

Deneyisel Florozis Oluşturulmuş Ratların Böbrek Dokusunda C ve E Vitaminlerinin İnflamasyon Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisi

The Effect of Vitamins C and E on Inflammation Gene Expression in Experimental Fluorosis-Induced Rat Kidney Tissue

Ayşe USTA^{1*}, Ahmet Cihat ÖNER², Veysel YÜKSEK³, Semiha DEDE⁴, Sedat ÇETİN⁴

¹ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Van, TÜRKİYE.

² Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE.

³ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Özalp Meslek Yüksekokulu, Van, TÜRKİYE.

⁴ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE.

* Sorumlu yazar: Ayşe USTA; E-mail: ayseusta@yyu.edu.tr.

ÖZET

Amaç: İnflamasyon, flor kaynaklı toksikasyon mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli bir adımdır. Bu çalışmada, florozis nefrotoksitesinde tedavi amacıyla C ve E vitaminlerinin uygulanmasının, inflamasyon gen ekspresyonları üzerine olası etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmada 48 adet 200-250 g ağırlığında Wistar-Albino ırkı erkek rat kullanıldı. Kontrol(K), Mısır yağı(M), NaF(NaF), NaF+vitamin E(NVE), NaF+vitamin C(NVC), NaF+vitamin C+vitamin E(NVCE) olmak üzere her biri 8 rat içeren 6 grup oluşturuldu. 16 hafta boyunca 150 mg/kg/gün NaF ratların içme sularına ilave edildi. Vitamin E mısırozü yağında eritilerek verildiği için mısır yağı kontrol grubu oluşturuldu ve ratlara 0,2 ml/gün olarak mısırozü yağ verildi. Tedavi gruplarına 16 hafta NaF verildikten sonra 4 hafta vitamin C (100 mg/kg/gün), vitamin E (300 mg/kg/gün), vitamin C+vitamin E (100 mg/kg/gün+300 mg/kg/gün) oral olarak uygulandı. Deney sonunda tüm gruplarda rat böbrek dokusundan elde edilen RNA izolasyon ürünlerinde, inflamasyon markırlarından IL-1 β , TNF- α genlerinin ekspresyonu real time-qPCR ile belirlendi. İnternal kontrol geni olarak beta-aktin (Actb) kullanıldı.

Bulgular: TNF- α ekspresyon seviyeleri, en yüksek NaF grubunda bulundu. Diğer tüm gruplarda önemli oranda düşüktü. IL-1 β gen ekspresyon düzeyleri; Mısır yağı ve NaF+vitamin C+E gruplarında en düşük, NaF ve NaF+vitamin C gruplarında ise en yüksek bulundu.

Sonuç: NaF ile deneysel oluşturulan floroziste artan florürün oluşturduğu olası böbrek hasarında tedavi amaçlı antioksidan vitamin uygulamasının inflamasyonu azalttığı görüldü. Vitamin C, vitamin E, vitamin C+vitamin E'nin inflamasyon markırları üzerinde kayda değer yararlı etkilerinin olduğu tespit edildi. NaF+vitamin C, NaF+vitamin E verilen gruplara kıyasla NaF+vitamin C+E kombinasyonunun inflamasyonu düşürmede daha etkili olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan vitamin, Böbrek, Florozis, Gen ekspresyonu, İnflamasyon.

ABSTRACT

Objective: Inflammation is an important step in elucidating fluorine-induced toxicity mechanisms. In this study, it was aimed to reveal the possible effects of the administration of vitamins C and E for the treatment of fluorosis nephrotoxicity on inflammation gene expressions.

Material and Method: In the study, 48 male Wistar-Albino rats weighing 200-250 g were used. Six groups of 8 rats each were formed as control(K), Corn oil(M), NaF(NaF), NaF+vitamin E(NVE), NaF+vitamin C(NVC), NaF+vitamin C+vitamin E(NVCE). For 16 weeks, 150 mg/kg/day NaF was added to the drinking water of rats. Since vitamin E was dissolved in corn oil, the corn oil control group was formed and corn oil was given to rats 0.2 ml/day. After NaF was administered to treatment groups for 16 weeks, vitamin C (100mg/kg/day), vitamin E (300mg/kg/day), vitamin C+vitamin E (100 mg/kg/day+300mg/kg/day) were administered orally for 4 weeks. At the end of the experiment, the expression of inflammation markers IL-1 β , TNF- α genes in RNA isolation products obtained from rat kidney tissue in all groups were determined by real time-qPCR. Beta-actin (Actb) was used as the internal control gene.

Results: TNF- α expression levels were highest in NaF group. It was significantly lower than in all other groups. IL-1 β gene expression levels; It was found lowest in corn oil and NaF + vitamin C + E groups and highest in NaF and NaF + vitamin C groups.

Conclusion: In possible kidney damage caused by increased fluoride in the experimentally induced fluorosis with NaF, it was observed that the application of antioxidant vitamins for therapeutic purposes reduced inflammation. It was determined that vitamin C, vitamin E, vitamin C+vitamin E had significant beneficial effects on inflammation markers. It was observed that the combination of NaF+vitaminC+E was more effective in reducing inflammation compared to the groups given NaF+vitamin C and NaF+vitamin E.

Keywords: Antioxidant vitamins, Fluorosis, Gene expression, Inflammation, Kidney.

Atf Yapmak İçin: Usta A, Öner AC, Yüksek V, Dede S, Çetin S. Deneyisel florozis oluşturulmuş ratların böbrek dokusunda C ve E vitaminlerinin inflamasyon gen ekspresyonu üzerine etkisi. *Van Sag Bil Derg* 2021, 14,(2) 199-208.

<https://doi.org/10.52976/vansaglik.872528>.

Geliş Tarihi: 03/02/2021

Kabul Tarihi: 14/04/2021

Basılama Tarihi: 30/08/2021

GİRİŞ

Kronik florozis, patogenezinde rol oynadığı düşünülen oksidatif stres ve hücrel membran lipidleri modifikasyonu yoluyla organlarda büyük sistem hasarına neden olmaktadır (Guan ve ark., 2000). Florür, oksidatif stres nedeniyle mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) kaskad aktivasyonu yoluyla hücreyi apoptoza indükler (Tian ve ark., 2018). Flor toksisitesinin altında yatan mekanizmalar arasında sinaptik iletimdeki bozukluklar, hücre içi sinyal kaskad bileşenlerinin değişen aktiviteleri, bozulmuş protein sentezi, transkripsiyonel faktörlerin eksikliği, oksidatif stres, metabolik değişiklikler, inflamasyon yer alır (Agalakova ve Nadei, 2020). Kronik florüre maruz kalma sonucu oluşan inflamasyon, hücre dışı matriks parçalanması ve değişen kalsiyum metabolizmasından dolayı kardiyomiyositlerde apoptoza neden olmaktadır. Oksidatif stres indüksiyonunun, çok sayıda inflamatuvar hücrenin görevlendirilmesiyle hücre ve doku hasarlarına yol açtığı görülmüştür (Quadri ve ark., 2018). İnflamasyon, organizmayı saldırılara karşı korumak için bağışıklık sisteminin enfeksiyona veya doku hasarına verdiği ilk tepkidir (Varol ve ark., 2012). Aktive edilmiş mikrogliya, proinflamatuvar transkripsiyon faktörlerinden nükleer faktör kappa B (NF-KB)'yi ve proinflamatuvar sitokinleri ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), interlökin 1 beta (IL-1 β), interlökin 6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) gibi nörotoksik molekülleri serbest bırakır. Diğer inflamatuvar yanıtlar, siklooksijenazların (Cox1 ve Cox2) ve birçok protein kinazın, nörotropik ve transkripsiyonel faktörlerin aktivitelerini düzenleyen prostanoidlerin (prostaglandinler ve tromboksanlar) uyarılmasını içerir. Kronik florozise inflamatuvar süreçler eşlik eder (Blaylock, 2007).

Böbrek, florürün vücuttan atılmasındaki görevi nedeniyle vücutta florür maruziyetine duyarlı hedef organlardan biridir (Xue ve ark., 2000). Aşırı florüre maruz kalan deney hayvanlarında böbrek fonksiyon bozukluğu, anormal metabolizmanın yanı sıra histopatolojik değişiklikler gözlenmiştir

(Xiong ve ark., 2007). Aşırı florürün tübüler disfonksiyonu indüklediği ve dolayısıyla idrarda seyrelme, bozulmuş protein geri emilimi ve idrarda artmış kalsiyum ve fosfat atılımı ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Santoyo-Sanchez ve ark., 2013). Kronik florozis yüksek seviyeli oksidatif stresin indüklediği rat böbreğinde anormal mitokondriyal ve morfolojik değişikliklere yol açmıştır (Qin ve ark., 2015). Son yapılan elektrofizyoloji çalışmalarında florür maruziyetinin (5 mg/L) fare hipokampus hücrelerinde L-tipi kalsiyum kanalını açarak aşırı kalsiyum yüklenmesine (Liao ve ark., 2017), ayrıca antioksidan kapasiteyi düşürerek böbrek hasarına yol açtığını göstermiştir (Shao ve ark., 2020).

Flor intoksikasyonu, esas olarak bronkoalveolar lavaj sıvısında nötrofillerin, eozinofillerin, lenfositlerin, makrofajların ve protein geçirgenlik indeksinin toplam ve diferansiyel hücre sayısındaki artışla kanıtlandığı üzere inflamasyona neden olur. NaF'ın sitotoksitesiyi uyardığını, mitokondriyal reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırdığını ve F9 embriyonik karsinom hücrelerinde apoptoza uyardığı gözlemlenmiştir. Ancak, NaF ile indüklenen tüm mitokondriyal oksidatif yaralanmaların, C vitaminin ön tedavisi ile Sirt1'in (Sirtuin 1) aşırı ekspresyonu yoluyla verimli bir şekilde iyileştirildiği bildirilmiştir (Peng ve ark., 2019). E vitamini de NaF'ın toksik etkilerini ciddi olarak azaltmıştır (Yüksek ve ark., 2017a; Yüksek ve ark., 2020).

Oksidatif stres ve inflamasyonun kronik F toksisitesinde arttığı bilinmektedir. İnflamasyon, flor kaynaklı toksikasyon mekanizmalarının aydınlatılmasında izlenen bir adımdır. İnflamasyonu inhibe etmeye yönelik tedaviler florozisin neden olduğu hasarı engellemede önemli bir hedef olabilir. Bu çalışmada, C ve E vitaminlerinin floroziste tedavi amacıyla kullanılması ve C+E vitamin kombinasyonu ile mRNA ekspresyon düzeyinde karşılaştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışma, deney hayvanlarının kullanımına dair 3R kuralı çerçevesinde, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi,

Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi 13/11/2014; 2014-12 nolu Etik Kurul Kararı ile izin verilen "Deneysel florozis oluşturulmuş ratlarda vitamin C ve vitamin E'nin DNA hasarı üzerine etkisi" isimli projenin sonunda ratlardan alınan böbrek doku örneklerinde yapıldı. Proje Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (30.11.2017 tarihli 2017/11 nolu karar).

Hayvan materyali ve deneme gruplarının hazırlanması

Çalışmada Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, 48 adet 200-250 g ağırlığında Wistar-Albino ırkı erkek rat kullanıldı. Denekler rastgele her biri 8 rattan oluşan altı deneme grubu olarak ayrıldı.

1. Kontrol grubu (K): Normal içme suyu ve rat yemi *ad-libitum* verildi.
2. Mısır yağı grubu (M): 16 hafta oral olarak 0,2 ml/gün mısırözü yağı oral yoldan verildi.
3. NaF grubu (NaF): 16 hafta içme suyu ile NaF (150 mg/kg/gün) (He ve Chen, 2006) verildi.
4. NaF+vitamin E grubu (NVE): 16 hafta içme suyu ile NaF (150 mg/kg/gün) verildikten sonra 4 hafta boyunca normal içme suyu yanında vitamin E mısırözü yağında eritilerek (300 mg/kg/gün) (Alireza ve ark., 2013) oral yoldan verildi.
5. NaF+vitamin C grubu (NVC): 16 hafta içme suyu ile NaF (150 mg/kg/gün) verildikten sonra 4 hafta boyunca normal içme suyu yanında vitamin C (100 mg/kg/gün) (Murugesan ve ark., 2005) suda eritilerek oral yoldan verildi.
6. NaF+vitamin C+E (NVCE): 16 hafta içme suyu ile NaF (150 mg/kg/gün) verildikten sonra 4 hafta boyunca normal içme suyu yanında yağda eritilmiş vitamin E (300 mg/kg/gün) + suda eritilmiş vitamin C (100 mg/kg/gün) oral yoldan verildi.

Ratlar deneme süresince 12 saat karanlık/aydınlık uygulanmış, sıcaklığı 22±2 °C olarak ayarlanmış

odalarda, önlerinde sürekli olarak yem ve taze su bulunan kafeslerde barındırıldı.

Doku örneklerinin toplanması ve analiz için hazırlanması

Böbrek dokuları çalışma gününe kadar -80 °C'de saklandı. Çalışma günü saklanan dokular oda sıcaklığında çözülmeye bırakıldı ve yaklaşık 100 mg kadarı steril tüplere alındı. Dokuların üzerine 0,2 ml steril fosfat tamponu eklenerek homojenize edildi. Homojenize edilen dokular santrifüj edildi. Tüpün üstünde kalan sıvı kısım atıldı ve pellet de hemen total mRNA izolasyon aşamasına geçildi.

RNA eldesi ve analizi

Pellet üzerine 1 ml soğuk trizol ayırıcı ilave edilip protokol uygulanarak saf RNA elde edildi (Chomczynski ve Mackey, 1995). Total RNA'ları kontrol etmek için elde edilen RNA'dan 5 µl alındı, gelred eklenerek % 0,7'lik agaroz jel elektroforezi ile yürütme işlemi yapıldı. Yürütme sonrasında RNA'ların jel elektroforez fotoğrafları çekildi. 28S, 18S ve 5S RNA görüntüsü net şekilde gözlemlendi. Total RNA'nın kantitatif değerlendirilmesinde (BioDrop, UK) nanodrop spektrofotometre cihazı kullanıldı. Total RNA'nın 260 ve 280 nm'de ki absorbansı ölçülerek RNA'nın hem miktarı hem de saflığı saptandı.

cDNA eldesi ve RT-qPCR analizi

cDNA eldesi için Rotor-Gene Q Software-Run cihazı ile Wizscript kit (Wizbio WizScript cDNA Sentez Kiti, Kore) protokolüne göre reverse transkripsiyon işlemi gerçekleştirildi.

Tüm gruplarda rat böbrek dokusundan elde edilen RNA izolasyon ürünlerinde inflamasyon markırlarından IL-1β, TNF-α genlerinin ekspresyon seviyeleri real time-qPCR yöntemi ile belirlendi. Elde edilen cDNA'lar hedef gen bölgesine özgü olarak tasarlanmış primerler (Sentegen, Türkiye) yardımıyla Wizbio Wizpure™ qPCR Mastermix (SYBR) kit kullanılarak gerçek zamanlı-PCR (Qiagen, Rotor Gen, USA) cihazı kullanılarak çoğaltıldı. Ekspresyon analizlerinde kontrol geni olarak Beta-aktin

(Actb) kullanıldı. Her bir örnek için 3 tekrarlı Gerçek Zamanlı PCR yapıldı. CT'ler (cycle treshold) amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcı itibarıyla belirlendi. Ekspresyon analizlerinde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülasyonu kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılık kontrol geni ekspresyonunun artış-azalış kat sayısı ile karşılaştırılıp değerlendirildi (Bustin, 2004).

İstatistiksel Analiz

Üzerinde durulan özellikler için tanımlayıcı istatistikler; Kruskal Wallis test sonuçları için uygun olacak şekilde median (min.-maks) ya da değişim genişliği kullanıldı. Bu özellikler bakımından gruplar arasında fark olup olmadığını belirlemek amacıyla Kruskal-Wallis testi, farklı grupları belirlemede

Dunnet çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Hesaplamalar için SPSS (ver: 13) istatistik paket programı kullanıldı

BULGULAR

Hedef genlerin ekspresyon seviyeleri

Böbrek doku örneklerinde ölçülen inflamasyon genlerine ait ekspresyon miktarları Tablo 1'de verilmektedir.

TNF- α ekspresyon seviyeleri, en yüksek NaF grubunda bulundu. Diğer tüm gruplarda önemli oranda düşüktü. IL-1 β gen ekspresyonları, mısır yağı ve NaF+vitamin C+E gruplarında en düşük bulundu. NaF ve NaF+vitamin C gruplarında en yüksek bulundu.

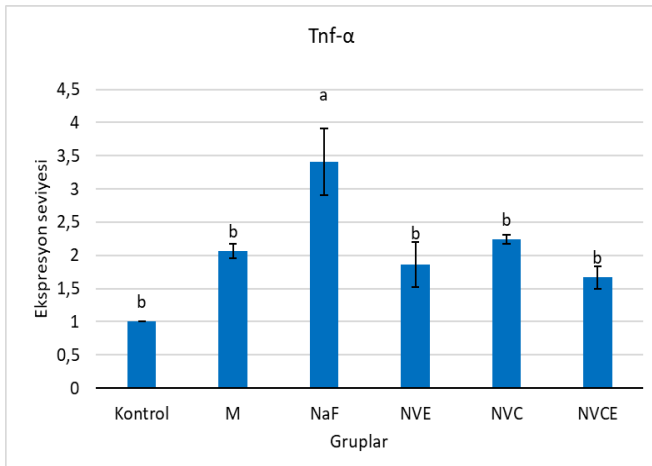
Tablo 1. Deneme gruplarına ait gen ekspresyon seviyeleri.

	Gruplar	Mean	Std. Dev.	Medyan	Min.	Max.	IQR	P
TNF- α	Kontrol	1.000	0.001	1.000b	1.00	1.00	0.01	0.001
	M	2.066	0.319	2.057 b [#]	1.72	2.43	0.65	
	NaF	3.411	1.216	4.005 a	1.79	4.38	2.34	
	NVE	1.864	0.965	1.661 b	0.81	3.39	1.87	
	NVC	2.244	0.189	2.239 b	2.02	2.48	0.40	
	NVCE	1.665	0.479	1.846 b	0.93	2.09	0.95	
IL-1 β	Kontrol	1.000	0.001	1.000b	1.00	1.00	0.01	0.001
	M	0.589	0.169	0.581 b	0.41	0.79	0.32	
	NaF	2.255	1.975	1.445 a	1.36	6.29	2.51	
	NVE	1.726	0.069	1.725 a	1.64	1.82	0.14	
	NVC	2.153	0.621	2.124 a	1.50	2.87	1.17	
	NVCE	0.489	0.019	0.488 b	0.46	0.51	0.04	

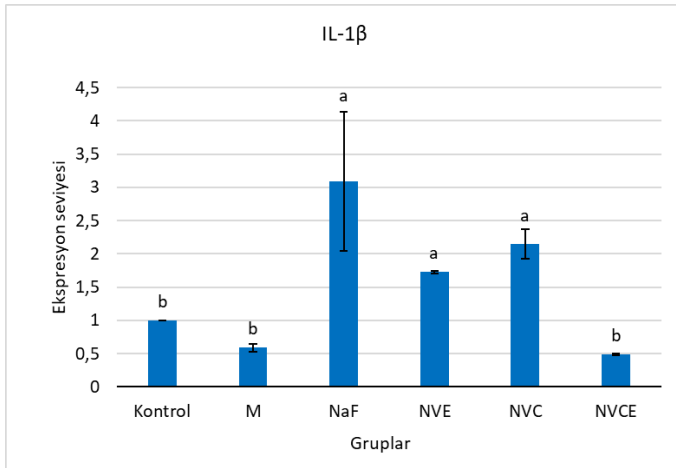
[#] Farklı harfi alan gruplar arası fark istatistik olarak önemlidir (p<0.05)

Çalışma sonucuna göre, TNF- α gen ekspresyon düzeylerinin NaF uygulanan grupta önemli oranda yüksek olduğu (p<0.05), NaF+vitamin E, NaF+vitamin C ve NaF+ vitamin C+E verilen gruplarda ise bu düzeylerin azaldığı (p<0.05) görüldü (Şekil 1).IL-1 β gen ekspresyon düzeylerinin

NaF uygulanan grupta önemli oranda yüksek olduğu (p<0.05), NaF+vitamin E, NaF+vitamin C, NaF+ vitamin C+E verilen gruplarda ise bu düzeylerin azaldığı (p<0.05) görüldü. IL-1 β gen ekspresyon düzeyleri; en düşük mısır yağı ve NaF+vitamin C+E gruplarında, en yüksek ise NaF ve NaF+vitamin C gruplarında bulundu (Şekil 2).



Şekil 1. TNF- α geninin gruplara ait ekspresyon seviyeleri.



Şekil 2. IL-1 β geninin gruplara ait ekspresyon seviyeleri.

TARTIŞMA

Florun tıp ve endüstriyel alanda yaygın kullanımının ardından tarihte daha önce hiç olmadığı kadar Flora maruziyet giderek artmaktadır. Örneğin çay bitkisi (*Camellia sinensis*) yüksek miktarda F ve Al biriktirme yetenekleriyle bilinir ve bir fincan siyah çayın 1.4 mg F içerebileceği bildirilmektedir (Wagh ve ark., 2017). Yakın zamanda Dünya Sağlık Örgütü, halk sağlığı açısından endişe verici on kimyasal listesine floru da eklemiştir. Ayrıca Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi tarafından F'nin gerekli olduğu hiçbir fizyolojik fonksiyon bulunmadığından F eksikliği tanımlanmamıştır (Efsa, 2013). Fazla florür alımının oksidatif stresin oluşturduğu lipid peroksidasyonu ve mitokondriopati nedeniyle yu-

muşak doku hasarına neden olduğu bilinmektedir (Quadri ve ark., 2018). Sert dokularda aşırı florür iyonları birikmesi nedeniyle iskelet veya diş florozuna neden olduğu bildirilmektedir (Blaszczyk ve ark., 2012). Hücreler, hayvanlar, insanlarla yapılan çeşitli çalışmalarda florun hem yumuşak hem de sert dokuda hasarlar oluşturmasının yanısıra flor nörotoksitesine de neden olduğu bildirilmiştir. Adenilil siklaz, alanin transaminaz, laktat dehidrojenaz ve glikojen fosforilaz dahil olmak üzere 20 enzim F tarafından uyarılır. Dolayısıyla F'nin enerji metabolizmasını değiştirebileceği ve çok sayıda metabolik bozukluğu tetikleyebileceği gözlenmiştir (Hirzy ve ark., 2017; Strunecka ve Strunecky, 2019).

Böbrekte oluşturduğu nefrotoksitesiyi değerlendirme açısından yapılan çalışmada florüre maruziyetin böbrek hücrelerinde hücre içi L-tipi kalsiyum kanalının açılmasına neden olduğu, Bax / Bcl-2 oranının ekspresyonunu artırarak apoptozu artırdığı tespit edilmiştir. Kalsiyum düzenleyici Cav1.2 proteininin anormal ekspresyonunun, hücre dışı kalsiyum akışını etkileyerek böbrek hücrelerinde aşırı kalsiyum yüklenmesine neden olarak bir dizi hücrel fizyolojik işlevi etkilediği bildirilmektedir (Shao ve ark., 2020). Florozisli rat böbreklerinde yüksek düzeyde lipid peroksidasyonu tespit edilmiş ve bu durum lipid bileşiminin spesifik modifikasyonuna neden olduğu bulunmuştur (Guan ve ark., 2000). Ayrıca F mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres, inflamasyon ve immünoisitotoksitesiyi de indüklemektedir (Strunecka ve Strunecky, 2019). Kronik florür maruziyeti rat seminifer tübül-lerinde TNF- α , IL-1 β , iNOS, Cox-2, NF-KB, p65 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artırır (Miltonprabu ve Thangapandian, 2015). Kronik florür maruziyetinde kalp kasında kaspaz-3 ekspresyonu artmış ve Bcl-2 düzeyi anlamlı olarak azalmıştır. Florür, kalp kası lifinde incelmeye ve bozuluma neden olarak neo-vaskülojeniz gözlenmiştir. Florür inflamasyonu, Interlökin-17 (IL-17) 3 kat artış, apoptozu 4 kat artış, doku kalsiyum seviyesinde ve matriks metaloproteinaz-9 (MMP-9) ekspresyonunda önemli artışla birlikte ultra yapısal

değişiklikleri ve kardiyomiyopatilere yol açan doku hasarını indükler. MMP'lerin ekspresyonu, inflamasyon ve tümör istilası gibi patolojik durumlarda yükselir (Quadri ve ark., 2018).

Antioksidan kullanımı NaF'ın neden olduğu karaciğer morfolojik anormalliklerini enzimlerin aktivitesindeki değişikliklerle önlemiştir. Antioksidanlar, florür bileşiklerinin toksisitesini önlemede önemli olabilir (Stawiarska-Pieta ve ark., 2012). Glutasyon peroksidaz, tüm hücrelerde önemli bir antioksidan enzimdir, hem E vitamini hem de selenyum içerir. E vitamini ve selenyumun en önemli etkisi doku yenilenmesinde görevli olmasıdır (Mcdowel ve ark., 1996). Yağda çözünebilen α -tokoferol, lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunun ilerlemesini sınırlandırarak lipid peroksidasyonunu inhibe eder. E vitamini, kemiklerde ve dişlerde florür birikimini azaltır ve florozisten korur (Blaszczyk ve ark., 2012). E vitamini antioksidan ve detoksifikasyon özelliklerinden dolayı florür kaynaklı toksisiteyi iyileştirme potansiyeline sahiptir. Tavşanlarda E vitamini florür kaynaklı üreme toksisitesini iyileştirmede iyi bir potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Kumar ve ark., 2012). NaF, Jun N-terminal kinaz (JNK) ve hücre dışı sinyalle düzenlenen protein kinaz (ERK)'nın fosforilasyonu ile oksidatif stres aracılı MAPK sinyal yolunu aktive eder. Vitamin E, oksidatif stres aracılı JNK ve ERK sinyal yolunu baskılayarak florozisin neden olduğu hücre apoptozunu azalttığını gösterir. Dolayısıyla florür maruziyetinde vitamin E kullanımının antioksidan aktiviteleri artırdığı ve koruyucu etkiye sahip olduğu ortaya koyulmuştur (Tian ve ark., 2018). α -tokoferol tedavisinin florozisli rat spermatozoalarında ROS, tiyobarbitirikasit oluşumunda azalmaya, SOD aktivitesinde artışa neden olarak fertilizasyonu önlemiştir (Izquierdo-Vega ve ark., 2011). NaF uygulanan ratlarda karaciğer dokularında antioksidan enzimlerden CAT ve GPx aktivitelerinin azaldığı ve MDA konsantrasyonunun arttığı gözlenmiştir. E vitamini takviyesi enzimatik antioksidan sistemi önemli ölçüde uyarılmamış ancak MDA konsantrasyonunun azalmasına neden olmuştur (Stolecka ve

ark., 2018). Arsenik ve florüre birlikte maruz kalan farelere E vitamini takviyesi, artmış ROS seviyesinde iyileşme, antioksidan enzim aktivitelerinde SOD ve GSH konsantrasyonunda artış sağlamıştır (Mittal ve Flora, 2007). Yüksek ve ark., E vitamini NRK-52E böbrek epitel hücrelerinde NaF kaynaklı oksidatif DNA hasarının önlenmesinde etkili olabileceğini bildirmiştir (2017a; 2017b).

C vitamini ile ön tedavi, Sirtuin 1 (Sirt1) ekspresyonunu artırmış ve NaF kaynaklı F9 hücre hasarında mitokondriyal oksidatif stresi ve apoptozu azaltmıştır. C vitamini reseptörü yoluyla olan Sirt1' in C vitamini SOD2 aktivitesini uyarmada rol oynadığını göstermektedir (Peng ve ark., 2019). Artan içme suyu ile oluşan florozis vakalarında oksidatif stres artmış, C Vitamini tedavisi ile serum florürde önemli bir azalma, serum SOD ve idrar florüründe artış görülmüştür (Ailani ve ark., 2009). Florürlü su alan ratlarda, uzaysal öğrenme ve hafıza yeteneğinde bozulma görülmüş, florüre ek C vitamini uygulanan gruplarda herhangi bir eksiklik gözlenmemiştir (Jetti ve ark., 2016). F maruziyeti ile ratlarda doku askorbat ve katalaz, süperoksit dismutaz ve glutasyon peroksidaz gibi serbest radikal temizleyici enzimlerde azalma gözlenmiş, ayrıca kandaki karaciğer hasar belirteçlerinden aspartat ve alanin aminotransferaz, alkalik fosfataz, laktat dehidrojenaz, MDA seviyeleri önemli ölçüde artmıştır. Florla birlikte askorbik asit uygulaması kandaki hepatik spesifik marker ve antioksidan enzimlerini artırmıştır (Raina ve ark., 2015).

Ratlara subkronik florür uygulaması endometrial apoptoz ve lipid peroksidasyonuna neden olmuştur. E ve C vitaminlerinin bir kombinasyonu ile tedavi, florürün neden olduğu endometrial apoptozu azaltmıştır (Guney ve ark., 2007). NaF ile muamele edilmiş ratlarda iskelet ve viseral anormalliklerinin görülme sıklığı anlamlı ölçüde daha yüksektir. NaF ile birlikte gebeliğin 6. ila 19. günlerinde C vitamini ve E vitamini birlikte verilmesi, vücut ağırlığı, mutlak uterus ağırlığı, implantasyon sayısı NaF kaynaklı azalmaları önemli ölçüde iyileştirmiştir. İskelet ve iç organ anormalliklerinin

toplam yüzdesi, florürle birlikte C vitamini ile tedavi edilen hayvanlarda önemli ölçüde azalmıştır. E vitamini daha az etkili olmuştur. C vitamininin ratlarda florür kaynaklı embriyotoksisitenin şiddetini ve insidansını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir (Verma ve Sherlin, 2001). Flor grubu rat akciğeri patolojik incelemelerinde eritroraji, hiperemi, epitel hücrelerinin nekrozu, interalveolar septada çok sayıda makrofaj, kan damarlarında infiltrasyonlar ve amfizematöz kabarcıklar ortaya çıkmıştır. Fokal vakuolar dejenerasyon hücreleri ve inflamatuvar infiltrasyonlar sadece pankreasta görülmüştür. A ve E vitaminleri birlikte uygulanmasının, incelenen organlarda görülen dejeneratif değişiklikler üzerinde ters etki yaptığını doğrulamıştır (Stawarska-Pieta ve ark., 2009). NaF grubu ratlarda serumdaki sodyum ve potasyum konsantrasyonları önemli ölçüde daha yüksek bulunmuş. NaF ile birlikte C + D + E vitaminlerinin bir kombinasyonunun uygulanması vücut ağırlığında, sodyum, potasyum, glikoz, protein konsantrasyonlarında önemli iyileşmeye neden olmuştur. NaF ile indüklenen etkileri iyileştirmede C + D + E vitaminlerinin birlikte tedavisinin, C, D ve E vitaminin ayrı olarak verilmesine göre daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Verma ve Guna Sherlin, 2002). Sodyum florür rat serumlarında kalsiyum ve fosfor seviyelerini önemli ölçüde düşürmüştür. NaF ile birlikte C, D, E vitaminlerinin bir kombinasyon halinde uygulanması serum kalsiyum ve fosfor düzeyinde önemli iyileşme sağlamıştır (Santoyo-Sanchez ve ark., 2013).

Bu çalışmadaki RT-qPCR sonuçlarına göre, inflamasyon mekanizmasında önemli proteinlerden TNF- α ve IL-1 β genlerinin ekspresyon seviyelerinin flor uygulanan grupta en yüksek olduğu, tedavi gruplarında flora ek olarak vitamin uygulamalarının inflamasyon belirteçlerini düşürdüğü belirlendi. Flozis tedavi gruplarında, NaF uygulamasına ek vitamin C veya vitamin E uygulamasına göre vitamin C+E kombinasyon uygulamasının inflamasyon belirteçlerini düşürmede daha etkili olduğu gözlemlendi. Literatür verilerine göre vitamin C ve vitamin

E'nin florür toksikasyonunu azalttığı hatta vitamin C+E kombinasyonunun daha etkili olduğu görülmüştür. Bu çalışma sonuçlarının literatür sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür. Florun organizmadan atılmasında en aktif organ böbrek olduğu için florun olumsuz etkilerinden de en fazla böbrekler etkilenir. Flor nefrotoksisitesini inhibe edici tedavilerin geliştirilmesine yönelik daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, NaF ile deneysel olarak oluşturulan florozisin yol açtığı olası böbrek hasarında inflamasyon gen ekspresyonunun arttığı, tedavi amacıyla antioksidan vitamin uygulamasının inflamasyonu azalttığı görüldü. Flor nefrotoksisitesi üzerine yapılan bu çalışmada uygulanan Vitamin C, vitamin E, vitamin C+vitamin E'nin inflamasyon markırları üzerinde kayda değer yararlı etkilerinin olduğu tespit edildi. NaF+vitamin C, NaF+vitamin E verilen gruplara kıyasla vitamin C+E birlikte kombinasyonunun inflamasyonu düşürmede daha etkili olduğu görüldü.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Agalakova NI, Nadei OV. Inorganic fluoride and functions of brain. *Crit Rev Toxicol* 2020; 50(1): 28-46.
- Ailani V, Gupta R C, Gupta SK, Gupta K. Oxidative stress in cases of chronic fluoride intoxication. *Ind J Clin Biochem* 2009; 24(4): 426-9.
- Alireza S, Leila N, Siamak S, Mohammad-Hasan KA, Behrouz I. Effects of vitamin E on pathological changes induced by diabetes in rat lungs. *Respirat Physiol Neurobiol* 2013;185(3):593-9.
- Blaszczyk I, Birkner E, Gutowska I, Romuk E, Chlubek D. Influence of methionine and vitamin E on fluoride concentration in bones and teeth of rats exposed to sodium fluoride in drinking water. *Biol Trace Elem Res* 2012; 146(3): 335-9.

- Blaylock RL. Fluoride neurotoxicity and excitotoxicity/microglial activation: critical need for more research. *Fluoride* 2007; 40(1): 89-92.
- Bustin, SA. (ed.) *A-Z of Quantitative PCR*. La Jolla, CA: International University Line; USA; 2004.
- Chomczynski P, Mackey K. Substitution of chloroform by bromo-chloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Anal Biochem* 1995; 225(1): 163-4.
- Efsa (European Food Safety Authority). *Dietetic Products, Nutrition, Allergies Panel Scientific opinion on dietary reference values for fluoride*. *EFSA J* 2013;11:3332.
- Guan ZZ, Xiao KQ, Zeng XY, Long YG, Cheng YH, Jiang SF et al. Changed cellular membrane lipid composition and lipid peroxidation of kidney in rats with chronic fluorosis. *Arch Toxicol* 2000; 74(10): 602-8.
- Guney M, Oral B, Take G, Giray SG, Mungan T. Effect of fluoride intoxication on endometrial apoptosis and lipid peroxidation in rats: role of vitamins E and C. *Toxicology* 2007; 231(2-3): 215-23.
- He LF, Chen JG. DNA damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rat oral mucosal cells and hepatocytes. *World J Gastroenterol*. 2006; 12(7): 1144-8.
- Hirzy J.W., Connett P., Xiang Q., Spittle B., Kennedy D. *Developmental Neurotoxicity of Fluoride: A Quantitative Risk Analysis Toward Establishing a Safe Dose for Children*. In: McDuffie J.E., editor. *Neurotoxins*. IntechOpen; London, UK. 2017; 115-132.
- Izquierdo-Vega JA, Sánchez-Gutiérrez M, Del Razo LM. NADPH oxidase participates in the oxidative damage caused by fluoride in rat spermatozoa. Protective role of α -tocopherol. *J Appl Toxicol* 2011; 31(6): 579-88.
- Jetti R, Raghuvveer CV, Mallikarjuna RC. Protective effect of ascorbic acid and *Ginkgo biloba* against learning and memory deficits caused by fluoride. *Toxicol Ind Health* 2016; 32(1): 183-7.
- Kumar N, Sood S, Arora B, Singh M, Beena, Roy PS. To study the effect of Vitamin D and E on sodium-fluoride-induced toxicity in reproductive functions of male rabbits. *Toxicol Int* 2012; 19(2): 182-7.
- Liao Q, Zhang R, Wang X, Nian W, Ke L, Ouyang W et al. Effect of fluoride exposure on mRNA expression of Cav1.2 and calcium signal pathway apoptosis regulators in PC12 cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 2017; 54(1): 74-9.
- Mcdowell LR, Williams SN, Hidioglou N, Njerud CA, Hille GM, Ochoaf L et al. Vitamin E supplementation for the ruminant. *Anim Feed Sci Technol* 1996; 60(1): 273-96.
- Miltonprabu S, Thangapandiyan S. Epigallocatechin gallate potentially attenuates Fluoride induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and dyslipidemia in rats. *J Trace Elem Med Biol* 2015; 29(1): 321-35.
- Mittal M, Flora SJ. Vitamin E supplementation protects oxidative stress during arsenic and fluoride antagonism in male mice. *Drug Chem Toxicol* 2007; 30(3): 263-81.
- Murugesan P, Muthusamy T, Balasubramanian K, Arunakaran J. Studies on the protective role of vitamin C and E against polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254)-induced oxidative damage in Leydig cells. *Free Radial Res* 2005; 39(11): 1259-72.
- Peng W, Xu S, Zhang J, Zhang Y. Vitamin C Attenuates sodium fluoride-induced mitochondrial oxidative stress and apoptosis via Sirt1-Sod2 pathway in F9 cells. *Biol Trace Elem Res* 2019; 191(1): 189-98.
- Qin SL, Deng J, Lou DD, Yu WF, Pei J, Guan ZZ. The decreased expression of mitofusin-1 and increased fission-1 together with alterations in mitochondrial morphology in the kidney of rats with chronic fluorosis may involve elevated oxidative stress. *J Trace Elem Med Biol* 2015; 29(1): 263-8.
- Quadri JA, Sarwar S, Pinky, Kar P, Singh S, Mallick SR et al. Fluoride induced tissue hypercalcemia,

- IL-17 mediated inflammation and apoptosis lead to cardiomyopathy: Ultrastructural and biochemical findings. *Toxicology* 2018;406-407(1): 44-57.
- Raina R, Baba NA, Verma PK, Sultana M, Singh M. Hepatotoxicity induced by subchronic exposure of fluoride and chlorpyrifos in wistar rats: mitigating effect of ascorbic acid. *Biol Trace Elem Res* 2015; 166(2): 157-62.
- Santoyo-Sanchez, MP, Del Carmen Silva-Lucero M, Arreola Mendoza L, Barbier OC. Effects of acute sodium fluoride exposure on kidney function, water homeostasis, and renal handling of calcium and inorganic phosphate. *Biol Trace Elem Res* 2013; 152(3): 367-72.
- Shao D, Zhang J, Tang L, Yu Q, Hu X, Ruan Q et al. Effects and molecular mechanism of L-type calcium channel on fluoride-induced kidney injury. *Biol Trace Elem Res* 2020; 197(1): 213-23.
- Stawiarska-Pieta B, Paszczela A, Grucka-Mamczar E, Szaflarska-Stojko E, Birkner E. The effect of antioxidative vitamins A and E and coenzyme Q on the morphological picture of the lungs and pancreata of rats intoxicated with sodium fluoride. *Food Chem Toxicol* 2009;47(10): 2544-50.
- Stawiarska-Pieta B, Bielec B, Birkner K, Birkner E. The influence of vitamin E and methionine on the activity of enzymes and the morphological picture of liver of rats intoxicated with sodium fluoride. *Food Chem Toxicol* 2012;50(3-4): 972-8.
- Stolecka Stolecka D, Blaszczyk U, Zalejska-Fiolka J, Romuk E, Owczarek A, Birkner E. The influence of methionine and vitamin E on oxidative stress in rats' liver exposed to sodium fluoride. *Med Pr.* 2018; 20;69(4): 403-12.
- Strunecka A, Strunecky O. Chronic fluoride exposure and the risk of autism spectrum disorder. *Int J Environ Res Public Health* 2019;16(18): 3431.
- Tian Y, Xiao Y, Wang B, Sun C, Tang K, Sun F. Vitamin E and lycopene reduce coal burning fluorosis-induced spermatogenic cell apoptosis via oxidative stress-mediated JNK and ERK signaling pathways. *Biosci Rep* 2018; 38(4): BSR20171003.
- Varol E, Aksoy F, Icli A, Arslan A, Yuksel O, Ersoy IH et al. Increased plasma neopterin and hs-CRP levels in patients with endemic fluorosis. *Bull Environ Contam Toxicol* 2012; 89(5): 931-6.
- Verma RJ, Guna Sherlin DM. Sodium fluoride-induced hypoproteinemia and hypoglycemia in parental and F(1)-generation rats and amelioration by vitamins. *Food Chem Toxicol* 2002; 40(12): 1781-8.
- Verma RJ, Sherlin DM. Vitamin C ameliorates fluoride-induced embryotoxicity in pregnant rats. *Hum Exp Toxicol* 2001; 20(12): 619-23.
- Waugh DT, Godfrey M, Limeback H, Potter W. Black tea source, production, and consumption: Assessment of health risks of fluoride intake in New Zealand *J Environ Pub Health* 2017;2017:5120504.
- Xiong X, Liu J, He W, Xia T, He P, Chen X et al. Dose-effect relationship between drinking water fluoride levels and damage to liver and kidney functions in children. *Environ Res* 2007; 103(1): 112-6.
- Xue C, Chen X, Yang K. Antagonistic effects of selenium and zinc on fluoride-induced kidney injury. *Health Res* 2000; 29(1): 21-3.

Yüksek V, Dede S, Taşpınar M, Çetin S. The effects of certain vitamins on apoptosis and DNA damage in sodium fluoride (NaF) administered renal and osteoblast cell lines. *Fluoride* 2017a; 50(3): 300-13.

Yüksek V, Çetin S, Usta A, Kömüroğlu AU, Dede S. Effect of some vitamins on antioxidant/prooxidant parameters in sodium fluoride (NaF)-treated cell line (hFOB 1.19). *Turk J Vet Res* 2017b; 1(1): 1-6.

Yüksek V, Çetin S, Usta A. The effect of vitamin E and selenium combination in repairing fluoride-induced DNA damage to NRK-52E cells. *Mol Biol Rep* 2020; 47(10): 7761-70.