



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SODYUM FLORÜR (NaF) UYGULANMASININ PI3K/AKT
SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN *İN VİTRO* OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Hemşire Rıskiye KORKMAZ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Veysel YÜKSEK

İKİNCİ DANIŞMAN
Prof.Dr. Semiha DEDE

VAN-2020

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SODYUM FLOR (NaF) UYGULANMASININ PI3K/AKT SİNYAL
YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN *İN VİTRO* OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

Hemşire Rıskiye KORKMAZ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Veysel YÜKSEK

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof.Dr. Semiha DEDE

VAN-2020

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

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında **Rıskiye KORKMAZ** tarafından hazırlanan “**Sodyum Florür (NaF) uygulanmasının PI3K/AKT sinyal yolağı üzerine etkisinin *in vitro* olarak araştırılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabuledilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 25/08/2020

Doç. Dr. Zübeyir HUYUT
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN
Bingöl Üniversitesi
Jüri Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi. Veysel YÜKSEK
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi
Jüri Üyesi

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

Prof. Dr. Semiha DEDE
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sodyum Florür (NaF) uygulanmasının PI3K/AKT sinyal yolağı üzerine etkisinin *in vitro* olarak araştırılması” başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Rıskiye KORKMAZ

Tarih:

İmza:

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmamın planlanması ve yürütülmesinde yol gösteren, ilgi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocalarım Prof. Dr. Semiha DEDE ve Dr. Öğr. Üyesi Veysel YÜKSEK'e yüksek lisans eğitimim boyunca değerli katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma, öğrenim hayatım süresince maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca bu araştırmanın gerçekleşmesi için destek sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkür ederim.

ÖZET

Korkmaz R, Sodyum Florür (NaF) uygulanmasının PI3K/AKT sinyal yolağı üzerine Etkisinin *in vitro* olarak araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2020. Bu tez çalışması, yüksek elektronegativiteye sahip flor elementinin neden olduğu hücre içi moleküler mekanizmaların düzenlenmesinde önemli bir role sahip PI3K/AKT yolağına olan etkisini ortaya koymak amacıyla plandı. Bu amaçla, flordan en çok etkilenen dokuların başında böbrek dokusu geldiği için çalışma materyali olarak NRK-52E rat böbrek epitel hücresi seçildi. Çalışmada flor kaynağı olarak NaF kullanıldı. Uygulanacak NaF konsantrasyonu MTT canlılık testi ile belirlendi. NaF konsantrasyonları 24 saat için proliferasyon artırıcı konsantrasyon olan (10 µM) ve sitotoksik konsantrasyonlar olan IC25 (2250 µM) ve IC50 (4250 µM) olarak belirlendi ve uygulandı. Çalışmada PI3K/AKT yolağında önemli role sahip olan genler ERBB2, PI3K, AKT ve mTOR genleri ile TP53 geni hedef genler olarak düşünüldü. Belirlenen NaF konsantrasyonu hücelere uygulandı ve 24 saatin sonunda çalışma gruplarında total mRNA izole edildi. Elde edilen mRNA'lar cDNA'ya çevrildi. Elde edilen cDNA'lar kullanılarak hedef genlerin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı-qPCR yöntemiyle tespit edildi. Çalışma sonunda elde edilen sonuçlara göre düşük konsantrasyonda verilen NaF konsantrasyonunun ERBB2, PI3K, AKT genlerini ekspresyonunu artırdığı, yüksek konsantrasyonda ise değiştirmedeği tespit edildi. mTOR ise verilen tüm konsantrasyonlarda ekspresyonunun azaldığı ortaya konuldu. TP53 geni ise düşük konsantrasyonda değişmediği, yüksek konsantrasyonda ise artış gösterdiği belirlendi. Yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlar ve literatürlere göre, florun PI3K/AKT yolağında yer alan kinaz enzimlerini inhibe edebileceği ve bunun sonucunda bazı genlerin ekspresyonunun azalmasına veya artışına neden olabileceği sonucuna varılabilir. Özet olarak NRK-52E böbrek epitel hücre serisinde florun neden olduğu hücre hasarının patogenezinde PI3K/AKT/mTOR yolağı önemli bir sinyal yolağıdır

Anahtar Kelimeler: NaF, PI3K, AKT, P53, NRK-52E hücre hattı

ABSTRACT

Korkmaz R, Invitro investigation of the effect of sodium fluoride (NaF) administration on PI3K/AKT signaling pathway. Health Sciences Institute, Department of Biochemistry (Veterinary Medicine), M.Sc. Thesis, Van, 2020. This thesis study was planned to determine the effect of fluoride has high electronegativity on the PI3K/AKT pathway, which has an important role in the regulation of intracellular molecular mechanisms. For this purpose, NRK-52E rat kidney epithelial cell was chosen as the study material, since kidney tissue is the leading tissue the most affected by fluoride. NaF was used as a source of fluorine in the study. The NaF concentration to be applied was determined by the MTT viability test. NaF concentrations were determined as concentrations (10 μ M) which are proliferation enhancing, IC₂₅ (2250 μ M) and IC₅₀ (4250 μ M) cytotoxic concentrations for 24 hours, and were applied. In the study, genes ERBB2, PI3K, AKT and mTOR genes, an important role in PI3K/ AKT pathway, and TP53 genes that have pathway were considered as target genes. The determined NaF concentration was applied to the cells and at the end of 24 hours. Total mRNA was isolated in the study groups. The obtained mRNAs were translated into cDNA. Expression levels of target genes were determined by real time-qPCR method by using the cDNAs. According to the results obtained at the end of the study, it was determined that the low concentration of NaF increased the expression of ERBB2, PI3K, AKT genes, but did not change in high concentrations. It was found that mTOR decreased in all NaF concentrations given. TP53 gene was found to be unchanged at low concentration, but increased in high concentration. According to the results obtained from the study and the literature, it was concluded that fluoride can inhibit the kinase enzymes in the PI3K/AKT pathway and as a result, it may cause a decrease or increase in the expression of some genes. In summary, the PI3K/AKT/mTOR is an important signaling pathway in the pathogenesis of fluorine-induced cell damage in the NRK-52E renal epithelial cell line.

KeyWords: NaF, PI3K, AKT, P53, NRK-52E cell line

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
Etik Beyan.....	III
Teşekkür.....	IV
Özet.....	V
Abstract.....	VI
İçindekiler.....	VII
Simgeler ve Kısaltmalar.....	IX
Şekiller Listesi.....	XI
Tablolar Listesi.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Flor.....	2
2.2. Florozis.....	2
2.3. Flor'un Sindirim ve Birikmesi.....	3
2.4. Flor'un Hücrel Etkileri.....	4
2.5. PI3K/AKT yolağı.....	5
2.5.1. PI3K/AKT yolağı aracılığıyla düzenlenen hücrel fonksiyonlar.....	6
2.5.2. PI3K'nın onkogenele ilişki.....	6
2.5.3. PI3K/AKT yolağı protein ve genleri	7
2.5.4. PI3K/AKT yolağı aktivatörleri.....	11
2.5.5. PI3K/AKT yolağı inhibitörleri.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Gereç.....	13
3.1.1. Çalışma materyali.....	13
3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler.....	13
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler.....	14
3.2. Yöntem.....	15
3.2.1. Sodyum florür (NaF) konsantrasyonlarının hazırlanması.....	15

3.2.2.	Hücre Kültürü.....	16
3.2.3.	Hücre pasajlama.....	16
3.2.4.	Sitotoksosite (MTT hücre canlılık) testi.....	16
3.2.5.	Çalışma gruplarının hazırlanması.....	17
3.2.6.	Total mRNA izolasyonu ve analizi.....	17
3.2.7.	Komplementer DNA (cDNA) izolasyonu.....	18
3.2.8.	Gerçek zamanlı-qPCR.....	19
3.2.9.	İstatistik analiz.....	20
4.	BULGULAR.....	21
4.1.	MTT Sonuçları.....	21
4.2.	Gerçek zamanlı-qPCR sonuçları.....	23
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	27
	KAYNAKLAR.....	34
	ÖZGEÇMİŞ.....	40
	EKLER.....	41
Ek 1:	Etik Kurul Raporu.....	43
Ek 2:	Tez Orjinallik Raporu.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

AKT	:	Protein Kinaz B
Bax	:	Bcl-2 İlişkili X Protein
Bim	:	Bcl-2 Benzeri Protein 11
Bcl-2	:	B-Hücre Lenfoma Gen-2
Bad	:	Bcl-2-Bağlantılı Ölüm Promatör
Bcl-xl	:	B-Hücreli Lenfoma-X Large
cDNA	:	Komplementer DNA
CT	:	Eşik Döngü Eğrisi
CIP1	:	Cylin Bağlantılı İnhibitör
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
ERBB2	:	Epidermal Büyüme Faktör
F	:	Flor
FGF	:	Fibroblast Büyüme Faktör
G	:	Gram
GSK-3	:	Glikojen Sentez Kinaz
GTPaz	:	Guanizon Trifosfat
Ins	:	İnsilün

mTORc	:	Memeli Rapamisin Hedefli Kompleks
Mg	:	Miligram
mM	:	Milimolar
NaF	:	Sodyum Florürü
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIK3CA	:	Fosfatidilinositol (3,4,5) Trifosfat
PIP₃	:	Fosfatidilinositol (3,4,5) Bifosfat
PIP₂	:	Fosfatidilinositol (4,5) Bifosfat
P21	:	Ras Proteini
P27	:	Siklin Kinaz İnhibitörü
PP2A	:	Protein Fosfat 2A
PTEN	:	Fosfataz Tensin Homoloğu
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
RTK	:	Reseptör Tirozin Kinaz
RPM	:	Dakkika Başın Dönüş
RT-qPCR	:	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S6K	:	Ribozomal Protein 53
TSC2	:	Tuberoz Sclerозis Kompleks 2

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1	RTK'ların P13K yolu üzerinden aşağı yönlü AKT aktivasyonu....	5
Şekil 2.	PI3K-AKT yolu üzerinden doğrusal olmayan sinyalizasyon	8
Şekil 3.	Çalışma gruplarına ait RNA agaroz jel görüntüsü.....	18
Şekil 4.	NRK-52E hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan NaF sonucu elde edilen MTT canlılık testi sütun ve eğim grafiği.	22
Şekil 5.	cDNA temelli gerçek zamanlı qPCR reaksiyonuna ait amplikasyon ve standart CT eğrisi.....	23
Şekil 6.	Her bir hedef gene ait elde edilen ürünlerin melting curve eğrisi..	23
Şekil 7.	Farklı konsantrasyonlarda verilen florun (NaF), NRK-52E hücrelerinde ERBB2 gen ekspresyon seviyesine etkisi.....	24
Şekil 8.	Farklı konsantrasyonlarda verilen florun (NaF), NRK-52E hücrelerinde AKT1 gen ekspresyon seviyesine etkisi.....	25
Şekil 9.	Farklı konsantrasyonlarda verilen florun (NaF), NRK-52E hücrelerinde PI3K gen ekspresyon seviyesine etkisi.....	25
Şekil 10.	Farklı konsantrasyonlarda verilen florun (NaF), NRK-52E hücrelerinde TP53 gen ekspresyon seviyesine etkisi.....	26
Şekil 11.	Farklı konsantrasyonlarda verilen florun (NaF), NRK-52E seri hücrelerinde mTOR gen ekspresyon seviyesine etkisi.....	26
Şekil 12.	Düşük orta ve yüksek konsantrasyondaki NaF'ın PI3K/AKT sinyalizasyon yolağının aşağı yönlü akışına etkisi.....	32

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.	NRK-52E Hücre dizisinin genel özellikleri.....	13
Tablo 2.	Gerçek zamanlı-qPCR için hedef genler ve dizilimleri.....	15
Tablo 3.	Gerçek zamanlı-qPCR için reaksiyon içeriği.....	19
Tablo 4.	NRK-52E hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan NaF sonucu elde edilen MTT canlılık testi sonucu.....	21
Tablo 5.	Real time-PCR sonuçlarına göre hedef genlere ait ekspresyon sonuçları.....	24

1. GİRİŞ

Flor, halojen ailesinin bir üyesi ve yüksek elektronegatifliğe sahip bir iz elementtir. Flor, oldukça reaktif bir gaz olduğu için, genellikle doğada serbest halde bulunmaz. Bileşikler oluşturur ve flor tuzları yani florid olarak kendini gösterir. Sularda, toprakta, kayalarda, atmosferde, yiyecek ve içeceklerde, hayvanlarda bitkilerde ve canlı dokularda bulunur (Song ve ark., 2014).

Flor fazlalığı insan ve hayvan sağlığı için birçok sağlık sorununa sebep olur. Flor, günlük hayatta ve endüstriyel uygulamalarda oldukça geniş kullanım alanına sahiptir. Dış koruyucu ürünler, kolesterol düşürücü, antibakteriyel, antidepresan ve insektisit gibi amaçlarla kullanılan ilaçların yapısında kullanılır. Flor, kemik mineral metabolizmasının homeostazisini etkileyerek, kemik dokusu üzerine harabiyet verici bir özellik sergiler (Song ve ark., 2014; Ergin ve Eden, 2017).

Flor vücutta başlıca böbrekler, yoluyla atılır ve karaciğerde metabolize olur. Florun vücuda uzun süre ve fazla alınması sonucu florozis hastalığı meydana gelmektedir. Floroziste, karaciğer ve böbrek dokularının hücre yapıları zarar görür (Agalakova ve Gusev, 2011; Song ve ark., 2015).

Bu tez çalışması; florun PI3K/AKT/mTOR yolağına olan etkisinin *in vitro* olarak araştırılması ve bu yol ile florun hücre apoptozu, sağkalımı, hücre poliferasyonu hücre döngüsü gibi hücresel fonksiyonlar üzerine muhtemel etkilerinin açıklığa kavuşturulabilmesi amacıyla gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda flor kaynağı olarak NaF, NRK-52E böbrek hücrelerine farklı konsantrasyonlarda uygulandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Flor

Flor (F), atom numarası 9, atom ağırlığı 19, yoğunluğu 1,265 olan, kokusu ozonu andıran bir elementtir. Halojenler grubunun ilk elementidir. Yüksek kimyasal reaktivite taşıması sebebiyle tüm elementler ve asal gazlarla kolayca bileşikler oluşturur (Atkins ve ark., 2010). Florlu bileşikler, yeryüzüne jeolojik yapıya bağlı olarak değişen oranlarda yayılmış bir elementtir. Özellikle volkanik bölgelerde bulunan yer altı ve yer üstü sularında fazla olmak üzere kayalarda, kömürde kireçte, bitkilerde ve birçok canlı türünün yapısında mevcuttur (Kahraman ve ark., 2011; Efe ve ark., 2020). Yer kabuğunun yaklaşık olarak %0.06-0.09'unu teşkil etmektedir. Flor, yapısı itibariyle yüksek elektronegatifliğe sahiptir. Bu yapı flor'a yüksek reaktivite kazandırmakta ve doğada element değil bileşik halinde yer almasını sağlamaktadır. Bu yapılardan fluorite (CaF_2), sellaite (MgF_2), fluorapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$), kryolite (Na_3AlF_6), villiaumite (NaF) özel olarak isimlendirilen doğal bileşiklerdir (Wei ve ark., 2014; Rafique ve ark., 2015). Flor ülkemizde ve dünyanın bazı bölgelerinde doğal olarak yüksek oranda bulunur (Narsimha ve Sudarshan, 2017; Efe ve ark., 2020).

Flor endüstriyel ürünlerde çok çeşitli yollarda kullanılır ve çevre kirliliğine bağlı florun yoğun kontaminasyonları gerçekleşir. Elektronik malzemelerde, soğutucularda, teflon yapımında, izolasyon malzemelerinde, fiberlerde surfaktanlarda, yangın söndürme cihazlarında, membranlarda, zirai pestisitlerde ve fungusitlerde, uranyum ve ilaç üretiminde, diş koruyucularda, medikal sahada suni kan veya likit soluma uygulamalarında ve pozitron emisyon tomografisinde görüntüleme maddesi olarak kullanılır (Kurtdeve ve ark., 2017).

Suda, havada, bitkilerde ve hayvanlarda bulunduğundan, canlılar kolayca maruz kalabilmektedirler (Wei ve ark., 2014). Sulardaki flor konsantrasyonu, fluorite (CaF_2) çözünürlüğü ile kontrol altına alınabilmektedir (Mondal ve ark., 2016).

2.2. Florozis

Florür potansiyel olarak çevresel bir tehlikeye sahiptir. İnsanlar su, yiyecekler ve soluk alıp verme yoluyla uzun süre flora maruz kalabilmektedirler. Çevredeki gıdalar ve

içme suyu aracılığıyla florürün geniş bir şekilde yayılması sağlık üzerinde genelde bir yan etkiye sahiptir. Optimal dozlarda uzun süreli flor alınması, vücutta herhangi bir sistemik zarara yol açmazken, optimal dozdan biraz daha yüksek ve uzun süre boyunca flor alınması ile de kronik flor toksisitesi oluşmaktadır (Guney ve ark., 2007; Song ve ark., 2014). İnsanlarda florür'ün en açık toksik etkisi, yüksek dozda olan bölgelerde görülen endemik diş ve kemik florozisidir (Agalakova ve Gusev, 2011). Florün hücre membranından hücreye geçişi ve yumuşak dokulara girişi bilinmektedir (Guney ve ark., 2007). Uzun süre düşük doz florür tüketilmesi sonrası nadir olarak yan etkisi olmasına rağmen, aşırı doza maruz kalma ciddi akut toksisiteye neden olmaktadır (Fejerskov ve ark., 1996; Bartlett ve ark., 2005; Li ve ark., 2005). Aşırı flor doku olgunlaşmasını yavaşlatarak anormal diş minesi oluşumuna neden olmaktadır (Yang ve ark., 2013). Uzun süre aşırı flor tüketimi dişlerin rengini kaybetmesi, felç, osteoporozis ve osteosklerozis gibi değişimlerle karakterize edilen kronik florozisede sebep olmaktadır (He ve ark., 2015). Yüksek seviyelerde absorbe olan flor çocuklarda %80-90, yetişkinlerde ise %60 oranında vücutta tutulumu olmaktadır. Florun dental veya iskeletsel florozise neden olması ilk olarak santral sinir sistemini etkilemektedir (Sebastian ve Sunitha, 2015).

2.3. Flor'un Sindirimi ve Birikmesi

Flor'un %80-90'ı pasif difüzyon yoluyla gastrointesitnal sistemden (GIS) emilimi sağlanır. Flor bileşiğinin çeşidine, çözünübilirliğine, dozuna ve GIS'in muhteiyatına göre emilen flor miktarı değişme göstermektedir. İdrar, terleme ve feçes yolu ile vücuttan atılır (Buzalaf ve Whitford, 2011).

İyonik flor vücuda girdikten sonra kan yoluyla kolayca dağılır. Plazmada kalma yarı ömrü 3-10 saat arasındadır. Böbrekler florun vücuttan atılmasında en önemli organdır, florün büyük bir kısmı bu yolla atılır. Vücutta biriken florür'ün ortalama %99'u iskelet sisteminde ve dişlerde yer almaktadır. Florun canlı organizmada en iyi bilinen etkisi dişlerde apatit yapılarında OH iyonlarıyla yer değiştirerek, yapısal dayanıklılığın sağlanmasıdır. Bu şekilde kemik yapısına katılmaktadır (Aoba, 1997). Flor özellikle diş sağlığında çokça kullanılan bir antibakteriyel yapı olarak kullanılmaktadır. Flor kemiklerin minerealizasyonunda ve rekalsifikasyonunda görev alan bir iz element olarak bilinmektedir. Ayrıca osteoporozis sürecinde tedavi amaçlı uygulanmaktadır (Mondal ve ark., 2015; Ribeiro ve ark., 2006; Guney ve ark., 2007).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ye göre, içme sularında yaklaşık olarak 1 mg/litre oranındaki doğal bir flor konsantrasyonunun halk sağlığı açısından problem olmadığı, diş sağlığı ve diş estetiği açısından önemli olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca DSÖ'ye göre içme sularında iklim şartlarına bağlı olarak tavsiye edilen flor içeriği 0.5-1.0 mg/litre aralığında olması gerektiği bildirilmiştir (Mondal ve ark., 2016).

2.4. Flor'un Hücresel Etkileri

Florürün hücre membranından taşınması, öncelikle hidrojen florür'ün (HF) iyonik olmayan difüzyonu yoluyla gerçekleşir. HF, suya benzer bir şekilde hücre membranını hızlı bir şekilde geçtiği bilinmektedir. Floridlerin ayrıca anyon kanalları yoluyla geçtiği de bilinmektedir. Florür, kalsiyum iyonosferleri oluşturmak için kalsiyum ile birleşerek hücre zarını kolayca geçebilmektedir. Florun zaman ve konsantrasyona bağlı olarak hücre tipine göre etki yaptığı bilinmektedir. Florun hücre içi bilinen en önemli etkileri, enzim etkileşimleridir. Birçok durumda bir enzim inhibitörü, bazen de bir enzim aktivatörü olarak da davranabilmektedir. Yapılan deneysel ve *in vitro* çalışmalarda, florun nontoksik konsantrasyonlarda etkili bir anabolik molekül olarak hareket ederken, toksik konsantrasyonlarda ciddi bir enzim inhibitörü olabildiği gösterilmiştir (Sireli ve Bülbül, 2004; Guney ve ark., 2007; Barbier ve ark., 2010).

Flor'un biyolojik membranlardan geçmesi suya benzer bir yol izlemektedir. HF'nin noniyonik difüzyonuyla membranlardan geçer. Flor'un solunum yolları epitellerinden geçmesi anyon kanalları yoluyla gerçekleşir. Sodyum florür ve sodyum fluorosilikat gibi çözünebilen flor bileşikleri sindirim kanalından çok iyi geçerken, sodyum fluoroaluminat ve kalsiyum diflorin biraz daha az çözünebilen flor bileşikleri, bağırsaklardan orta derecede emilir (Gutknecht ve Walter, 1981).

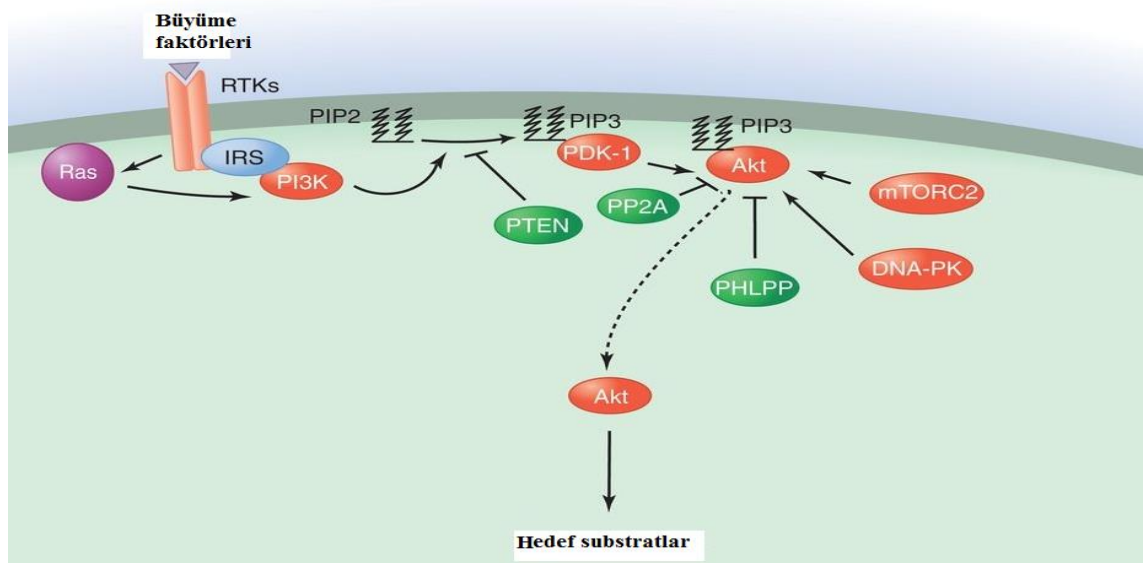
Florurun kana geçmesiyle tüm vücuda yayılması kolaylaşır. Florun en fazla bulunduğu yer kemik ve dişlerdir. Flor kemik lezyonlarının gelişme döneminde kemikten aşırı miktarda mobilize olan kalsiyum ve fosforla birleşerek idrarla fazla miktarda atılır. Florun vücuda girişi azaldıktan sonra kemik ve dişte depolanan flor kana geçer ve pH değişiklikleriyle idrarla atılımı etkilenir (ATSDR, 2003).

Flor, fosforiltransfer aktivitesine sahip enzimlerle olan (GTP'az ve ATP'az aktivitesine benzer) ilişkisiyle (florid ile bileşik oluşturup inhibisyon) açıklanmaktadır.

Flarla temasın protein sentezini ve sekresyonunu engelleyerek proteinlerin bir membran kompartımanından diğetine transportunu etkilediğı belirlenmiştir (Mendoza ve ark., 2009).

2.5 PI3K/AKT yolağı

PI3K-Akt Yolu, hücre dışı sinyallere cevap olarak metabolizmayı, hücre sağkalımını, çoğalmayı, büyümeyi ve anjiyogenezi destekleyen bir hücre içi sinyal iletim yoludur (Bezilya ve Hemmings, 2001). Buna bir dizi alt-substrat serisinin serin ve/veya treoninfosforilasyonu aracılık eder. İlgili anahtar proteinler fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) ve Akt/Protein Kinaz B (PKB)'dir (Bozulic ve Hemmings, 2009). AKT tüm yüksek ökaryot hücrelerde hem fizyolojik hem de patolojik önemi olan en önemli ve çok yönlü protein kinazlarından biri olarak, bir kavşak noktası olarak oraya çıkmıştır. Bu sinyal yolunda rol oynayan kilit moleküller reseptör tirozin kinaz (RTK'ler), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat (PIP2), fosfatidilinositol-3,4,5-bisfosfat (PIP3) ve AKT (Hemmings ve Restuccia, 2012)'dir.



Şekil 1. RTK'ların PI3K yolu üzerinden aşağı yönlü AKT aktivasyonu (Hemmings and Restuccia, 2012).

2.5.1. PI3K/AKT yollağı aracılığıyla düzenlenen hücresel fonksiyonlar

Hücre apoptozu/sağkalım

Hücre sağkalımı ve apoptozu arasındaki denge normal hücre büyümesini kontrol eder. AKT bu dengeyi, öncelikle pro ve antiapoptotik genlerin transkripsiyon faktörlerini değiştiren bir fosforilasyon kaskadı ile kontrol eder. AKT, proapoptotik proteinleri ve işlevlerini bloke ederek hücrelerin yaşamını arttırır. Akt, Bcl-2 ailesi, Bax ve Bim proteininin fonksiyonunu veya gen ekspresyonlarını negatif yönde düzenlemektedir (Osaki ve ark., 2004).

Protein sentezi ve hücre büyümesi

AKT'ın en önemli fonksiyonlarından biri, TSC2'nin inhibisyonu ve mTOR kompleksi 1'in (mTORC1) dolaylı olarak aktivasyonu yoluyla hücre büyümesini arttırmadaki rolüdür (Alessi ve ark., 1997). mTORC1, çeviri başlatma ve ribozom biyogenezinin kritik bir düzenleyicisidir ve hücre büyümesi kontrolünde görevlidir (Sarbasov ve ark., 2005). mTORC1, S6K ve eIF4E -birleştirici protein 1 (4E-BP1), S6'yı aktive edebilir ve protein sentezini ve hücre büyümesini teşvik edebilir (Cho ve ark., 2009; Ben ve ark., 2011).

Hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü

P21 / Waf1 / Cip1 proteininin fonksiyonu, hücreyi sakin durumda tutmaktır. Ayrıca P27 / Kip2, de ayrıca hücreyi G1 durumunda tutmak için benzer bir işleve sahiptir. Protein AKT ayrıca P21 / Waf1 / Cip1 ve P27 / Kip2'yi fosforile edebilir ve anti-proliferatif etkilerini sitoplazmada tutmayarak inhibe edebilir. Böylece hücrenin çoğalmasına hücre döngüsünü teşvik edebilir (Cho ve ark.,2009). Genel olarak, PI3K-AKT sinyal yolunun işlevi, hücreyi çoğalma ve büyümeye teşvik etmek ve aynı anda hücre apoptozunu inhibe etmektir (Alessi ve ark.,1997; Cho ve ark.,2009).

2.5.2. PI3K'nın onkogenezele ilişki

PI3K-AKT yolunun genel düzenleme yönü, hücre büyümesini ve çoğalmasını teşvik etmektir (Osaki ve ark., 2004). Bu sinyal yolunun aşırı aktivasyonu, aşırı hücreyi aşırı bir şekilde uyabilir ve bunun sonucu olarak onkogeneze olan anormal hücre

çoğalmasına neden olabilir (Engelman, 2009). PI3K yolundaki anormallikler kanserde sık görülür ve neoplastik dönüşümde rol oynar. PI3K'nın kendisi, mutasyonel aktivasyonun sık görülen bir hedefidir. Meme kanserinde en sık görülen genetik sapmalar, p110a'yı şifreleyen PIK3CA genindeki somatik yanlış mutasyonlardır (Brugge ve ark., 2007).

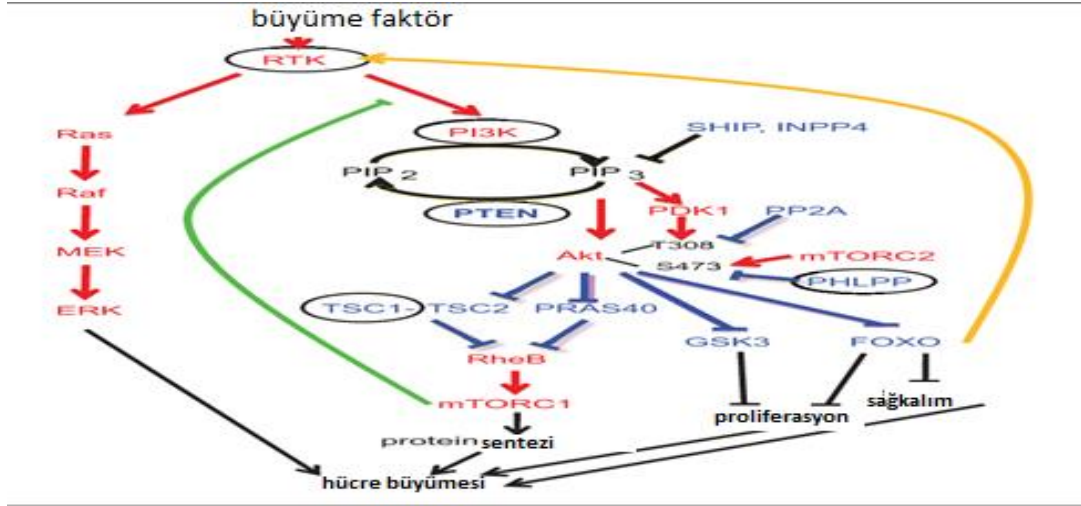
AKT ve PTEN ayrıca insan kanserlerinde sık görülen genomik ve epigenetik değişimin hedefleridir. AKT'yi ifade eden genin en yaygın mutasyonu, aktivasyon noktası mutasyonu ve gen kopya sayısının anormal şekilde artmasıdır (Osaki ve ark., 2004). Meme kanseri, kolon kanseri, yumurtalık kanseri ve idrar kesesi karsinomunda çok sık gözlenir (Ben ve ark., 2011). PTEN geninin ortak mutasyonu, endometriyum kanseri, beyin kanseri, cilt kanseri ve prostat kanseri olan hastaların %10'undan fazlasında PTEN gen mutasyonuna sahip olan gen kopya sayısı ve inaktivasyon noktası mutasyonunun anormal kaybıdır (Cho ve ark., 2009).

Kanserde, yüksek PKB aktivitesi seviyeleri, AKT genlerinin amplifikasyonu ve PTEN gibi PI3-kinaz sinyalleme yolağının bileşenlerinde ve PI3-kinaz alt birimleri mutasyonları dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalarla meydana gelir (Luo ve ark., 2003).

Yapılan çalışmalarda pH'ya bağlı olarak yeni inhibitörlerin PKB özgünlüğü gösterdiği bildirilmiştir. PI3K/PKB yollağıtarfında düzenlenen hücrel olayların bir kısmı kanser ilerlenmesinde rol almaktadır. Ayrıca, farklı PKB izoformlarının kanser ilerlemesinde potansiyel olarak zıt etkilerinin akılda tutulması çok önemlidir. Bu nedenle, her PKB izoformuna özgü farmasötik inhibitörler, anormal PKB sinyalleri gösteren hastalıkların tedavisi için çok önemli olacaktır (Arboleda ve ark., 2003; 2004; Barnett ve ark., 2005)

2.5.3. PI3K/AKT yolağı protein ve genleri

PI3K geni ve proteini



Şekil 2. PI3K-AKT yolu üzerinden doğrusal olmayan sinyalizasyon (Georgescu, 2010).

Büyüme faktörleri, paralel büyüme yollarını daha da aktive eden reseptör tirozin kinazları (RTK) aktive eder. Ras ve akış aşağı efektörler aracılığıyla sinyal veren MAPK yolu, doğrusal büyümeyi teşvik eden bir yola bir örnektir. PI3K-AKT yolu, protein ve lipid efektörleri ve onkoprotein (kırmızı) ve büyüme baskılayıcıları (mavi) katmanları yoluyla sinyal veren doğrusal olmayan yola bir örnektir. PI3K-Akt yolunun negatif geri besleme döngüleri yeşil (baskı) veya turuncu (etkinleştirme) olarak gösterilir (Georgescu, 2010).

Fosfoinositidler, fosfatidilinositol (PI) halkasının spesifik kinazlar tarafından 3',4 veya 5 pozisyonlarında hidroksil gruplarının fosforilasyonu ile oluşturulan lipid membranların negatif yüklü bileşenleridir. PI 3'-OH kinaz (PI3K) fosforilasyon pozisyonuna göre PI, PI-4-fosfat (PI-4-P) veya PI-4,5-bisfosfat (PI-4,5-P2) olmak üzere 3 protein sınıfını kapsamaktadır (Georgescu, 2010). Fosfatidilinositol-3 kinazlar olarak da adlandırılan fosfoinositol-3 kinaz (PI3K'ler), hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, motilitesi, hayatta kalması vb. hücre içi fonksiyonlarda yer alan, ayrıca kanserle alakalı bir enzim ailesidir (Brazilve Hemmings, 2001).

Hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması, motilitesi, hayatta kalması ve hücre içi ticareti de dahil olmak üzere olağanüstü çeşitlilikte bir grup hücresel fonksiyonlar sınıfı PI3K'lerin, PI3K/AKT/mTOR yolunda olduğu gibi protein kinaz B'yi (AKT) aktive etme kabiliyeti ile ilgilidir. PI3K'ler ayrıca insülin sinyal yolunun önemli

bir bileşenidir. Bu nedenle diyabetesmellitusta PI3K sinyalinin rolü büyük ilgi görmektedir (Franke ve ark.,1997).

PI3K / AKT yolunun, çok çeşitli hücrel aktiviter, özellikle de hücrel proliferasyon ve hayatta kalma dizisi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Örneğin, astrositlerin seramide bağı apoptozdan korunmasında rol oynadığı gösterilmiştir (Gómez-Santos ve ark., 2002).

AKT geni ve proteini

AKT, FOXO (forkhead box protein) ve p53 gibi transkripsiyon faktörlerini etkileyerek BH3 protein ekspersiyonunu inhibe etmektedir (Guertin ve ark., 2006). AKT, fosforilasyonyoluyla p53 bozulmasını destekleyebilir. AKT ayrıca GSK3 izoformlarını yüksek oranda korunmuş bir N-terminal düzenleyici bölge üzerinde fosforlandırabilir ve kinazı etkisiz hale getirir, böylece GSK3 yoluyla apoptoz ve glukoz metabolizmasını düzenler (Alessi, 2001; Cho ve ark., 2009). Akt çok sayıda hedefi fosforile eder. Hücre döngüsü ilerlemesi, hayatta kalma, glikoliz, anjiyogenez ve protein sentezinin fosforilasyon ve inaktive edici inhibitörlerde yer aldığından dolayı onkogeneizde yer alan pek çok süreçte önemlidir (Brazil ve Hemmings, 2001).

RT kinaz-ERBB2 geni ve proteini

Reseptör tirozin kinazlar (RTK'lar), birçok polipepti büyüme faktörü, sitokin ve hormon için yüksek hücre yüzey reseptörleridir (Robinson ve ark.,2000). RTK'lar, MAPK / ERK, PI3K / AKT / mTOR ve PLCG1 / PKC dahil olmak üzere birçok sinyal yolunu kullanır. Bu yollar, ürünleri hücre farklılaşmasını, hücre döngüsü ilerlemesini ve hücre iskeleti değişimini destekleyen, hücre yaşlanmasını ve apoptozu inhibe eden çok sayıda genin transkripsiyonunu düzenler (Zwick ve ark., 2001). RTK'ların ve alt akış yollarının aktivitesinin düzenlenmesi, modüle ettikleri hayati hücrel süreçler göz önüne alındığında kritik öneme sahiptir. RTK aktivasyonuna hücrel cevabı engellemeye ya da sonlandırmaya hizmet eder (Ornitz ve Marie, 2015).

ERBB-2, RTK-protein kinaz alt ünitelerinden biri olan ERBB (epidermal büyüme faktörü / EGF ve neuregulinler) ailesinin plazma membranına bağı dört reseptör kinazlardan biridir. Dördü de bir hücre dışı ligand bağlanma domeni, bir transmembran

domeni ve çok sayıda sinyal molekölü ile etkileşime girebilen ve hem ligand-bağımlı hem de ligandtan bağımsız aktivite sergileyen bir hücre-içi domeni içerir (Jain, 2009).

Birkaç istisna dışında, RTK'lar hücre farklılaşmasını, çoğalmasını, hayatta kalma, metabolizmasını ve göçünü düzenleyen büyüme faktörlerini bağlar. Bu hücreyel olayların biyolojik sonuçları sadece intrauterin gelişimde değil, yetişkin doku fonksiyonunda ve homeostazda da önemlidir. İnsülin ve insülin büyüme faktörü-1 (IGF-1) bağlanması, vücuttaki hücrelerde glikoz homeostazını, glikoz alımını, glikojenezi ve lipogenezi uyarır (Kiselyov ve ark.,2009).

Artan RTK sinyali kontrolsüz hücre büyümesine ve çoğalmasına neden olur. RTK genlerinin DNA amplifikasyonu, RTK sinyalinin anormal biçimde artmasının bir başka yoludur. Klinik olarak, bu durum kanser ve diğer hiperproliferatif bozukluklarla sonuçlanır (Mok ve ark.,2009; Zhou ve ark.,2011; Gregorc ve ark.,2018).

P53 geni ve proteini

P53 ilk olarak 1979 yılında tümör gelişimi lehine işlev gösteren bir protein olarak tanımlanmıştır. Proteininin tümör baskılayıcı rolünün ortaya konulması sonrasında, p53 proteinini kodlayan gen Tümör Protein 53(TP53) olarak isimlendirilmiştir. P53 proteinin, tümör baskılayıcı işlevi, DNA tamiri, hücre döngüsünün kontrol edilmesi, gen ifadesinin düzenlenmesi, yaşlanma ve programlı hücre ölümü gibi birçok hücreyel olayda rol almaktadır (Varley ve ark.,1997; Brandon ve ark., 2016). Hücre yaşamında birçok önemli işleve sahip olan p53'ün, mutasyon ya da delesyon gibi bir nedenle ortadan kalkması gibi durumlarda hücre ve organizmanın nasıl etkilendiğine dair çalışmalar vardır. P53 proteini transkripsiyon faktörü işlevine sahip 393 amino asitten oluşan bir proteindir (Varley ve ark.,1997; Hanahan ve Weinberg 2011).

DNA'da gerçekleşen çift zincir kırılmaları ya da telomer hasarları gibi durumlarda da eş-dörtlü (homo-tetramer) yapılar halinde doğrudan DNA'ya bağlanarak, DNA sarmalının çözülmesine engel olmaktadır (Tan ve Luo, 2009). p53'ün hem transkripsiyon faktörü olarak işlev göstermesinde hem de transkripsiyondan bağımsız mekanizmalarla DNA ilişkili işlevlerini gerçekleştirmesinde oldukça önemlidir (Prives ve Manfredi, 1993). Onkogenik mutasyonlar sıklıkla p53 geninin DNA bağlanma bölgesini kodlayan dizilerinde oluşmaktadır (Tan ve Luo, 2009). İstatistiksel olarak ifade edildiğinde; insan

kanserlerinin %50'sinde p53 mutasyonları görülmekte ve bu mutasyonların %95'i p53 proteininin DNA'ya bağlanma bölgesi'nde gerçekleşmektedir (Ho ve ark., 2006; Tan ve Luo, 2009).

2.5.4. PI3K/AKT yolağı aktivatörleri

Fosfoinositid -3 kinaz arttırıcısı (PIKE)

PI3K arttırıcı PIKE adı verilen bir GTPaz sınıfı tanımlanmıştır. PI3K katalitik alt birimleri grup 1 metabotropikglutamat reseptörlerine (mGlu1/5) bağlanır ve PI3K sinyallemesini aktive eder. Fosfoinositidkinaz arttırıcı PIKE nöroeksitotoksik hareketlere karşı koruyucu mekanizmalarda rol oynar. PIKE, PI3K ile değil, AKT ile etkileşime girer ve onun faaliyetini arttırır. Hem PI3K hem de AKT, hücrel büyüme tetikleyen ve apoptoza karşı etkili olan büyüme faktörü aracılı sinyallemede önemli etkenler olduğundan, PIKE'ler, fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirmeleri için hayati önem taşıyan anahtar moleküller olarak hizmet eder (Sofroniew ve Howe, 2001; Arevalo ve Wu, 2006; Gross ve ark., 2015).

2.5.5. PI3K/AKT yolağı inhibitörleri

Fosfataz ve tensin homologu (PTEN)

Fosfataz ve tensin homologu (PTEN), insanlarda PTEN geni tarafından kodlanan bir proteindir (Steck ve ark.,1997). Bu genin mutasyonları birçok kanserin gelişiminde bir adımdır. Tam genom verilerinin mevcut olduğu çoğu memelide PTEN'e (ortologlar) karşılık gelen genler tanımlanmıştır. PTEN fosfataz protein ürününün etkisiyle bir tümör baskılayıcı gen olarak işlev görür. Bu fosfataz, hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynar, hücrelerin çok hızlı büyümesini ve bölünmesini önler (Chu ve Tarnawski,2004).

Bu gen tarafından kodlanan protein bir fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat 3-fosfatazdır. Protein tirozin fosfatazların çoğundan farklı olarak, bu protein tercihen fosfoinositid substratlarını fosforile eder. Hücrelerde hücre içi fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat seviyelerini negatif olarak düzenler ve AKT sinyal yolunu negatif olarak düzenleyerek bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür. PTEN proteini vücutta yaygın olarak eksprese edilir. Hücre büyümesi, hayatta kalma ve göç gibi hücrel davranışların

düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan AKTsinyal yolunun inhibisyonu ile sonuçlanır (Chu ve Tarnawski, 2004; Shi ve ark.,2014).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

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

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma materyali

Çalışmada sıçan renalepitelyal NRK-52E (ATCC® CRL-1571™) hücreleri kullanıldı.

Tablo 1. NRK-52E Hücre dizisinin genel özellikleri

Organizma	Sıçan
Doku	Böbrek epitelyal
Morfoloji	Düzensiz şekilli, genellikle yuvarlak
Yüzey tutulumu	Yapışan hücreler
Tümörjenik	Hayır
Besiyeri	DMEM highglukoz, %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin
Besi yeri yenileme	Haftada 2-3 defa
Pasaj metodu	0.25% tripsin, 0.02% EDTA
Ayırma oranı	1:3-1:4
Biyogüvenlik düzeyi	1

3.1.2. Kullanılan alet ve malzemeler

<u>Alet/malzeme</u>	<u>Marka</u>	<u>Model</u>
Falkon tüpler	Spl	15, 50 mL' lik
Otomotik Pipetler	Eppendorf	10, 100, 200, 1000 µL'lik
PCR tüpler	Qiagen	0,2 mL
Pipet uçları	Biologix	10, 100, 200 ve 1000 L'l'lik
Ependorf tüpler	Ependorf	(1.5 mL'lik)
Ependorf tüpler	Ependorf	(2 mL'lik)
Soğutmalı santrifüj	Universal	320R
Distile su cihazı	Merck	Milliporedirect-Q 3 UV

Hassas terazi	Radwag	220.R2
Karıştırıcı-Vorteks	Yellowline	Tts 2
RT-PCR	Rotor gene	Rotor gene
Nanodrop	Biodrop	Biodrop
Buzdolabı (+4 °C)	Profilo	Profilo
Derin dondurucu (-20 °C)	İndesit	İndesit
Derin dondurucu (-80 °C)	Sanyo	Sanyo
Flask	SPL	75, 25 cm ²
Kriyoviyal tüpler	Corningincorporated	
Distile su cihazı	Merck	Milliporedirect-Q 3 UV
Hassas terazi	Radwag	220.R2
Laminar kabin	Biobasafetycabinet	BSC-L300
Kronometre	Elabscience	Elabscience
İnkübatör	ESCO	CO ₂ inkübatör
Inverted (ters) mikroskop	Nikon	Eclipse ts100
Thoma lamı	Marienfeld	0,0025mm ² 'lik
Portüp	ISOLAB	Plastik
Su banyosu	MRC	WBO-100
ELISA cihazı	Anthos-Zenyth	200 rt
Kültür plakları	Costar 96'lık	3599

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal madde	Marka	Katalog no
Dimetilsulfoksit (DMSO)	Applichempanreac	A3672,0250
FBS	Capricornscientific	FBS-12B
L-Glutamin	Capricornscientific (200mM 100mL)	GLN-B
Penisilin-Streptomisin	Capricornscientific (100x)	PS-B
Etil alkol (%96)	Sigma	Sigma
Trypsin-EDTA(%0,25 %0,1)	Capricornscientific	TRY-1B
DMEM High Glukoz	Capricornscientific	DMEM-HA

% 0,7'lik agaroz	0,7 gr agaroz, 100 mL 1XTBE içerisinde mikro dalga fırın yardımıyla eritilerek hazırlandı. İçerisine 5 µl redgel karıştırıldı	
Redgel	İnvitrogen	15585-011
Brom fenol mavisi	Amresco	115-39-9
cDNA sentez kiti	Qiagen RT2 First Strand	330411
Trizolreagent	Thermo-Scientific	1029608
PBS	Sigma	P4417-50TAB
Kloroform	Sigma	242162, 5L
İzopropil alkol	Merck marka	109634
Etil alkol (%75, soğuk)	Merck	100986.2500
Master mix	Wizbio	W1711R-5

Tablo 2.Gerçek zamanlı-qPCR için hedef genler ve dizilimleri

Gen	F (5'-3')	R (5'-3')
ERBB2	ATGCTCATCGCTCACAACCA	AACTCCTCCCTTCAGGATCTC
AKT1	CTCCTCAAGAATGATGGCACC	ACTCAAACCTCGTTCATGGTC
PI3K	GGAGAACTATGAACAACCTGTG	CATCTTCCAGTAACGTAGGCAG
TP53	CTGGACGACAGGCAGACTTT	GTCCCGTCCCAGAAGATTCC
ACTB	CTCCTCAAGGATGGCACC	GCTCATTGTAGAAAGTGTGGT
mTOR	GCCATTGCCAGCCTCATTG	GAAAGTGTCCCCTGCCATTG

3.2. Yöntem

3.2.1.Sodyum florür (NaF) konsantrasyonlarının hazırlanması

Çalışmada hücrelere uygulanan florun ana stok solüsyonu hücre medyum ortamında hazırlandı. Hücrelere uygulanacak NaF'ın en iyi proliferasyonu artırıcı konsantrasyon ile NaF'ın IC₂₅ ve IC₅₀'lerini belirlemek için hücrelere, final konsantrasyonları 10, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000,7000 7500, 8000 µM olacak şekilde hücre serisinin kendi medyum ortamı içinde konsantrasyonları hazırlandı (Yüksek et al., 2017).

3.2.2. Hücre kültürü

NRK-52E hücresi; 37 °C, %5 CO₂ ve %95 nem içeren ortamda, %10 FBS, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin DMEM high glikoz besi yerinde çoğaltıldı.

3.2.3. Hücre pasajlama

Hücrelerin yoğunluğu flask içerisinde %70-80 sıklığa (confluency) ulaşınca pasajlandı. Pasaj işlemi Tripsin-EDTA (%0,25-%0,1) kullanılarak yapıldı. Pasajlama süreci basamakları özetle şu şekilde yapıldı. İçerisinde hücre bulunan ve %70-80 hücre yoğunluğuna ulaşan 25 cm²'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, 15 mL'lik falkon tüpüne aktarıldı. Bu tüp 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında 15 mL'lik falkon tüpünün üst kısmı atıldı ve tüpün içerisine 2-3 mL kadar besi yeri 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 edildi.

3.2.4. Sitotoksosite (MTT hücre canlılık) testi

NaF'ın NRK-52E hücrelerindeki canlılığı artırıcı en iyi konsantrasyonu, IC₂₅ ve IC₅₀ konsantrasyonlarını saptamak amacıyla MTT testi 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 platelerinin her bir kuyucuk başına 8000 hücre ekildi. Hücreler 24 saat, 37 °C ve CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Bir gecelik inkübasyon sonrasında, hücrelerin

üzerindeki besi yeri alınarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan NaF (10, 50, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 7000, 7500, 8000 μ M) içeren 100 μ L medyum eklendi. Konsantrasyon başına en az 4 kuyucuk kullanıldı. 24 saatlik inkübasyondan sonra, her bir kuyucuğa içinde 10 mL MTT solüsyonu olan 100 μ L 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 μ L MTT liziz solüsyonu eklendi ve formazan kristallerinin iyice çözünmesi için pipetaj yapıldı. Sonunda canlı hücrelerin optik yoğunlukları ELISA cihazında 570 nm dalga boyunda okutuldu. Konsantrasyon belirleme işleminden sonra NaF'ın konsantrasyonları excel doğrusal grafiği yardımıyla tespit edildi.

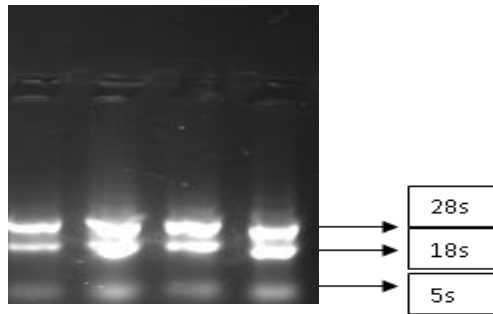
3.2.5. Çalışma gruplarının hazırlanması

Çalışma grubu, kontrol; sadece medyum verilen grup, NaF grubu; hücre proliferasyonunu artırıcı en iyi NaF konsantrasyonu verilen grup, NaF IC₂₅ ve NaF IC₅₀ olmak üzere 4 grup olarak oluşturuldu. Uygulanacak NaF konsantrasyonları belirlendikten sonra her bir çalışma grubu için 25 cm² lik flasklara, flask başına 75x10⁴ hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin yapışması için 24 saat beklendikten sonra üzerindeki medyum atıldı. Atılan medyum yerine hücrelere FBS içermeyen medyum eklenerek hücrelerin G1 fazında durması için 8 saatlik serum açlığına bırakıldı. 8 saatlik serum açlığından sonra hücrelere çalışma gruplarına göre medyumları ilave edildi. 24 saat inkübasyon sonrası hücreler tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı. Total RNA izolasyon aşamasına geçildi.

3.2.6. Total mRNA izolasyonu ve analizi

Bu basamaktan sonraki işlemler aksi belirtilmediği zaman buz üzerinde devam edildi. Santrifüj edilen hücrelerin üzerindeki medyum pipet yardımıyla atılıp alta kalan hücre lizatı 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 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpün üstü pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Tüpe 1 mL soğuk trizol reagent ilave edilerek hücre lizatı pipet yardımıyla iyice homojenize edildi. Bu karışım 5 dk oda sıcaklığında

nükleoproteinlerin 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 şiddetli bir şekilde vortekslendi ve 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra numuneler 12000xg'den fazla olmayacak şekilde 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj aşaması sonrasında karışım üç fazlı olmak üzere bir yapı halini aldı; bu fazlar alta kloroformlu alt faz, ortada hafif beyazımsı interfaz ve en üstte RNA'nın bulunduğu şeffaf faz şeklinde oluşmaktadır. Üste kalan şeffaf faz mikropipet yardımıyla dikkatlice alınarak temiz steril bir 1.5 mL ependorf tüpe aktarıldı. RNA seperasyon aşaması için yeni bir tüpe aktarılan üst faz 0.5 mL izopropil alkole pipet yardımıyla iyice karıştırıldı. 10 dk 15-30 °C'de inkübe edildi ve 12000 x g'den fazla olmayacak şekilde 10 dk 2- 4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpün dibinde jel benzeri bir pelet oluştu. Tüpün üstü tamamen atıldıktan sonra jel benzeri pelet olan RNA 1 mL % 75'lik etil alkol ile vortekslenerek yıkandı. 7500 x g'den fazla olmayacak şekilde 5 dk 2-8 °C'de santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi iki defa tekrarlandı ve santrifüj edilerek üstü atıldı, pelet hücre kültürü laminer kabinde 12-15 dk tüpün ağzı açık bırakılarak kurumaya alındı. Kuruma işlemini 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.



Şekil 3. Çalışma gruplarına ait RNA agaroz jel görüntüsü.

3.2.7. Komplementer DNA (cDNA) izolasyonu

RNA elde edilen dokulardan, gerçek zamanlı-PCR'da ekspresyon analizi için kullanılmak amacıyla cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA eldesi için Wizbio marka (WizScript, catno: W2211) kit kullanıldı. Bu kitin önerdiği protokol kullanılarak cDNA elde edildi.

3.2.8. Gerçek zamanlı-qPCR

PI3K/Akt yolak mekanizması için, Beta aktin (ACTB), Akt-1, ERBB-2, PI3K ve TP53 (P53) genlerinin ekspresyonları belirlendi.

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

Tablo 3.Gerçek zamanlı-qPCR için reaksiyon içeriği

Reaksiyon içeriği	Bir örnek için	Reaksiyon döngüsü
Master miks (2X)	10 µL	*95°C 7' denatürasyon
Primer	Forward: 1 µL Reverse: 1 µL	*95°C 20"
dH ₂ O	7 µL	*52-55°C 60"
cDNA	1 µL	40 döngü
Toplam	20 µL	<i>MeltingCurve</i> Ramp: 50-99 (1'er derece artış) "90 °C 5"

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

Kontrol geni olarak aktin beta (ACTB) kullanıldı. Her bir örnek için üç bağımsız tekrar yapıldı. Bir ct (cycletreshold), amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcı itibarıyla belirlendi.

Hedef genlerin ürünlerinin değerlendirilmesi $\Delta\Delta C_t$ ve $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoduyla belirlendi (Livak ve Schmittgen, 2001). Gruplar arasındaki farklılık kontrol genin ekspresyonun artış-azalış kat (foldchanges) sayısı ile karşılaştırılıp değerlendirildi.

3.3.9. 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: 22) istatistik paket programı kullanıldı.



4. BULGULAR

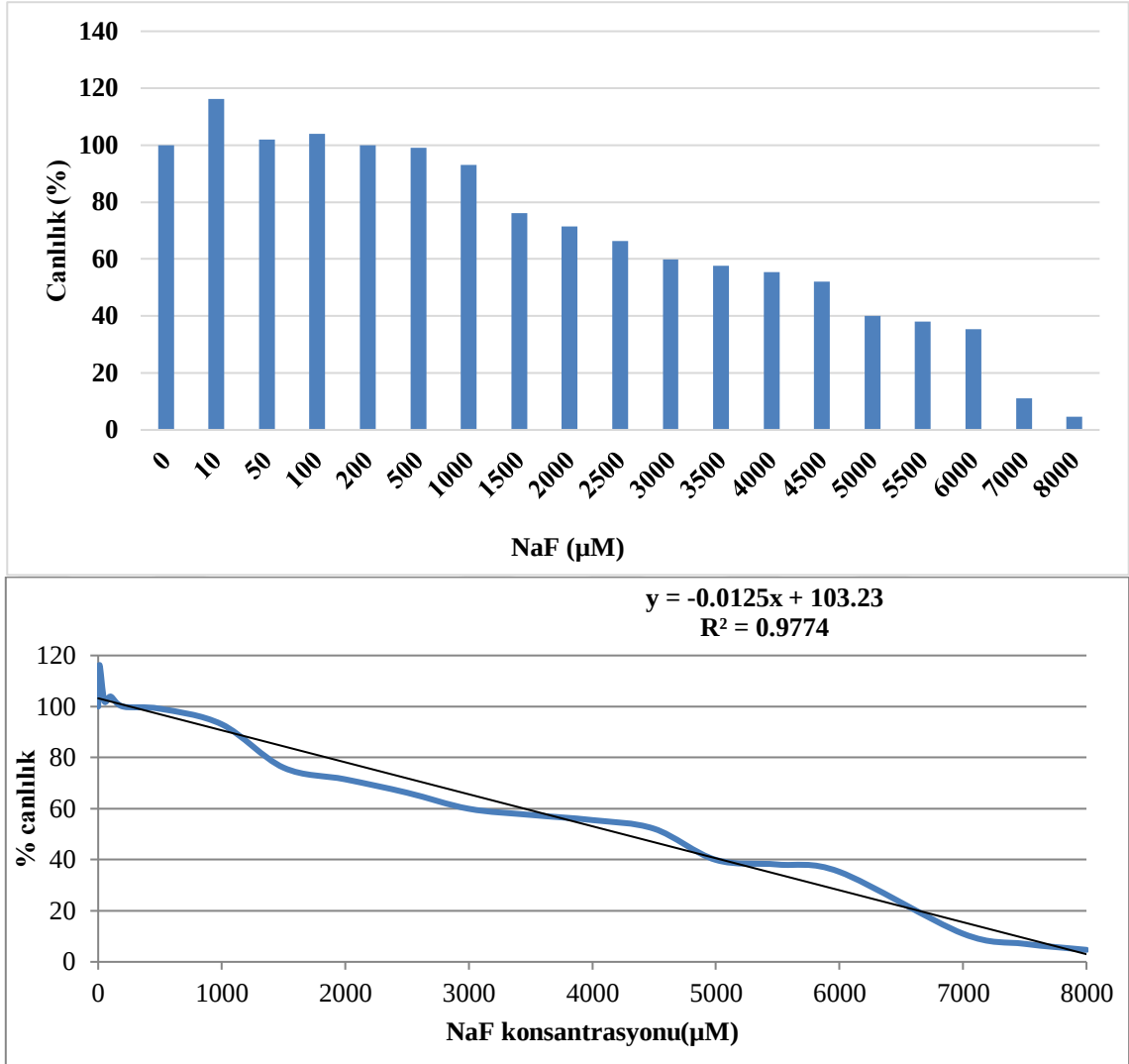
4.1. MTT Sonuçları

96'lık kuyucuklara ekilen NRK-52E böbrek hüclerine farklı konsantrasyonlarda (0, 10,50, 100, 200, 500, 100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 7000, 8000 μ M) sodyum florür (NaF) uygulandı. NaF uygulandıktan 24 saat sonra MTT canlılık testi yapıldı. Canlılık testinde NaF verilmeyen kontrol grubu %100 canlı kabul edilerek diğer grupların canlılığı belirlendi. Sonuçlar aşağıda verilen tablo ve grafikteki gibi özetlendi.

Tablo 4. NRK-52E hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan NaF sonucu elde edilen MTT canlılık testi sonucu

NaF Konsantrasyonu (μ M)	Canlılık (%) sonucu
Kontrol (0)	100
10	116
50	102
100	103
200	100
500	99
1000	93
1500	76
2000	71
2500	66
3000	60
3500	57
4000	56
4500	48
5000	40
5500	38
6000	35
7000	11
8000	7

24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda NaF hüclere uygulandı. Uygulama sonunda elde edilen MTT sonuçlarına göre en yüksek hücre canlılığı kontrol grubuna göre 10 μ M da yaklaşık olarak %16 bir artış göstermiştir. 100, 200 ve 500 μ M da ise kontrol grubuna göre bir değişim olmadı. 500 μ M'dan itibaren artan NaF konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığı azalmaya başladı. En yüksek konsantrasyon olan 8000 μ M da canlılık %7 ye kadar düşüş göstermiştir.



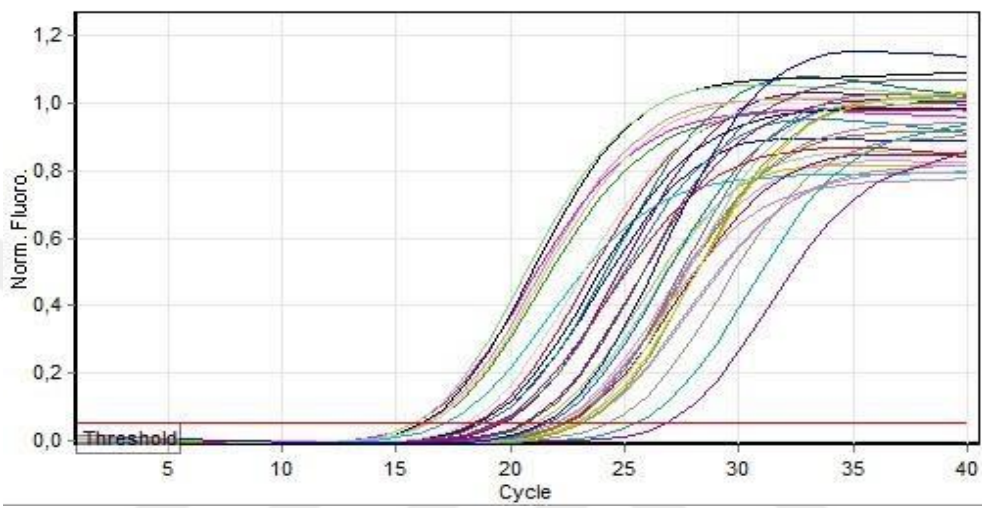
NaF IC₂₅ ve IC₅₀ konsantrasyonlarını belirlemek için microsoft excel eğim grafiğinden elde edilen denklem kullanılmıştır

Şekil 4. NRK-52E hücre hattına farklı konsantrasyonlarda uygulanan NaF sonucu elde edilen MTT canlılık testi sütun ve eğim grafiği.

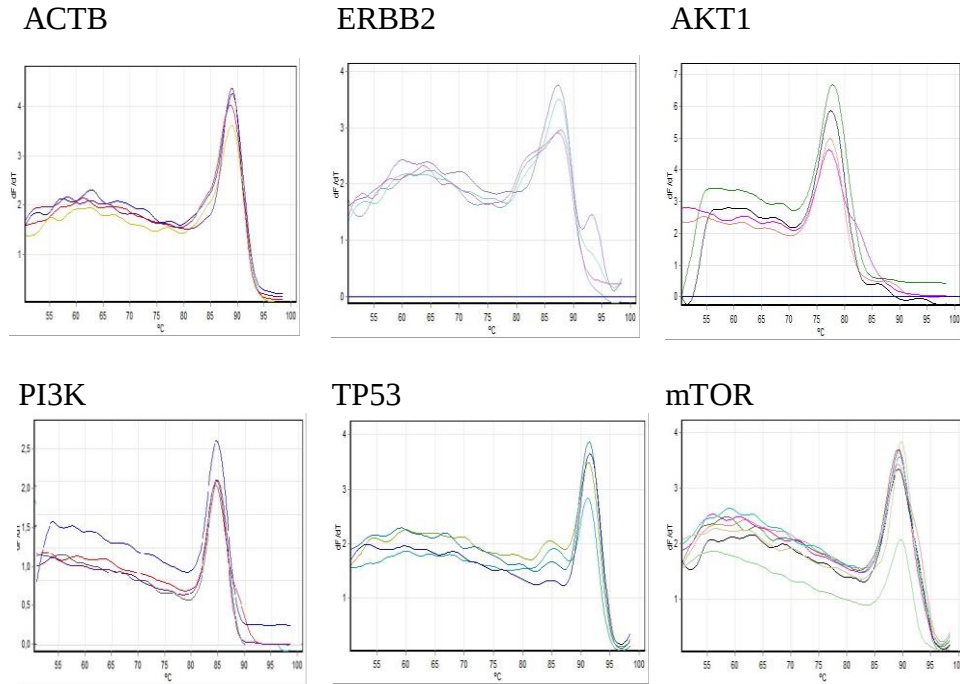
MTT sonuçlarına göre hücre proliferasyonu en iyi artıran NaF konsantrasyon 10 µM, hücre proliferasyonunu %25 oranında inhibe eden (IC₂₅) NaF konsantrasyonu 2250 µM ve hücre proliferasyonun %50 oranında inhibe eden (IC₅₀) NaF konsantrasyonu 4250 µM olarak tespit edildi. NaF IC₂₅ ve IC₅₀ konsantrasyonunu belirlemek için Microsoft Excel eğim grafiği kullanıldı. Bu elde edilen konsantrasyonlar çalışma gruplarına uygulandı. Çalışma grupları kontrol, NaF 10 µM (F), IC₂₅ (F25) ve IC₅₀ (F50) olmak üzere dört grup olarak belirlendi.

4.2. Gerçek zamanlı-qPCR sonuçları

Çalışmada hedef genlere ait gerçekleştiren tüm gerçek zamanlı-qPCR çalışmaları sırasında elde edilen CT grafiği ve melting curve sonuçları aşağıda verildiği gibidir. Elde edilen bu grafikler her bir hedef gene özgü dizayn edilmiş primerlerin doğru bağlandığı ve bölgelerin çoğaldığını göstermektedir.



Şekil 5. cDNA temelli gerçek zamanlı qPCR reaksiyonuna ait amplifikasyon ve standart CT eğrisi.

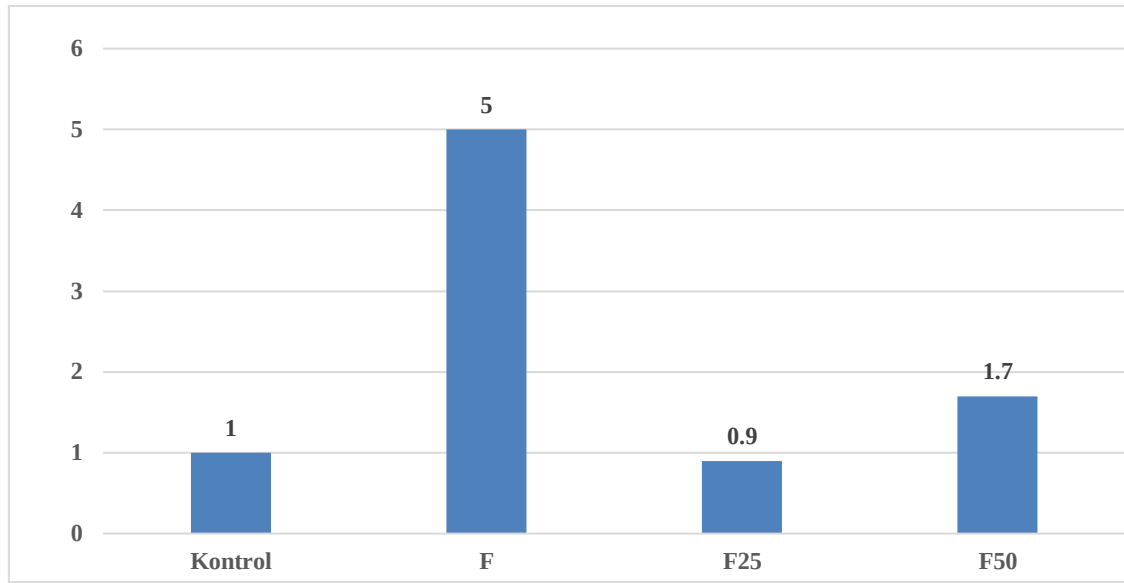


Şekil 6. Her bir hedef gene ait elde edilen ürünlerin melting curve eğrisi.

Tablo 5. Real time-qPCR sonuçlarına göre hedef genlere ait ekspresyon sonuçları.

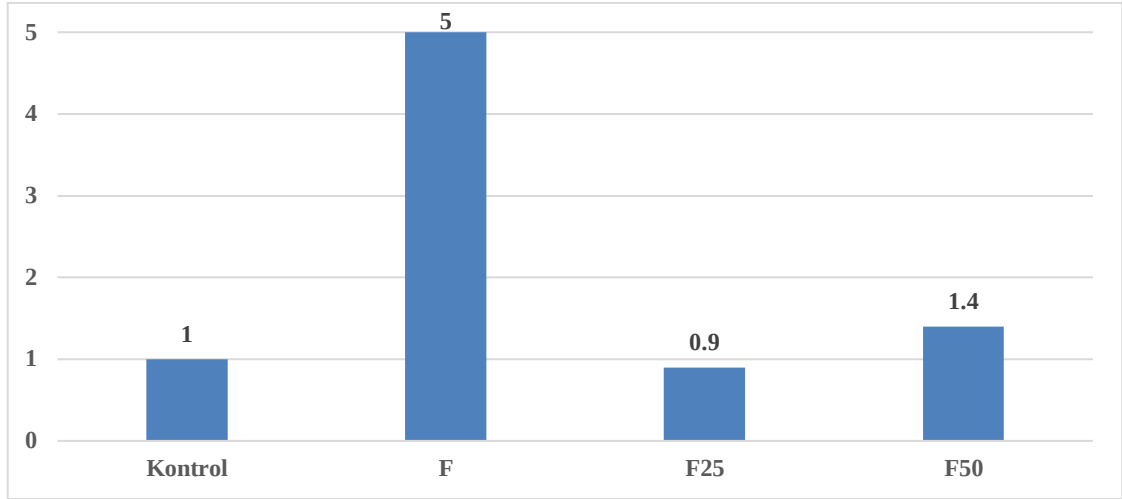
	ERBB2 (ort±ss)	AKT1 (ort±ss)	PI3K (ort±ss)	TP53 (ort±ss)	mTOR (ort±ss)
Kontrol	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
F	5.06±3.04*	5.01±0.35*	4.16±2.10*	1.25±0.11	0.17±0.02*
F25	0.92±0.29	0.88±0.54	1.57±1.13	3.17±0.54*	0.54±0.15*
F50	1.75±0.58	1.42±0.74	2.00±0.85	39.38±13.28*	0.31±0.00*

*Diğer gruplara göre anlamlı ($p \leq 0.05$). ort; ortalama ss; standart sapma.



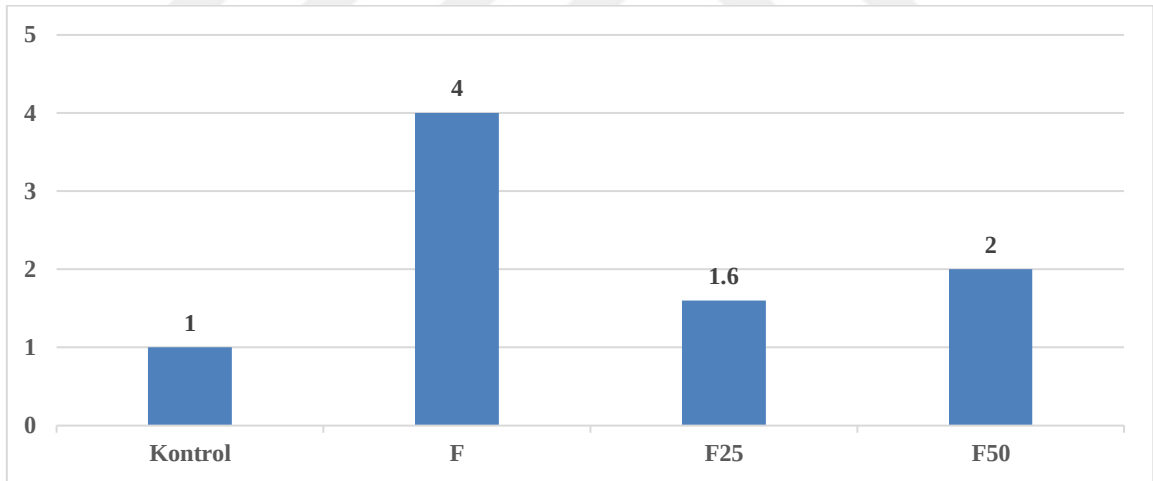
Şekil 7. Farklı konsantrasyonlarda verilen florun (NaF), NRK-52E seri hücrelerinde ERBB2 gen ekspresyon seviyesine etkisi.

Gruplar arasındaki farklılık kontrol grubunun ekspresyonun artış-azalış kat (fold changes) sayısı ile karşılaştırılıp yapılan değerlendirmeye göre; ERBB2 geni, kontrol grubuna göre NaF 'ın proliferasyonu arttırıcı konsantrasyon olan 10 μ M verilen F grubunda yaklaşık olarak 5 kat bir artış göstermiştir ($p \leq 0.05$). Diğer gruplarda istatistiksel olarak bir değişim gözlenmemiştir ($p \geq 0.05$).



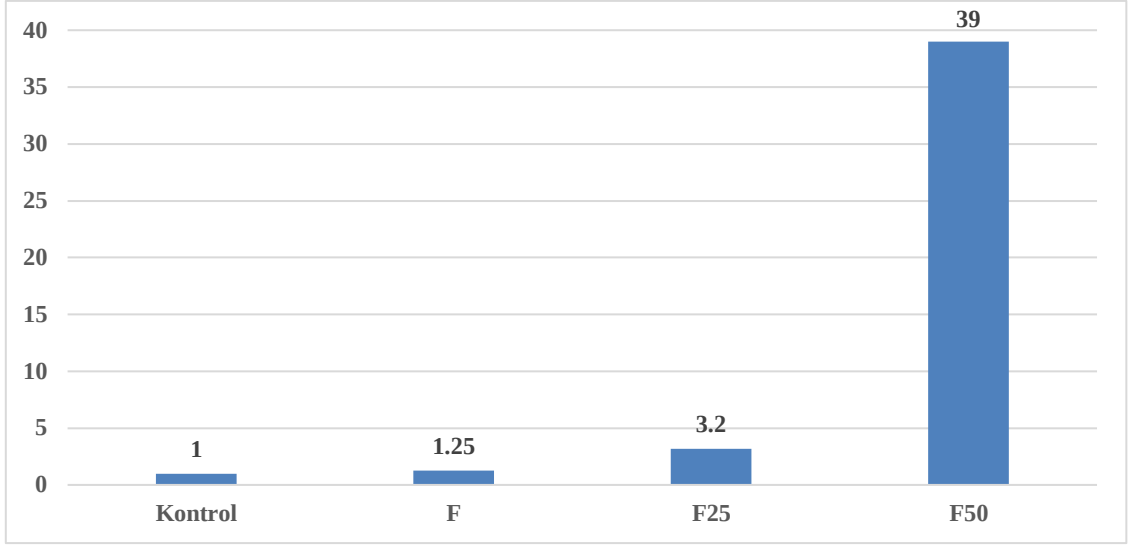
Şekil 8. Farklı konsantrasyonlarda verilen florun (NaF), NRK-52E hücrelerinde AKT1 gen ekspresyon seviyesine etkisi.

AKT1 geni F grubunda istatistiksel olarak 5 kat bir artış ($p \leq 0.05$) göstererek upregülasyon sağlarken, diğer gruplarda kontrol grubuna göre ekspresyonları değişmemiştir.



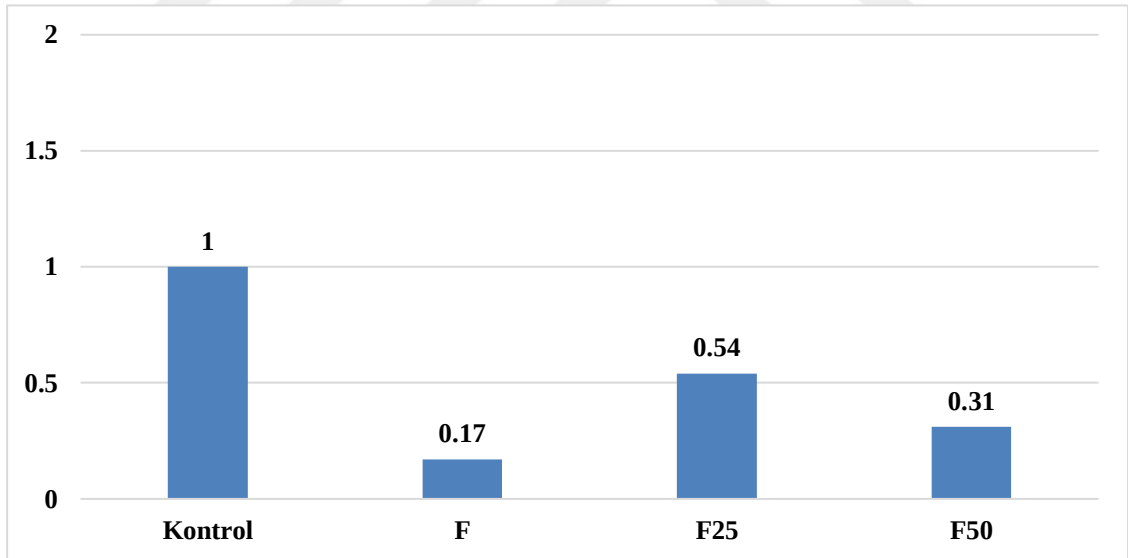
Şekil 9. Farklı konsantrasyonlarda verilen florun (NaF), NRK-52E hücrelerinde PI3K gen ekspresyon seviyesine etkisi.

PI3K geni F grubunda istatistiksel olarak yaklaşık 4 kat artmıştır. F50 grubunda 2 kat bir artış sağlamasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p \geq 0.05$). Diğer gruplarda ise ekspresyon seviyesinde bir değişim görülmedi.



Şekil 10. Farklı konsantrasyonlarda verilen flor'un (NaF), NRK-52E hücrelerinde TP53 gen ekspresyon seviyesine etkisi.

Gruplar arasında TP53 gen ekspresyon seviyesine baktığımızda F50 grubunda gen seviyesinde istatistiksel olarak 39 kat bir artış ($p \leq 0.05$) meydana geldiği tespit edildi. F25 grubunda 3 kat anlamlı ($p \leq 0.05$) bir artış meydana gelmiştir.



Şekil 11. Farklı konsantrasyonlarda verilen florun (NaF), NRK-52E hücrelerinde mTOR gen ekspresyon seviyesine etkisi.

mTOR geni; kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ($p \leq 0.05$) sırasıyla F grubunda 4/5, F25 grubunda 1/2, F50 grubunda ise yalşık olarak 2/3 oranında azalma tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Flor iyonu yapısı nedeniyle çok aktif bir elementtir ve bu sebeptendir ki birçok yerde çeşitli bileşikler olarak yer almaktadır (Anuradha et al., 2001, Bai et al., 2010). Çeşitli yollarla tüketilen flor bileşikleri, başta kemik yapısında bulunmakla birlikte, yumuşak dokularda da birikmektedir (Barbier et al., 2010). Böbrek, florun atılmasında ve geri alınmasında önemli rol alan birincil organdır. Bu nedenle böbreklerde, fazla flor alınmasına bağlı olarak histopatolojik ve foksiyonel değişimler görülmektedir (Xu et al., 2005). Fazla flor alınmasına bağlı olarak meydana gelen oksidatif stres, apoptozis, DNA hasarı ve sinyal yolları ile ilgili moleküler mekanizmaların altında yatan nedenlerle ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur (Güney ve ark., 2007; Song ve ark., 2015; Yüksek ve ark., 2017; Çetin ve ark., 2019; Yüksek ve ark., 2017; Yüksek ve ark., 2020).

PI3K/Akt, hücrel farklılaşmaları, çoğalmaları, hücrenin devamlılığının sağlanması, invazyon v.s birçok hücrel olayları düzenleyen bir sinyal yolağıdır. (Pompura ve Dominguez-Villar, 2018).

Bu tez çalışmasının amacı, NRK-52E hücre serisinde bir flor kaynağı olan NaF'ın, böbrek dokusunda PI3K/AKT yolağına olan etkisini ortaya koymaktır. Bu amaç doğrultusunda *in vitro* şartlarda hücre kültürü ortamında NRK-52E rat böbrek hücre serisine farklı konsantrasyonlarda NaF uygulandı. Çalışmada kuyucuk başına 8000 hücre ekildi. MTT testi sonucuna göre, proliferasyonu artıran NaF konsantrasyonu, NaF IC₂₅ ve NaF IC₅₀ konsantrasyonu ile PI3K/AKT yolağına da majör enzimlerin gen (ERBB2, AKT1, PI3K ve TP53) ekspresyon seviyeleri belirlendi. 24 saat sonunda elde edilen MTT testi sonucu NaF'ın faydalı konsantrasyonu 10 µM, IC₂₅'i 2250 µM ve IC₅₀'si 4250 µM olarak tespit edildi.

He ve ark., (2015) RPMI8226 insan kökenli hücre serisine 48 saat sonunda farklı konsantrasyonlarda NaF verdikleri çalışmada 320 µM konsantrasyonun hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini rapor etmişler.

HL- 60 hücre serisine NaF verilen çalışmada ise, 2500 µM NaF'ın hücre sayısının ciddi anlamda azalmaya yol açtığı tespit edilmiş (Otsuki et al., 2005). Çalışma materyali olarak H9c2 hücre serisinin kullanıldığı diğer bir çalışmada ise 380 µM konsantrasyonda

NaF uygulanan çalışmada 24 saat içinde bu konsantrasyonun hücre proliferasyonunu artırdığı, 48 saatin sonunda ise azaltmaya başladığı görülmüştür (He ve ark., 2015).

HePG2 karaciğer hücre serilerinden elde edilmiş hepatositlerde, 48 saat sonra NaF uygulanan hücre proliferasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, düşük konsantrasyonlarda hücre proliferasyonunu artırırken, yüksek dozlarda azalmasına neden olmuştur (Gutowska ve ark., 2016).

Laboratuvarımızda daha önce yine aynı hücre serisinde (NRK-52E) yapılan çalışmalarda, kuyucuk başına 10000 hücre ekilmiş ve 24 saatin sonunda farklı konsantrasyonlarda NaF (100, 250, 500, 1000, 2000, 5000, 7500 ve 10000 μ M) uygulanmıştır. 24 saat uygulama sonunda yapılan MTT testi sonucunda NaF konsantrasyonu arttıkça hücre proliferasyonunun azaldığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada NaF IC₅₀ konsantrasyonu NRK-52E hücre serisinde 6000 μ M, HfOB 1.19 hücre serisinde ise 5000 μ M olarak tespit edilmiştir (Çetin ve ark., 2019).

NRK-52E kullanılan başka bir çalışmada ise 3, 12 ve 24 saat boyunca 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000, 10000, 12000 ve 15000 μ M dozlarında NaF uygulanmış ve NaF IC₅₀ 3200 μ M olarak tespit edilmiştir. Çalışmada kuyucuk başına 7000 hücre ekilmiştir çalışma sonunda elde edilen MTT sonucunda 3, 12 ve 24 saat süresince 250 μ M konsantrasyona kadar hücre proliferasyonun arttığı sonrasında ise azaldığı saptanmıştır (Yüksek ve ark., 2020).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlarda da hücre proliferasyonu NaF konsantrasyonu arttıkça azalmıştır. Bu sonuç literatür verileri ile uyumludur. Fakat NaF'ın sitotoksik konsantrasyonu hücre cinsine, NaF uygulama süresine ve NaF'ın uygulandığı hücre sayısına göre değişebilmektedir. Bu noktada uygulanan NaFIC₂₅ ve NaFIC₅₀ dozları farklılık gösterebilmektedir.

Florun, hücre metabolizmasına olan etkisiyle ilgili moleküler düzeyde birçok araştırma yapılmıştır. Florür, esterazlar, asimetrik hidrolazlar ve fosfatazlar gibi çeşitli enzimleri inhibe ve ayrıca tirozin kinaz aktivitesini etkileyen bir nükleofilik reaktiftir (Viñals ve ark., 1993). Florun apoptozis, nekrotik ve otofajik ölüm yolları (Urut, 2018), oksidatif stres (Efe ve ark., 2020) DNA zincir kırıklarının tamir genleri (Ameeramja ve ark., 2016; Yüksek ve ark., 2020) ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur.

PI3K/AKT/mTOR sinyalizasyon yolağı hücre mekanizmalarında geniş bir anlamda birçok hücreysel mekanizmayı etkilemektedir. Dolayısıyla bu mekanizma ile ilgili, başta kanser çalışmaları olmak üzere birçok alanda araştırma yapılmaktadır. Bu çalışmada ise, florun PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağına etkisini ortaya koyabilmek için, NRK-52E hücre serilerine farklı konsantrasyonlarda NaF uygulandı. NaF uygulamalarının proliferasyon artırıcı etkisi düşük (10 μ M), orta (IC₂₅, 2250 μ M) ve yüksek (IC₅₀, 4250 μ M)24 konsantrasyonlarda olmak üzere gerçekleştirildi. 24 saatlik uygulama sonunda, PI3K/AKT yolağında yer alan bazı kilit enzimleri kodlayan genler ile TP53 genin mRNA ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı-qPCR metodu ile belirlendi. Çalışma sonunda elde edilen verilere göre düşük konsantrasyonda verilen NaF reseptör tirozin kinazın bir alt ünitesi olan ERBB2 gen ekspresiyonunda artışa neden olduğu tespit edildi. Bu artışla birlikte PI3K ve AKT1 gen ekspresiyonunda aynı şekilde anlamlı bir artış gerçekleşmişti. Düşük (10 μ M) konsantrasyonda verilen NaF mTOR ekspresyon düzeyinde bir azalmaya ve P53 ekspresyonunda ise bir değişime neden olmadığı tespit edilmiştir. Orta (IC₂₅) ve yüksek (IC₅₀) konsantrasyonlarda uygulanan NaF'ın ise ERBB2, PI3K ve AKT1 düzeylerinde bir değişime neden olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar MTT sonuçlarımızla uyumlu bulunmuştur. mTOR seviyesi ise uygulanan bütün NaF konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. TP53 gen ekspresyon düzeyi ise düşük (10 μ M) konsantrasyonda değişmediği orta (IC₂₅) ve özellikle yüksek (IC₅₀) konsantrasyonda önemli bir artış göstermiştir.

ERBB2 tanımlanmış bir liganda sahip olmayan ERBB tirozin kinaz ailesinin benzersiz bir üyesidir (Penuel ve ark., 2001). ERBB2 çeşitli habis tümörlerde çok fazla eksprese olmaktadır. Ayrıca kanser hastalarının sağkalımında ve farklı tümöral oluşumlarda etkili olduğu belirtilmektedir (Wichmann ve ark., 2014).

Wang ve ark., (2020) deneysel florozis oluşturularak yaptıkları çalışmada, gerçek zamanlı-qPCR ve western blotting sonuçlarına göre florun PI3K ve AKT genlerinin ekspresyonunu artırdığını tespit etmişlerdir.

C2C12 hücre serilerine sitotoksik konsantrasyonda NaF uygulanan çalışmada, PI3K mRNA ekspresiyonunun önemli bir şekilde arttığı, fakat AKT1 gen ekspresiyonunun ise anlamlı olarak azaldığı rapor edilmiştir (Zhou ve ark., 2018).

NaF, PI3K, AKT ve mTOR mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin aşağı regülasyonu ile karakterize edilen mTOR aktivitesinin inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Kuang ve ark., 2018). Huang ve ark., (2018) HUVECs hücrelerine NaF uyguladıkları çalışmada P-AKT/AKT oranının aşağıya doğru bir azalma gösterdiği tespit etmişlerdir. Deneysel olarak kronik florozis oluşturulan çalışmada, akciğer dokusunda PI3K ve AKT1 mRNA ve protein seviyesine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre PI3K ve AKT1 mRNA ve proteinlerin ekspresyonu florozisli hepatositlerinde önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir (Fan ve ark., 2015).

Shenoy ve ark., (2019) hücre proliferasyonunda gen ekspresyon değişimlerinin araştırılması için C2C12 miyoblast hücre serilerine düşük (1.5 ppm) ve yüksek (5 ppm) konsantrasyonlarda NaF uygulamışlardır. Düşük konsantrasyon NaF'ın PI3K/AKT yolağını aktive ettiğini, yüksek konsantrasyonda ise inhibe ettiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca 24 saatlik NaF uygulaması sonucu, mTOR ekspresiyonunun kontrol grubuna göre düşük olduğu sonucu da ortaya konulmuştur.

Guo ve ark., (2020) toksik dozda NaF vererek farelerde yaptıkları çalışmada mTOR gen ekspresyonunun önemli oranda azaldığını tespit etmişlerdir. Zhang ve ark., (2017), Florür'ün, mTOR'un fosforilasyonunu inhibe ettiği, bunun da AKT ve PI3K mRNA ekspresyon seviyelerinde bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. HAT-7 hücre serilerinde yüksek konsantrasyonda NaF uygulamasıyla, Flor otofaji ilişkisinin incelediği çalışmada, otofagozom artıkcı mTOR'un hem mRNA hemde protein seviyesinde bir azalma tespit edilmiştir (Shuang ve ark., 2015).

NaF'ın p53 geni üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. Buna göre, Suzuki ve ark., (2018) LS8 hücrelerine 5 mM konsantrasyonda NaF uyguladıkları çalışmada florun p53 asetilasyonunu indüklediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerine 24 saat boyunca 40 ve 60 mg/L NaF uygulanan çalışmada da 60 mg/L NaF konsantrasyonunun p53 ekspresyonunu önemli

oranda artırdığı rapor edilmiştir (Tu ve ark., 2018). Luo ve ark., (2018) 42 gün boyunca 0, 12, 24 ve 48 mg/kg olmak üzere farklı konsantrasyonda NaF uyguladıkları deneysel florozis çalışmasında, 12 mg/kg'dan daha fazla NaF verilen gruplarda böbrek hücrelerinde p53 mRNA ekspresyon seviyesinin arttığını ve hücre proliferasyonunu ve böbrek gelişimini inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Gu ve ark., (2019) MC3T3-E1 hücre serinde yaptıkları çalışmada p53 gen ekspresyon seviyesinin arttığını tespit etmişler. Farklı konsantrasyonlarda flor maruz kalan alüminyum döküm işçilerinin lenfositlerinden elde edilen mRNA'dan yapılan gerçek zamanlı-qPCR çalışmasında flor dozuna bağlı p53 ekspresyon seviyesinin artış gösterdiğini tespit etmişlerdir (Wen ve ark., 2019).

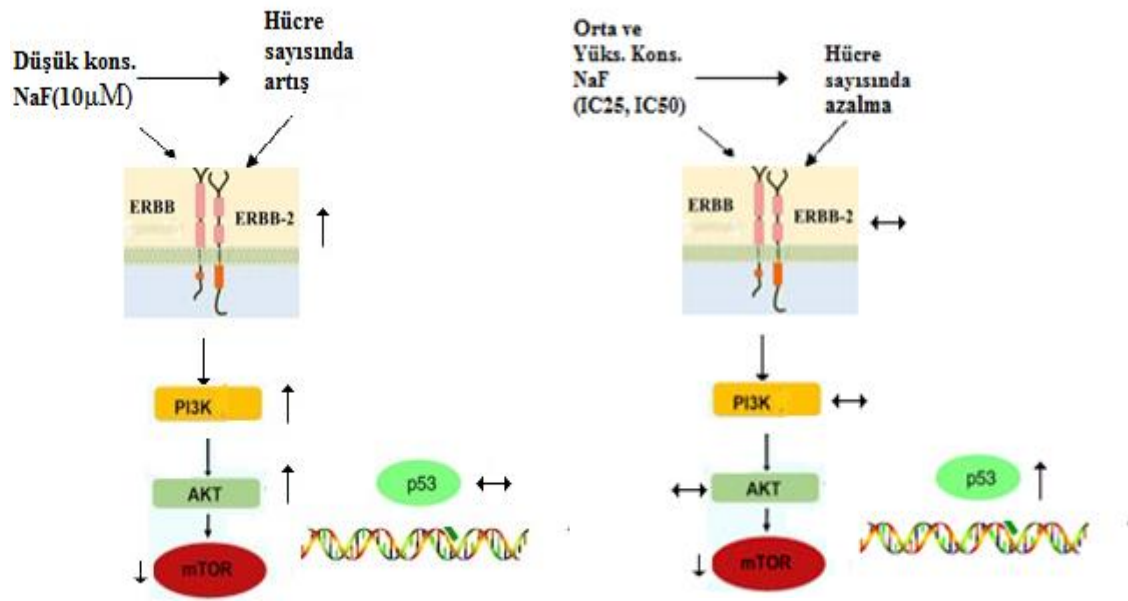
Sunulan bu tez çalışmasında, elde edilen sonuçları, hem *in vivo* hemde *in vitro* çalışmalarla karşılaştırdığında sonuçların uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Düşük konsantrasyonda flor verilen çalışma grubunda PI3K/AKT yolağında etkili RT-kinaz alt ünitesi olan ERBB2 ile PI3K ve AKT1 gen ekspresyon seviyesinde önemli bir artış olduğu görüldü. Bu sonuçların verilen literatürler ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Düşük (10 μ M) konsantrasyonda verilen NaF her ne kadar hücre proliferasyonunda bir artış sağlamış olsa bile genel itibarıyla proliferasyonda pozitif etki sağlayan mTOR geninde bir artışa neden olmamış aksine azalmasına neden olmuştur. Orta (IC₂₅) ve yüksek (IC₅₀) konsantrasyonlarda NaF verilen çalışma gruplarında ise PI3K/AKT yolağında yer alan hedef genlerin ekspresyon seviyelerinde bir değişim olmadığı saptanmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar literatürlerle uyumlu olup, sitotoksik konsantrasyonda verilen NaF'ın PI3K/AKT yolağındaki kinaz enzimlerinin inhibisyonuna neden olabileceği sonucuna varılabilir.

DNA hasarının tamirinde etkili olan p53 ekspresyon seviyesi düşük konsantrasyonda NaF verilen hücre grubunda değişmezken, yüksek konsantrasyonda NaF verilen gruplarda ise aksine ekspresyon seviyesinin çok yüksek oranda artışına neden olduğu düşünülmektedir. Daha önceki çalışmalarımızdaki sonuçlarda ortaya konulduğu üzere, NaF konsantrasyonu arttıkça DNA hasarında artışı söylenebilir (Yüksek ve ark., 2020; Çetin ve ark., 2020). Bu da NaF'ın neden olduğu DNA hasarını

artmasına karşı, bir DNA tamir geni olan TP53 ekspresyon seviyesinin artma nedeni olduğu sonucuna varılabilir.

Bu çalışmada artan AKT1 ekspresyon seviyesine karşın, mTOR artış göstermemiştir. Bu sonuçlara göre NRK-52E hücrelerinde düşük konsantrasyonda uygulanan NaF hücre proliferasyonunun mTOR üzerinden değil de başka bir protein kinaz yoluyla sağlandığı söylenebilir. Fakat hücre proliferasyonunda ve büyümesinde pozitif etkiye sahip mTOR seviyesinde aşağı yönlü bir azalma tespit edilmiştir. Özellikle sitotoksik konsantrasyonlarda verilen flor kaynağı olan NaF'ın kinaz enzimlerini inhibe etmesinden kaynaklanan, PI3K-AKT sinyal genlerinin ekspresyonunda azalma olduğu düşünülmektedir. Özet olarak NRK-52E böbrek epitel hücre serisinde florun neden olduğu hücre hasarının patogenezinde PI3K/AKT/mTOR yolağı önemli bir sinyal yolağıdır. Sonuçlar aşağıda şematize edilmiştir (Şekil 12).



(Genlerin bitişiğindeki işaretler ekspresyon değişimlerini göstermekte; yukarı yönlü artışı, aşağı yönlü azalışı ve sağlı solu gösterim ise değişimin olmadığını göstermektedir).

Şekil 12. Düşük orta ve yüksek konsantrasyondaki NaF'ın PI3K/AKT sinyalizasyon yolağının aşağı yönlü akışına etkisi:

Sonuç olarak, RTK, PI3K ve AKT1 genleri düşük flor konsantrasyonunda artarken bununla ilgili olduğu düşünülen ve artması beklenen, mTOR gen ekspresyonun

da paralel artış görülmemiştir, hatta azalma tespit edilmiştir. Bu durumun nedeninin ortaya konulması için transkripsiyon faktörlerinin, translasyon sonrası durumun araştırılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca ileriki çalışmalarda NRK-52E hücre serisi ile birlikte farklı hücre serileri kullanılarak, PI3K/AKT yolağında yer alan ve hücre proliferasyonunda görev alan önemli genlerin daha fazlasına bakılması ve bu hedef genlere ait protein miktarlarının western blotting v.b yöntemlerle ortaya konulması çalışma sonuçlarının daha iyi anlaşılmasında etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Agalakova NI, Gusev GP. Molecular mechanisms of cytotoxicity and apoptosis induced by inorganic fluoride. *Int Schol Res Not* 2012;Article ID 403835
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, ve ark. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*. 1997;1;7(4):261-9. doi: 10.1016/s0960-9822(06)00122-9.
- Alessi DR. Discovery of PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction. Colworth Medal lecture. *Biochem Soc Trans*. 2001;29:1-14
- Ameeramja J, Panneerselvam L, Govindarajan V, Jeyachandran S, Baskaralingam V, Perumal E (2016) Tamarind seed coat ameliorates fluoride induced cytotoxicity, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and apoptosis in A549 cells. *J Hazard Mater*. 20016;15(301):554-65. doi: 10.1016/j.jhazmat.2015.09.037
- Anuradha CD, Kanno S, Hirano S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. *Free Radical Biol Med*. 2001;1:367–73
- Aoba T (1997) The effect of fluoride on apatite structure and growth. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1997;8(2):136-53.
- Arboleda MJ, Lyons, JF, Kabbinar FF, Bray MR, Kar BE, Ayala R, ve ark. Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2003;63(1):196-206.
- Atkins PW, Overton TL, Rourke JP, Weller MT, Armstrong FA, 2010. The Group 17 Elements In "Inorganic Chemistry", Ed, PW Atkins, TL Overton, JP Rourke, MT Weller, FA Armstrong, 5th ed, Publisher Great Britain by Oxford University Press, W. H. Freeman and Company, 41 Madison Avenue, New York, NY 10010
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for fluorides, hydrogen fluoride, and fluorine., Atlanta ATSDR Publication;2003.
- Bai C, Chen T, Cui Y, Gong T, Peng X, Cui HM. Effect of high fluorine on the cell cycle and apoptosis of renal cells in chickens. *Biol Trace Elem Res*. 2010;138:73–180
- Barbier O, Arreolar-Mendoza L, Del Roza LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem-Biological Interactions*. 2010;188:319-33
- Barnett SF, Bilodeau MT, Lindsley CW. The Akt/PKB family of protein kinases: a review of small molecule inhibitors and progress towards target validation. *Curr Top Med Chem*. 2005;5(2):109-25. doi: 10.2174/1568026053507714.
- Bartlett JD, Dwyer SE, Beniash E, Skobe Z, Payne-Ferreira TL. Fluorosis: a new model and new insights. *J Dent Res*. 2005;84(9):832-36)
- Ben I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*. 2011;23(10): 1515-27

- Bozulic L, Hemmings BA. PKB'de PIKKing: PKB aktivitesinin fosforilasyonla düzenlenmesi. *Curr Opin Celi Biol.* 2009;21(2):256–61
- Brandon J, Aubrey Andreas, Strasser, Gemma L, Kelly 2, Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway Cold Spring Harb Perspect Med 2016 May 2;6(5):a026062. doi: 10.1101/cshperspect.a026062
- Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(11):657-64. doi: 10.1016/s0968-0004(01)01958-2.
- Brugge J, Hung MC, Mills GB. A new mutational AKTivation in the PI3K pathway. *Cancer Cell.* 2007;12(2):104-7. doi: 10.1016/j.ccr.2007.07.014.
- Buzalaf, M. A. and Whitford, G. M. Fluoride metabolism. *Monographs in Oral Sciences.* 2011;22:20–36
- Cho D, Mier J W, Atkins M B. PI3K/Akt/mTOR pathway: a growth and proliferation pathway[M]//Renal cell carcinoma. Humana Press. 2009: 267-85.
- Chu EC, Tarnawski AS. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology. *Med Sci Monit.* 2004;10(10): RA235-41. Epub 2004 Sep 23.
- Çetin S, Yur F, Taşpınar M, Yüksek V. The effects of some minerals on apoptosis and DNA damage in sodium fluoride-administered renal and osteoblast cell lines. *Fluoride.* 2019;52(3):362-78
- Efe U, Dede D, Yüksek V, Çetin. Apoptotic and oxidative mechanisms in liver and kidney tissues of sheep with fluorosis *Biological Trace Element Research.* 2020;https://doi.org/10.1007/s12011-020-02121-y.
- Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nature Reviews Cancer.* 2009;9 (8):550-62
- Ergin E, Eden E. Florun insan sağlığına olumsuz etkisi var mı? *Ege Üniv Diş Hek Derg.* 201738(1):13-20.
- Fan B, Yu Y, Zhang Y. PI3K-Akt1 expression and its significance in liver tissues with chronic fluorosis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(2):1226-36.
- Fejerskov O, Ekstrand J. Burt BA, Fluoride in Dentistry. 2nd. ed. Munksgraad, Copenhag en. Boisen Print. 1996
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science.* 1997 31;275(5300):665-68. doi: 10.1126/science.275.5300.665.
- Georgescu MM. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control Genes *Cancer.* 2010;1(12):1170-7
- Gómez-Santos C, Ferrer I, Reiriz J, Viñals F, Barrachina M, Ambrosio S. MPP+ increases alpha-synuclein expression and ERK/MAP-kinase phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res.* 2002;935(1-2):32-9. doi: 10.1016/s0006-8993(02)02422-8.
- Gregorc V, Lazzari C, Karachaliou N, Rosell R, Santarpia M. Osimertinib in untreated epidermal growth factor receptor (EGFR)-mutated advanced non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2018;7(Suppl 2):S165-S170. doi: 10.21037/tlcr.2018.03.19.

- Gross C, Chang CW, Kelly SM, Bhattacharya A, McBride SM, Danielson SW, ve ark.. Increased expression of the PI3K enhancer PIKE mediates deficits in synaptic plasticity and behavior in fragile X syndrome. *Cell Rep.* 2015;11(5):727-36. doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.060. Epub 2015 Apr 23
- Gu X, Wang Z, Gao J, Han D, Zhang L, Chen P, ve ark. SIRT1 suppresses p53-dependent apoptosis by modulation of p21 in osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to fluoride. *Toxicol In Vitro.* 2019;57:28-38
- Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, ve ark. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell.* 2006;11(6):859-71. doi: 10.1016/j.devcel.2006.10.007.
- Guney M, Oral B, Demirin H, Karahan N, Mungan T, Delibas N. Protective effects of vitamins C and E against endometrial damage and oxidative stress in fluoride intoxication. 2007;34(5-6):467-74
- Gutknecht J, Walter A. A hydrofluoric and nitric acid transport through lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1981;644:153-56
- Gutowska I, Baranowska-Bosiacka I, Siwiec E, Szczuko M, Kolasa A, Kondarewicz A, ve ark. Lead enhances fluoride influence on apoptotic processes in the HepG2 liver cell line. *Toxicol Ind Health.* 2016;32, 3, 517-525.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144: 646–674
- He H, Wang H, Jiao Y, Ma C, Zhang H, Zhou Z. Effect of sodium fluoride on the proliferation and gene differential expression in human RPMI8226 Cells. *Biol Trace Elem Res.* 2015;167(1):11-7
- He H, Wang H, Jiao Y, Ma C, Zhang H, Zhou Z. Effect of sodium fluoride on the proliferation 352 and gene differential expression in human RPMI8226 Cells. *Biol Trace Elem Res.* 2015;167(1):11-7.
- Hemmings B A, Restuccia D F. Pi3k-pkb/akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2012;4(9): a011189.
- Jain S. The many faces of RET dysfunction in kidney Organogenesis. 2009;5(4):177-90. doi: 10.4161/org.5.4.10048.
- Kahraman T, Alemdar S, Alişarlı M, Ağaoğlu S (2011). Fluoride levels of drinking water in bitlis province (Turkey). *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2011;17(5):825-29
- Kiselyov VV, Versteyhe S, Gauguin L, De Meyts P. Harmonic oscillator model of the insulin and IGF1 receptors' allosteric binding and activation. *Mol Syst Biol*
- Kuang P, Deng H, Liu H, Cui H, Fang J, Zuo Z, ve ark. Sodium fluoride induces splenocyte autophagy via the mammalian targets of rapamycin (mTOR) signaling pathway in growing mice *Aging (Albany NY)* 2018;10(7):1649-1665. doi: 10.18632/aging.101499.
- Kurtdede E, Pekcan M, Karagül H. Türkiye’de florozis sorunu ve florun biyokimyasal etkileşimi. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg.* 2017;12(3):320–26.

- Lei S, Zhang Y, Zhang K, Li J, Liu L. Effects of fluoride on the expression of Beclin1 and mTOR in ameloblasts. *Cells.Tissues Organs*. 2015;200(6):405-12. doi: 10.1159/000441052.
- Li Y, Decker S, Yuan ZA, Denbesten PK, Aragon MA, Jordan-Sciutto K, ve ark. Effects of sodium fluoride on the actin cytoskeleton of murine ameloblasts. *Arch Oral Biol*. 2005;50(8):681-88.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001;25(4):402-8
- Luo Q, Guo H, Kuang P, Cui H, Deng H, Liu H, ve ark. Sodium fluoride arrests renal G2/M phase cell-cycle progression by activating ATM-Chk2-P53/Cdc25C signaling pathway in mice. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(5):2421-2433. doi: 10.1159/000495899.
- Luo, J Manning, BD ve Cantley, LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 2003;4(4):257-62. doi: 10.1016/s1535-6108(03)00248-4.
- Mendoza-Schulz A, Solano-Agama C, Arreola-Mendoza L, Reyes-Marquez B, Barbier O, Del Razo LM. The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells. *Toxicol Lett*. 2009;190:179-86
- Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, ve ark. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N. Engl.J. Med*. 2009;361(10):947-57
- Mondal D, Dutta G, Gupta S. Inferring the fluoride hydrogeochemistry and effect of consuming fluoride-contaminated drinking water on human health in some endemic areas of Birbhum district, West Bengal. *Environ Geochem Health*. 2016;38(2):557-76
- Narsimha A, Sudarshan V. Contamination of fluoride in groundwater and its effect on human health: a case study in hard rock aquifers of Siddipet, Telangana State, India A. *Appl Water Sci*. (2017) 7:2501–12
- Ornitz DM, Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling in skeletal development and disease. *Genes Dev*. 2015;29(14):1463-86. doi: 10.1101/gad.266551.115.
- Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis*. 2004;9(6):667-76
- Otsuki S, Morshed SR, Chowdhury SA, Takayama F, Satoh T, Hashimoto K, ve ark. Possible link between glycolysis and apoptosis induced by sodium fluoride. *J Dent Res*. 2005;84(10): 919-23.
- Penuel E, Schaefer G, Akita RW, Sliwkowski MX. Structural requirements for ErbB2 transactivation. *Semin Oncol*. 2001;28(6 Suppl 18):36-42
- Pompura SL, Dominguez-Villar M. The PI3K/AKT Signaling pathway in regulatory t-cell development, stability, and function. *J Leukoc Biol*. 2018;doi: 10.1002/JLB.2MIR0817-349R. Online ahead of print.
- Rafique T, Naseem S, Ozsvath D, Hussain R, Bhanger MI, Usmani TH. Geochemical controls of high fluoride groundwater in Umarkot Sub-District, Thar Desert, Pakistan. *Sci*

- Total Environ. 2015;15(530-531):271-78. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.05.038. Epub 2015 Jun 3.
- Ribeiro DA, Alves de Lima PL, Marques ME, Salvadori DM. Lack of DNA damage induced by fluoride on mouse lymphoma and human fibroblast cells by single cell gel (comet) assay. *Braz Dent J*. 2006;17(2):91-4.
- Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Onkogen*. 2000;19(49):5548-57
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005;307(5712):1098-101
- Sebastian ST, Sunitha S. A cross-sectional study to assess the intelligence quotient (IQ) of school going children aged 10-12 years in villages of Mysore district, India with different fluoride levels. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2015;33:307-11
- Shenoy PS, Sen U, Kapoor S, Ranade AV, Chowdhury CR, Bose B. Sodium fluoride induced skeletal muscle changes: Degradation of proteins and signaling mechanism. *Environ Pollut*. 2019;244:534-48
- Shi Y, Wang J, Chandarlapaty S, Cross J, Thompson C, Rosen N, Jiang X. PTEN is a protein tyrosine phosphatase for IRS1. *Nat Struct Mol Biol*. 2014;21(6):522-7. doi: 10.1038/nsmb.2828.
- Sireli M, Bülbül A. The effect of acute fluoride poisoning on nitric oxide and methemoglobin formation in the Guinea pig. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*. 2004;28(2004):591-95
- Song GH, Gao JP, FW Chun, Chen CY, Yan XY, Guo M, ve ark. Sodium fluoride induces apoptosis in the kidney of rats through caspase-mediated pathways and DNA damage. *J Physiol Biochem*. 2014;70(3):857-68
- Song GH, Huang FB, Gao JP, Liu ML, Pang WB, Li Wb, ve ark. Effects of fluoride on DNA damage and caspase-mediated apoptosis in the liver of rats. *Biol Trace Elem Res*. 2015;166(2):173-82.
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, ve ark. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet*. 1997;15(4):356-62. doi: 10.1038/ng0497-356
- Suzuki M, Ikeda A, Bartlett JD. Sirt1 overexpression suppresses fluoride-induced p53 acetylation to alleviate fluoride toxicity in ameloblasts responsible for enamel formation. *Arch Toxicol*. 2018;92(3):1283-93. doi: 10.1007/s00204-017-2135-2
- Tan Y, Luo R. Structural and functional implications of *p53* missens cancer mutations. *PMC Biophysics* 2009;2(5):1-10
- Tu W, Zhang Q, Liu Y, Han L, Wang Q, Chen P, ve ark. Fluoride induces apoptosis via inhibiting SIRT1 activity to activate mitochondrial p53 pathway in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018;347:60-69. doi: 10.1016/j.taap.2018.03.030.
- Urut F. Sodyum florürün (NaF) böbrek hücre serilerindeki sitotoksik etkisinin araştırılması [Yüksek lisans tezi]. Van: Van Yüzüncü Yıl University; 2018.

- Varley JM, Evans DGR, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome-a molecular and clinical review, *Brit J Cancer* 1997; 76(1):1-14
- Venkateswarlu P. Evaluation of analytical methods for fluorine in biological and related materials. *J Dent Res(Spec Iss)* 1990;69:514-21
- Viñals F, Testar X, Palacín M, Zorzano A. Inhibitory effect of fluoride on insulin receptor autophosphorylation and tyrosine kinase activity. *Biochem J.* 1993 Apr 15;291 (Pt 2) (Pt 2):615-22. doi: 10.1042/bj2910615
- Wang J, Xu H, Cheng X, Yang J, Yan Z, Ma H, ve ark. Calcium relieves fluoride-induced bone damage through the PI3K/AKT pathway. *Food Funct* 2020;11(1):1155-64. doi: 10.1039/c9fo02491c.
- Wei Y, Wu Y, Zeng B, Zhang H. Effects 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.*2014;162(1-3):18-25.
- Wen P, Wei X, Liang G, Wang Y, Yang Y, Qin L, ve ark. Long-term exposure to low level of fluoride induces apoptosis via p53 pathway in lymphocytes of aluminum smelter workers. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019;26(3):2671-80. doi: 10.1007/s11356-018-3726-z.
- Wichmann H, Güttler A, Bache M, Taubert H, Vetter M, Wür P, ve ark. Inverse prognostic impact of ErbB2 mRNA and protein expression level in tumors of soft tissue sarcoma patients. *Strahlenther Onkol.* 2014;190(10):912-8. doi: 10.1007/s00066-014-0655-8.
- Xu H, Jin XQ, Jing L, Li GS. Effect of sodium fluoride on the expression of bcl2 family and osteopontin in rat renal tubular cells. *Biol Trace Elem Res.* 2006;109(1):55-60.
- Yang T, Zhang Y, Li Y, Hao Y, Zhou M, Dong N, ve ark. High amounts of fluoride induce apoptosis/cell death in matured ameloblast-like LS8 cells by downregulating Bcl-2. *Arch Oral Biol.* 2013;58(9):1165-73.
- Yüksek V, Dede S, Usta A, Çetin S, Taşpınar M. DNA damage-induced by sodium flouride(NaF) and the effect of cholecalciferol. *Biocell.* 2020;44(2):263-68
- 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.* 2017;50(3):300–313.
- Zhang J, Zhu Y, Shi Y, Han Y, Liang C, Feng Z, ve ark. Fluoride-Induced autophagy via the regulation of phosphorylation of mammalian targets of rapamycin in mice leydig cells. *J Agric Food Chem.* 2017;65(40):8966-8976. doi: 10.1021/acs.jafc.7b03822. Epub 2017 Oct 2.
- Zhou BH, Tan PP, Jia LS, Zhao WP, Wang JC, Wang HW. PI3K/AKT signaling pathway involvement in fluoride-induced apoptosis in C2C12 cells. *Chemosphere.* 2018;199:297-302. doi: 10.1016/j.chemosphere.
- Zwick E, Bange J, Ullrich A. Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer.* 2001;8(3):161-73. doi: 10.1677/erc.0.0080161.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Hakkari’de doğdu. İlk, orta, lise eğitimini Van’da lisans eğitimini Ağrı’da tamamladı. Ağrı Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu Hemşirelik Bölümünde 2010-2014 yılları arasında eğitim gördü. 2014-2015 Pedagojik Formasyon programını Van Yüzüncü Üniversitesin’de tamamladı.2015 yılında Van/Gürpınar ilçesi Gürpınar Toplum Sağlığı Merkezin de çalışmaya başladı.2016 yılında Van/Gevaş ilçesi Gevaş Devlet Hastanesine atandı.2018-2019 yılları arası Van Bölge Eğitim ve Araştırma Hastanesinde çalıştı. Halen Gürpınar Devlet Hastanesinde çalışmakta. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimine 2017 yılında başladı.

EKLER

EK1. Etik Kurul Rapor

Evrak Tarih ve Sayısı: 13/03/2019-21528



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

Sayı : 27552122-604.01.02-E.21528
Konu : Prof. Dr. Semiha DEDE'ye ait Onay
Gerektirmeyen Belge

13/03/2019

Sayın Prof. Dr. Semiha DEDE

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 07.03.2019 tarih ve 02 sayılı kararı gereğince; Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz, "Sodyum florür (NaF) uygulanmasının PI3K/Akt sinyal yolağı üzerine etkisinin in vitro olarak araştırılması" adlı çalışma ile ilgili, 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 sayı ile yayınladığı yönetmeliğin 2. Maddesi 2. Fıkrasının b bendinde yer alan "Bu Yönetmelik; Deneysel olmayan klinik veteriner hekimliği uygulamalarını kapsamaz." hükmü gereğince VAN YUHADYEK'ten Çalışma ve Araştırma Kesin Sonuç Onay Belgeleri alınmasına gerek olmadığına karar verilmiştir.
Gereğini bilgilerinize rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Semiha DEDE
Etik Kurulu Başkanı

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

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

Ayrıntılı bilgi için irtibat: Mehmet Şah OĞUZ
Unvanı: Bilgisayar İşletmeni
Dahili No: 22007

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



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

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

Araştırmacının Adı Sodyum florür (NaF) uygulanmasının PI3K/Akt sinyal yolağı üzerine etkisinin in vitro olarak araştırılması
Title of the Research Investigation of the effect of NaF administration on PI3K / Aktsignalingpathway in vitro
Araştırmacı(lar) Yürütücü / Chief investigator: Prof. Dr. Semiha DEDE
Investigator(s) Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Riskiye KORKMAZ

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

Tür / species: Sayı / Numbers:

Yaş /Age: Cinsiyet / Sex:

Araştırmacının Öngörülen Başlama Tarihi / Proposed Research Starting Date:

Araştırmacının Öngörülen Bitiş Tarihi / Proposed Research Completion Date:

Dosya no / File no:

Karar:

Yukarıda bilgileri verilen planlanan araştırma projesi için Hayvan Deneyleri Etik Kurul Onayı gerekmektedir. Tarih: 07/03/2019 ; Karar no: 2019/02

Decision:

The proposed research project detailed above does not need Animal Researches Ethic Committee Approval. Date:07/03/2019 Decision number 2019/02

BAŞKAN/CHAIR		
	Prof. Dr. Semiha DEDE	
ÜYE	ÜYE	ÜYE
 Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	 Prof. Dr. Sıddık KESKİN	 Prof. Dr. Suphi DENİZ
ÜYE	ÜYE	ÜYE
 Prof. Dr. Nalan ÖZDAL	 Doç. Dr. Atilla DÜRMÜŞ	 Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN
ÜYE	ÜYE	ÜYE
 Doç. Dr. Ferda KARAKUŞ	 Dr. Öğr. Üyesi Oruc ALLAHVERDİYEV	 Dr. Öğr. Üyesi Cansel Yılmaz DEMİR
ÜYE	ÜYE	ÜYE
 Dr. Öğr. Üyesi Hacer ŞAHİN AYDINYURT	 Dr. Öğr. Üyesi Şükrü ONALAN	 Vet. Hek. Kerem OĞRAK
ÜYE	ÜYE	
 Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET	 Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU	

EK 2. Tez Orjinallik Raporu



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



YÜKSEK LİSANS TEZİ ORJİNALLİK RAPORU

Tez Başlığı / Konusu Sodyum Florür (NaF) Uygulanmasının PI3K/AKT Sinyal Yolağı Üzerine Etkisinin *in vitro* Olarak Araştırılması

İntihal taraması yapılan bölümler ve sayfa sayıları

Kapak sayfası	Giriş	Ana bölümler	Sonuç bölümleri	Toplam sayfa sayısı
1	1	17	7	26

İntihal taraması yapılan program Turnitin

Taramanın yapıldığı tarih 14/08 / 2020

Benzerlik oranı % %11

***Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:**

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

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

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı
Riskiye KORKMAZ
İmza

RK

Öğrencinin Adı Soyadı	Riskiye KORKMAZ
Anabilim Dalı	Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı
Öğrenci No	17930001038
Programı	☒ Yüksek Lisans ☐ Doktora
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR Dr. Öğr. Üyesi Veysel YÜKSEK	ENSTİTÜ ONAYI Doç. Dr. Hamit Mekan ALP UYGUNDUR Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Yardımcısı