

**T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİSFENOL A'YA MARUZ KALAN RAT DOKULARINA NARİNGENİNİN
ETKİSİ**

MEHMET KARAKUŞ

KİMYA ANABİLİM DALI

ADYAMAN, 2022

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİSFENOL A'YA MARUZ KALAN RAT DOKULARINA NARİNGENİNİN ETKİSİ

Mehmet KARAKUŞ

Adıyaman Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet ÖZKAYA
Yıl :2022, Sayfa sayısı: IX+54

Jüri : Doç. Dr. Ahmet ÖZKAYA
Doç. Dr. Kenan KORAN
Prof. Dr. Adnan KURT

Bu tez çalışmasında, ratlara Bisfenol A (BFA) ile oluşturulan oksidatif strese karşı Naringenin'in (N) düzeltici etkileri araştırıldı. Çalışmada dört grup vardır. Bu gruplar; Kontrol grubu (K), BFA grubu (B), Naringenin grubu (N) ve BFA+N (BN) grubudur. BFA 25 mg/kg gün ve Naringenin 50 mg/kg gün olarak uygulandı. Ratların karaciğer ve beyin dokularında MDA, GSH, AChE, GST, Ces, mineral ve yağ asit düzeyleri araştırıldı. Karaciğer dokusunda B grubu Fe ve Ca düzeyi K grubuna göre arttı. Ayrıca, B grubu MDA ve Ces düzeyi K grubuna göre artarken, B grubu GSH ve GST düzeyi K grubuna göre azaldı. BN grubu MDA ve Ces düzeyi B grubuna göre azalırken, BN grubu GSH düzeyi B grubuna göre arttı. Karaciğer dokusunda, B grubu 16:0 yağ asidi düzeyi K grubuna göre artarken, B grubu 18:1n9c ve 18:2n6c yağ asit düzeyi K grubuna göre azaldı. Beyin dokusunda, B grubu MDA düzeyi K grubuna göre artarken, BN grubu MDA düzeyi B grubuna göre azaldı. B grubu AChE ve Ces enzim aktiviteleri K grubuna göre azalırken, B grubu GSH ve GST enzim aktivite düzeyleri nispi düzeyde azaldı. BN grubu GST enzim aktivite düzeyi B grubuna göre arttı.

Sonuç olarak, BFA' nın oluşturduğu oksidatif strese karşı Naringenin'in antioksidan olarak koruyucu etkileri vardır.

Anahtar Kelimeler: Bisfenol A; Naringenin; MDA; Enzim Aktivitesi; Mineral; Yağ Asitleri

ABSTRACT

MSc Thesis

EFFECT OF NARINGE ON RAT TISSUE EXPOSED TO BISFENOL A

Mehmet KARAKUŞ

Adiyaman University
Graduate Education Institute
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet ÖZKAYA
Year : 2022, Number of pages: IX+54

Jury : Assoc. Prof. Dr. Ahmet ÖZKAYA
Assoc. Prof. Dr. Kenan KORAN
Prof. Dr. Adnan KURT

In this thesis study, the protective effects of Naringenin (N) against Bisphenol A (BFA) induced oxidative stress in rats was investigated. There are four groups in the present study. These groups are Control group (K), BFA group (B), Naringenin group (N) and BFA+N (BN) group. BFA was administered as 25 mg/kg day and Naringenin as 50 mg/kg day. The MDA, GSH, AChE, GST, Ces, mineral and fatty acid levels were investigated in liver and brain tissues of rats. In liver tissue, Fe and Ca levels increased in B group compared to K group. In addition, MDA and Ces levels increased whereas GSH and GST levels decreased in B group compared to K group. While the MDA and Ces levels of the BN group decreased compared to the B group, the GSH level of the BN group increased compared to the B group. In liver tissue, 16:0 fatty acid level of B group increased compared to K group while 18:1n9c and 18:2n6c fatty acid levels of B group decreased compared to K group. In brain tissue, MDA level of B group increased compared to group K while MDA level of BN group decreased compared to B group. While AChE and Ces enzyme activities in B group decreased compared to K group, enzyme activity levels of GSH and GST in B group decreased relatively. GST enzyme activity level in BN group increased compared to B group.

As a result, Naringenin has protective effects as an antioxidant against the oxidative stress induced by BFA.

Keywords: Bisphenol A; Naringenin; MDA; Enzyme Activity, Mineral; Fatty Acids

DESTEKLER

Bu tez çalışması Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FEFYL/2020-0002 numaralı proje ile desteklenmiştir.



BEYAN

“Bisfenol A’ya Maruz Kalan Rat Dokularına Naringenin Etkisi” başlıklı tezimde yaptığım çalışmaların tamamının akademik kurallara ve etik değerlere bağlı kalınarak yürütüldüğünü ve tezimde yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu ayrıca alıntılardan bilimsel etiğe uygun atıf yaparak yararlanmış olduğumu beyan ederim.

Mehmet KARAKUŞ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, beni her konuda destekleyen, çalışmalarımın tüm aşamalarında yardımını esirgemeyen, teşvik eden ve akademik kişiliği ile bana örnek olan, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyacağım, değerli Danışman Hocam Doç.Dr Ahmet ÖZKAYA'ya, deneysel çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, çalışmalarımındaki katkı ve desteklerinden dolayı Doç.Dr Ertan YOLOĞLU ve Dr.Öğr.Üyesi Miraç UÇKUN'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmalarım sırasında laboratuvarındaki deneylerin yapılmasında yardımcı olan değerli iş arkadaşım Kenan TÜRKAN'a teşekkür ederim.

Mehmet KARAKUŞ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT.....	II
DESTEKLER.....	III
BEYAN.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Bisfenol A.....	2
2.2. Naringenin	5
2.3. Redükte Glutasyon.....	7
2.4. Glutasyon-S-Transferaz	9
2.5. Karboksilesteraz Enzimi	10
2.6. Asetilkolinesteraz Enzimi	10
2.7. Malondialdehit.....	11
2.8. Yağ asitleri.....	12
2.9. Mineraller	13
2.10. Çalışmanın Amacı	16
3. MATERYAL VE METOD	18
3.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler	18
3.2. İnceleme Materyali	18
3.3. Kullanılan Cihazlar ve Yardımcı Aletler	18
3.4. Deney Hayvanları	18
3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	19
3.6. Homojenizasyon İşlemleri	20
3.7. GSH Analizi	20
3.8. GST Aktivite Analizi.....	20
3.9. MDA Analizi	21
3.10. Ces Aktivite Analizi	21
3.11. AChE Aktivite Analizi	22
3.12. Toplam Protein Analizi.....	22
3.13. Lipitlerin Ekstraksiyonu	23
3.14. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması	23
3.15. Element Analizi	24
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	26
5. BULGULAR.....	27
6.TARTIŞMA	32
KAYNAKLAR	38
KİŞİSEL BİLGİLER	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Bisfenol A ve türevleri.....	3
Çizelge 3.1 GC-FID kolon sıcaklık programı	24
Çizelge 3.2 Mikrodalga cihazı çalışma şartları	24
Çizelge 3.3 ICP-MS Cihazında standart minerallerin kalibrasyon değerleri-1.....	25
Çizelge 3.4 ICP-MS Cihazında standart minerallerin kalibrasyon değerleri-2.....	25
Çizelge 5.1 Karaciğer dokusu mineral düzeyleri (ppm)	27
Çizelge 5.2 Karaciğer dokusu MDA ve enzim aktivite düzeyleri	28
Çizelge 5.3 Karaciğer dokusu yağ asit düzeyi (%)	29
Çizelge 5.4 Beyin dokusu MDA ve enzim aktivite düzeyleri.....	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 BFA'nın moleküler yapısı	2
Şekil 2.2 Bisfenol A ve türevlerinin yapısı	3
Şekil 2.3 Naringenin kimyasal yapısı.....	5



SİMGELER VE KISALTMALAR

AChE	: Asetilkolinesteraz
ATCI	: Asetiltiyokolin iodat
BFA	: Bisfenol A
Ca	: Kalsiyum
Ces	: Karboksilesteraz
Cu	: Bakır
DTNB	: 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoik acid)
Fe	: Demir
GSH	: Redükte Glutatyon
GST	: Glutatyon-S-Transferaz
HCl	: Hidroklorik Asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
H ₂ SO ₄	: Sülfürik Asit
KHCO ₃	: Potasyum Bikarbonat
MDA	: Malondialdehit
Mg	: Magnezyum
Mn	: Mangan
N	: Naringenin
NaCl	: Sodyum Klorür
PNPA	: p-nitrofenol asetat
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBA	: Thiobarbiturik Asit
TCA	: Trikloroasetik Asit
Zn	: Çinko
14:0	: Myristik Asit
15:0	: Pentadekanoik Asit
16:0	: Palmitik Asit
16:1	: Palmitoleik Asit
17:0	: Heptadekonoik asit
18:0	: Stearik Asit
18:1n9c	: Oleik Asit
18:2n6c	: Linoleik Asit
18:3n3	: Gamma Linolenik Asit
18:3n6	: Alpha Linolenik Asit
20:0	: Araşidik Asit
20:2n6	: Eicosadienoik Asit
20:3n6	: Cis-8, 11, 14-Eicosatrienoik Asit
20:4n6	: Araşidonik Asit
22:6n3	: Dokosahekzanoik Asit
24:1	: Nervonik Asit

1. GİRİŞ

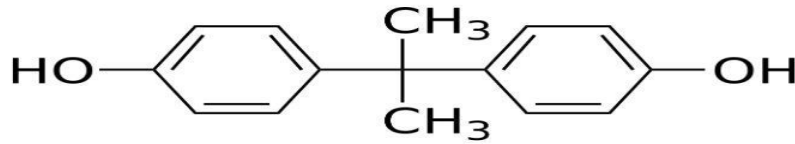
Çevre kirliliği ve tehlikeli kimyasallar insanların, hayvanların ve bitkilerin yaşamlarını olumsuz etkilemektedir. Toksik maddeler, canlı metabolizmasında reaktif oksijen türleri (ROT) üretimine yol açar. Bu sitotoksik ajanlar hücre ölümünü indüklemektedir [1]. Bisfenol A (BFA) potansiyel bir endokrin bozucu kimyasaldır. BFA plastik biberonlarda, su şişelerinde, yiyecek ve içecek kaplarında kullanılmaktadır. İnsanların BFA'ya maruz kalma olasılığı oldukça yüksektir. BFA'nın konserve gıdaların katı ve sıvı fraksiyonlarında tespiti yapılmıştır. BFA ile ilgili araştırmalarda bu kimyasalın insan vücudunda tespiti belirlenmiştir [2-6].

Naringenin flavonoid türevi bir moleküldür. Özellikle turuncgillerde ve üzüm besinlerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Naringenin doğal bir antioksidandır. Naringenin'in hiperglisemi, hiperlipidemi ve kardiyovasküler sistemler üzerine yararlı etkileri bilinmektedir. Naringenin'in hem *in vitro* hemde *in vivo* olarak antidiyabetik etkileri belirtilmiştir [7-10].

Bu tez çalışmasında BFA ile oksidatif strese maruz kalan rat karaciğer ve beyin dokuları üzerine Naringenin'in koruyucu etkileri araştırıldı. Araştırmamızda, ratların karaciğer ve beyin dokularında malondialdehit (MDA), redükte Glutasyon (GSH) düzeyleri ile Glutasyon-S-transferaz (GST), Asetilkolinesteraz (AChE), Karboksilesteraz (Ces) enzim aktiviteleri ölçümleri yapıldı. Ayrıca, karaciğer dokularında demir (Fe), çinko (Zn), magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), mangan (Mn) ve bakır (Cu) mineralleri ile yağ asit düzeyleri incelendi.

2. GENEL BİLGİLER**2.1. Bisfenol A**

BFA 2,2-bis (4-hidroksifenil) propan olarak adlandırılan organik sentetik bir bileşiktir. Yapısında iki metil grubu, iki fenol halkası ve bu halkaya bağlı iki hidroksil grubu vardır [11].



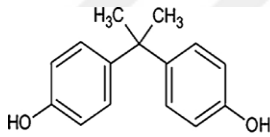
Şekil 2.1 BFA'nın moleküler yapısı [11].

Beyaz ve kristalli yapıda katı bir madde olan BFA bileşiğinin molekül ağırlığı 228,29 g/ mol, erime noktası 156 °C ve kaynama noktası 220 °C dir [12,13]. BFA, düşük buhar basıncına ve yüksek erime noktasına sahip olup, organik çözücülerde (etanol, aseton, dimetilsülfoksit) iyi çözünen, fakat su da çok az çözünen bir maddedir [14]. Suda kısmen çözünen BFA'nın pKa'sı 9,6 ile 11,3 arasındadır. Biyolojik olarak parçalanabilen bir madde olan BFA 28 günde % 81-93 oranında karbondioksit mineralize olur.

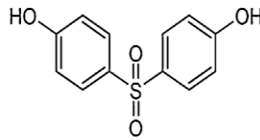
Yapılan bir çalışmada BFA'nın nehirdeki bozulma yarı ömrünün 0,5-3 gün olduğu ölçülmüştür [11]. Bisfenol A'nın birçok türevi bulunmaktadır [15].

Çizelge 2.1 Bisfenol A ve türevleri

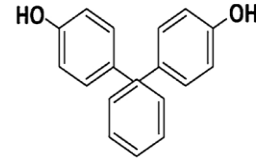
İsim	Kısa İsmi	Kimyasal İsmi	Doğrusal Formülü	Molekül Ağırlığı
Bisfenol A	BFA	2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane	4-(HO)C ₆ H ₄] 2C(CH ₃) ₂	228.29
Bisfenol S	BFS	2,2-bis [4- hydroxyphenol]sulfone	4-(HO)C ₆ H ₄] ₂ SO ₂	250.27
Bisfenol F	BFF	2,2-bis [4-hydroxyphenol] methane	CH ₂ (C ₆ H ₄ OH) ₂	200.23
Bisfenol AP	BFAP	4,4'-(1-phenylethylidene) bisphenol	CH ₃ C(C ₆ H ₅)(C ₆ H ₄ OH) ₂	290.36
Bisfenol Z	BFZ	4,4'-(cyclohexane-1,1-diyl)diphenol	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	268.350
Bisfenol AF	BFAF	4,4'-hexafluoroisopropylidene]diphenol	(CF ₃) ₂ C(C ₆ H ₄ OH) ₂	336.23
Bisfenol B	BFB	2,2-bis(4-hydroxyphenyl)butane	C ₁₆ H ₁₈ O ₂	242.32



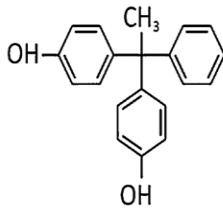
Bisphenol-A (BPA)



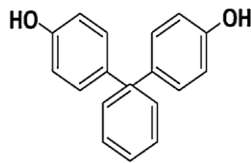
Bisphenol-S (BPS)



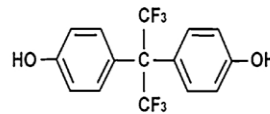
Bisphenol-F (BPF)



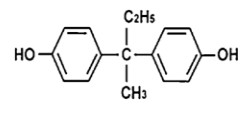
Bisphenol-AP (BPAP)



Bisphenol-Z (BPZ)



Bisphenol-AF (BPAF)



Bisphenol-B (BPB)

Şekil 2.2 Bisfenol A ve türevlerinin yapısı [15].

Araştırmacılar 1990'lı yıllarda sulardaki BFA miktarını tespit etmeye başlamışlardır [16]. Süreç içerisinde çeşitli çevresel örneklerdeki BFA düzeyleri de tespit edilmiştir [17]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, yüzey sularında BFA tespiti yapılmıştır. Dünyanın değişik yerlerindeki nehir sularından alınan su örneklerinde BFA tespiti yapılarak çevresel kirliliğe dikkat çekilmiştir.

Brezilya'nın değişik nehir havzalarından Sinus nehri havzasında (0-517 ng/L) [18], Rio das Velhas nehri havzasında (8,6-168,3 ng/L) [19], Iguassu nehri havzasında (0.62-12.61 ng/L) [20], BFA düzeyleri tespit edilmiştir. Almanya'da yüzey sularında (0,0005-0.41 µg/L) [21], Hollanda'nın farklı yerlerinden elde edilen yüzey sularında 330 ng/L'ye kadar BFA tespit edilmiştir [22]. Malezya'nın Langat Nehri havzasının yüzey suyunda tespit edilen BFA seviyesi 215 ng/L [23], Portekiz'in farklı nehirlerinden toplanan yüzey suyu numunelerinde ise bu oran 0.07-4 µg/L olarak belirlenmiştir [23,24]. Suudi Arabistan'ın Riyad şehrinde depolanmış sulara elde edilen su şişelerinde BFA (7,5 ng/L) [25], Malezya' da ise (3,3 ng/L) [23] olarak tespit edildiği rapor edilmiştir.

Sanayi bölgelerindeki yüzey sularında BFA konsantrasyonunun yaklaşık 10 kat daha yüksek olduğu yapılan araştırmalarda tespit edilmiştir [26]. Belediye atık su sahası sızıntısıyla kirlenmiş su örneklerinde ise yaklaşık 200 kat daha yüksek BFA seviyesi tespit edilmiştir [27].

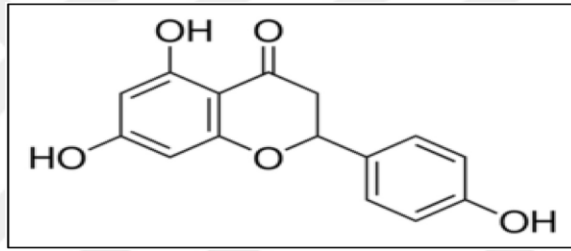
BFA'nın birçok değişik kimyasal formu bulunmaktadır. BFA'nın alternatif kullanımı olarak kullanılan BFAP Çin ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki gıda ürünlerinde tespiti yapılmıştır [28]. Çin'deki gıdalarda BFAP değerinin ABD' dekinden yaklaşık 12 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir [29]. BFAP ayrıca diş macunu, losyonlar, makyaj malzemeleri ve ev tozu gibi ürünlerde de tespit edilmiştir [30]. Çin'deki kanalizasyon atıklarında BFA (4.69 ng / g), BFF (3.84 ng / g) ve BFS (3.02 ng / g) olarak rapor edilmiştir [31].

BFA'ya insanlar her dönemde maruz kalmaktadır. İnsanların plesentası [32], kordon kanı [33], amitotik sıvı [34], fetal karaciğer [35] ve anne sütünde [36] BFA tespit edilmiştir. BFA meme kanseri ve prostata neden olmaktadır [37,38]. BFA'nın inflamatuvar etkisinin yanında hepatikte mitokondriyal apoptaza neden olan etkiside bulunmaktadır [39,40]. BFA'nın erkek fare yavrularında sperm üretimini azalttığı

bildirilmiştir [41,42]. BFA düşük dozlarda dahi oksidatif strese neden olmaktadır [43].

2.2 Naringenin

Naringenin ilk defa Power ve Tutin tarafından keşfedilmiştir. Dean tarafından formülasyonu 1963 yılında yapıldı. Naringenin molekül formülü $C_{15}H_{12}O_5$ ve molekül ağırlığı 272,3 g/mol olarak bilinmektedir. Yapısal olarak flavonon glikozit yapısına sahiptir. Bu molekül, greyfurt ve limon gibi turuncgillerde oldukça zengin olarak bulunmaktadır. Kuhnau tarafından yapılan bir çalışmada insanların flavonoid alımı 1 g / gün olarak tespit edilmiştir [44,45].



Şekil 2.3 Naringenin kimyasal yapısı [44,45].

Akdeniz diyeti meyve ve sebze ağırlıklıdır ve Naringenin bu diyetlerde bulunmaktadır [46]. Yapılan deneysel çalışmalarda Naringenin'in sahip olduğu birçok özellik açıklanmıştır. Naringenin'in antitrombotik, antiateroskleroz, antidiyabetik, antihipertansiyon, antiinflamatuvar, antihiperlipidemik ve antioksidan etkileri vardır [47-55]. Diyabet hastalığında Naringenin'in plazmadaki glikoz düzeyini azalttığı bildirilmiştir [56]. Ayrıca bazı hayvan çalışmalarında bu maddenin diyabet komplikasyonları üzerinde etkisinin yanında antihiperglisemik bir ajan olduğu da kanıtlanmıştır [50,51]. Naringenin, glikoz metabolizmasını iyileştirerek pankreastaki insülin salınımını uyarmaktadır [57]. Naringenin'in antihiperglisemik etkisinin yanında diabetes mellitus tedavisinde oksidatif stres giderici olarakta kullanıldığı bildirilmiştir. Kronik hipergliseminin en önemli parametrelerinden biri MDA seviyelerindeki artışlardır. Bu alanda yapılan çalışmada, Naringenin'in

diyabetteki lipid peroksidasyonunu azaltarak antioksidan bir ajan olarak hareket ettiği rapor edilmiştir [55]. Ayrıca, bu etkinin plazmada sınırlı kalmadığı ve karaciğer, pankreas ve böbrek gibi dokularda da gösterdiği bildirilmiştir [53,52]. Tip 1 diyabetik sıçanlarda Naringenin'in diyabetik nefropatiyi iyileştirdiği ve hücre apoptozunu azalttığı bildirilmiştir [58]. Alloxan ile indüklenen hayvan çalışmasında, Naringenin ve Quersetin birlikte diyabetteki artan oksidatif stresi sınırladığı, diyabete maruz kalan hayvanların böbrek ve karaciğer DNA hasarlarını düzelttiği rapor edilmiştir [59].

Alzheimer, Parkinson, Huntington ve Amyotrofik Lateral Skleroz gibi kronik dejeneratif hastalıklar en yaygın beyin hastalıkları arasındadır. Bu hastalıkların birçok nedeni olmasına rağmen, en yaygın görüş oksidatif stresin mitokondriyal mutasyonlara neden olduğu ve bunun sonucu olarakta nöronal ölüm ile birlikte nörol disfonksiyon kayıplarına yol açtığı bildirilmiştir [60]. Naringenin antioksidan ve inflamatuvar mekanizmaları etkisiyle nörodejenerasyonu engeller. Sıçanlarda oluşturulan Alzheimer modeline karşı Naringenin'in koruyucu etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada Naringenin'in lipid peroksidasyonunu ve apoptozu azalttığı, öğrenme yetenekleri ve hafızadaki gelişmeleri arttırdığı rapor edilmiştir [61].

Naringenin en büyük özelliklerinden biride antikolinesteraz etkisinin olmasıdır. Ayrıca, diyabette hafıza bozukluğunu iyileştirici etkisi rapor edilmiştir [62]. Parkinson ve Alzheimer hastalıklarında kolinerjik kayıplar ve kolinerjik kusurlar bulunmaktadır [63]. Naringenin, her iki hastalığın tedavisinde potansiyel olarak nöroprotektif ajan olarak kullanılabilir. Ayrıca, Naringenin'in intraserebroventriküler streptozotosinin neden olduğu nöronal ve bilişsel eksikliği önlediği ileri sürülmüştür [64]. Sıçan modellerinde oluşturulan Parkinson hastalığında Naringenin'in beyin dokusundaki artan MDA düzeyini azalttığı ve azalan GSH düzeyini arttırdığı rapor edilmiştir [65]. Belirtilen bu çalışmalarda Naringenin'in antioksidan aktivitesi ile potansiyel bir nöroprotektif ajan olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir [66].

Ekzojen kirleticilerden hava kirliliği, sigara dumanı ve çevre kirliliği astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığına neden olmaktadır. Ayrıca, serbest radikaller, bakteriler, virüsler ve mantarlar solunum yollarına endojen olarak etki gösterir. Serbest radikallere maruz kalma miktarı ve süresine bağlı olarak dokular zarar görür.

Bu radikaller solunum sistemini, bağışıklığı ve inflamatuvar hücrelerini olumsuz etkiler [67]. Naringenin, astımlı hayvan modellerinde mukus üretimini azaltarak etki gösterir. Aynı zamanda, oksidatif strese mukus üretimi ve iltihaplanmayı şiddetlendirmekten sorumlu olan interlökinde azalmaya neden olur [68]. Naringenin, hesperitin gibi diğer flavonoidlerle sinerjik etkiye sahiptir ve hava yoluyla inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonunu ve mukus tıkaçı oluşumunu önemli ölçüde azaltır [69]. Kanserojen ajanlar hem evsel hem de endüstriyel bölgelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bu ajanlara uzun süre maruz kalındığı için yaşlı insanlarda kanser riskinin arttığı gözlemlenmiştir [70]. Kanserojen koşullar altında hem mutasyona uğramış hücreler artmakta hem de serbest radikallerin düzeyi artmaktadır. Kanser hücrelerinin artması apoptozu, anjiyogenezi ve metastazı teşvik eder [71]. Ayrıca, DNA hasarına yol açarak karsinogenezin artmasına neden olur [70,72]. Kolon, mesane, mide, prostat, karaciğer, pankreas, rahim lösemi kanserlerine karşı Naringenin antiproliferatif etki göstermektedir [73-76]. Aynı zamanda, Naringenin tümör büyümesini inhibe etmektedir [72].

2.3. Redükte Glutasyon

GSH glutamik asit, glisin ve sisteinden oluşan, düşük molekül ağırlığına sahip bir tripeptittir. Vücuttaki birçok hücrede sentezlenen, intraselüler konsantrasyonu yüksek olan ve non-protein tiyol yapısında olan bir antioksidandır [77]. GSH hücreleri endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidanların zararlı etkilerinden koruyan glutasyon, önemli bir non-enzimatik antioksidan ve indirgen ajandır [78]. GSH düzeyi vücudun hastalıklara karşı korunması ve bağışıklık düzeyi için oldukça önemlidir. GSH düzeyinin düşük olması, hipertansiyon kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi çeşitli hastalıklara karşı risk oluşturmaktadır. Glutasyon memelilerin bütün dokularında özellikle karaciğerde sentezlenir [79]. Yetişkin bir insanda günlük GSH üretimi yaklaşık 10 gr civarında olduğu tahmin edilmektedir [80]. Vücutta bulunan GSH konsantrasyonunun büyük çoğunluğu (%90) hücre sitozolunda bulunur. Çok az bir miktarda mitokondri ve diğer organellerde bulunur. Safra

asidinin salgısı sırasında GSH konsantrasyonunda önemli bir artış meydana gelir. Buna karşın ekstrasellüler sıvıda bu oran düşmektedir. Sistemde bulunan sülfidril aktif grubu redüksiyon ve konjugasyon reaksiyonlara katılmaktadır. Bu reaksiyonlar sonucu ksenobiyotiklerin zararlı etkilerinin ve peroksi dozların yok edilmesi sağlanır [81]. Protein mutasyonları ve enzim stabilitesinin bozulması sonucu insanlarda glutatyon sentetaz eksikliği meydana gelir. Bu enzim geninin tamamen yok olması ölümlere yol açabilir [82]. Hücre içinde önemli bir antioksidan olan glutatyon ksenobiyotiklerin zararlı etkilerinin yok edilmesinde, aminoasitlerin taşınmasında, proteinlerdeki sülfhidril gruplarının redükte formda tutulmasında ve bazı enzimatik reaksiyonlarda koenzim olarak görev yapması gibi bir etkiye sahiptir. Tiyol gurubu içeren önemli bir tripeptit olan glutatyon, hücredeki önemli fonksiyonlarının (DNA, protein sentezi, enzim aktivitesi regülasyonu) yanında antioksidan olarakta görev yapmaktadır. Memeli hücrelerde milimolar düzeyde bulunan glutatyonun büyük bölümü karaciğerde bulunur. Glutatyon gibi tiyollerin oksidasyonu sonucu tiyol ve oksijen radikalleri oluşur. Oluşan peroksitlere ve oksidatif strese karşı serbest radikallerle reaksiyona girerek oluşacak hasarlara karşı koruma sağlar [83]. GSH bir enzim değildir ancak antioksidatif özellik gösterir. DNA sentezinde, aminoasit taşınmasında, perroksit metabolizmasında ve birçok enzim aktivitelerinin düzenlenmesinden sorumludur [84]. Bir sistein deposu olan GSH protein olmayan tek tiyoldur. Hücre dışında kararsız olan sistein hızlıca okside olup sistine dönüşür [85]. GSH serbest radikallere karşı direk savunma yapabildiği gibi sitozolik GSH redoks döngüsünde substrat olarak görev alabilir [86]. GSH dokularda indirgenmiş glutatyon GSH ve okside glutatyon GSSG olmak üzere birbiriyle dengede olan iki türü bulunur [87]. Bitki hücrelerinde kloroplast, mitokondri ve plazma membranında ROT meydana gelmektedir. Normal metabolizma sürecinde ise peroksizomlarda süperoksit radikalleri oluşur. Oluşan bu ROT ve radikaller Süperoksit dismutaz (SOD) ve Glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilir [88].

2.4. Glutatyon-S-Transferaz

Glutatyon-S-Transferazlar (GST), endojen ve ekzojen kaynaklı elektrofilik ve hidrofilik bileşiklerin glutatyon ile etkileşimini sağlayarak daha kolay atılabilen ve toksik etkisi daha düşük olan metabolitlere dönüşümünü sağlayan Faz II detoksifikasyon enzim ailesinin bir üyesidir [89]. GST enzimlerinin molekül ağırlığı 24-29 kilodalton ve her bir alt birimi ise yaklaşık 210 aminoasitten meydana gelmiştir [90]. GST'nin hem detoksifikasyon hem de hücre içi bağlayıcı ve taşıyıcı rolü vardır. Katalitik olarak GSH'daki sistein SH grubu ile yabancı maddeleri bağlayarak elektrofilik bölgeyi nötralize ederler. Oluşan GSH konjugatlarının sudaki çözünürlüğü artar ve metabolizmadan atılması daha kolay olur. GSH'dan glutamat ve glisin koparılarak, sisteinin serbest amino grubu merkapturik asitlere dönüşür. Ksenobiyotik klasik atılım ürünlerinden merkapturik asitler olan N-asetil sistenin, S-alkile olmuş türevleri safra ile atılır. Hidrofobik ve lipofilik bileşikleri bağlayan GST'nin kanserojen ve mutajen maddelerin detoksifikasyonunda önemli rolü vardır [91].

Organizmaya zarar veren endobiyotik ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda GST enzimleri önemli rol oynar [92]. GST'ler konjugasyon ve indirgenme reaksiyonlarında rol oynarlar. Elektrofilik merkez içeren hidrofabik ksenobiyotiklerin GSH ile konjugasyonunu katalizlerler. Ayrıca katalitik olmayan yolla bazı endojen ve ekzojen kaynaklı maddeleri bağlayarak hücre içine taşınmasını sağlar. Böylelikle endojenlerin iletiminde rol oynarlar [93]. GST enzimlerinin en temel görevlerinden biri oksidatif stresin sebep olduğu zararlara karşı hücreyi korumaktır. GSH, Faz I enzimleri tarafından oluşturulan metabolitler ile konjugasyona girerek DNA, RNA ve protein ile bağlanmasını önleyerek hücre hasarını engeller. GSH noksanlığında; Ksenobiyotiklerin metabolitleri proteinlere bağlanarak onları değişime uğratarak antijenik özelliklerini değiştirebilirler. Bunun sonucunda antikör sentezini uyarmayan bir molekül gibi davranır ve antikörle birleşerek hücre hasarına sebebiyet verebilir [94]. GST enzimleri ile ilaç direnç proteinlerinin ekspresyonlarındaki artış ilaç direncine neden oluşturabilir. GSH hücre içinde en fazla bulunan ve tiyol grubu içeren bir tripeptittir [95]. Antikanser ajanının

hücre içine girmesiyle hücrede GSH düzeyinde ve GST enziminin ekspresyonunda artış olmaktadır [96]. Enzim, GSH'ın ksenobiyotikler ile konjugasyonunu kataliz ederek çeşitli pompalar aracılığı ile dışarı atılmasına neden olur. Sonuç olarak GST enzim etkinliği ile ilacın hücre içinde uzun süre kalması zorlaşır [97]. GST ler doğal koruyucu sistemler olarak kabul edilirler. Özellikle pestisit, herbisit, kanserojenler ve antikanser ilaçlar gibi elektrofilik özellik gösteren ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda önemli rol oynamaktadır [98].

2.5. Karboksilesteraz Enzimi

Karboksilesteraz (Ces, E.C. 3.1.1.1) ester, amid ve tiyoester bağları içeren substratların hidrolizini katalize eden serin hidrolazların bir sınıfıdır [99]. Ces'ler, multi gen ailesi ürünleri olup, çoğu memeli dokusunun mikrozomal fonksiyonlarında bulunur [100]. Ces, genel olarak karaciğerde yüksek düzeyde bulunan bir enzimdir. Ayrıca, farklı konsantrasyonlarda beyin, merkezi sinir sistemi, testis, yağ dokusu, kas ve lökositlerde bulunur. Karaciğerde sentezlenen Ces, çözünmüş formda bulunduğu plazmaya salgılanır. Zararlı kimyasal maddelerin izlenmesinde, biyobelirteçler arasında Ces'ler kirliliğin izlenmesi için uygun enzimlerdir [101]. Ces'lerin aktivite ölçümü tarımsal kimyasalların ekosistem üzerindeki etkisini önceden belirlemede önemlidir [102]. Ces'ler, endojen molekülleri, yani kolesterol esterlerinin dönüşümünde rol oynarlar [103]. Ayrıca, ksenobiyotik kimyasalların metabolizmasında, kişisel bakım ürünleri ve pestisitlerde yer alırlar [104]. Ces'ler organofosforlu pestisitlere olan yüksek affinitelerinden dolayı, pestisitlere ve diğer kimyasal esterlere karşı yararlı biyobelirteçler olarak kabul edilirler [105].

2.6. Asetilkolinesteraz Enzimi

Asetilkolinesteraz (AChE) (E.C. 3.1.1.7), nörotransmitter bir madde olan asetilkolinin, kolin ve asetik aside hidrolizini katalize eden bir enzimdir [106]. En önemli substratı asetilkolin olan ve ağırlıklı olarak kolin esterlerini hidrolize eden

AChE oldukça yüksek bir aktiviteye sahiptir. Her bir molekül enzim saniyede yaklaşık 25000 asetilkolin (ACh) parçalamaktadır. Oluşan ürün asetat ve kolin'dir [107]. Asetilkolin esterase enzimi başlıca beyin, sinir hücreleri, kırmızı kan hücreleri kaslarda ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunurken karaciğer, pankreas ve kan serumunda daha az miktarda bulunur [108]. AChE'nin aktivitesinde meydana gelen azalma sinir sistemi hastalıklarına ve ölüme neden olur [109]. AChE' nin ilk saflaştırılma işlemi 1938 yılında elektrik balığının elektrik organından ekstraksiyon yoluyla yapılmıştır [110]. Elektrik balığının elektrik organı en zengin AChE kaynaklarından biridir [111]. Asetilkolin ilk tanımlanan ve en çok bilinen nörotransmitter olup asetik asit ve kolinin esteridir. Asetilkolin günümüzde Alzheimer ve Parkinson hastalıklarının teşhisinde ve tedavisinde önemli rol oynamaktadır [112]. Nörotransmitter bir madde olan asetilkolinin görevi, sinirsel uyarıları kaslara ve ilgili dokulara ulaştırmaktır.

2.7. Malondialdehit

MDA lipid peroksidasyonunun önemli bir ürünüdür. Çoklu bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşur. Hücre membramlarının iyon değişimine etki ederek, iyon geçirgenliğine ve enzim aktivitesine olumsuz etki eder [113]. Lipid peroksidasyonu sırasında peroksitatif hasarın belirteci olan MDA aynı zamanda biyolojik yapılarda kolayca tespit edilebilir [114]. MDA çoğunlukla oksidatif stresin bir belirteci olarak kullanılır. Serbest oksijen radikallerinin etkisiyle lipid peroksidasyonunun artması MDA'nın yükselmesine sebep olur. Organik yapılar ve membran fonksiyonları üzerine zararlı etkileri olan lipid peroksidasyonu hücre ölümlerine sebep olabilir [115]. Hücre membramlarında bulunan doymamış yağ asitleri, serbest radikallerle çok kolay tepkimeye girer ve lipid oksidasyonuna sebep olurlar [116]. MDA'nın metabolize olması enzimatik olarak mümkündür. Arginin, histidin ve lizin gibi aminoasitler, elektrofilik özelliğinden dolayı MDA'ya karşı hassasiyet gösterirler [117]. Lipid peroksidasyonunun en önemli göstergelerinden olan MDA oluşumu, membran komponentlere büyük hasar vererek bozulmasına,

ayrıca iyon nakli ve enzim aktivitesi gibi membram özelliklerinde bozulmasına neden olur. Burada en fazla değişim başta karaciğer olmak üzere beyin, böbrek ve kalp dokularında meydana gelir [118]. MDA miktarı araşidonik asit (20:4n6) ve linoleik asit (18:2n6c) gibi ikiden fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin oksidasyonu sırasında büyük oranda artmaktadır [119]. Lipit peroksidasyonunun sonlandırılması hidroperoksidin aldehitlere ve diğer karbonil bileşiklere dönüşümü ile olmaktadır [120].

2.8. Yağ asitleri

Yağ asitlerinin büyük çoğunluğu lipitlerin temel yapıtaşlarını oluştururlar. Hayvan ve bitki organizmalarının lipitlerinde yüzden fazla yağ asidi izole edilmiştir. Lipitlerin en önemli sınıfını oluşturan yağ asitleri 4-24 karbon atomu arasında zincir uzunluklarına sahip organik asitlerdir. En sık rastlanılan yağ asitleri 14-22 karbon atomlu olanlarıdır. Yağ asitlerinin kimyasal yapısında bir uçta metil (CH₃) grubu ve diğer uçta karboksil (COOH) grubu bulunmaktadır. Burada metil grubu hidrofobik, karboksil grubu ise hidrofilik özellik gösterir. Yağ asitleri doymuş ve doymamış yağ asitleri olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Hidrokarbon zincirinde karbonlar arasında tekli bağ varsa doymuş yağ asitleri bir ve birden fazla çift bağ varsa doymamış yağ asitleri olarak adlandırılır. Yapılarında bir tane çift bağ varsa monoansature (MUFA), birden fazla çift bağ varsa poliansature (PUFA) yağ asitleri olarak adlandırılır. Memelilerde en çok bulunan yağ asitleri palmitat (16:0), stearat (18:0) ve oleat (18:1) yağ asitleridir. Memeliler sature yağ asitlerini sentezleyebilirler. Fakat polisature yağ asitleri sentezlenememekte olup mutlaka diyet yoluyla alınmalıdır. Memelilerin sentezleyemediği, linoleat (18:2) bitkisel yağlarda, linolenat (18:3) balık yağında bol bulunur ve organizmalarında sentezlenemediği için mutlaka dışarıdan alınması gereklidir. Memeli canlılar linoleat ve linolenatı alırlarsa poliansature yağ asitlerini sentezleyebilirler [121].

2.9. Mineraller

İnsan ve hayvan organizmaları genel olarak organik ve inorganik maddelerden meydana gelmektedir. Organik maddelerin yapısını karbonhidrat, lipid protein ve hormon oluştururken, inorganik maddelerin yapısını su ve mineraller oluşturmaktadır. Organik bileşiklerin tam olarak oksidasyona uğradıktan sonra geriye kalan kül kısmına mineral adı verilmektedir. Canlılar yaşamlarını devam ettirebilme, büyüme ve üreme gibi fonksiyonlarını sürdürebilmek için beslenme yoluyla karbonhidrat, lipid, protein ve vitaminlerin yanında inorganik maddelere de ihtiyaç duymaktadırlar. Mineraller yapısal olarak metabolizmada önemli rol oynarlar. Minerallerin metabolik rolleri, türüne göre değişiklik gösterebilmektedir. Bazı maddelerle bileşik oluşturup, organik yapılar meydana getirmek suretiyle aktivatör, düzenleyici ve transmitter olarak işlev görürler. Asit – baz dengesini, osmotik basıncı, membran geçişini sağlayan minareller ayrıca sinir ve kas sisteminin fonksiyonları içinde gereklidirler. Dokularda gram düzeyinde bulunan ve organizma tarafından gereksinimi fazla olan Ca, P, Mg, K, Cl, Na ve S gibi elementlere makro elementler denilmektedir. Vücuttaki Ca, P ve Mg gibi minarellerin büyük çoğunluğu kemiklerde yer almakta, kemiklerin yapısını ve dansitesini sağlamaktadırlar. Ayrıca makro elementlerin birçoğunun hormonlarda, kan dokusunda ve sinir sisteminde fonksiyonları bulunmaktadır. Günlük ihtiyaçları dokularda miligram düzeyinde olan Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, Co, Cr, Se, F ve I gibi elementlerde mikro elementler denilmektedir. Mikro elementlere olan günlük ihtiyaç makro elementlere göre çok düşük olmasına rağmen hepsi yaşam için çok önemlidirler. Bu mineraller kendi başlarına ve enzimlerle kofaktör veya vücut sıvılarında elektrolit olarak, transport sistemde oksijen bağlayarak, enzimatik olmayan moleküllerde yapısal komponent olarak görev yapmaktadırlar [122].

Ca vücutta en fazla bulunan minerallerdendir. Yetişkin bir insanda yaklaşık 1 kilogram civarında Ca bulunmaktadır. Vücutta bulunan toplam Ca'nın %99'u kemik yapısında bulunurken %1'i de yumuşak doku ve ekstraselüler sıvıda bulunmaktadır. Ca albümin üzerindeki negatif yüklü bölgelere bağlandığından, pH değişimleri bağlanmayı etkilemektedir. Alkali bağlanmada, bağlanma artar ve serbest Ca

azalırken, asidik bağlanmada, bağlanma azalır ve serbest Ca düzeyinde artma meydana gelir. Ca sinir impulslarının iletimi içinde gereklidir. Nöromusküler bölgelerde bulunan ekstraselüler sıvıda bulunan Ca iyonları, iletişimi harekete geçiren asetil kolinin sinir ucu membranlarından ayrılmasına sebep olarak kas fibrillerini harekete geçirirler. Ca bir kısım enzim aktiviteleri içinde gerekli bir minareldir. Kas kontraksiyonunda enerji salınımı sağlayan adenozin trifosfataz (ATPaz), yağların parçalanmasını sağlayan lipaz, kolesterol esterlerini hidrolize eden kolin esteraz ve protein sindiriminde görev alan proteolitik enzimlerin aktivitelerinde gereklidir. Fazla miktarda Ca alınması, Fe emilimini bozar, ayrıca kemiklerde ve yumuşak dokularda kalsifikasyona neden olur. Yaş ilerledikçe kemiklerde mineral miktarı düşmektedir. Orta yaştan sonra mineral kaybının sebebi; Östrojen-androjen hormon oranının değişmesi, fiziksel aktivitenin azalması ve beslenme ile mineral alımının düşmesinden kaynaklanmaktadır [122].

Cu bitki ve hayvan dokuları ile suda doğal olarak bulunan bir mineraldir. Canlı organizmalarda Cu^{+2} ve Cu^{+} değerlikli olarak bulunur. Nötral sulu ortamda Cu iyonu hidroksit (OH^{-}) yapısında bulunur. Cu depolama yeri karaciğerdir. Kalp, beyin ve böbreklerde yüksek konsantrasyonda, kas ve kemiklerde ise düşük konsantrasyonda bulunur. Cu, Fe metabolizmasında önemli rol oynar. Cu eksikliği Fe absorpsiyonunu bozarak anemiye sebep olur. İnsanlarda Cu metabolizmasının en önemli bozukluğu Cu'ın karaciğerde birikmesi sonucu oluşan Wilson hastalığı (hepatolentiküler dejenerasyon)'dır. Östrojenler hepatik serüloplazmin sentezini arttırarak serumdaki Cu konsantrasyonu arttırmaktadırlar. Cu minerali içeren ve güçlü bir antioksidan olan enzimlerden biri SOD enzimidir. Bütün SOD'lar süperoksit anyonların peroksitlere dönüşümünü katalize ederler. İnsanlarda serum kolesterol ve Cu düzeyleri arasında ters bir orantı vardır. Düşük Cu tüketiminin hiperkolesterolemiye ve hiperglisemiye dolayısıyla ateroskleroz riskini arttıracığı belirtilmektedir. Akut ve kronik enfeksiyonlarda karaciğer hastalıklarında ve pellegrad serumda Cu düzeyi yüksektir. Cu başta hayvansal ürünlerde olmak üzere bütün yiyeceklerde bulunan bir mineraldir [122].

Fe yeryüzünde çok bulunan bir elementtir. Kaya ve toprakta ferit (Fe^{+3}) bulunur ve çoğu biyolojik sistemler için kullanışlı değildir. Serbest (Fe^{+2}) demir,

moleküler oksijen ve hidrojen iyonlardan kaynaklanan serbest radikal reaksiyonlarını katalizleyerek serbest radikallerin toksisitesini azaltmak için çeşitli proteinlere bağlanırlar. Canlı organizmada Fe'in oksidatif gücü ve zararlı reaktivitesi Fe taşıyan proteinin bağlanması ile engellenmektedir. Fe normal immün sistem işlemleri için gereklidir. Mineralin hem noksanlığı hemde fazlalığı immün sistemi etkiler. Kan hücrelerinden eritrositlerin yapısında bulunan hemoglobinin molekülünün çekirdeğini oluşturan Fe kan oluşumunda önemli bir mineraldir. Fe içeren enzimlerden NADH-dehidrojenaz ve süksinat dehidrojenaz enerji metabolizmasında yer alır ve elektron tepkimesi yaparlar. Hidrojen peroksidaz ise reaktif molekülü olarak oksijen metabolizmasında yer alır. Katalaz ve peroksidaz enzimleri H_2O_2 'yi su ve oksijene çevirirler. Bunun sonucu olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) birikmesi önlenir ve biyolojik aktif moleküllerin zarar görmesi engellenmiş olur. Fe eksikliğinde eritrositlerde lipid peroksidasyonu artmaktadır. Enfeksiyon hastalıklarında Fe'in serumdaki konsantrasyonu ve intestinalden emilimi azalmaktadır. Bunun sebebi, bakteriyel enfeksiyonlarda bakterilerin minerali kullanmasıdır. Serumda ferritin miktarının artması çeşitli enfeksiyonlar, karaciğer hastalıkları ve kanserle ilişkilidir [122].

Mg organizmadaki bütün hücelere dağılmış halde olduğundan dolayı birçok metabolik işlevde yer almaktadır. Bu nedenle yetersiz olması durumunda çok ciddi biyokimyasal semptomatik değişikliklere yol açabilir. Mg'un enzim tepkimelerinde genellikle ATP ile yapmış olduğu bileşik kullanılır. Mg minerali, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması için ayrıca Mg^{+2} iyonu da proteinlerin, karbonhidratların ve nükleik asitlerin sentezi için gereklidir. Mg^{+2} iyonu karbonhidrat metabolizmasında birçok enzim için aktivatör işlevi görmektedir. Mg^{+2} iyonu protein metabolizmasında da hücre ribozomlarında protein sentezi için ko-enzimdir. Vücut sıvılarında bulunan mineral osmotik basıncı ve asit-baz dengesini sağlar. Kemik ve dişlerin yapısını Ca ve P ile beraber sağlar [122].

Mn biyolojik sistemler için kritik durumda olan bir mineraldir. Yetişkin bir vücutta toplam 20 mg Mn vardır. Bunun büyük miktarı karaciğer, kemik, pankreas, tükürük bezleri ve midede bulunur. Mn birçok besin metabolizmasını metal-enzim bileşiği olarak katalize eder. Beyinde yüksek oranda bulunan glutamin sentetaz

enzimini Mn aktive etmektedir. Mn lipoprotein lipaz enzimini aktive ederek serumdaki yağı temizleme özelliği gösterir. Ayrıca uzun zincirli yağ asidi ve kolesterol sentezlerinde ko-faktör olarak görev yapar. Mn içeren önemli enzimler arginaz, piruvat karboksilaz ve mitokondriumda SOD'dur [122].

Zn, Fe elementinden sonra vücutta en fazla bulunan minerallerden biridir. Vitamin mineral desteklerinde Fe: Zn oranının 3:1'den büyük olması Zn emilimini inhibe etmektedir. Fazla miktarda alınan Zn'da Cu emilimini olumsuz etkilemektedir. Zn taşıyan önemli metalloenzimlerden karbonil anhidraz, alkalın fosfataz, RNA ve DNA polimeraz, timidin kinaz, karboksipeptidaz, alkol dehidrogenaz, süperoksit dismutaz gibi enzimlerin integral bir komponentidir. Zn içeren enzimler karbonhidrat, lipid ve nükleik asit metabolizmasında ve protein sentezinde önemli fonksiyonlara sahiptirler. Zn erkek üreme işlevi spermatojenez için gereklidir ve testosteron aktif dihidrotestesterona dönüşümünde yer alır. Zn'nin deri ve bağ dokusu metabolizmasındaki rolü protein ve kollajen sentezine girmesidir. Bu durumun yaraların iyileşme sürecine olumlu katkısı olmaktadır [122].

2.10. Çalışmanın Amacı

BFA insan metabolizmasına su, hava, toprak ve yiyecekler yoluyla geçmektedir. Özellikle yiyecek ve içecek kaplarından geçen BFA, kapların bulunduğu ortamdaki şartlara göre daha da artmaktadır. Ayrıca, plastik su şişelerinin yapısında bulunan BFA'nın belli oranda suya karıştığı tespit edilmiştir. BFA'nın canlı metabolizmasına birçok zararları tespit edilmiştir. Meme kanseri, tümör oluşumu ve üreme sistemi üzerine olumsuz etkileri bilinmektedir. BFA'nın en önemli özelliği hücrede oksidatif stresi arttırmasıdır. Naringenin birçok meyve ve sebzede bulunan doğal bir antioksidandır. Naringenin'in antitümör, antiinflamatuvar, hepatoprotektif ve antioksidan özellikleri bilinmektedir. BFA'nın toksik ve endokrin bozucu etkilerine bağlı olarak fizyolojik fonksiyonlardaki bozulmanın tekrar düzeltilmesine yönelik yeni maddelerin veya doğal ürünlerin keşfedilmesi önem arz etmektedir. Bu nedenlerden dolayı bu çalışmada, BFA'nın oluşturduğu oksidatif

stres ve toksik etkilerin azaltılmasına yönelik doğal bir antioksidan olan Naringenin uygulaması ratlara yapıldı. Rat karaciğer ve beyin dokularında birçok biyokimyasal parametrelerin düzeyleri incelendi.



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Etil alkol, izopropil alkol, metil alkol, n-hekzan, EDTA- Na_2 , Tris-EDTA tamponu, H_2SO_4 , HCl, HNO_3 , H_2O_2 , KHCO_3 , KCl, NaCl, tiobarbiturik asit (TBA), trikloroasetik asit (TCA), fosfat tamponu, redükte GSH, DTNB, ultra saf su, fizyolojik su, yağ asitleri standardı ve mineral standartları kullanıldı.

3.2. İnceleme Materyali

Bu deneysel uygulamada 11-12 haftalık ve 200-250 gr ortalama ağırlıklarına sahip *Wistar Albino* cinsi erkek ratlar kullanıldı.

3.3. Kullanılan Cihazlar ve Yardımcı Aletler

Derin dondurucu ($-80\text{ }^\circ\text{C}$), Gaz Kromatografisi (GC-FID), İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS), mikrodalga yakma cihazı, mikroplate ataçmanlı spektrofotometre (UV/VIS), hassas terazi, çelik başlıklı homojenizatör, teflon başlıklı homojenizatör, santrifüj, santrifüj tüpleri, su banyosu, otomatik pipetler ve vorteks.

3.4. Deney Hayvanları

Yapılan deneysel çalışmada, *Wistar Albino* cinsi erkek ratlar kullanıldı. Ratlar, Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi (ADYÜ DEHAM)'nden temin edildi. Deneysel uygulamalar burada gerçekleştirildi. Deneysel çalışmanın etik kurulu da yine bu kurumdan alındı (Etik Kurul No:

2020/11). Havalandırma sistemi bulunan bir ortamda tutulan ratların temizlik ve bakımları günlük düzenli olarak yapıldı. Tel kapaklı, sert ve şeffaf plastikten yapılmış polikarbonat kafeslerde pellet yem, su ve ad libitum olarak beslemesi yapıldı. Beslenme yemleri özel çelik kaplarda ve suları da paslanmaz çelik kaplardan yapılmış olan özel biberonlarda verildi. Deney çalışmasında kullanılacak olan ratların bulunduğu oda sıcaklığı ortalama 21°C de sabit tutuldu. Hayvanlar 12 saat ışıklı ve 12 saat karanlık ortamda takip edildi. Çalışma 30 gün sürdü ve her grupta 7 rat kullanarak gerçekleştirildi. Araştırmada 28 adet yetişkin, 200-250 gr ağırlığında erkek *Wistar albino* rat kullanıldı. Deneysel çalışma dört gruptan oluşmaktadır.

- Kontrol grubu (K)
- Bisfenol A grubu (B)
- Naringenin grubu (N)
- Bisfenol A +Naringenin grubu (BN)

Kontrol grubuna 0,5 ml zeytinyağı orogastrik olarak uygulaması yapıldı. Naringenin 50 mg/kg gün dozda olacak şekilde zeytinyağında hazırlanarak orogastrik sonda ile uygulaması yapıldı [123]. BFA 25 mg/kg gün olacak şekilde zeytinyağında çözülerek orogastrik sonda ile verildi [124]. Kombinasyonlu grubunda (BN), BFA sabah 9:00 saatinde, Naringenin ise öğle sonu saat 16:00 da uygulamaları ratlara yapıldı. Deneysel uygulama sonucunda sıçanlara 30. günde Ketamin/Xylazine anestezisi uygulandıktan sonra sakrifiye edildi. Biyokimyasal değerlendirme için karaciğer ve beyin doku örnekleri alınarak -80 °C saklandı.

3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Enzimlerin aktiviteleri ile ilgili çalışma Thermo-3001 mikropate ataçmanlı spektrofotometre (UV/VIS) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Bütün numuneler cihazda üç tekrarlı olarak okutuldu. Enzim aktivitelerinin ölçümü yapılırken spesifik aktivite (nmol/dk/mg protein) olarak ifade edildi.

3.6. Homojenizasyon İşlemleri

Karaciğer doku numunelerinin parçalama işleminde çelik uçlu homojenizatör, beyin dokusu numunelerinin parçalama işleminde ise teflon başlıklı homojenizatör kullanıldı. Doku numuneleri 45 saniye boyunca 2200 rpm’de parçalandı. Dokuların parçalama işlemi, doku ağırlığının hacimce 4 katına denk gelecek şekilde (w/v) soğutulmuş homojenizasyon tamponu (pH: 7,4 olan 0.1M potasyum fosfat tamponu içinde; 1 mM DTT, 1 mM EDTA ve 0.15 M KCl) içerisinde yapıldı. Parçalanmış olan doku örnekleri 2 ml’lik ependorf tüplerin içerisine aktarılıp 20 dakika süre ile 4 °C sıcaklık ve 16000 xg devirde santrifüj edildi. Santrifüj işleminden elde edilen süpernatant kısmı ile enzim aktivitelerinin ölçümü yapıldı.

3.7. GSH Analizi

Beyin ve karaciğer doku numuneleri GSH analizi mikrotplate ataçmanlı UV/VIS spektrofotometre cihazında yapıldı. Glutasyon analizi Sedlak ve Lindsay metodu kullanılarak yapıldı. Homojenize edilen doku parçaları %50 TCA ile çöktürüldü. 10 dakika 12000 xg de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant kısımdan 0,5 ml alındı ve üzerine 0,2 M pH:8,9 olan Tris-EDTA tamponundan 2 ml, 0.01 M DTNB çözeltisinden 0,1 ml ilave edildi. Bu karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 412 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında absorbans ölçümleri yapıldı [125]. GSH analiz sonuçları nmol/mg protein olarak hesaplandı.

3.8. GST Aktivite Analizi

Doku numunelerinde GST enzim aktivitesini belirlemek için mikrotplate ataçmanlı UV/VIS spektrofotometre cihazı kullanıldı. Çalışma 1974 yılında Habig ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemle göre yapıldı. 344 nm dalga boyunda okunan

absorbansın spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanır. 20 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) %96'lık etil alkol içinde hazırlanarak substrat olarak kullanıldı. 0.002 M redükte glutatyon kofaktör olarak kullanıldı. Mikrolaka kuyucuklarına sırası ile 10 µl süpernatant, 0,1 M ve pH: 6,5 olan 100 µl fosfat tamponu, 100 µl GSH çözeltisi ve son olarak 10 µl CDNB çözeltisinden multipipetlerle 96'lık mikrolaka kuyucuklarına pipetleme işlemi yapıldı. Karışım 15 sn süreyle karıştırılarak spektrofotometre cihazında okuma işlemi yapıldı ve sonuç dataları kaydedildi. GST aktivitesi nmol/dk/mg protein olarak kaydedildi [126-125].

3.9. MDA Analizi

Doku örneklerindeki Malondialdehit analizi mikrolate ataçmanlı UV/VIS spektrofotometre cihazında yapıldı. Yöntem TBA ile MDA'nın asidik ve sıcak ortamda tepkimesi sonucu oluşan pembe renkli pigmentin spektrofotometrede okunması esasına dayanır. MDA analizi Placer vd. (1996) tarafından kullanılan yöntem ile yapıldı [127]. Reaksiyon karışımı olarak %15 TCA, %0.375 TBA, 0.25 N HCl kimyasallarından oluşan çözelti kullanıldı. Analiz için 500 µl doku homojenatı ve 1,5 ml reaksiyon karışımı ağzı kapaklı tüp içerisine konulur 100 °C' de kaynar su banyosu içinde 30 dakika boyunca inkübasyona bırakılır. Sonra oda sıcaklığına soğutma yapılır. 16000 rpm de 10 dakika santrifüjasyon yapılır. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant kısmından 250 µl alınarak pipet yardımıyla mikrolakara pipetlenir. Cihazda 532 nm dalga boyunda köre karşı okuma işlemi yapıldı. Sonuçlar 3 tekrarlı olarak okutuldu. MDA düzeyleri nmol/mg protein olarak hesaplandı.

3.10. Ces Aktivite Analizi

Ces enzim aktivitesinin ölçümü için %96'lık etil alkol içinde hazırlanmış olan 26 mM PNPA substrat olarak kullanıldı [128,129]. 5 µl örnek çözeltisi ve pH: 7,4 olan 0.05 M trizma çözeltisinden 250 µl alınarak kuyucuklu mikrolakalara pipetleme işlemi yapıldı. Karışım 3 dakika süre ve 25 °C de inkübasyona bırakıldı.

Son işlem olarak, son konsantrasyonu 0,5 mM olacak şekilde 5 µl p-nitrofenol asetat mikrolaklara eklendi ve 405 nm dalga boyunda 2 dakika süre ile absorbans değerleri ölçüldü. Ces enzim aktivitesi Thermo-3001 mikrolate ataçmanlı UV/VIS spektrofotometre cihazında yapıldı. Sonuçlar nmol/dk/mg protein olarak hesaplandı.

3.11. AChE Aktivite Analizi

AChE enzim aktivitesi ölçümü mikrolate ataçmanlı UV/VIS spektrofotometre cihazında yapıldı. Bu analiz için Ellman (1961) tarafından kullanılan yöntemin, Özmen vd. (1998) tarafından modifiye edilmiş şekli kullanıldı [130,131]. Asetiltiyokolin iodit (ATCI) substrat olarak kullanıldı. Mikrolaka kuyucuklarının içerisine 10 µl dokulardan elde edilen süpernatant konuldu. Bunun üzerine 0.701 mM ATCI ve pH:8 olan 0,1 M trizma tamponunda hazırlanmış olan 0.136 mM DTNB çözeltisinden 200 µl eklendi. Mikrolaka içerisine konulan karışımların 25 °C’ de 412 nm dalga boyunda absorbans değişimleri ölçüldü. AChE aktivite sonuçları nmol/dk/mg protein olarak hesaplandı.

3.12. Toplam Protein Analizi

Toplam protein miktarı 1976 yılında Bradford tarafından geliştirilen yöntemle yapıldı. Yöntem alkali ortamda peptit bağlarının Cu ile kompleks oluşturması esasına dayanır. Reaksiyon sonucu mavi-mor renkli kompleks oluşmaktadır. Çalışma mikrolate ataçmanlı UV/VIS spektrofotometre cihazında yapıldı. Homejenize edilmiş doku örneklerinden alınan süpernatant kısım 1/4 oranında seyreltildi ve üzerine 250 µl Bradford çözeltisinden eklendi. Karışım oda sıcaklığında 15 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonucu oluşan renk değişimine bağlı olarak 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapıldı. Sonuçlar mg protein olarak spesifik aktivite değerlerinin hesaplanmasında kullanıldı [132].

3.13. Lipitlerin Ekstraksiyonu

Hara ve Radin metodu kullanılarak karaciğer dokularında lipit ekstraksiyonu yapıldı [133]. Çelik uçlu homojenizatör yardımıyla karaciğer dokuları parçalandı. Homojenizasyon tüpünün içerisine karaciğer doku örneklerinden 0,5 g alındı. Üzerine 3:2 (v/v) oranında hazırlanmış hekzan- izopropil alkol karışımından 6 ml eklendi. Doku örnekleri 30 sn boyunca homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Homojenizatörün parlayıcı kısmı 2 ml hekzan-izopropil alkol çözeltisi ile yıkandı. Homojenize edilmiş olan numuneler santrifüj tüplerinin içerisine alındı ve 10 dk süreyle 4500 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra doku örneklerinin süpernatant kısmı alınarak, metilleştirme işlemi için ağzı kapaklı deney tüplerine alındı.

3.14. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Lipitler içinde bulunan yağ asitlerinin gaz kromatografik analizinin yapılabilmesi için polar olmayan uçucu ve kararlı yapıya sahip metil esterlerine dönüştürülmesi gerekir [134]. Metil esteri hazırlamak için hekzan/izopropil alkol fazı içindeki lipit ekstraktı sızdırma yapmayan deney tüplerine alındı. Üzerine %2'lik $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{SO}_4$ karışımından 5 ml ilave edildi, vorteks ile iyice karışmaları sağlandı. 15 saat, 50 °C lik su banyosunda çeker ocak içerisinde metilleşmeye bırakıldı. Sonra, tüpler soğutuldu ve üzerine 5 ml %5 lik NaCl çözeltisi ilave edilerek iyice karıştırıldı. Oluşan yağ asidi metil esterleri 5 ml hekzan ile ekstrakte edildi. Faz ayırımı için bir süre bekletildi. Oluşan üst faz otomatik pipetle alındı ve üzerine 5 ml %2 lik KHCO_3 çözeltisi ilave edildi. Fazların birbirinden ayrılması için 4 saat bekletildi. Ayrılan hekzan fazı cam deney tüpüne alındı ve hekzan fazı uzaklaştırıldı. Hekzan fazı uzaklaştırıldıktan sonra yağ asit metillerinin üzerine 2 ml hekzan ilave edildi. Bu karışım 0.22 µm PTFE şırınga ucu filtreden süzüldü. 2 ml lik ağzı kapaklı viallerin içine alınan ve yağ asitlerini içeren hekzan fazındaki numune Shimadzu QP

2010 Ultra Gaz Kromatografisi cihazında ve Teknokroma TR-CN100 100m x 0.25mm x 0.20um kolonunda analizi yapıldı. 37'lik yağ asit standardı örneklerin analizine başlamadan önce GC-FID'de okunarak her bir yağ asidinin geliş dakikası tespit edildi. Kolon sıcaklık programı Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1 GC-FID kolon sıcaklık programı

Artış Sıcaklığı °C/dk	Sıcaklık °C	Bekleme Süresi (dk)
	140	6
3	240	20

3.15. Element Analizi

Element analizleri için karaciğer doku örneklerinin sindirim işlemi Berghof marka MSW-4 mikrodalga yakma cihazında yapıldı. Bunun için analizi yapılacak olan doku numunesinden 250 mg tartıldı ve cihazın hem asit ve yüksek basınca dayanıklı olan teflon kapların içerisine konuldu. Doku numunelerinin içinde olduğu teflon kapların üzerine çeker ocak içerisinde %65'lik nitrik asitten 5 ml eklendi ve karıştırıldı. Çeker ocak içerisinde 15-20 dk bekletilen numuneler kapakları kapatılarak cihaza yerleştirildi. Mikrodalga yakma cihazı çalışma şartları Çizelge 3.2'deki gibi uygulandı.

Çizelge 3.2 Mikrodalga cihazı çalışma şartları

Step	1	2
T (°C)	160	190
P (bar)	40	40
Power (%)	80	90
Ta (min)	5	1
Time (min)	5	15

Mikrodalga yakma işleminin ardından sıvı hale gelmiş olan doku örnekleri Perkin Elmer marka NexION 350X model ICP-MS cihazında gerekli seyreltmeler yapılarak

okutuldu. Mn ve Cu için 1-2-5-10-25 ppb; Fe, Zn, Mg, Ca için 25-50-100-250-500 ppb'lik kalibrasyon standartları cihaza verildi. Okunan değerler Çizelge 3.3 ve 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.3 ICP-MS Cihazında standart minerallerin kalibrasyon değerleri-1

(ppb)	Fe	Zn	Mg	Ca
25	25,000	25,000	25,000	25,000
50	50,603	50,573	50,502	50,749
100	100,571	100,314	100,449	99,997
250	251,208	249,743	250,661	250,701
500	512,808	494,136	497,288	497,183

Çizelge 3.4 ICP-MS Cihazında standart minerallerin kalibrasyon değerleri-2

(ppb)	Mn	Cu
1	1,000	1,000
2	2,027	1,999
5	5,001	4,988
10	10,034	9,968
25	25,066	24,953

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel değerlendirme programı olarak SPSS 20 kullanıldı. Grup karşılaştırmalarında Varyans analizi ANOVA yapıldı ve gruplar arasındaki farklılıkların tespiti için Tukey testi uygulandı. Standart sapma olarak standart error (SE) alındı.



5. BULGULAR

Çizelge 5.1 Karaciğer dokusu mineral düzeyleri (ppm)

Mineraller	K	N	B	BN
Fe	69,764±1,616	73,569±2,615	87,365±1,366 ^c	82,728±3,771 ^a
Zn	20,324±0,148	20,325±0,450	20,591±0,419	20,661±0,573
Mg	214,423±5,510	217,574±6,132	216,277±2,938	211,567±4,654
Ca	26,501±0,255	26,048±0,289 ^z	30,026±0,358 ^c	29,564±0,397 ^c
Mn	2,685±0,095	2,695±0,055	2,846±0,047	2,683±0,088
Cu	3,864±0,052	3,761±0,129	4,151±0,117	3,846±0,125

K grubuna göre karşılaştırma. a: $p < 0.05$, b: $p < 0.01$, c: $p < 0.001$

B grubuna göre karşılaştırma. x: $p < 0.05$, y: $p < 0.01$, z: $p < 0.001$

K grubu Fe düzeyine göre B ve BN gruplarında artış saptandı ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.05$). K ve N grupları Ca düzeyleri arasında istatistiksel fark gözlenmezken ($p > 0.05$), K grubu Ca düzeyine göre B ve BN gruplarında artış tespit edildi ($p < 0.001$). Tüm grupların Zn ve Mg düzeyleri arasında istatistiksel fark olmadığı gözlemlendi ($p > 0.05$). B grubu Mn ve Cu düzeyleri K grubuna göre nispi düzeyde arttığı tespit edildi ($p > 0.05$).

Çizelge 5.2 Karaciğer dokusu MDA ve enzim aktivite düzeyleri

Parametreler	K	N	B	BN
MDA	0,130±0,012	0,141±0,015	0.209±0,020 ^c	0,151±0,014 ^z
GSH	0,22±0,03	0,21±0,02	0,17± 0,01 ^a	0,22±0,02 ^x
Ces	1965,98±30,83	2330,13±184,94	2752,89±110,93 ^y	2171,19±104,85 ^{ax}
AChE	7,23±0,56	5,30±0,14 ^a	6,02±0,44	6,77±0,42
GST	95,15±3,81	89,33±2,86	80,18±2,40 ^a	91,33±3,64

K grubuna göre karşılaştırma. a: p<0.05, b: p<0.01, c: p<0.001

B grubuna göre karşılaştırma. x: p<0.05, y: p<0.01, z: p<0.001

Karaciğer dokusu MDA ve enzim aktivite düzeyleri Çizelge 5.2’de gösterilmiştir. K grubu MDA düzeyine göre B grubunda artış gözlemlendi (p<0.001). BN grubu MDA düzeyi B grubuna göre azaldığı tespit edildi (p<0.001). K ve BN grupları GSH düzeyine göre B grubunda azalma saptandı (p<0.05). K grubu Ces enzim aktivite düzeyine göre B ve BN gruplarında artış gözlemlendi (p<0.01, p<0.05). B grubu Ces enzim aktive düzeyine göre BN grubunda azalma tespit edildi (p<0.05). K grubu AChE enzim aktivite düzeyine göre N grubunda azalma gözlenirken (p<0.05), K, B ve BN grupları arasında istatistiksel fark olmadığı tespit edildi (p>0.05). K, N ve BN grupları GST enzim aktiviteleri arasında istatistiksel fark tespit edilemezken (p>0.05), B grubu GST enzim aktivite düzeyi K grubuna göre azaldı (p<0.05).

Çizelge 5.3 Karaciğer dokusu yağ asit düzeyi (%)

Yağ asitleri	K	N	B	BN
14:0	0,139±0,004	0,148±0,003 ^x	0,179±0,010 ^b	0,149±0,006 ^x
15:0	0,335±0,006	0,341±0,017 ^x	0,391±0,004 ^a	0,273±0,012 ^{bz}
16:0	14,788±0,463	15,461±0,204 ^x	17,059±0,427 ^b	16,260±0,238 ^a
17:0	1,077±0,055	1,084±0,039	1,177±0,055	0,869±0,030 ^{az}
18:0	25,110±0,790	24,898±0,360	25,086±0,351	24,334±0,504
20:0	0,181±0,006	0,161±0,003 ^x	0,128±0,009 ^c	0,149±0,005 ^a
22:0	0,213±0,008	0,214±0,005	0,206±0,009	0,216±0,016
24:0	0,240±0,012	0,231±0,005	0,222±0,009	0,224±0,015
ΣSFA	42,083±0,915	42,538±0,872	44,448±0,998	42,474±0,718
16:1	0,359±0,020	0,317±0,019 ^z	0,508±0,036 ^b	0,300±0,014 ^z
18:1n9t	0,039±0,003	0,043±0,003	0,037±0,001	0,039±0,001
18:1n9c	7,104±0,302	6,542±0,215	6,067±0,072 ^a	7,411±0,282 ^y
20:1n9	0,130±0,008	0,126±0,007	0,113±0,002	0,135±0,004
24:1	0,085±0,004	0,079±0,006	0,091±0,004	0,093±0,007
ΣMUFA	7,717±0,417	7,107±0,385	6,816±0,518	7,978±0,572
18:2n6c	13,875±0,502	13,116±0,356	11,804±0,249 ^a	12,525±0,474 ^a
18:3n6	0,338±0,008	0,330±0,013	0,352±0,012	0,348±0,011
18:3n3	0,376±0,018	0,309±0,010 ^a	0,269±0,015 ^c	0,282±0,018 ^b
20:2n6	0,685±0,035	0,699±0,022	0,699±0,024	0,590±0,032
20:3n6	0,551±0,038	0,596±0,043	0,564±0,011	0,602±0,042
20:4n6	28,722±0,232	29,715±0,184	28,677±0,060	29,453±0,256
20:5n3	0,060±0,004	0,057±0,007	0,063±0,009	0,061±0,012
22:6n3	5,593±0,465	5,533±0,285	6,308±0,116	5,687±0,288
ΣPUFA	50,200±1,212	50,355±1,515	48,736±1,418	49,548±1,207
ΣUSFA	57,917±1,618	57,462±1,917	55,552±1,898	57,526±1,765

K grubuna göre karşılaştırma. a: p<0.05, b: p<0.01, c: p<0.001

B grubuna göre karşılaştırma. x: p<0.05, y: p<0.01, z: p<0.001

Karaciğer dokusu yağ asitleri tablosu Çizelge 5.3' de gösterilmiştir. B grubu 14:0, 15:0 ve 16:0 yağ asitleri düzeyi K grubuna göre arttığı tespit edildi (p<0.01, p<0.05). BN grubu 14:0 ve 15:0 yağ asitleri düzeyleri B grubuna göre azalırken (p<0.05, p<0.001), 16:0 yağ asitleri düzeyi ise nispi oranda azalmıştır (p>0.05).

B grubu 17:0 yağ asit düzeyi K ve N gruplarına göre nispi oranda artarken ($p>0.05$), BN grubu 17:0 yağ asit düzeyi K ve B gruplarına göre azalmıştır ($p<0.05$, $p<0.001$).

B grubu 16:1 yağ asit düzeyi K, N ve BN gruplarına göre yüksek çıktığı tespit edildi ($p<0.01$, $p<0.001$). B grubu 18:1n9c yağ asit düzeyi K ve BN gruplarına göre azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$, $p<0.01$). B grubu 18:2n6c yağ asit düzeyi K grubuna göre azaldığı saptandı ($p<0.05$). BN grubu 18:2n6c yağ asit düzeyi B grubuna göre nispi oranda arttığı tespit edildi ($p>0.05$). K grubu 18:3n3 yağ asit düzeyine göre N, B ve BN gruplarında azalma gözlemlendi ($p<0.05$, $p<0.001$, $p<0.01$). K grubu $\sum$ SFA düzeyine göre B grubunda nispi oranda artış tespit edildi ($p>0.05$). K, N ve BN grupları $\sum$ SFA düzeyleri birbirlerine yakın değerlerde sonuç elde edildi ($p>0.05$). B grubu $\sum$ MUFA düzeyi diğer gruplara göre nispi oranda azaldığı gözlemlendi ($p>0.05$). B grubu $\sum$ PUFA ve $\sum$ USFA düzeyleri diğer gruplara göre nispi oranda azaldığı tespit edildi ($p>0.05$).

Çizelge 5.4 Beyin dokusu MDA ve enzim aktivite düzeyleri

Parametreler	K	N	B	BN
MDA	0,085±0,007	0,091±0,009	0,148±0,012 ^c	0,112±0,010 ^{ay}
GSH	0,172±0,017	0,185±0,006	0,165±0,011	0,217±0,025
Ces	668,751±20,456	546,293±53,192 ^x	405,518±18,495 ^c	474,828±34,519 ^b
AChE	38,115±2,413	31,433±1,649	29,282±1,471 ^a	33,653±2,228
GST	49,286±1,031	48,490±2,419	45,614±2,868	58,043±1,969 ^{ay}

K grubuna göre karşılaştırma. a: $p<0.05$, b: $p<0.01$, c: $p<0.001$

B grubuna göre karşılaştırma. x: $p<0.05$, y: $p<0.01$, z: $p<0.001$

Beyin dokusu MDA ve enzim aktivite düzeyleri Çizelge 5.4' te gösterilmiştir. Kontrol grubu MDA düzeyine göre B ve BN gruplarında artış gözlenmiştir ($p<0.001$, $p<0.05$). B grubu MDA düzeyini Naringenin etkisiyle BN grubunda azaldığı tespit edildi ($p<0.01$). K grubu GSH düzeyine göre N ve BN gruplarında nispi oranda artış saptanırken, B grubunda nispi azalma tespit edildi. K grubu Ces enzim aktivite düzeyine göre B grubunda önemli düzeyde azaldığı gözlemlendi ($p<0.001$).

Aynı şekilde, K grubuna göre BN grubunda da azalma tespit edildi ($p<0.01$). B grubu Ces enzim aktivite düzeyi N grubuna göre azaldığı gözlemlendi ($p<0.05$). Beyin dokusu için en önemli enzimlerden olan AChE enzim aktivitesidir. K grubu AChE enzim aktivitesine göre B grubunda azalma tespit edildi ($p<0.05$). Ayrıca K grubu AChE enzim aktivitesine göre N ve BN gruplarında da nispi oranda azalma gözlemlendi. B grubu AChE enzim aktivite düzeyine göre BN grubunda nispi oranda artış gözlemlendi. K grubu GST enzim aktivite düzeyine göre B grubunda nispi oranda azalma tespit edilirken, K grubu GST enzim aktivite düzeyine göre BN grubunda artış saptandı ($p<0.05$). Ayrıca, B grubu GST enzim aktivite düzeyine göre BN grubunda artış gözlemlendi ($p<0.01$).

6.TARTIŞMA

BFA'nın endüstride kullanımı oldukça yaygın olduğu görülmektedir. Polikarbonat plastikleri, epoksi reçineleri, boyalar ve diğ malzemeleri gibi birçok endüstriyel malzemenin yapısında bulunan BFA, çevresel bir kirletici olarak da öne çıkmaktadır. Özellikle yiyecek ve içecek kaplarının yapısındaki BFA, gıda zinciri yoluyla insan metabolizmasına geniş ölçüde girmektedir. BFA yüksek düzeyde toksititeye sahip olduğu için dokularda ciddi düzeyde zarar oluşturmaktadır. Naringenin ise doğal bir antioksidandır ve birçok meyve ve sebze de bulunur. Bu tez çalışmasında BFA'ya maruz bırakılan rat karaciğer ve beyin dokuları üzerine Naringenin'in antioksidan etkileri araştırıldı. Çalışmada, dokulardaki enzim aktivitesi, yağ asit ve mineral düzeyleri incelendi.

Çalışmamızda; BFA verilen rat karaciğer dokularının MDA düzeyinde artış gözlemlendi. Ayrıca, BFA grubu GSH düzeyi ile GST enzim aktivite düzeylerinde azalma tespit edildi. Karaciğer dokusundaki en önemli enzimlerden olan Ces enzim aktivitesinin BFA grubunda çok önemli düzeyde arttığı gözlemlendi. MDA, GSH, GST ve Ces oksidatif hasarın en önemli biyoparometreleridir. Lipit peroksit ürününün göstergesi MDA'dır. BFA'ya maruz kalan rat karaciğer dokularında MDA düzeyi ile Ces enzim aktivitelerinin artması, GSH ve GST enzim aktivitesinin azalması bu maddenin toksititesini işaret etmektedir. Yapılan bir araştırmada 70 gün süresince 40 mg/kg BFA uygulanan rat karaciğer ve böbrek dokularında lipit peroksidasyon ürünü olan TBARS düzeyinin arttığı, glutatyon peroksidaz (GP_x) ve SOD enzim aktivitelerinin azaldığı rapor edilmiştir [135]. Aynı çalışmada, BFA'ya karşı *Ginkgo biloba* yaprak ekstraktı (100 mg/kg) ve melatonin (10 mg/kg) uygulaması ratlara yapılmıştır. Rat karaciğer dokularında *Ginkgo biloba* yaprak ekstraktının ve melatonin'in lipit peroksidasyon ile GSH düzeylerini ve SOD ve GP_x enzim aktivitelerini düzelttiği açıklanmıştır [135].

GSH molekülü GP_x, glutatyon redüktaz (GR) ve GST gibi birçok antioksidan enzimin katalitik döngülerine katılan hücre içi önemli bir antioksidandır [136,137]. Yapılan başka bir çalışmada, BFA (0,5 ve 50 mg/kg) uygulanan rat karaciğer

dokularında antioksidan enzimlerde SOD, katalaz (CAT) ve GP_x ve total antioksidan kapasite düzeyleri azalırken, oksidatif stres belirteci olan nitrik oksit (NO) ve MDA düzeylerinde önemli düzeyde arttığı rapor edilmiştir [138]. BFA ile yapılan birçok çalışmada bu maddenin karaciğerde antioksidan-oksidan dengesini bozduğu belirtilmiştir. BFA oksidatif stresi ve ROT'u arttırarak karaciğer hasarı ve mitokondriyal disfonksiyonu oluşturduğu rapor edilmiştir [139,140]. Ayrıca, BFA'nın MDA'nın hepatotoksitesiteyi indüklediği, koruyucu enzimleri inhibe edebileceği ve karsinogenik bir ajan olduğunda bildirilmiştir [141].

Çalışmamızda, karaciğer dokusu Ces enzim aktivitesi BFA grubunda yüksek çıktığı tespit edildi. Ces enzimi karaciğerde yoğun olarak bulunmaktadır ve detoksifikasyon özelliğine sahiptir. Çalışmamızda uygulanan BFA'nın toksitesini azaltmak için Ces enzim aktivitesinin önemli düzeyde arttığını düşünmekteyiz. İnsan vücudunda biyolojik fonksiyonları farklılık gösteren esteraz grubu enzimler vardır. Bu enzimler birçok dokuda tespit edilmiştir. Asetilkolin esteraz, butilkolin esteraz, karboksil esteraz, kolesterol esteraz gibi birçok esteraz enzim dokularımızda mevcuttur. Bu enzimler tarafından üretilen metabolitlerdeki artışlar Alzheimer hastalığı, beyin kanseri, hiper kolesterolemi, koroner arter hastalığı gibi patolojik durumlara yol açar. Bu nedenle araştırmacılar çeşitli esteraz inhibitörleri üzerine odaklanmıştır. Ces enzimi esterlerin, amidlerin ve tiyoesterin hidrolizini katalize etmektedir. Birçok ilaç ve ksenobiyotikler Ces enzimleri üzerine etkiye sahiptir [142-145].

Çalışmamızın diğer önemli sonuçlarından biride, BFA'ya maruz kalan rat karaciğer dokularında GST enzim aktivitelerinin kontrol grubuna göre azalmasıdır. GST enzimi, hücrede en önemli detoksifikasyon görevini yapan enzimidir. En önemli görevlerinden biride hücrede reaktif oksijen türlerini temizlemesidir [145,146]. Ratlara oragastrik yöntemle uygulanan değişik konsantrasyonlardaki BFA'nın (0,2, 2 ve 20 mg/kg) dokularda birçok enzim aktivitesini azalttığı bildirilmiştir. BFA'nın konsantrasyonu arttıkça CAT, GR, GP_x ve SOD enzim aktivitelerinde azalma olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca lipid peroksidasyon düzeyinin konsantrasyona bağlı olarak attığı belirtilmiştir [43].

BFA uygulanan rat karaciğer ve böbrek dokuları üzerine *Asparagus officinalis* ekstratının etkisi çalışmasında, BFA grubu serum AST, ALT, ALP, Üre, keratin ve bilirubin seviyelerinin arttığı rapor edilmiştir. BFA uygulanan rat karaciğer dokularında MDA seviyesinin arttığı, GSH ve total antioksidan kapasite seviyelerinin düştüğü rapor edilmiştir. BFA'nın toksisitesini *Asparagus officinalis* ekstratının azalttığı bildirilmiştir [147].

Çalışmamızda, Naringenin BFA'nın oluşturduğu yüksek lipid peroksidasyon düzeyini önemli düzeyde azalttığı tespit edilmiştir. BFA'nın azalttığı GSH düzeyi ve GST enzim aktivite düzeyini kontrol grubu seviyelerine arttırdığı gözlemlendi. Ayrıca, BFA'nın Ces enzim aktivite düzeyini karaciğer dokusunda arttırdığı tespit edildi. Bu artışı naringenin kontrol grubu seviyesine kadar azalttığı gözlemlendi.

Arsenik toksitesine karşı silymarin ve naringenin uygulanan rat karaciğer dokularına etkileri çalışmalarında, arseniğin GSH, SOD ve CAT enzim aktivitelerini azaltırken, GST ve TBARS seviyelerini arttırdığı bildirilmiştir. Ancak, Naringenin'in antioksidan etkisiyle GSH düzeyini, CAT, SOD, GST ve GP_x düzeylerini artırarak arseniğin oluşturduğu toksiteyi azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca, arseniğin oluşturduğu yüksek lipid peroksidasyon düzeyini Naringenin'in azalttığı da açıklanmıştır [123]. Yapılan başka bir çalışmada, diyabet oluşturulmuş rat karaciğer dokularında Naringenin'in, yüksek lipid peroksidasyonunu düşürdüğü, SOD, CAT ve GP_x enzim aktivitelerini artırarak düzelttiği rapor edilmiştir [52].

Kadmiyuma maruz kalan rat karaciğer dokularında Naringenin'in etkisi çalışması yapılmıştır. Kadmiyumun neden olduğu karaciğer hasarı tespitinde kullanılan serum biyokimya belirteçlerinden AST, ALT, ALP, GGT ve serum total bilirubin (TB) ve lipid peroksidasyon düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Ayrıca kadmiyumun düşürdüğü antioksidan enzimlerden SOD, CAT, GP_x, GST, GR, GSH, vitamin C ve vitamin E düzeylerini Naringenin'in düzelttiği rapor edilmiştir [148]. Çalışmamızda, BFA'nın beyin dokusunda MDA düzeyini arttırdığı, AChE ve Ces enzim aktivitelerini azalttığı gözlemlendi. Ayrıca, BFA ve GSH düzeyi ile GST enzim aktivitelerini nispi oranda azalttığı tespit edildi. Naringenin ise BFA'nın oluşturduğu toksik etkiyi MDA ve GST düzeyini istatistiksel olarak düzeltirken, GSH, Ces ve AChE düzeylerinde ise nispi oranda düzelttiği saptandı. Yapılan önemli bir

çalışmada, rat beyin dokularında BFA'nın AChE enzim aktivitelerini önemli düzeyde düşürdüğü ve flovonoid türevi curcumin'in (50 mg/kg ve 100 mg/kg) uygulamalarında düzeltici etkileri rapor edilmiştir. Ayrıca çalışmalarında BFA'nın toksik etkilerinden dolayı beyin dokusundaki antioksidan enzimlerden SOD ve CAT'ın önemli düzeyde azaldığı, bu azalmayı curcumin'in düzelttiği bildirilmiştir [149]. BFA'nın toksitesine karşı Naringenin'in beyin dokusundaki koruyucu etkileri çalışması araştırmamız için önemli olduğu düşüncesindeyiz. Yapılan bir çalışmada BFA 50 mg/kg, naringenin ise 40, 80 ve 160 mg/kg düzeylerinde ratlara uygulamasının bir ay süresince yapıldığı belirtilmiştir. Kontrol grubuna göre BFA uygulanan rat beyin dokularında MDA ve ROT düzeylerinin önemli düzeyde arttığı, GSH, CAT, SOD ve GSH-Px düzeylerinin azaldığı rapor edilmiştir. BFA'ya karşı Naringenin uygulanan rat beyin dokularında ise MDA, ROT düzeylerinde azalış GSH, CAT, SOD ve GPx enzim aktivitelerinde artış bildirilmiştir. Rapor edilen bu çalışmada, Naringenin BFA' nın oluşturduğu oksidatif hasarı ve bilişsel bozulmalara karşı terapötik potansiyeli olduğu belirtilmiştir [150].

Çalışmamızda, BFA uygulanan rat karaciğer dokularında Fe ve Ca düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı tespit edildi. Ayrıca, BFA grubu Cu düzeyinin diğer gruplara göre nispi oranda arttığı gözlemlendi. Yapılan bir çalışmada, düşük doz BFA (10 mg/kg gün) ve yüksek doz BFA (25 mg/kg günlük) uygulanan rat akciğer dokularında Fe, Zn ve Cu düzeyleri araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarında, düşük ve yüksek doz uygulanan rat akciğer dokularında Fe düzeyinin nispi oranda arttığı, Cu düzeylerinin önemli düzeyde artarken, Zn düzeylerinde ise BFA grubunda önemli düzeyde azaldığı rapor edilmiştir [151]. Cu lysyl oksidaz, cytochrome C oksidaz gibi birçok enzimin kofaktörüdür. Fe, çeşitli biyokimyasal yollarda yer alır ve katalaz gibi enzimlerin prostetik grubudur. Fe alımı kontrolü bozulduğunda özellikle tümör hücrelerinin büyümesinde önemli bir faktördür [151]. Hücre içinde artan Fe peroksidasyona neden olup mebran lipidlerinin yapısını bozmaktadır [152]. Hücre içerisinde artan Fe ve Cu gibi metal iyonları OH[•] radikalini oluşturur. H₂O₂ proteinlerin hem gruplarında bulunan Fe ile reaksiyona girerek reaktif Fe'leri oluşturur. Radikalik reaksiyonlar sonucunda H₂O₂ süperoksit radikali ile reaksiyona girerek en zararlı radikal olan OH[•] radikali oluşmaktadır. Haber-Weiss

reaksiyonu olarak bilinen bu reaksiyonda, Fe^{+3} süperoksit tarafından Fe^{+2} 'ye indirgenir. Fe^{+2} Fenton reaksiyonu ile H_2O_2 'den $OH^\cdot$ radikali üretir [91]. Birçok toksikolojik çalışmada toksik maddelerin Fe ve Ca düzeylerini arttırdığı rapor edilmiştir [153-155].

Polifenolik fitokimyasalların antioksidan özelliklerinin yanı sıra en önemli özelliklerinden biride iyi bir şelatör olmasıdır. Bu fitokimyasallar iyonlar ile şelat yaparak toksik etkilerini azaltmaktadır. Çalışmamızda doğal bir antioksidan ve polifenolik bir bileşik olan Naringenin Cu, Fe ve Ca düzeylerinde nispi oranda etki göstermiştir. Sonuçlarımız birçok literatürle benzerlik göstermiştir [156,157].

Karaciğer dokusu yağ asit düzeyleri incelendiğinde, BFA'nın Σ SFA düzeyini artırırken, Σ MUFA, Σ PUFA ve Σ USFA düzeylerinde azalışa neden olduğu gözlemlendi. Özellikle bireysel yağ asitlerinden 16:0 yağ asit düzeyini önemli düzeyde arttırdığı tespit edildi. Ayrıca, doymamış yağ asitlerinden 18:1 n9c, 18:2 n6c ve 18:3 n3 yağ düzeylerini azalttığı tespit edildi. BFA uygulanan erkek sıçan yavrularının karaciğer dokularında 16:0 artarken, 18:2n6 düzeyinin azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca, 18:3n3, 20:5n3 ve 22:6n3 düzeylerini nispi düzeyde azalttığı rapor edilmiştir [158]. Çalışmamızın önemli sonuçlarından biride BFA grubunun kilo artış düzeyinde gözlemlendi. BFA grubu ratların kilo artış düzeyi diğer gruplara göre yüksek çıktığı tespit edildi. Naringenin verilen kombinasyonlu grupta ise bu kilo artışını engelleyerek azalttığı gözlemlendi. BFA'nın obezite ile ilgili olarak literatörlerde oldukça yaygın bilgi verildiği gözlenmiştir. BFA'nın obeziteye sebeplerinin birçok farklı mekanizmayla bağlantılı olduğu açıklanmıştır. BFA'nın insülin rezistansı ve yağ oluşumuna etkileri rapor edilmiştir [159]. BFA'nın metabolik değişikliklere yol açarak yağ hücresi oluşumunu artırdığı ve lipid birikimine sebep olduğu bildirilmiştir [160]. Farelere düşük ve yüksek doz uygulanan BFA'nın yağ hücreleri ile pankreas β -hücrelerindeki östrojen reseptörleri aracılığıyla obeziteye neden olmaktadır [161]. Ratların gebelik döneminde verilmeye başlanan BFA'nın doğum sonrası süt kesimine kadar devam eden çalışmada, erkek yavrularda kilo artışı gözlenmiştir [162].

Sonuç olarak, BFA uygulanan rat dokuları üzerine antioksidan özellik gösteren Naringenin'in birçok biyokimyasal parametreler üzerine pozitif etkileri

tespit edilmiştir. BFA'nın olumsuz olarak etkilediği Fe, Cu, MDA, GSH, Ces, GST, AChE üzerinde Naringenin pozitif etkileri olduğu gözlemlendi. Ayrıca, doymamış yağ asitleri düzeyindeki olumsuz etkileri Naringenin düzelttiği saptandı. Özellikle, BFA'nın doymuş yağ asit düzeylerindeki artışı Naringenin azalttığı tespit edilirken, BFA'nın doymamış yağ asitleri düzeylerindeki olumsuz etkiyi düzelttiği gözlemlendi. Bu tez çalışmasının ileriki yapılacak çalışmalara ışık tutabileceğini düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

- [1] K.J. Barnham, C.L. Masters, A.I. Bush, "Neurodegenerative diseases and oxidative stress", *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 3, no.3, pp.205–214, 2004.
- [2] B.S. Rubin, "Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects", *J. Steroid Biochem Mol. Biol.*, vol.127, no.1, pp. 27–34, 2011.
- [3] H.M. Koch, A.M. Calafat, "Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture", *Philos Trans. R. Soc. B B. S.* vol. 364, no. 1526, pp. 2063–2078, 2009.
- [4] M.N. Tzatzarakis, V. Karzi, E. Vakonaki, M. Goumenou, M. Kavvalakis, P. Stivaktakis, "Bisphenol A in soft drinks and canned foods and data evaluation", *Food Addit Contam part B Surveill.* vol. 10, no. 2, pp. 85–90, 2017.
- [5] S. Pal, K. Sarkar, P.P. Nath, M. Mondal, A. Khatun, G. Paul, "Bisphenol S impairs blood functions and induces cardiovascular risks in rats", *Toxicol Rep*, vol. 20, no. 4, pp. 560–565, 2017.
- [6] M.N. Tzatzarakis, E. Vakonaki, M.P. Kavvalakis, M. Barmpas, E.N. Kokkinakis, K. Xenos, "Biomonitoring of bisphenol A in hair of Greek population", *Chemosphere*, vol. 118, pp. 336–341, 2015.
- [7] N. Guthrie, E.M. Kurowska, "Anticancer and cholesterol-lowering activities of citrus flavonoids", In R.E.C. Wildman (Ed.) *Handbook of nutraceuticals and functional foods*, New York, CRC press, 2001.
- [8] M. Lagouge, C. Argmann, Z. Gerhart-Hines, H. Meziane, C. Lerin, F. Daussin, N. Messadeq, J. Milne, P. Lambert, P. Elliott, B. Geny, M. Laakso, P. Puigserver, J. Auwerx, "Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 alpha", *Cell*, vol.127,no. 6, pp. 1109-22, 2006.
- [9] E.J. Lee, D.I. Kim, W.J. Kim & S.K. Moon, "Naringin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression and Akt phosphorylation in tumor necrosis factor-alpha-induced vascular smooth muscle cells", *Molecular Nutrition & Food Research*, vol.53, no. 12, pp. 1582–91, 2009.
- [10] R. H. Liu, "Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action", *The Journal of Nutrition*, vol. 134(2), pp. 3479–3485, 2004.

- [11] M. Wright-Walters, C. Volz, E. Talbott, D. Davis, "An updated weight of evidence approach to the aquatic hazard assessment of Bisphenol A and the derivation a new predicted no effect concentration (Pnec) using a non-parametric methodology", *Science of the Total Environment*, vol. 409, no. 4, pp. 676-85, 2011.
- [12] L. Vandenberg, R. Hauser, M. Marcus, N. Olea, W. Welshons, "Human exposure to bisphenol A (BPA)", *Reprod Toxicol*, vol. 24, no.2, pp.139–77, 2007.
- [13] S. Flint, T. Markle, S. Thomson, E. Wallace, "Bisphenol Aexposure effects and policy; a wildlife perspective", *J. Environ Manage*, vol.15, no. 104, pp.19–34, 2012.
- [14] J.R. Koduru, L.P. Lingamdinne, J. Singh, K. Choo, "Effective removal of bisphenol A (BPA) from water using a goethite/activated carbon composite", *Process Safety and Environmental Protection*, vol.103, pp.87-96, 2016.
- [15] M. Faheem, R. K. Bhandari, "Detrimental Effects of Bisphenol Compounds on Physiology and Reproduction in Fish: A Literature Review", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 81-103497, 2021.
- [16] J. Corrales, L.A. Kristofco, W.B. Steele, B.S. Yates, C.S. Breed, E.S. Williams, B.W. Brooks, "Global Assessment of Bisphenol A in the Environment, *Dose Response*, 13(3): 1559325815598308, 2015.
- [17] R.K. Bhandari, S.L. Deem, D.K. Holliday, C.M. Jandegian, C.D. Kassotis, S.C. Nagel, D.E. Tillitt, F.S. Vom Saal, C.S. Rosenfeld, "Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 α -ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species", *General and Comparative Endocrinology*, vol. 1, No. 214, pp.195–219, 2015a
- [18] G.P. Peteffi, J.D. Fleck, I.M. Kael, D.C. Rosa, M.V. Antunes, R. Linden, "Brazilian Journal of Biology Ecotoxicological risk assessment due to the presence of bisphenol A and caffeine in surface waters in the Sinos River Basin-Rio Grande do Sul-Brazil", *Braz. J. Biol*, vol. 79, no.12, pp. 712–721, 2019.
- [19] M. Moreira, S. Aquino, M. Coutrim, J. Silva, R. Afonso, "Determination of endocrine-disrupting compounds in waters from Rio das Velhas, Brazil, by liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (ESI-LC-IT-TOF/MS)", *Environmental Technology*, vol. 32(11-12), pp: 1409–17, 2011.

- [20] S. Froehner, K.S. Machado, F. Falcão, C. Monnich, M. Bessa, ‘‘Inputs of Domestic and Industrial Sewage in Upper Iguassu, Brazil Identified by Emerging Compounds’’, *Water, Air, & Soil Pollution*, vol. 215, pp. 251–259, 2011.
- [21] H. Fromme, T. K  chler, T. Otto, K. Pilz, J. M  ller, A. Wenzel, ‘‘Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment’’, *Water Research*, vol.36, no.6, pp.1429–38, 2002a
- [22] A. Belfroid, M. van Velzen, B. van der Horst, D. Vethaak, ‘‘Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements’’, *Chemosphere*, vol. 49, no.1, pp: 97–103, 2002.
- [23] V.A. Santhi, N. Sakai, E.D. Ahmad, A.M. Mustafa, ‘‘Occurrence of bisphenol A in surface water, drinking water and plasma from Malaysia with exposure assessment from consumption of drinking water’’, *Science of The Total Environment*, vol. 15, 427–428, 332–338, 2012.
- [24] A. Debora de A, S. Lacorte, P. Viana, D. Barcel  o, ‘‘Occurrence of nonylphenol and bisphenol-A in surface waters from Portugal’’, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 12, no. 4, pp. 532–537, 2001.
- [25] M. ElAmin, M. Elobeid, M. Daghestani, Z. Almarhoon, E. AlOlayan, P. Virk, S. Omer, Z. Hassan, ‘‘Bisphenol A Detection in Various Brands of Drinking Bottled Water in Riyadh, Saudi Arabia Using Gas Chromatography/Mass Spectrometer’’, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, vol. 11, no. 3, pp. 455–459, 2012.
- [26] P. Hohenblum, O. Gans, W. Moche, S. Scharf, G. Lorbeer, ‘‘Monitoring of selected estrogenic hormones and industrial chemicals in groundwaters and surface waters in Austria’’, *Science of The Total Environment*, vol. 333, pp. 185–193, 2004.
- [27] J. Sánchez-Avila, J. Bonet, G. Velasco, S. Lacorte, ‘‘Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs and PAHs in an industrial sewage grid discharging to a Municipal Wastewater Treatment Plant’’, *Science of The Total Environment*, vol. 407, pp. 4157–4167, 2009.
- [28] C. Liao, K. Kannan, ‘‘Concentrations and profiles of bisphenol a and other bisphenol analogues in foodstuffs from the united states and their implications for human exposure’’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, no. 19, pp. 4655–4662, 2013.

- [29] C. Liao, K. Kannan, "A survey of alkylphenols, bisphenols, and triclosan in personal care products from China and the United States", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 67, no.1, pp. 50–59, 2014a.
- [30] C. Liao, F. Liu, Y. Guo, H-B. Moon, H. Nakata, Q. Wu, K. Kannan, "Occurrence of Eight Bisphenol Analogues in Indoor Dust from the United States and Several Asian Countries: Implications for Human Exposure", *Environmental Science & Technology*, vol. 46, no. 16, pp. 9138–9145, 2012.
- [31] S. Song, M. Song, L. Zeng, T. Wang, R. Liu, T. Ruan, G. Jiang, "Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China", *Environmental Pollution*, vol. 186, pp. 14–19, 2014.
- [32] G. Schonfelder, W. Wittfoht, H. Hopp, C.E. Talsness, M. Paul, "Parent bisphenolA accumulation in the human maternal-fetalplacental unit", *Environ Health Perspect*, vol. 110, no. 11, pp. A703-7, 2002.
- [33] Y.Wan, K. Choi, S. Kim, K. Ji, H. Chang, S. Wiseman, P.D.Jones, J.S. Khim, S. Park, J. Park, M.H. Lam, J.P. Giesy, "Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers and bisphenol A in pregnant women and their matching fetuses: placental transfer and potential risks", *Environ Sci Technol*, vol.44, no.13, pp.5233-39, 2010.
- [34] Y. Ikezuki, O. Tsutsumi, Y. Takai, Y. Kamei, Y. Taketani, "Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure", *Hum Reprod*, vol. 17, no. 11, pp. 2839-2841, 2002.
- [35] X.L. Cao, J. Zhang, C.G. Goodyer, S. Hayward, G.M. Cooke, "Bisphenol A in human placental and fetal liver tissues collected from Greater Montreal area (Quebec) during (1998–2008)", *Chemosphere*, vol. 89, no. 5, pp. 505-511, 2012.
- [36] Y. Sun, M. Irie, N. Kishikawa, M. Wada, N. Kuroda, "Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection", *Biomed Chromatogr*, vol. 18, no. 8, pp. 501–507, 2004.
- [37] G.S. Prins, W.Y. Tang, J. Belmonte, S.M. Ho, "Developmental exposure to bisphenol A increases prostate cancer susceptibility in adult rats: epigenetic mode of action is implicated", *Fertil Steril*, vol. 89, pp. e41, 2008.
- [38] M. Pupo, A. Pisano, R. Lappano, M.F. Santolla, E.M. De Francesco, S. Abonante, C. Rosano, M. Maggiolini, "Bisphenol A induces gene expression

- changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer - associated fibroblasts”, *Environ Health Perspect.*, vol. 120(8) , pp. 1177–82, 2012.
- [39] Y.B. Wetherill, B.T. Akingbemi, J. Kanno, J.A. McLachlan, A. Nadal, C. Sonnenschein, C.S. Watson, R.T. Zoeller, S.M. Belcher, “In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action”, *Reprod Toxicol.* vol. 24(2), pp. 178–198, 2007.
- [40] W.Xia, Y. Jiang, Y. Li, Y. Wan, J. Liu, “Early-life exposure to bisphenol A induces liver injury in rats involvement of mitochondria-mediated apoptosis”, *PLoS One*, 9(2): e90443, 2014.
- [41] O. Takahashi, S. Oishi, “Testicular toxicity of dietary 2,2-bis(4 hydroxyphenyl)propane (BPA) in F344 rats”, *Arch Toxicol.* vol.75, pp.42–51, 2001.
- [42] K.C. Chitra, K.R. Rao, P.P.Mathur, “Effect of bisphenol A and co-administration of bisphenol A and vitamin C on epididymis of adult rats: a histological and biochemical study” *Asian J. Androl.* vol. 5, pp. 203–208, 2003.
- [43] V. Bindhumol, K.C. Chitra, P.P. M,athur, “Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats”, *Toxicology*, vol. 188, pp. 117-124, 2003.
- [44] J.B. Harborne, “Comparative biochemistry of the flavonoids series II. 3-Desoxyanthocyanins and their distribution in ferns and gesneriads, *Phytochemistry* 5, London, New York, Akademik press, 1967
- [45] J. Kühnau, “The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition”, *World Reviev of Nutrition Diet.* vol. 24, pp:117–191, 1976.
- [46] P. Totta, F. Acconcia, S. Leone, I. Cardillo, M. Marino, “Mechanisms of naringenin-induced apoptotic cascade in cancer cells: involvement of estrogen receptor alpha and beta signalling”, *IUBMB Life*, vol. 56 (8) pp. 491–499, 2004.
- [47] Y. Liu, W. An, A. Gao, “Protective effects of naringenin in cardiorenal syndrome”, *Journal of Surgical Researce*, vol. 208(3), pp. 416-423, 2016.
- [48] E.E. Mulvihill, J.M. Assini, B.G. Sutherland, “Naringenin decreases progression of atherosclerosis by improving dyslipidemia in high-fat-fed low-density lipoprotein receptor-null mice, *Arterioscler*”, *Thromb. Vasc. Biol.* Vol. 30, no.4 pp. 742–748, 2010.

- [49] O.M. Ahmed, A.M. Mahmoud, A. Abdel-Moneim, M.B. Ashour, ‘‘Antidiabetic effects of hesperidin and naringin in type 2 diabetic rats’’, *Diabetologia Croatica*, vol. 41, no.2, pp. 53–67, 2012.
- [50] A. Visnagri, M. Adil, A.D. Kandhare, S.L. Bodhankar, ‘‘Effect of naringin on hemodynamic changes and left ventricular function in renal artery occluded renovascular hypertension in rats’’, *J. Pharm. Bioallied Sci.* vol.7, pp.121–127, 2015.
- [51] S.J. Tsai, C.S. Huang, M.C. Mong, W.Y. Kam, H.Y. Huang, M.C. Yin, ‘‘Anti inflammatory and antifibrotic effects of naringenin in diabetic mice’’, *J. Agric. Food Chem.* Vol. 60, no.1, pp. 514-521, 2012.
- [52] D.H. Priscilla, M. Jayakumar, K. Thirumurugan, ‘‘Flavanone naringenin: an effective antihyperglycemic and antihyperlipidemic nutraceutical agent on high fat diet fed streptozotocin induced type 2 diabetic rats’’, *Journal of Functional Foods*, vol. 14, pp. 363–373, 2015.
- [53] A. Sharma, A.K. Patar, S. Bhan, ‘‘Cytoprotective, antihyperglycemic and antioxidative effect of naringenin on liver and kidneys of Swiss diabetic mice’’, *International Journal of Health Sciences and Research*, vol. 6, pp. 118–131, 2016.
- [54] S.M. Jeon, H.K. Kim, H.J. Kim, G.M. Do, T.T. Jeong, ‘‘Hypocholesterolemic and antioxidative effects of naringenin and its two metabolites in high-cholesterol fed rats’’, *Transl. Res.* vol.149, no.1, pp.15–21, 2007.
- [55] T. Annadurai, A.R. Muralidharan, T. Joseph, M.J. Hsu, P.A. Thomas, P. Geraldine, ‘‘Antihyperglycemic and antioxidant effects of a flavanone, naringenin, in streptozotocin-nicotinamide-induced experimental diabetic rats’’, *Journal of Physiology and Biochemistry volume*, vol. 68, no.3, pp. 307–318, 2012.
- [56] R.R. Ortiz-Andrade, J.C. Snchez-Salgado, G. Navarrete-Vzquez. et al., ‘‘Antidiabetic and toxicological evaluations of naringenin in normoglycaemic and NIDDM rat models and its implications on extra-pancreatic glucose regulation’’, *Diabetes Obes. Metab.* vol.10, no.11, pp. 1097–1104, 2008.

- [57] S. Bhattacharya, N. Oksbjerg, J.F. Young, P.B. Jeppesen, ‘‘Caffeic acid, naringenin and quercetin enhance glucose-stimulated insulin secretion and glucose sensitivity in INS-1E cells’’, *Diabetes Obes. Metab.* vol.16, no.7, pp.602–612, 2014.
- [58] S. Roy, F. Ahmed, S. Banerjee, U. Saha, ‘‘Naringenin ameliorates streptozotocin-induced diabetic rat renal impairment by downregulation of TGF- β 1 and IL-1 via modulation of oxidative stress correlates with decreased apoptotic events’’, *Pharmaceutical Biology*, vol. 54, no. 9, pp. 1616–1627, 2016.
- [59] N. Orsolic, G. Gajski, V. Garaj-vrhovac, D. Dikic, Z.P. Prskalo, D. Sirovina, ‘‘DNA-protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice’’, *European Journal of Pharmacology*, vol. 656(1-3), pp. 110–118, 2011.
- [60] M.H. Yan, X. Wang, X. Zhu, ‘‘Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease’’, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 62, pp. 90–101, 2013.
- [61] S. Ghofrani, M.-T. Joghataei, S. Mohseni, et al. ‘‘Naringenin improves learning and memory in an Alzheimer's disease rat model: insights into the underlying mechanisms’’, *European Journal of Pharmacology*, vol. 764, pp. 195–201, 2015.
- [62] A. Rahigude, P. Bhutada, S. Kaulaskar, M. Aswar, K. Otari, ‘‘Participation of antioxidant and cholinergic system in protective effect of naringenin against type-2 diabetes-induced memory dysfunction in rats’’, *Neuroscience* vol.226, pp.62-72, 2012.
- [63] P.T. Francis, A.M. Palmer, M. Snape, G.K. Wilcock, ‘‘The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress’’, *Journal of Neurology, Neurosurgery, Psychiatry*, vol. 66, no. 2, pp. 137–147, 1999.
- [64] M.B. Khan, M.M. Khan, A. Khan, et al., ‘‘Naringenin ameliorates Alzheimer's disease (AD)-type neurodegeneration with cognitive impairment (AD-TNDCI) caused by the intracerebroventricular- streptozotocin in rat model’’, *Neurochemistry International*, vol. 61, no. 7, 1081–1093, 2012.
- [65] M.A. El Madani, R.M.A. Elsalam, A.S. Attia, S.M. El-Shenawy, M.S. Arbid, ‘‘Neuropharmacological Effects of Naringenin, Harmine and Adenosine on Parkinsonism Induced in Rats’’, *Scholars. Res. Lib*, vol.8, no.5, pp. 45–57, 2016.
- [66] A.S. Lee, ‘‘The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress’’, *Methods*, vol. 35, no.4, pp. 373–381, 2005.

- [67] W. Domej, K. Oettl, W. Renner, "Oxidative stress and free radicals in COPD-implications and relevance for treatment", *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, vol. 9,no.1, pp. 1207–1224, 2014.
- [68] C. Iwamura, K. Shinoda, M. Yoshimura, Y. Watanabe, A. Obata, T. Nakayama, "Naringenin chalcone suppresses allergic asthma by inhibiting the type-2 function of CD4 T cells", *Allergol. Int.* vol. 59, no.1, pp. 67–73, 2010.
- [69] E. Seyedrezazadeh, S. Kolahian, A.A. Shahbazfar, et al., "Effects of the flavanone combination hesperetin-naringenin, and orange and grapefruit juices, on airway inflammation and remodeling in a murine asthma model", *Phytotherapy Research*, vol. 29, no.4, pp. 591–598, 2015.
- [70] S. Mena, A. Ortega, J.M. Estrela, "Oxidative stress in environmental-induced carcinogenesis", *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 674, pp. 36–44, 2009.
- [71] V. Sosa, T. Moliné, R. Somoza, R. Paciucci, H. Kondoh, M.E. Leonart, "Oxidative stress and cancer: an overview", *Ageing Research Reviews*, vol. 12, no. 1, pp. 376-390, 2013.
- [72] S.-I. Kanno, A. Tomizawa, T. Hiura, et al. "Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol.28, no.3, pp. 527–530, 2005.
- [73] H. Yoon, T.W. Kim, S.Y. Shin, et al. "Design, synthesis and inhibitory activities of naringenin derivatives on human colon cancer cells", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 23, no.1, pp. 232–238, 2013.
- [74] J.H. Lee, C.H. Park, K.C. Jung, H.S. Rhee, C.H. Yang, "Negative regulation of beta-catenin/Tcf signaling by naringenin in AGS gastric cancer cell", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 335, no. 3, pp. 771–776, 2005.
- [75] K. Gao, S.M. Henning, et al., "The citrus flavonoid naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells", *J. Nutr. Biochem.*, vol. 17(2), pp. 89–95, 2006.
- [76] Y. Son, Y.-K. Cheong, N.-H. Kim, H.-T. Chung, D.G. Kang, H.-O. Pae, Mitogenactivated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways? *J. Signal. Transduct.* 792639, 2011.

- [77] A. Meister, M.E. Anderson, "Glutathione", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 52, pp. 711-760, 1983.
- [78] A.Z.Reznick, L. Packer, C.K.Sen, J.O. Holloszy, M.J. Jackson, 'Free Radical and Oxidative Damage in Biology and Medicine: An introduction', '*Oxidative Stress in Skeletal Muscle*. (B. Halliwell). I. Edition. Birkhauser Publisher. London, 1998.
- [79] P.V. Vignais, "The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism" *Cell Mol. Life Sci. CMLS*, vol. 59, pp.1428-59, 2002.
- [80] A.Meister, "Glutathione metabolism", *Methods Enzymol.* vol.251, pp.3-7, 1995.
- [81] A.Meister, "Biosynthesis and function of glutathione, an essential biofactor", *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, vol. 38, Spec No: 1-6, 1996.
- [82] R. Njalsson, K. Carlsson, et al."Kinetic properties of missense mutations in patients with glutathione synthetase deficiency" *Biochemical Journal*, vol. 349, no.1, pp. 275-279, 2000.
- [83] N.Smirnoff, J.E. Pallanca, "Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress", *Biochemical Society Transactions*, vol. 24, no.2, , pp. 472-8, 1995.
- [84] O. Blokhina, E. Virolainen, K.V. Fagerstedt, "Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review", *Annals Botany*, vol. 91. pp. 179-94, 2003.
- [85] L.Yuan, N. Kaplowitz, "Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity", *Molecular Aspects of Medicine*, vol.30, pp. 29-41, 2009.
- [86] M.F. Knapen, P.L. Zusterzeel, W.H. Peters, E.A. Steegers, "Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction. A review", *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* vol. 82, no.2, pp. 171-184, 1999.
- [87] M. Aktas, U. Değirmenci, S. Ercan, L. Tamer, U. Atik, "The Comparison of Spectrophotometric and HPLC Methods in Reduced Glutathione Measurements", *Türkiye Klinik Biyokimya Dergisi*, vol.3, no.3, pp. 95-99, 2005.
- [88] E. Koç, A.S. Üstün, "Patojenlere karşı bitkilerde savunma ve antioksidanlar" *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, vol.24 (1-2), pp. 82-100, 2008
- [89] J.D.Hayes, J.U.Flanagan, I.R.Jowsey, "Glutathione transferases" *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 45, pp. 51-88, 2005.
- [90] S. Raghunathan, R.J. Chandross, R.H. Kretsinger, T.J. Allison, C.J Penington, G.S. Rule, "Crystal structure of human class mu glutathione transferase GSTM2-2.

Effects of lattice packing on conformational heterogeneity. *Journal of Molecular Biology*, vol. 238, no.5, pp. 815-832, 1994.

[91] E.M. Gözükar, *Biyokimya*, Nobel tıp kitapevi, İstanbul, 2011

[92] R.C. Strange, M.A. Spiteri, S. Ramachandran, A.A. Fryer, ‘‘Glutathione-S-transferase family of enzymes’’, *Mutation Research*, vol. 482(1-2), pp. 21-26, 2001.

[93] B. Mannervik, P. Alin, C. Guthenberg, H. Jensson, M.K. Tahir, M. Warholm, H. Jörnvall, ‘‘Identification of three classes of cytosolic glutathione transferases common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties’’, *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 82(21), pp. 7202-7206, 1985.

[94] P. Board, M. Coggan, P. Johnston, V. Ross, T. Suzuki, G. Webb, ‘‘Genetic Heterogeneity Of The Human Glutathione Transferases: A Complex of Gene Families’’, *Pharmacology & Therapeutics*, vol.48, no.3, pp. 357-369, 1990.

[95] Y. Aksoy, ‘‘Kanserde ilaç direncinin üstesinden gelmenin yolları: Yeni ilaçların tasarımı’’, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, vol. 30, no.6, pp. 2011-2016, 2010.

[96] A. Sau, F. P. Tregno, F. Valentino, G. Federici, A.M. Caccuri, ‘‘Glutathione transferases and development of new principles to overcome drug resistance’’, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 500, no. 2, pp. 116-122, 2010.

[97] D. Fournier, J.M. Bride, M. Poirie, J.B. Berge, F.W. Plapp, ‘‘Insect glutathione Stransferases. Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides’’, *J Biol Chem*, vol.267(3), pp.1840-45, 1992.

[98] M.A. Gyamfi, I.I. Ohtani, E. Shinno, Y. Aniya, ‘‘Inhibition of glutathione stransferases by Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, Thonningia sanguinea, in vitro’’, *Food Chem Toxicol*, vol. 42(9), pp. 1401-8, 2004.

[99] S.C.Laizure, V. Herring, Z. Hu, K. Witbrodt, R.B. Parker, ‘‘The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance? *Pharmacotherapy*, vol. 33, no.2, pp. 210-222, 2013.

[100] M. Hosokawa, ‘‘Structure and Catalytic Properties of Carboxylesterase Isozymes Involved in Metabolic Activation of Prodrugs’’ *Molecules*. vol.13, no.2, pp. 412-431, 2008.

[101] C.E. Wheelock, B.M. Phillips, B.S. Anderson, J.L.Miller, M.J. Miller, B.D. Hammock, ‘‘Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring

and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 195, pp. 117-78, 2008.

[102] C.E. Wheelock, G. Shan, J. Ottea, "Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides", *J. Pesticide Sci.* vol.30(2), pp. 75–83, 2005.

[103] M.K. Ross, M.J. Edelman, "Carboxylesterases: A multifunctional enzyme involved in pesticide and lipid metabolism" *ACS Symposium Series*, vol. 1099, pp. 149–164, 2012.

[104] D. Nos, J. Navarro, E. Saiz, "J.C. Sanchez-Hernandez, M. Sol'e, "Tetrabromobisphenol A inhibits carboxylesterase activity of marine organisms from different trophic levels", *Chemosphere*, vol. 238, 2020.

[105] J. Est'evez, E. Vilanova, M.A. Sogorb, "Biomarkers for testing toxicity and monitoring exposure to xenobiotics", *Biomarkers Toxicol.* pp. 1165–1174, 2019.

[106] M. Pohanka, "Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology" *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, vol. 155, no.3, pp. 219-229, 2011.

[107] B.P. Doctor, P. Taylor, D.M. Quinn, R.L. Rotundo, M.K. Gentry, "Diversity and Processing of AChE" *Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins*, pp. 25-29, 1998.

[108] A.A. Rao, G.R. Sridhar, U.N. Das, "Elevated butyrylcholinesterase may predict the development of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease", *Medical Hypotheses*, vol. 69, no.6, pp. 1272-1276, 2007.

[109] D.M. Quinn, "Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states", *Chemical Reviews*, vol. 87, no. 5, pp. 955–979, 1987.

[110] A. Güven, "Asetilkolinesterazın Önemi ve İnhibitörleri", *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, vol. 6, no.1-2, pp. 145-151, 2000.

[111] H.T. Clarke, D. Nachmansohn, "In Ion Transport Across Membranes", *Acedemic Pres Inc.* New York. 35s, 1954.

[112] M.E. Hasselmo, "The Role Of Acetylcholine In Learning And Memory" *Current Opinion in Neurobiology*, vol.16, no.6, pp: 710-715, 2006.

- [113] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Mancol, M. Izakovic M. Mazur, “Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stres-induced canser”, *Chemico-Biological Interactions*, vol. 160, no.1, pp. 1-40, 2006.
- [114] L.L. De Zwart, J.H. Meerman, J.N. Commandeur, N.P. Vermeulen, “Biomarkers of free radical damage aplications in experimental animals and inhumans”, *Free Radic Biol Med.*, vol. 26, no.1-2, pp. 202-226, 1999.
- [115] M. Polat, “Toxoplasma gondii pozitif hastalarda oksidatif stres ve protein oksidasyon ürünlerinin degerlendirilmesi”, (yüksek lisans tezi, basılmamış) Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri, 2011
- [116] E. Cadenas, “Biochemistry of oxygen toxicity”, *Annual Review of Biochemistry*, vol. 58, pp. 79-110, 1989.
- [117] S. Pizziment, E. Ciamporcerro, M. Daga, P. Pettazzoni, A. Arcaro, G. Cetrangolo, et al., “Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins”, *Frontiers in Physiology*, vol. 4, pp. 242, 2013.
- [118] L.E. Rikans, K.R. Hornbrook, “Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging”, *Biochemical Biophys. Acta.*, vol. 1362, no.2-3, pp. 116-127, 1997.
- [119] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, “*Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press Inc, New York, 2015.
- [120] G.A. Khoschsorur, B.M. Winklhofer-Roob, H. Rabl, Th. Auer, Z. Peng, R.J. Schaur, “Evaluation of a sensitive Hplc method for the determination of malondialdehyde and application of the method to different biological materials”, *Chromatographia*, vol. 52, pp. 181-184, 2000.
- [121] L. Kalaycıoğlu, B. Serpek, M. Nizamlioğlu, N. Başpınar, A.M. Tiftik, *Biyokimya*, Ankara: Nobel, 2013.
- [122] M. Aksoy, *Beslenme Biyokimyası*, Ankara: Hatipoğlu, 2016.
- [123] A. Jain, A. Yadav, A.I. Bozhkov, V.I. Padalko, S.J. Flora, “Therapeutic efficacy of silymarin and naringenin in reducing arsenic-induced hepatic damage in young rats”, *Ecotoxicol Environ Safety*, vol. 74, no.4, pp. 607–614, 2011.
- [124] M. Aydogan, A. Korkmaz, N. Barlas, D. Kolankaya, “The effect of vitamin C on bisphenol A, nonylphenol and octylphenol induced brain damages of male rats”, *Toxicology*, vol. 249, no.1, pp. 35–39, 2008.

- [125] J. Sedlak, R.H. Lindsay, "Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent", *Analytical Biochemistry*, vol. 25, no. 1, pp. 192-205, 1968.
- [126] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, "Glutathione-S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation", *Journal of biological Chemistry*, vol. 249, no. 22, pp. 7130-7139, 1974.
- [127] Z.A. Placer, L.L. Cushman, B.C. Johnson, "Estimation of product of lipid peroxidation (malony dialdehyde) in biochemical systems", *Analytical Biochemistry*, vol.16, no. 2, pp. 359-364, 1996.
- [128] U. Nousiainen, R. Törrönen, "Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in the rat liver by in vivo and in vitro inhibition", *General Pharmacology; The Vascular System*, vol. 15, no. 3, pp. 223-227, 1984.
- [129] P. Santhoshkumar, T. Shivanandappa, "In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver", *Chemico-biological interactions*, vol.119-120, pp. 227-282, 1999.
- [130] G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, R.M. Feather-Stone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochemical Pharmacology*, vol.7, no. 2, pp. 88-90, 1961.
- [131] M. Özmen, S.E. Dominguez, A. Fairbrother, "Effects of dietary azinphos methyl on selected plasma and tissue biomarkers of the gray-tailed vole", *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, vol.60, no. 2, pp. 194-201, 1998.
- [132] M.M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, vol.72, no. 1-2, pp. 248-254, 1976.
- [133] A. Hara, N.S. Radin, "Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent", *Analytical Biochemistry*, vol. 90, no. 1, pp. 420-426, 1978.
- [134] W.W. Christie, "Gas Chromatography and Lipids", Glasgow: The Oil Press, 1992.
- [135] M.M. Wahby, Z.M. Abdallah, H.M. Abdou, M.I. Yousef, Al-Sayed A. Newairy, "Mitigating potential of Ginkgo biloba extract and melatonin against

hepatic and nephrotoxicity induced by Bisphenol A in male rats”, *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 4, no.4, pp. 350–357, 2017.

[136] S. Melov, “Animal models of oxidative stress, aging, and therapeutic antioxidant interventions” *Int J Biochem Cell Biol*, vol.34(11), pp.1395-1400, 2002.

[137] S.K. Biswas, I. Rahman, “Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione”, *Mol Aspects Med.*, vol.30, pp.60–76, 2009.

[138] J. I. Eid, S.M. Eissa, A. A. El-Ghor, “Bisphenol A induces oxidative stress and DNA damage in hepatic tissue of female rat offspring”, *The Journal of Basic & Applied Zoology*, vol. 71, pp. 10–19, 2015.

[139] M.K. Moon, M.J. Kim, I.K. Jung, Y.D. Koo, H.Y. Ann, K.J. Lee, S.H.Kim, Y.C. Yoon, B.J. Cho, K.S. Park, H.C. Jang, Y.J. Park, “Bisphenol A impairs mitochondrial function in the liver at doses below the no observed adverse effect level”, *Journal of Korean Medical Science*, vol. 27, no.6, pp. 644–652, 2012.

[140] J. Asahi, H. Kamo, R. Baba, Y. Doi, A. Yamashita, “Bisphenol A induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in mouse non-parenchymal hepatocytes”, *Life Sciences*, vol. 87(13-14), pp. 431–438, 2010.

[141] G. Bauer, “Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis”, *Anticancer Res.* vol. 20, pp. 4115–4139, 2000.

[142] M. Alipour, M. Khoobi, A. Foroumadi, H. Nadri, A. Moradi, A. Sakhteman, M. Ghandi, A. Shafiee, “Novel coumarin derivatives bearing N-benzyl pyridinium moiety: potent and dual binding site acetylcholinesterase inhibitors”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 20(24), pp. 7214–7222, 2012.

[143] M. K Ross, A. Borazjani, C.C. Edwards, P. M. Potter, “Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases”, *Biochemical Pharmacology*. vol.71, no.5, pp. 657–669, 2006.

[144]. E. W Morgan, B.F. Yan, D. Greenway, A. Parkinson, “Regulation of Two Rat-Liver Microsomal Carboxylesterase Isozymes - Species-Differences, Tissue Distribution, and the Effects of Age, Sex, and Xenobiotic Treatment of Rats” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 315, no.2, pp.513–526, 1994.

- [145] R. S. Holmes, M. W. Wright, S. J. F. Laulerkind, L. A. Cox, M. Hosokawa, et al. "Recommended nomenclature for five mammalian carboxylesterase gene families: human, mouse, and rat genes and proteins", *Mammalian Genome*. vol. 21(9–10), pp. 427–441, 2010.
- [146] S. Amjad, S. Umesalma, "Protective Effect of *Centella asiatica* against Aluminium-Induced Neurotoxicity in Cerebral Cortex, Striatum, Hypothalamus and Hippocampus of Rat Brain Histopathological, and Biochemical Approach", *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*, vol. 6, no.1, pp.1–7, 2015.
- [147] S.M. Poormoosavi, H. Najafzadehvarzi, M.A. Behmanesha, R. Amirgholami, "Protective effects of *Asparagus officinalis* extract against Bisphenol A induced toxicity in Wistar rats". *Toxicology Reports*, vol.5, pp. 427–433, 2018.
- [148] J. Renugadevi, S.M. Prabu, "Cadmium-induced hepatotoxicity in rats and the protective effect of naringenin", *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 62, no.2, pp. 171–181, 2010.
- [149] J.K. Akintunde, A.A. Farouk, O. Mogbojuri, "Metabolic treatment of syndrome linked with Parkinson's disease and hypothalamus pituitary gonadal hormones by turmeric curcumin in Bisphenol-A induced neuro-testicular dysfunction of wistar rat", *Biochemistry and Biophysics Reports*, vol. 17, pp. 97–107, 2019.
- [150] M. Mahdavinia, A. Ahangarpour, L. Zeidooni, A. Samimi, S. Alizadeh, M. A. Dehghani, S. Alboghobeish, "Protective Effect of Naringin on Bisphenol A-Induced Cognitive Dysfunction and Oxidative Damage in Rats", *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, Vol. 8, No. 2, pp. 141-153, 2019.
- [151] A. Rehman, T. Akhtar, N. Hameed, N. Sheikh, "In vivo assessment of bisphenol A induced histopathological alterations and inflammatory gene expression in lungs of male Wistar rats", *Human Exp. Toxicology*, vol.40(3), pp.538-549, 2020.
- [152] B. Nehru, P. Anand, "Oxidative damage following chronic aluminium exposure in adult and pup rat brains" *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, vol. 19(2-3), pp. 203–208, 2005.
- [153] C.H. Guo, C.J. Huang, Y.L. Chiou, G.S. W. Hsu, "Alteration of trace element distribution and testis ACE activity in mice with high peritoneal aluminum", *Biological Trace Element Research*, vol. 86, no.2, pp. 145-157, 2002.

- [154] J. Chmielnicka, M. Nasiadek, "Tissue distribution and urinary- excretion of essential elements in rats orally exposed to aluminum-chloride", *Biological Trace Element Research*, vol. 31, no.2, pp. 131-138, 1991.
- [155] R.J. Ward, Y. Zhang, R.R. Crichton, "Aluminium toxicity and iron homeostasis" *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 87(1-2), pp. 9-14, 2001.
- [156] A.V.Panov, L. Andreeva, J.T. Greenamyre, "Quantitative evaluation of the effects of mitochondrial permeability transition pore modifiers on accumulation of calcium phosphate: comparison of rat liver and brain mitochondria", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 424, no.1 pp. 44-52, 2004.
- [157] D.A. Vatter, K. Shetty, "Biological functionality of ellagic acid: A review", *Journal of Food Biochemistry*, vol. 29, no.3, pp. 234-266, 2005
- [158] L. Dundera, M. H. Lejonklou, L. Lind, U. Risérus, P. M. Linda, "Low-dose developmental bisphenol A exposure alters fatty acid metabolism in Fischer 344 rat offspring", *Environmental Research*, vol. 166, pp. 117–129, 2018.
- [159] K. Sakurai, M. Kawazuma, T. Adachi, T. Harigaya, Y. Saito, N. Hashimoto, C. Mori "Bisphenol A affects glucose transport in mouse 3T3-F442A adipocytes", *British Journal of Pharmacology*, vol. 141, no. 2, pp. 209-14, 2004.
- [160] J. Wang, B. Sun, M. Hou, X. Pan, X. Li, "The environmental obesogen bisphenol A promotes adipogenesis by increasing the amount of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in the adipose tissue of children", *international journal of obesity*, vol. 37, no. 7, pp. 999-1005, 2013.
- [161] P. Alonso-Magdalena, S. Morimoto, C. Ripoll, E. Fuentes, A. Nadal, "The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance", *Environ Health Perspect*, vol.114(1), pp.106-12, 2006.
- [162] A. Marmugi, S. Ducheix, F. Lasserre, A. Polizzi, A. Paris, N. Priymenko, et al. "Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver", *Hepatology*, vol. 55, no.2, pp. 395-407, 2012.