VİTAMİN E SELENYUM KOMPLEKSİNİN SODYUM FLORÜR İLE OLUŞTURULAN SİTOTOKSİTEDE OTOFAJİK YOLAĞA ETKİSİ

Dr. Öğr. Üyesi Veysel YÜKSEK
Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

ÖZET: Bu çalışmada, NRK-52E hücre serisinde, sodyum florür (NaF) ile indüklenen otofajide vitamin E+Selenyumun kompleksinin (ES) verilmesinin terapötik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. NRK-52E böbrek epitelyal hücrelerinde NaF'ın ve ES kompleksinin etkisi MTT metodu ile saptanmıştır. Kontrol, NaF, ES ve NaF+ES olmak üzere oluşturulan 4 gruba moleküllerin sitotoksik (IC_{50}, NaF için) ve proliferatif (ES için) konsantrasyonları hücrelere uygulanmış ve ardından otofajik yolaktaki genlerin ekspresyonları gerçek zamanlı-PZR ile saptanmıştır. NaF'ın IC_{50} değeri 24.saat için 3200µM olarak tesit edilirken, ES için her hangi bir sitotoksisite saptanmıştır. ES kombinasyonu (vit. E için 60 µM, Se için 0,01 µM) konsatrasyonda 24 saatte en yüksek proliferasyon etkisini göstermiştir. Bu nedenle, moleküllerin otofajik etkileri NaF için IC_{50} ve ES için ise 60+0,01 µM konsantrasyonları seçilmiştir. Çalışma grupları olan NaF, ES ve NaF+ES gruplarında Sqstm1 geni sırasıyla; 8.8 kat, 5.3 kat ve 17 kat artığı, Atg5 genin ise yine sırasıyla 5.5, 2.0 ve 10 kat artığı saptanmıştır. Bu çalışma, ES kombinasyonun NaF ile birlikte böbrek hücrelerine uygulanmasının atofajik genlerin ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. Sonuç olarak, NRK-52E hücrelerinde, ES kompleksinin uygulamasının NaF ile indüklenen otofajiyi arttırabileceği saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: NRK-52E hücre hattı, Sodyum florür , Vitamin E, Selenyum, Otofaji

The Effect of Vitamin E Selenium Complex on The Autophagic Pathway in Cytotoxicity Caused by Sodium Fluoride

ABSTRACT: Objectives: In this study, it was aimed to investigate therapeutic effect of Vitamin E+Selenyum (ES) combination on the autophagy induced through the sodium fluoride (NaF) in the NRK-52E cell line.The cytotoxic effect of NaF and ES combination in NRK-52E renal epithelial cells was determined by MTT method. Cytotoxic (for IC50, NaF) and proliferative (for ES) concentrations of molecules were administered to Control, NaF, ES and NaF+ES formed into 4 groups and then the expression of the genes in the au-

tophagy pathway was determined by RT-PCR.The IC50 value of NaF was determined to be 3200μM for 24 hours, while no cytotoxicity was detected for ES combination. ES combination showed the highest proliferation effect at (vit. E for 60 μM, Se for 0,01 μM) in 24 hours. Therefore, the autophagic effects of the molecules have been selected concentration IC_{50} for NaF and 60+0,01 μM for ES combination. It was determined to be increased Sqstm1 gene 8.8-fold, 5.3-fold and 17-fold, likewise for Atg5 gene 5.5, 2.0, 10-fold in NaF, ES and NaF + ES groups respectively. In this study, it was found that the application of the ES combination to renal cells with NaF increased the expression of atophagic genes. As a result, it was determined that application of ES complex in NRK-52E cells could increase NaF-induced autophagy.

Keywords: NRK-52E Cell line, Sodium Fluoride ,vitamin E, Selenium, Autophagy

1. GİRİŞ

Florür (F), suda ve çeşitli besin maddelerinde doğal olarak bulunabilen elektronegatifliği yüksek bir elementir. F, diş ve kemiklerin normal bakımı için gereklidir. Fakat uzun süreli maruziyeti ve yüksek konsantrasyon da bulunması diş, kemik ve değişik dokuların zarar görmesine neden olmaktadır (Perumal ve vd., 2013:236).Böbrek, florun atılımında görevli başlıca organdır. Diyet, yaş, cinsiyet, kalsiyum alımı, flor alımının dozu ve süresi, florun taşınmasında böbrek etkinliğinin sonucunu etkileyen faktörlerdir. İdrarda artan flor ve artmış kemik flor içeriği, flor toksisitesinin göstergeleridir (Krishnamachari, 1985:279). Morfolojik tanımlar ve moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucu apoptoza ek veya alternatif olarak düşünülen temel ölüm yollarından birisi de otofaji olmuştur. Yapılan çalışmalar apoptozisten farklı olarak otofajinin, besin yokluğunda veya hücresel stres durumunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak homestostazisinin korunmasında yardımcı olduğu gösterilmiştir (Galluzzi ve vd., 2012,:107; Anding ve Baehrecke, 2015:67; Karadağ, 2016:19). Endoplazmik retikulum stres NaF indiklü apoptozis ve otofajide hayati rol oynar. Ayrıca, NaF ile indüklenen otofajinin inhibisyonunu takiben apoptoz teşvik edilir (Li ve vd,. 2019:77).Vitamin E ve selenyum içeren glutatyon peroksidaz, tüm hücrelerde mevcut olan antioksidan sistemin ayrılmaz bir parçasıdır. Antioksidatif işlemler ile ilişkili olan C vitamini, glutatyon ve selenyum, E vitamininin durumunu, fonksiyonunu ve hücresel düzeyde elde edilebilirliğini sürdürmede önemlidirler (Altıner ve vd., 2017:149) Selenyum ve E vitamininin en önemli etkisi doku rejenerasyonudur (McDowell ve vd., 1996:273). Florun neden olduğu, doku (Güney ve vd., 2007:467) ve organ hasarı ile DNA hasarının (Pal ve Sarkar, 2014: 484) önlenmesinde vitaminler (Yüksek ve vd., 2017:300), flavonoidler

(Pal ve Sarkar., 2014:484), ve doğal molekülerin kullanımına ilişkin (Çetin ve vd., 2017:508) çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada, NRK-52E hücre serisinde, sodyum florür (NaF) ile indüklenen otofajide vitamin E+Selenyumun kompleksinin (ES) verilmesinin terapötik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır

2. MATERYAL ve METOD

Bu çalışmanın laboratuvar aşamaları Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilecektir. Çalışma, NRK-52E böbrek epitelyel hücre serisi kullanılarak gerçekleştirildi.

2.1 Hücre Kültürü

Çalışma materyalı olarak NRK-52E böbrek epit hücre seri kullanılmıştır. Hücreler in vitro ortamında 10% FBS, 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin, RPMI 1640, 5% CO2 and 95%, 37°C incubation). kültür edilerek çoğaltılmıştır.

2.2 Solüsyonların Hazırlanması

Sodyum florür (NaF), vitamin E, Se ve vitamin+Se solusyonun hazırlanması :Çalışmada ugulananan uygun dozların ve çözünme ortamlarını belirlemek için NaF (Yang ve vd., 2011:910; Wei ve vd., 2014:18; He ve vd., 2015:11), vitamin E (Yüksek ve vd., 2017:300), dozları referans alınarak stok solüsyonlar hazırlandı. NaF'ın final konsantrasyonları 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 5000, 7500, 10000 ve 20000 μM olacak şekilde medyum ortamı içinde konsantrasyonları hazırlandı. Vitamin E (alfa tokoferol)'nin ticari olarak satın alınan 0,950 gr/ml konsantrasyonu % 96 etil alkol içinde stok solüsyonu 220.000 μM olarak hazırlandı.

2.3 MTT assay

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra- zolium bromide) hücre canlılık testi NaF'n 24 saat için IC50 konsantrasyonunu belirlemek için ayrıca NaF'ın konsantrasyonları (100, 250, 500, 1000, 2000, 5000, 7500, 10000 μM) vitamin E+Se ile kombinesi (yüksek ve ark., 2017; Çetin ve ark., 2019) uygulanarak gerçekleştirldi. Hücrelere 96'lık pleytlere kuyu başına 7 x 10^3 olacak şekilde ekilerek bir gece inkübe edildi. MTT sonuçları, kontrol grubu %100 canlıl kabul edilerek Excel Microsoft eğim grafiğinde kullanılarak NaF'ın IC_{50} konsantrasyonu belirlendi. Kontrol ve çalışma grupları belirlendi.

2.4 Total RNA isolation and quantitative real time PCR (qRT-PCR)

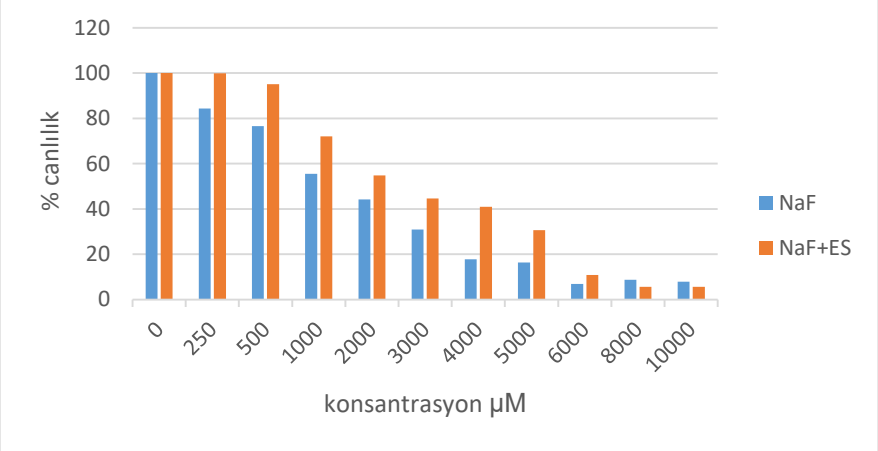
Hücreler 25 cm^2 flasklara 10^6 yoğunlukta olacak şekilde ekimi gerçekleştirildi ve bir gece yapışması için inkübe edildi. Üzerindeki medium dökülerek yerine NaF'ın belirlenen IC50 konsantrasyonu ve vitamin E ve selenium (ES) kompleksinden oluşan proliferative konsantrasyonları kontrol, NaF, NaF+ES ve ES grubu olmak üzere uygulandı.Trizol reagent kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. RNA miktaraları Biodrop spektrometrede ölçüldü ve cDAN sentezi gerçekleştirildi. Kontrol geni olarak gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. Her bir örnek için üç bağımsız tekrar yapıldı. Bir ct (cycle treshold), amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcı itibarıyle belirlendi.

Hedef genlerin ürünlerinin değerlendirilmesi kontrol grubunun ct değerlerinin farklılığı ve tekrarlanan gruplar, uygun ekspresyonun belirlenmesinde kullanıldı. ΔΔCt ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri belirlendi. Gruplar arasındaki farklılık kontrol (GAPDH) ekspresyonun artış-azalış kat (fold changes) sayısı ile karşılaştırılıp değerlendirildi.

3. BULGULAR

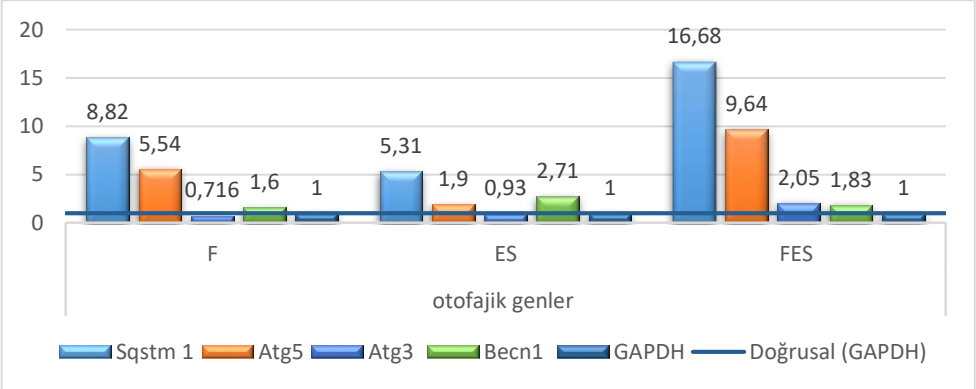
Çalışmada uygulanan, NaF'ın IC50 konsantrasyonu 3200 µM olarak tespit edildi. Vitamin E konsantarasyonu 60 µM olarak ve selenyum konsantrasyonu 0,01 µM olarak belirlendi (Yüksek, 2017:300, Çetin, 2019:362)

Şekil 1: MTT Canlılık Testi Sonuçları



24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda NaF uygulanan hücrelerdeki hücre canlılığı giderek azaldığı ortaya konuldu. Fakat NaF ile birlike vit E+Se kompleksi uygulamasının sitotoksikasyonu önemli oranda azaltığı en yüksek iki NaF konsantrasyonu olan son üç konsantrasyon hariç yaklaşık % 25-30 oranında canlılığı artırdığı tespit edildi.

Şekil 2: Hedef Genlerin Ekspresyon Düzeyleri



Çalışma grupları olan NaF, ES ve NaF+ES gruplarında Sqstm1 geni sırasıyla; 8.8 kat, 5.3 kat ve 17 kat artığı, Atg5 genin ise yine sırasıyla 5.5, 2.0 ve 10 kat artığı saptanmıştır.

4. TARTIŞMA SONUÇ

Flor molekülü doğada ve yaşamsal birçok kaynakta bulunmaktadır. Flora uzun süre maruz kalan canlıların birçok dokusunda flor birikimi meydana gelir. Biriken bu flor molekülleri, organizmalarda yapısal olarak hasara neden olmaktadır. İnsanda ise bu hasar sürecinin görüldüğü dokuların başında böbrek gelmektedir. Florun neden olduğu dokusal hasarın altında oksidatif stress ve toksisite yolakları yer almaktadır.

Florür toksisitesi ve oksidatif stres arasındaki yakın bir ilişki olduğuna dair insan, deneysel hayvanlarda ve hücre kültüründe çalışmalar yapılmış ve bu ilişki çeşitli düzeylerde ortaya konulmuştur. Hem in-vivo hemde in-vitro çalışmalarda hücre türlerine göre değişmekele birlikte yüksek konsantrasyonlarda NaF uygulaması DNA hasarı, apoptozisin tetiklenmesi ve hücre döngüsünün değişmesine neden olabileceği gösterilmiştir. (He ve Chen, 2006:1144; Zhang ve ark, 2008:1).

He ve arkadaşları İnsan RPMI8226 hücre serilerine 48 saat inkübasyon süresince farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 40, 80, 160, 320 μM) NaF uyguladıklarında yüksek konsantrasyonda (160–320 μM) Naf'ın hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe etiği ve hücre ölümlerinin artış düzeylerinin artığını söylemişler (He ve vd., 2015:11). NaF, HL-60 hücrelerinde apoptozis ile ilgili çeşitli parametreleri indüklemiştir. 2.5 mM konsantrasyon uygulandığında hücre sayısının ani bir şekilde azaldığı, 7.5 veya 10.0 mM konsantrasyonlarda kontrol gruplarına göre hücre canlılığının %11 oranında düştüğü gösterilmiştir (Otsuki ve vd., 2005:919). Florun H9c2 hücrelerde, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ortaya konulmuştur (Yan ve vd., 2015:210). Flor ile birlikte vitamin E ve C uygulanan endometrial hasarlı ratlarda apoptozisin önemli ölçüde azaldığı, vitamin E ve C kombinasyonunun ise flor-indüklü apoptotik etkileri iyileştirebildiği gösterilmiştir (Güney ve vd., 2007:467). Daha önce yaptığımız iki farklı çalışmada farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 5000, 7500, 10000 ve 20000 μM) 24 saat boyunca NaF uyguladığımız HfOB 1.19 ve NRK-52E hücre serilerinde beli bir konsantrasyondan sonra NaF ın hücre ölümünü ciddi oranda etkilediği ve proliferasyonu azaltığını tespit etmiştik (Yüksek ve vd, 2017:300). Aynı çalışmada belirtilen konsantrasyonlarla birlikte vitamin E verilmesi hücre proliferasyonunu artırdığını belirtilmişti (Yüksek ve vd, 2017:300). Bir başka çalışmamızda da belirtiğimiz sitotoksik konsantrasyonlarda NaF uygulan iki farklı hücre serisinde selenyumun NaF sitotoksik konsantrasyonunu önemli oranda azaltığı ve hücre proliferasyonunu artırdığı tespit edilmişti (Çetin ve vd., 2019: 362).

Bu çalışmada 24 saat inkübasyon süresi boyunca 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 5000, 7500 ve 10000 μM konsantrasyonlarda hücrelere NaF uygulandı. İnkübasyon süresi sonunda NaF'ın artan konsantrasyonlarının hücre canlılığında giderek azalan bir durum ortaya koyduğu tespit edildi. Artan NaF konsantrasyonu ile birlikte hücre proliferasyonu ciddi anlamda düşüş göstererek yukarıda belirtilen çalışmalarla uyumlu olduğu ortaya konulmuştur. Sadece NaF, verilen konsantrasyonlarla NaF ile birlikte ES kompleksi uygulanan grubu karşılaştırdığımızda sonuçlar daha önceki çalışmalarımızı desteklemiş olup ES kompleksinin NaF'ın sitotoksik etkisini azaltığı ortaya konulmuştur.

Her ne kadar florür hücresel apoptozu indüklese de, florür kaynaklı apoptozda otofajinin rolü belirsizliğini koruyor. Otofaji, zarar görmüş organelleri ve protein agregatlarini parçalayan, büyük oranda koruma sağlayan bir hücre içi sindirim işlemidir (Kuang ve vd, 2018: 1649). NaF uygulamasındaki otofaji belirteçleri olan mRNA ve protein ekspresyon seviyeleri incelendiğinde NaF'nin neden olduğu hasarda potansiyel bir moleküler mekanizma olarak otofajiyi gösteren veriler ortaya konulmuştur (Zhang ve vd: 2017:8966; Kuang ve vd., 2018: 1649).

Florürün, sinir system ve osteoblast hücrelerinde endoplazmik retikulum (ER) stresi ve otofajiyi indükleyerek etki ettiği bildirilmiştir (Niu ve vd, 2018:889; Tu ve vd., 2018:60; Zhao ve vd., 2018:26). Ayrıca, dental florozide otofajinin önemi kanıtlanmıştır (Lei ve vd., 2015:405)

Hücrelere 24 saat boyunca farklı konsantrasyonda NaF uygulanmış, WB yöntemiyle otofajini iki önemli markırı olan Beclin-1 ve LC3II ve kaspaz enzimleri olan 3,8 ve 9 sevilerine bakılmış, otofaji göstergelerinin NaF konsantrasyonu artıkça artığı, kaspaz enzim miktarları ise 0,5 mM ile birlikte bir artış gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca M3T3-E1 hücrlerinde NaF indüklü apoptozisin otofaji inhibisyonu yarafından artırmaktadır ifadesine yer verilmiştir.(Li ve vd., 2019:77)

Flor ile birlikte vitamin E ve C uygulanan endometrial hasarlı ratlarda apoptozisin önemli ölçüde azaldığı, vitamin E ve C kombinasyonunun ise flor-indüklü apoptozisi önleyebileceği saptanmıştır (Güney ve vd., 2007:467) Pal ve Sarkar., (2014) yaptıkları çalışmada florun neden olduğu DNA hasarını önlenmesinde resveratrolun faydalı olabileceğini ortaya koymuştur. Önceki çalışmamızda ise (Yüksek ve vd., 2017.300).

Florun neden olduğu hücre hasarın önlenmesinde, vitamin ve selenyum ve/veya bunların kombinasyonun verilerek, otofajik genler üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışma mevcut değildir. Bu çalışma bu anlamda bir ilktir

Bu çalışma, ES kombinasyonun NaF ile birlikte böbrek hücrelerine uygulanmasının atofajik genlerin ekspresyonunu arttırdığı saptanmıştır. Sonuç olarak, NRK-52E hücrelerinde, ES kompleksinin uygulamasının NaF ile indüklenen otofajiyi arttırabileceği saptanmıştır.

KAYNAKÇA

ALTINER A , ATALAY H , BİLAL (2017). ‘’Bir antioksidan olarak E vitamini’’, Balikesir Saglik Bil Derg. 6 (3) :149-157

ANDİNG, AL., BAEHRECKE, E. H. (2015). ‘’Autophagy İn Cell Life And Cell Death’’, Apoptosis And Development, 114, :67–91.

ÇETİN S, YUR F, TAŞPINAR M, DEDE S, YÜKSEK V (2017). ‘’The Effects of Lycopene Application on Sodium Fluoride (NaF) Applied Renal Cell Line’’, Int. J Sec Metabolite 4(3): 508-511

ÇETİN S, YUR F, TAŞPİNAR M, YÜKSEK V (2019). ‘’The Effects Of Some Minerals on Apoptosis and DNA Damage in Sodium Fluoride-Administered Renal And Osteoblast Cell Lines’’, Research Report Fluoride 52(3):362-378

GÜNEY M, ORAL B, DEMİRİN H, KARAHAN N, MUNGAN T, DELİBAS N (2007). ‘’Protective effects of vitamins C and E against endometrial damage and oxidative stress in fluoride intoxication’’, Clin Exp Pharmacol Physiol, 34, 5-6, 467- 74.

HE H, WANG H, JİAO Y, MA C, ZHANG H, ZHOU Z (2015). ‘’Effect of sodium fluoride on the proliferation and gene differential expression in human RPMI8226 Cells’’, Biol Trace Elem Res, 167, 1, 11-17.

HE LF, CHEN JG (2006). ‘’DNA damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rat oral mucosal cells and hepatocytes’’, World J Gastroentero, 12(7): 1144-1148.

KARADAĞ A (2016). ‘’Otofaji: Programlı Hücre Ölümü’’, Ankara Üniversitesi Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi, 15(2), 21-26

KRİSHNAMACHARİ KA (1986). ‘’Skeletal fluorosis in humans: a review of recent progress in the understanding of the disease’’, Prog Food Nutr Sci, 10, 3-4, 279-314

KUANG P, DENG H, LİU H, CUİ H, FANG J, ZUO Z, DENG J, Lİ Y, WANG X, ZHAO L (2018). ‘’Sodium fluoride induces splenocyte autophagy via the mammalian targets of rapamycin (mTOR) signaling pathway in growing mice’’, Aging (Albany NY). 10(7):1649-1665. doi: 10.18632/aging.101499. [Epub ahead of print]

LEİ S, ZHANG Y, ZHANG K, Lİ J, LİU L (2015). ‘’Effects of fluoride on the expression of Beclin1 and mTOR in ameloblasts’’, Cells Tissues Organs, 200(6):405-412.

Lİ X, MENG L, WANG F, HU X, YU Y (2019). ‘’Sodium fluoride induces apoptosis and autophagy via the endoplasmic reticulum stress pathwayin MC3T3-E1 osteoblastic cells’’, Mol Cell Biochem, 454(1-2):77-85. doi: 10.1007/s11010-018-3454-1. Epub 2018 Dec 5.

MCDOWELL LR, WİLLİAMS SN, HİDİROGLOU N ve vd (1996). ‘’Vitamin E supplementation for the ruminant’’, Animal Feed Science Technology. 1996;60:273-296

NIU Q, CHEN J, XIA T, LI P, ZHOU G, XU C, ZHAO Q, DONG L, ZHANG S, WANG A (2018). ‘’Excessive ER stress and the resulting autophagic flux dysfunction contribute to fluoride-induced neurotoxicity’’, Environ Pollut, 233:889-899.

OTSUKİ S, MORSHED SR, CHOWDHURY SA, TAKAYAMA F, SATOH T, HASHİMOTO K, SUGİYAMA K, AMANO O, YASUİ T, YOKOTE Y, AKAHANE K, SAKAGAMİ H (2005). ‘’Possible link between glycolysis and apoptosis induced by sodium fluoride’’, J Dent Res, 10, 919-923.

PAL S, SARKAR C (2014). ‘’Protective effect of resveratrol on fluoride induced alteration in protein and nucleic acid metabolism, DNA damage and biogenic amines in rat brain’’, Environ Toxicol Pharmacol, 38(2): 684-699

PERUMAL E, PAUL V, GOVİNDARAJAN V, PANNEERSELVAM L (2013). ‘’A brief review on experimental fluorosis’’, Toxicol Lett, 25, 223, 2, 236-251.

TU W, ZHANG Q, LİU Y, HAN L, WANG Q, CHEN P, ZHANG S, WANG A, ZHOU X (2018). ‘’Fluoride induces apoptosis via inhibiting SIRT1 activity to activate mitochondrial p53 pathway in human neuroblastoma SH-SY5Y cells’’, Toxicol Appl Pharmacol, 347:60-69.

WEİ Y, WU Y, ZENG B, ZHANG H (2014). ‘’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, 162, 1-3, 18-25.

YAN X, YANG X, HAO X, REN Q, GAO J, WANG Y, CHANG N, QİU Y, SONG G (2015). ‘’Sodium Fluoride Induces Apoptosis in H9c2 Cardiomyocytes by Altering Mitochondrial Membrane Potential and Intracellular ROS Level’’, Biol Trace Elem Res 166(2):210-5. doi: 10.1007/s12011-015-0273-z.

YANG S, WANG Z, FARQUHARSON C, ALKASİR R, ZAHRA M, REN G, HAN B (2011). ‘’Sodium fluoride induces apoptosis and alters bcl-2 family protein expression in MC3T3-E1 osteoblastic cells’’, Biochem Biophys Res Commun, 410, 4, 910- 915.

YÜKSEK V., DEDE S., TAŞPINAR M., ÇETİN S (2017). ‘’The effects of vitamins A, D, E, and C on apoptosis and DNA damage in sodium fluoride-treated renal and osteoblast cell lines’’, Fluoride, 50(3)300, 300-313.

ZHANG J, ZHU Y, SHİ Y, HAN Y, LİANG C, FENG Z, ZHENG H, ENG M, WANG J (2017). ‘’Fluoride-ınduced autophagy via the regulation of phosphorylation of mammalian targets of rapamycin in mice leydig cells’’, J Agric Food Chem, 65(40):8966-8976.

ZHANG M, WANG A, XİA T, HE P (2008). ‘’Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-kappaB in primary cultured rat hippocampal neurons’’, Toxicol Lett, 179(1): 1-5

ZHAO Y, Lİ Y, GAO Y, YUAN M, MANTHARİ RK, WANG J, WANG J (2018). ‘’TGF-β1 acts as mediator in fluoride-induced autophagy in the mouse osteoblast cells’’, Food Chem Toxicol, 115:26-33.