and tissues. *Adv Dent Res*, 8, 1, 113-115.
- Whitford GM (1996). The metabolism and toxicity of fluoride 2nd, revised edition. *Monographs in Oral Science*, 16, Switzerland, Karger.
- Whitford GM, Pashley DH, Garman RH (1997). Effects of fluoride on structure and function of canine gastric mucosa. *Dig Dis Sci*, 42, 10, 2146-2155.
- World Health Organisation (WHO) Expert Committee on Oral Health Status and Fluoride Use. (1994). Fluorides and oral health. WHO Technical Report Series No. 846. World Health Organisation, Geneva.
- Whitford GM (1992). Acute and chronic fluoride toxicity. *J Dent Res*, 71, 5, 1249-1254.
- Wu Y, Zhao Q, Zhang ZG (2010). The rat renal injury of chronic fluorosis. *Chin J Public Health*, 26, 66-67.
- Xiong X, Liu J, He W, Xia T, He P, Chen X, Yang K, A Wang (2007). Dose-effect relationship between drinking water fluoride levels and damage to liver and kidney functions in children. *Environ Res*, 103, 112-116.
- Xu H, Hu LS, Chang M, Jing L, Zhang XY, Li GS (2005). Proteomic analysis of kidney in fluoride-treated rat. *Toxic Lett*, 160, 1, 69-75.
- Xu H, Wang CH, Zhao ZT, Zhang WB, Li GS (2008). Role of oxidative stress in osteoblasts exposed to sodium fluoride. *Biol Trace Elem Res*, 123, 1-3, 109-115.
- Yang GQ, Wang SZ, Zhou RH, Sun Z (1983). Endemic selenium intoxication of humans in China. *Am J Clin Nutr*, 37, 5, 872-881.
- Yang S, Wang Z, Farquharson C, Alkasir R, Zahra M, Ren G, Han B (2011). Sodium fluoride induces apoptosis and alters bcl-2 family protein expression in MC3T3-E1 osteoblast cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 410, 910-915.
- Yang S, Zhang L, Miao Ke, Qian W, Zhang Z (2013). Effect of selenium intervention on chronic fluorosis-induced renal cell apoptosis in rats. *Biol Trace Elem Res*, 153, 237-242.
- Yokuş B, Çakır DÜ (2002). Biomarker of in vivo oxidative DNA damage; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *T Klin J Med Sci*, 22, 535-543.

- Yu J, Shi YX, Wang W, Wu Y, Sun DJ (2008). Effects of calcium on the growth of femur distal epiphyseal plate cartilage in fluorosis rats. *Chin J Endemiol*, 27, 43–46.
- Zalewska A, Knaś M, Maciejczyk M, Waszkiewicz N, Klimiuk A, Choromańska M, Matczuk J, Waszkiel D, Car H (2015). Antioxidant profile, carbonyl and lipid oxidation markers in the parotid and submandibular glands of rats in different periods of streptozotocin induced diabetes. *Arch Oral Biol*, 60, 9, 1375-1386.
- Zhang Y, Sun G, Jin Y, Wang Y (2003). Effects of fluoride on cell cycle and apoptosis in cultured osteoblasts of rats. *Wei Sheng Yan Jiu*, 32, 5, 432–433.
- Zhang Y, Li W, Chi HS, Chen J, DenBesten PK (2007). JNK/c-Jun signaling pathway mediates the fluoride-induced down-regulation of MMP-20 in vitro. *Matrix Biol*, 26, 8, 633–641.
- 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-κB in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicol Lett*, 179, 1, 1–5.
- Zhang Z, Zhou B, Wang H, Wang F, Song Y, Xi S (2015). Maize purple plant pigment protects against fluoride-induced oxidative damage of liver and kidney in rats. *Int J Environ Res Public Health*, 11, 1, 1020-1033.
- Zhang Y, Sun X, Sun G, Liu S, Wang L (2006). DNA damage induced by fluoride in rat kidney cells. *Fluoride*, 39, 3, 191-194.
- Zhang Y, Zhang K, Ma L, Gu H, Li J, Shuang L (2016). Fluoride induced endoplasmic reticulum stress and calcium overload in ameloblast. *Archives of Oral Biology*, 69, 95-101.
- Zhao M, Duan XF, Wen DH, Chen GQ (2009). PU.1, A novel caspase-3 substrate, partially contributes to chemotherapeutic agents-induced apoptosis in leukemic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 382, 3, 508–513
- Zhu WJ, Zhang ZG, Shen XY (2009). Pathogenesis of fluorosis and the role of selenium against fluoride. *Chin J Endemiol*, 28, 6, 704–706.

ÖZGEÇMİŞ

Sedat ÇETİN, 1981 yılında Ankara'da dünyaya geldi. İlk, orta ve lise eğitimini Ankara'da tamamladı. 2002 yılında girdiği Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesin'den 2007 yılında mezun oldu. 2008 yılında askerlik eğitimini Gemlik Askeri Veteriner Okulu ve Eğitim Merkez Komutanlığı'nda Asteğmen olarak tamamladı. 2009 yılında Iğdır İl Tarım Müdürlüğünde göreve başladı. 2011 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda açılan Araştırma Görevlisi kadrosunda göreve başladı. Halen aynı kurumda görev yapmaktadır. Evli bir çocuk babasıdır.

EK 1. ETİK KURUL ONAY BELGESİ



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

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

Araştırmanın Adı :Renal ve Osteoblast Hücre Hatlarında NaF Uygulaması, Minerallerin Apoptozis ve DNA Hasarı Üzerine Etkilerinin

Title of the Research :Investigation of NaF and minerals treatment onto DNA damage and osteoblastcell lines

Araştırmacı(lar) : Yürütücü / Chief investigator: Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR

Investigator(s) : Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): -Prof. Dr. Fatmagül YUR Arş. Gör. Sedat ÇETİN

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

Tür / species:

Sayı / Numbers:

Yaş /Age:

Cinsiyet / Sex: Erkek-dişi /

Araştırmanın Öngörülen Başlama Tarihi / Proposed Research Starting Date: 05.05.2016

Araştırmanın Öngörülen Bitiş Tarihi / Proposed Research Completion Date: 10.01.2017

Dosya no / File no:

Karar:


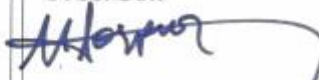
Yukarıda bilgileri verilen planlanan araştırma projesi için Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onayı gerekmemektedir. Tarih: 29/ 12 / 2016 ; Karar no: 2016/12

Decision:

The proposed research project detailed above does not need Animal Researches Ethic Committee Approval. Date: 29 / 12 / 2016 Decision number 2016/12

	BASKAN/CHAIR Prof. Dr. Semiha DEDE	
ÜYE Prof. Dr. Fazıl ŞEN	ÜYE Prof. Dr. Sıddık KESKİN	ÜYE Prof. Dr. Suphi DENİZ
ÜYE Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	ÜYE Doç. Dr. Atilla DÜRMÜŞ	ÜYE Doç. Dr. Abdülbaki AKSAKAL
ÜYE Doç. Dr. Nalan ÖZDAL	ÜYE Yrd. Doç. Dr. Özer ALKAN	ÜYE Yrd. Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ
ÜYE Yrd. Doç. Dr. Canser Yılmaz DEMİR	ÜYE Yrd. Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN	ÜYE Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU
ÜYE Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET		

EK 2. TEZ ORJİNALLİK RAPORU

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU	
Tarih: 23/01/2017	
Tez Başlığı / Konusu: Renal ve Osteoblast Hücre Hatlarında NaF Uygulaması, Bazı Minerallerin Apoptozis ve DNA Hasarı Üzerine Etkileri	
Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 65 sayfalık kısmına ilişkin, 20/01/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6 (Altı) dir. Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir: - Kabul ve onay sayfası hariç, - Teşekkür hariç, - İçindekiler hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - Gereç ve yöntemler hariç, - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - Tezden çıkan yayınlar hariç, - 7 kelimededen daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)	
Yüzlüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.	
Gereğini bilgilerinize arz ederim.	Tarih ve İmza 23.01.2017  Sedat ÇETİN
Adı Soyadı: Sedat ÇETİN Öğrenci No: Anabilim Dalı:139301023 Programı: Veteriner/Biyokimya Statüsü:Y.Lisans <input type="checkbox"/> Doktora <input checked="" type="checkbox"/>	
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR  (Unvan, Ad Soyad, İmza) Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza)