

## Farede (*Mus musculus*) Kronik Flor Toksikasyonuna Karşı C Vitamininin İyileştirici Etkilerinin Histopatolojik ve Elektroforetik Yöntemlerle Araştırılması

Yusuf ERSAN<sup>1</sup>, Tahir TIRAŞOĞLU<sup>1</sup>, Evren KOÇ<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kars

<sup>2</sup>Kafkas Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Kars

8-10A

**Özet:** Bu çalışmayla kronik flor toksikasyonuna karşı vitamin C'nin tedavi edici bir etkiye sahip olup olmadığı histopatolojik ve elektroforetik yöntemlerle belirlenmeye çalışıldı. 6 ay süre ile I. ve II. gruptaki farelere normal çeşme suyu [0.3 ppm flor ( $F^-$ )], III. ve IV. gruptaki farelere ise 30 ppm  $F^-$  içeren su içirildi. 6 aylık süre sonunda II. ve IV. gruptaki hayvanlara 15 gün süreyle 100 mg/kg dozunda C vitamini (Askorbik asit şeklinde) enjekte edildi. Çalışma bitiminde analizler için kan ve karaciğer doku örnekleri alındı. Histopatolojik ve elektroforetik bulgulara göre, kronik flor toksikasyonunun karaciğer dokusunda dejenerasyonlara sebep olduğu ve serum protein ekspresyonlarında artış ve azalmalara sebep olduğu, vitamin C uygulamasının bu dejenerasyonları iyileştirici bir etki göstermediği sonucuna varıldı. Ayrıca sadece vitamin C uygulamasının da karaciğer dokusunda dejeneratif etki gösterdiği, serum protein ekspresyonlarında da florozisle birlikte benzer etki gösterdiği tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Fare, florozis, vitamin C, SDS-PAGE, karaciğer dejenerasyonu.

### Investigation of the Curative Effects of Vitamin C Against Chronic Fluorosis by Histopathological and Electrophoretic Methods in Mice (*Mus musculus*)

**Abstract:** By this study chronic toxicity of fluorine's therapeutic effect against vitamin C histopathological and electrophoretic methods were examined to determine whether it has. I. and II. mice groups have starved with, normal tap water (0.3 ppm  $F^-$ , III. and IV. groups have starved with water that containing 30 ppm F-group for 6 months. At the end of the 6 month period II. and IV. groups were injected, 100 mg / kg dose of vitamin C (ascorbic acid form) for 15 days. At the end of the work blood and liver tissue samples were taken for analysis. According to the findings with histopathological and electrophoretic chronic fluoride intoxication caused by degeneration of the liver tissue and serum protein expressions and reductions caused by increased vitamin C was concluded that the application of this degeneration show a therapeutic effect. Also only the application of vitamin C in the liver tissue showed degenerative effect of serum protein expressions were detected in the same effect with fluorosis.

**Keywords:** Mouse, fluorosis, vitamin C, SDS-PAGE, liver degeneration.

\* Bu çalışma 2013 yılında, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

**e-mail:** evrenkoc@hotmail.com.tr

## Giriş

Flor elektronegatifliği yüksek ve kimyasal açıdan çok etkin bir element olduğundan canlı dokularda mutlaka florürler şeklinde bulunur. Fizyolojik işlemlerde gerekli olan bu madde vücutta en fazla kemik ve dişlerde yer almaktadır (Pişkin, 1994) ve dışarıdan alınması gereken önemli inorganik elementlerden birisidir (Oto, 2002). Petrol ürünleri, termik santralleri, uranyum zenginleştirici tesisler, boya sanayi, teflon yapımı gibi endüstriyel alanlarda flor kaynakları önemli bir yer tutarlar. Flor canlı vücuduna içme suyu, ilaçlar ve yiyecek maddeleri ile alınmaktadır. Flor atmosferde hidrojen florür olarak bulunur. Hidrojen florür de akciğerlerden çok hızlı emilime uğrar. Deniz sularından elde edilen ürünlerden en fazla flor alınımı sağlanır (Küçükırmak, 2007). Fakat florun fazla miktarlarda alınmasına bağlı olarak florozis olarak adlandırılan flor zehirlenmeleri şekillenmektedir (Oto, 2002). Doğadaki flor organizmaya sindirim ve solunum sistemi ile alınmaktadır (Cerklewski, 1997). Flor bileşikleri, canlılarda gastrointestinal sistemden hızlı ve etkili bir şekilde emildikten sonra, kan yoluyla proteinlere bağlanmadan vücuda dağılmaktadır (Varol ve Varol, 2010). Gıdalar ile alınması zorunlu olan C vitamininin yeterli oranda alınmaması

sonucu diş eti çekilmesi diye de adlandırılan ve tedavi edilmediği durumda ölümcül olabilen iskorbüt hastalığı meydana gelir (Irvin et al.1976).

Bitkiler ve birçok hayvan glukozdan askorbik asit sentezleyebilirler fakat, insanlar ve primatlar L-gulonolakton oksidaz enzimine sahip olmadıklarından askorbik asit sentezleyemezler (Nishikimi et al. 1994). Askorbik asit, güçlü indirgeyici özelliğinden dolayı kuvvetli bir antioksidandır. Lipit peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok etmek suretiyle, lipitleri oksidasyona karşı korur. Askorbik asit antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de gösterir. Antioksidan etkileri yanında organizmada fenton reaksiyonunda ferri demiri ferro demire indirgeyerek hidrojen peroksitle etkileşmeye uygun olan süperoksit radikalinin üretimine neden olur. Bundan dolayı serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir (Üzümlüoğlu Coşkun, 2008).

Bu çalışmada, kronik flor toksikasyonu oluşturulan farelerde C vitamini uygulamasının iyileştirici etkileri histopatolojik ve elektroforetik yöntemlerle belirlenmeye çalışıldı.

## Materyal ve Metot

### 1. DeneY Grublarının Oluşturulması

Bu araştırma Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (2010-37) onayı ile yapıldı. Araştırmada 30-35 gr ağırlığında ve 55-60 günlük yaşlarda *Mus musculus* cinsi fareler kullanıldı. Fareler her grupta 10'ar tane hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı ve I. gruptaki fareler normal çeşme suyu (0.3 ppm F<sup>-</sup>), II. ve III. gruptaki farelere 6 ay süre ile 30 ppm F<sup>-</sup> içeren su içirildi, IV. gruptaki farelere de deney süresince normal çeşme suyu içirildi. 6 aylık süre sonunda III. ve IV. gruptaki hayvanlara 15 gün süreyle 100 mg/kg dozunda C vitamini (Askorbik asit şeklinde) enjekte edildi. Deney süresi sonunda hayvanlardan eter anestezisi altında kan ve karaciğer doku örnekleri alındı.

### 2. Florozisin Oluşturulması

Flor toksikasyonu oluşturabilmek için sodyum florür (Merck 106449) kullanıldı. 1 lt suya 4,44 g NaF (2 gr F<sup>-</sup>) çözündürülerek 2000 ppm F<sup>-</sup> içiren stok solüsyonu hazırlandı ve çalışmada kullanılan 30 ppm'lik florlu içme suları bu stok solüsyonların seyreltilmeleri ile hazırlandı. Stok solüsyon haftada bir yenilendi.

Kontrol grubunun içme suyu ise içeriğinde 0.3 ppm F<sup>-</sup> bulunan çeşme suyu kullanıldı. Çeşme ve hazırlanan florlu içme sularındaki F<sup>-</sup> konsantrasyonu Thermo Elemental – Orion Marka Flormetre ile doğrulandı.

### 3. Histopatoloji

Çalışma süresi sonunda hayvanlardan alınan doku örnekleri % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Rutin histolojik metotlarla preparatlar hazırlanarak hematoksilin-eozin boyama metoduyla boyanıp ışık mikroskopunda değerlendirildi (Olympus BX51, JAPAN).

### 4. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektforezi (SDS-PAGE)

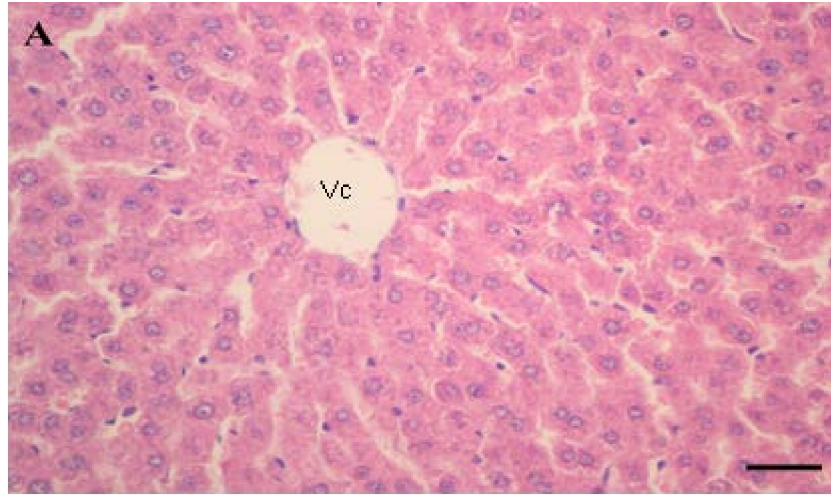
Çalışma süresi sonunda farelerden alınan kan numuneleri, +4°C ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları çıkarıldı ve çalışma süresine kadar -20°C'de bekletildi. Numunelerin protein konsantrasyonları biüret yöntemi ile ölçüldü (Weber et al. 1972). SDS- PAGE işlemi Laemmli, 1970 ve O'Farrell et al. 1975 metotlarına göre yapıldı. Elektforez uygulamasında protein standardı olarak, sığır albumini (66 kD), yumurta albumini (45 kD), karbonik anhidraz (29 kD) ve tripsinojen (18 kD) kullanıldı.

## Bulgular

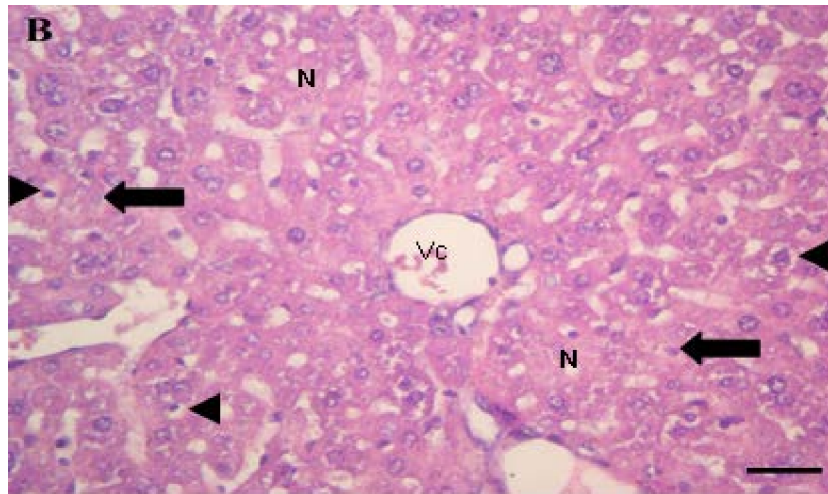
### 1. Histopatolojik Bulgular

Mikroskopik inceleme sonucunda kontrol grubu hayvanların karaciğer dokusunun normal görünümde olduğu, ancak vitamin C

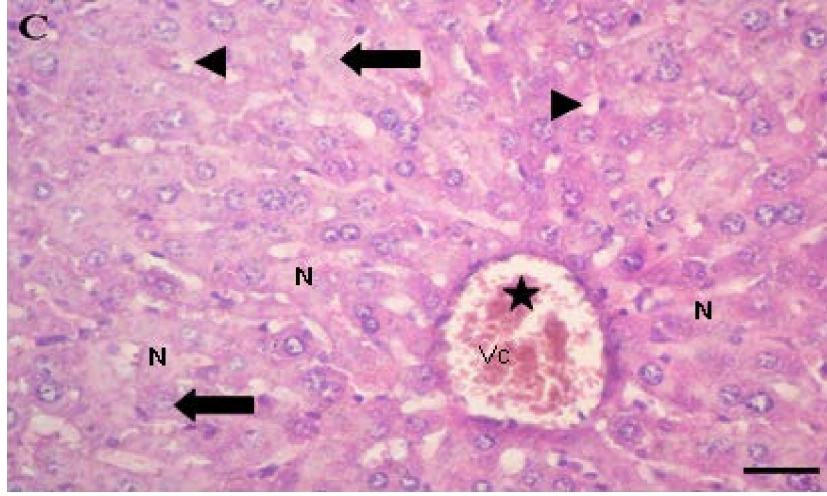
uygulanan, florozisli ve florozisle birlikte vitamin C uygulanan gruplarda vakuolar ve hidropik dejenerasyonlarla birlikte nekroz oluşumu gibi çeşitli dejenerasyonlar tespit edildi (Şekil 1A, B, C, D).



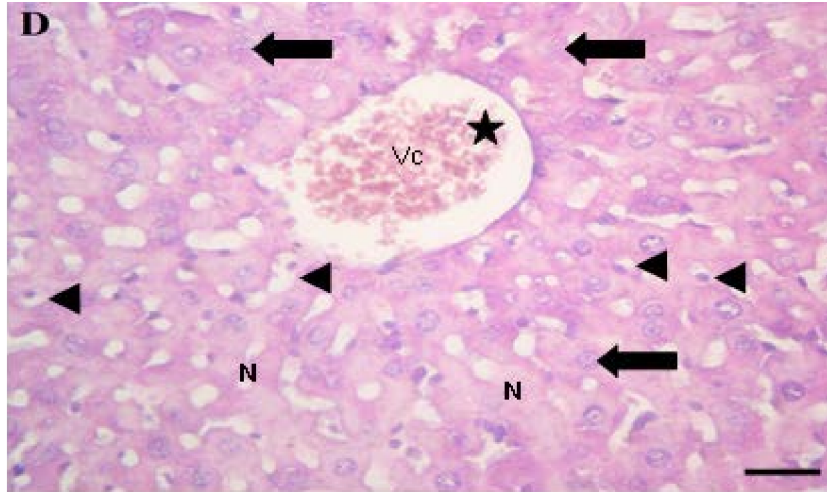
Şekil 1A: Kontrol grubu karaciğer dokusu. Vena centralis (Vc). H-E, bar = 20 µm.



Şekil 1B: Vitamin C uygulanan gruptaki hayvanlara ait karaciğer dokusu. Fokal nekroz alanları (N), hidropik dejenerasyon (oklar), vakuolar dejenerasyon (ok başları) ve Vena centralis (Vc). H-E, bar = 20 µm.



**Şekil 1C:** Kronik flor toksikasyonu oluşturulan gruptaki hayvanlara ait karaciğer dokusu. Fokal nekroz alanları (N), hidropik dejenerasyon (oklar), vakuolar dejenerasyon (ok başları), hiperemi (yıldız) ve Vena centralis (Vc). H-E, bar = 20 µm.

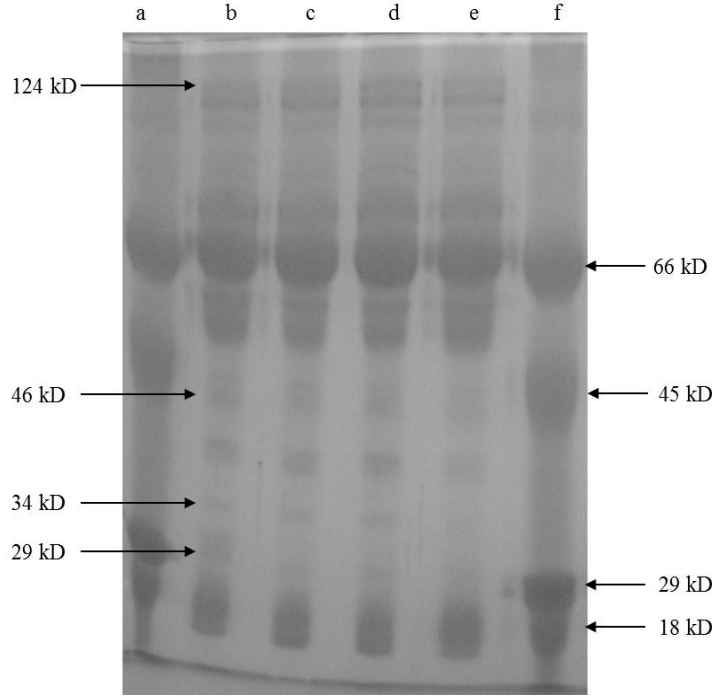


**Şekil 1D:** Kronik flor toksikasyonu oluşturulan ve vitamin C uygulanan gruptaki hayvanlara ait karaciğer dokusu. Fokal nekroz alanları (N), hidropik dejenerasyon (oklar), vakuolar dejenerasyon (ok başları), hiperemi (yıldız) ve Vena centralis (Vc). H- E, bar = 20 µm.

### 1. Elektroforetik Bulgular

SDS-PAGE'den elde edilen elektroferograma göre, florozis oluşturulan ve vitamin C uygulanan gruptaki hayvanların 124 kilodalton (kD), 46 kD, 39 kD ve 34 kD'luk protein ekspresyonlarında

kontrol grubun göre artış, 29 kD'luk protein ekspresyonunda ise azalma meydana geldiği saptandı. Ayrıca, florozis ile birlikte vitamin C uygulanan grupta ise 46 kD, 39 kD, 34 kD ve 29 kD'luk protein bantlarında incelmeler meydana geldiği tespit edildi (Şekil 2A).



**Şekil 2A:** Kronik flor toksikasyonu oluşturulan farelerin SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen serum proteinlerinin elektroforegramı. a-f: standart proteinler, b: kontrol grubu, c: vitamin C grubu, d: florozis grubu, e: florozis + vitamin C grubu.

## Tartışma ve Sonuç

Florozis’li canlıların gevşek dokularında flor’un tahriş edici,  $Ca^{+2}$ ’u bağlayıcı, birçok enzim sistemlerini engelleyici etkilerine bağlı olarak şekillenen  $Ca^{+2}$  düzeylerindeki azalmalar, hücrelerdeki oksijen kullanımını azaltmakta ve bunun sonucunda çeşitli bozulmalar oluşabilmektedir (Chauhan et al. 2011). Kronik florozis’te, gevşek dokularda ortaya çıkan bozukluklarla beraber kemik, böbrek, tiroid bezi, hipofiz, hipotalamus, testis ve dişlerde bozukluklar görülebilmektedir (Boillat et al. 1981). Doğal olaylar sonucu olarak şekillenen kronik florozis olgularına dünyada ve Türkiye’nin birçok bölgesinde endemik olarak rastlanmaktadır (WHO 1984).

Yurdumuzun natürel florozis gözlenen yerlerinden birisi de Van ilimizdir. Volkanik arazi yapısına sahip Muradiye ve Çaldıran yörelerinde insan ve hayvanların metabolizmalarında doğal florozis görüldüğü bilinmektedir (Fidancı et al. 1988; McDowel et al. 1983). Akut florozis tanılarına çok az rastlanırken, kronik florozis bir sağlık sorunu olması yanında hayvansal ürünlerde oluşturduğu kayıplar sebebiyle de ekonomik bir sıkıntı oluşturmaktadır (Maylin et al. 1987; McDowel et al. 1983). Benzer şekilde Xiong et al. 2007, çocuklarda içme suyu ile alınan 2.0 mg/L düzeyinde froridin karaciğer ve böbrek dokularında hasara neden olabileceğini belirtmişlerdir. Yu et al. 1990, yüksek dozda kronik flor maruziyeti durumunda hepatositlerde fokal

nekrozlar ve bağ dokularında hiperplazi görüldüğünü belirtmiştir. Yüksek dozdaki florun canlılardaki hedef organı karaciğerdir. Birçok araştırmacı tarafından yüksek dozda florun metabolizmada anormalleşmelere ve histopatolojik bir takım değişikliklere neden olduğunu ifade etmişlerdir (Grucka-Mamczar et al. 1997; Kapoor et al. 1993). Hayvan deneyleri yüksek dozlarda ve uzun süre uygulanan floridin mitokondrilerde şişmeye, endoplazmik retikulum sisternalarında genişlemelere ve karaciğerde RNA granüllerinde azalmalara neden olduğunu göstermektedir (Zhan et al. 1988). Yine bazı araştırmacılar flor toksikasyonunun sadece karaciğerde değil aynı zamanda beyin, tiroit, böbrek, kemik, diş ve hatta kan dokuda dahi metabolik, fonksiyonel ve histopatolojik birtakım bozulmalara neden olabilmektedir (Guan 1989; Liu 1989). Akdoğan et al. 2002, florozis oluşturulmuş tavşanların böbrek dokusunda yapısal ve biyokimyasal değişiklikleri araştırmış ve içme sularındaki flor arttıkça doku MDA aktivitesinde önemli bir artış olduğunu, böbrek dokusundaki antioksidan enzimlerden SOD, GDH-Px, GSH-Rd, CAT aktivite düzeylerinin doza bağımlı olarak değişkenlik gösterdiğini ve bu enzim aktivitelerinde kontrole göre; 10 ppm'lik grupta anlamlı bir yükselme, 40 ppm'lik grupta ise anlamlı bir düşüş bulunduğunu

belirtmişlerdir. Ersan et al. 2010, 3 ay süreyle farklı dozlarda kronik flor toksikasyonu oluşturulan farelerin karaciğer dokularında, doz artışıyla paralellik gösteren derecelerde farklı dejenerasyonlar meydana geldiğini belirtmişlerdir. Mevcut çalışmada da kronik flor toksikasyonu sonucunda karaciğer dokusunda dejenerasyonlar meydana geldiği tespit edildi. Vitamin C, koyucu özellik göstermesinin yanında peroksidasyon tepkimelerine karşıda diğer antioksidanların da etkinlik kazanmasını sağlamaktadır (Halliwell et al. 1986). Bir araştırmada, kronik florozis oluşturulmuş maymunlarda kapiller endotelde bozulmalara neden olmakla birlikte kemik zarının etrafında birikmeler gösterdiğini dile getirmişlerdir. C vitaminin eksikliğinde ise bu bulguların daha kuvvetli olduğunu saptamışlardır (Pandit et al. 1940). Wadhvani 1955, yine maymunlarda yaptığı çalışmada C vitamini uygulamasının kronik florozisi hafiflettiği bunun yanında C vitamini eksikliğinin ise florozisi ağırlaştırdığını bildirmiştir. Bazı araştırmacılar ise, vitamin C'nin antioksidan özelliklerinin yanı sıra prooksidan özellik gösterdiğini ve normal fizyolojik koşullarda bile vitamin C'nin reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı olarak DNA hasarına neden olduğunu belirtmişlerdir (Paolini et al. 1999; Podmore et al. 1998). Bu çalışmada da vitamin C uygulamasının florozis sonucu



oluşan hasara karşı iyileştirici etki göstermediği, yalnız vitamin C uygulanan grupta da dejenerasyonlar meydana geldiği tespit edildi. Serum protein elektroforezi ile ilgili araştırmalarda ise deneysel olarak yapılan bir araştırmaya rastlanmadı. Ancak Altıntaş et al. 2000, yaptıkları bir araştırmada, koyunların serum proteinlerini SDS- PAGE yöntemi ile incelenmiş ve elde ettikleri protein bantlarını dansitometrede değerlendirmiş ve sonuç olarak Eskişehir bölgesindeki florozisli koyunlarda 66 kD ve 55 kD paternlerde artış, 31 kD olanda ise düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Van bölgesindeki florozisli hayvanlarda ise 31 kDa molekül ağırlıklı paternin Eskişehir yöresine oranla yüksek %'ye sahip olduğu belirlemişlerdir. Sonuç olarak, florozisin koyunlarda böbrek fonksiyonlarını değişik düzeylerde etkileyebileceği, idrardaki yüksek flor konsantrasyonu nedeniyle böbreğin glomerular filtrasyon hızını artırarak buna yanıt vereceği, idrar flor düzeylerine göre bazı serum protein

paternlerinde önemli değişiklikler gözlenebileceği ve hastalığın izlenmesinde ve prognozunda bu değişikliklerden yararlanılabileceğini ifade etmişlerdir. Mevcut çalışmada da kronik florozis oluşturulan ve vitamin C uygulanan gruptaki hayvanların 124 kilodalton (kD), 46 kD, 39 kD ve 34 kD'luk protein ekspresyonlarında kontrol grubun göre artış, 29 kD'luk protein ekspresyonunda ise azalma meydana geldiği saptandı. Ayrıca, florozis ile birlikte vitamin C uygulanan grupta ise 46 kD, 39 kD, 34 kD ve 29 kD'luk protein bantlarında incelmeler meydana geldiği tespit edildi.

Sonuç olarak; kronik flor toksikasyonuna karşı vitamin C uygulamasının iyileştirici bir etki göstermediği, aksine uygulanan doz ve sürede vitamin C'nin de toksik etki gösterebileceği kanısına varıldı. Vitamin C ve florozisle ilgili elde edilen bu verilerin kesin sebeplerinin belirlenmesi için daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir.

## **Teşekkür**

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. (Proje no: 2011-FEF-01).



## Kaynaklar

**Akdoğan M, Bilgili A, Karagöz E, Gökçimen A, Eraslan G, Ustüner E 2002.** Flor zehirlenmesi oluşturulmuş tavşanların böbrek dokusunda yapısal ve biyokimyasal değişiklikler. *Turk J Vet Anim Sci*, 26:71-77.

**Altıntaş A, Fidancı UR, Sel T, Duru Ö, Başsatan A 2000.** Doğal ve endüstriyel florozisli koyunlarda böbrek fonksiyonu ve serum protein elektroforezi. *AÜ Vet Fak Derg*, 47(2):105-114.

**Boillat MA, Garcia J, Velebit L 1980.** Radiological criteria of industrial fluorosis. *Skeletal radiology*, 5(3):161-165.

**Cerklewski FL 1997.** Fluoride bioavailability—nutritional and clinical aspects. *Nutrition research*, 17(5):907-929.

**Chauhan SS, Ojha S, Mahmood A 2011.** Modulation of lipid peroxidation and antioxidant defense systems in rat intestine by subchronic fluoride and ethanol administration. *Alcohol*, 45(7):663-672.

**Ersan Y, Koç E, Ari İ, Karademir B 2010.** Histopathological effects of chronic fluorosis on the liver of mice (Swiss albino). *Turkish Journal of Medical Sciences*, 40(4):619-622.

**Fidancı UR, Salmanoğlu B, Maraşlı Ş, Maraşlı N 1998.** İç Anadolu Bölgesinde doğal ve endüstriyel florozis ve bunun hayvan sağlığı üzerine etkileri. *Tr J of Veterinary and Animal Science*, TUBİTAK, 22:537-544.

**Grucka-Mamczar E, Machoy Z, Tarnawski R, Birkner E, Mamczar A 1997.** Influence of long-term sodium fluoride administration on selected parameters of rat blood serum and liver function. *Fluoride*, 30(3):157-164.

**Guan ZZ 1991.** An experimental study of blood biochemical diagnostic indices for chronic fluorosis. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]*, 25(1):33-35.

**Halliwell B, Gutteridge JM 1986.** Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of biochemistry and biophysics*, 246(2):501-514.

**Irwin MI, Hutchins BK 1976.** A conspectus of research on vitamin C requirements of man. *Journal of Nutrition*, 106(6):821-879.

**Kapoor V, Prasad T, Bhatia KC 1993.** Effect of dietary fluorine on histopathological changes in calves. *Fluoride*, 26(2):105-110.

**Küçükirmak G 2007.** Florun fizyolojik ve toksikolojik karakteristikleri. *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Bitirme Tezi*, İzmir.

**Laemmli UK 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-685.

**Liu WX 1989.** Experimental study of behavior and cerebral morphology of rat pups generated by fluorotic female rat. *Zhonghua bing li xue za zhi Chinese journal of pathology*, 18(4):290-292.

**Maylin GA, Eckerlin RH, Krook L 1987.** Fluoride intoxication in dairy calves. *The Cornell veterinarian*, 77(1):84-98.

**McDowell LR, Arthington JD 2005.** Minerals for grazing ruminants in tropical regions. *Minerals for grazing ruminants in tropical regions*, (Ed. 4).

**Nishikimi M, Fukuyama R, Minoshima S, Shimizu N, Yagi K 1994.** Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulono-gamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *Journal of Biological Chemistry*, 269(18):13685-13688.

**O'Farrell PH 1975.** High resolution two-dimensional electrophoresis of biological properties and significance. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 88:497-501.

**Oto G 2002.** Muradiye ve Çaldıran yöresinden alınan su ve koyunların kan örneklerindeki flor düzeyine mevsimsel değişimlerin etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, Van.

**Pandit CG, Rao DN 1940.** Endemic Fluorosis in South India. Experimental Production of Chronic Fluorine Intoxication in Monkeys (*Macaca radiata*). *Indian Journal of Medical Research*, 28(2):559-574.

**Paolini M, Pozzetti L, Pedulli GF, Marchesi E, Cantelli-Forti G 1999.** The nature of prooxidant activity of vitamin C. *Life sciences*, 64(23):273-278.

**Pişkin I 1994.** Kobaylarda akut flor zehirlenmesinin elektrokardiyogram üzerine etkileri. *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, Ankara.

**Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J 1998.** Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature*, 392(6676):559-559.

**Üzümlüoğlu Coşkun M 2008.** Şizofrenide etyopatogenezinde oksidatif stresin rolü. *Bakırköy Prof Dr Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, İstanbul.*

**Varol E, Varol S 2010.** Çevresel bir Hastalık Olarak Florozis ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 9(3):233-238.

**Wadhvani TK 1955.** Effect of fluorine on the composition of bones: changes in the composition of bones of monkeys (*Macaca radiata*). *The Indian journal of medical research*, 43(2):321-330.

**Weber K, Pringle JR, Osborn M 1971.** Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods in enzymology*, 26:3-27.

**WHO 1984.** Fluorine and fluorides. Geneva, World Health Organization. Environmental Health Criteria.

**Xiong X, Liu J, He W, Xia T, He P, Chen X, Yang K, Wang A 2007.** Dose–effect relationship between drinking water fluoride levels and damage to liver and kidney functions in children. *Environmental Research*, 103(1):112-116.

**Yu YN, Chao XM, Xiao KQ 1990.** Morphometric study on the damaged liver of rats with chronic fluorosis. *Chinese Journal of Endemiology*, 9(1):1-3.

**Zhan CW, Huo DJ 1988.** Ultrastructural findings in liver, kidney, thyroid gland and cardiac muscle of rabbits following sodium fluoride administration. *Fluoride*, 21(1):32-38.