

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA PB ASETATA BAĞLI KARACİĞER TOKSİSİTESİNDE
NARİNGİNİN MUHTEMEL KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI:
DENEYSEL BİR ÇALIŞMA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEHMET FATİH ALTINDAL

DANIŞMAN
DOÇ. DR. YUSUF ÖZAY

ADİYAMAN, 2025

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA PB ASETATA BAĞLI KARACİĞER TOKSİSİTESİNDE
NARİNGİNİN MUHTEMEL KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI:
DENEYSEL BİR ÇALIŞMA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MEHMET FATİH ALTINDAL

DANIŞMAN
DOÇ. DR. YUSUF ÖZAY

ADİYAMAN, 2025

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen TIPFYL\2024-001 nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

RATLARDA PB ASETATA BAĞLI KARACİĞER TOKSİSİTESİNDE NARINGİNİN MUHTEMEL KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI: DENEYSEL BİR ÇALIŞMA

Mehmet Fatih ALTINDAL

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Adıyaman Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Eylül/2025, Sayfa: 91

Danışman: Doç. Dr. Yusuf ÖZAY

Pb çevresel bir toksin olarak günlük hayatımızın her evresinde karşımıza çıkmaktadır. Pb ihtiva eden maddeler canlılar üzerinde birçok zararlı etkiye sahiptir. Doğal bir bileşik olan naringin birçok bitkinin yapısında yer almaktadır. Naringinin hayvan metabolizması üzerine antioksidan, antikanserojen ve antilipidemik gibi birçok faydalı etkileri vardır. Bu çalışmada, Pb asetata maruz kalan Rat karaciğer dokularında naringinin lipit peroksidasyon, Pb düzeyleri ve karboksil esteraz enzim aktiviteleri üzerine etkileri, Enzimatik aktivasyon ve Non-enzimatik aktivasyonların tayini, Biyokimyasal bulgular, Element analizleri, Histolojik bulgular, Gen ekspresyonları ile İmmünohistokimyasal bulgulardan NF- κ B ve Tnf- α 'nın ekspresyon düzeyleri araştırıldı. Çalışmada Kontrol gurubu (K), Pb asetat (P) gurubu, Naringin (N) gurubu ve Pb asetat + Naringin (PN) gurubu oluşturuldu. Her grupta yetişkin 7 erkek Rat olmak üzere 28 erkek Rat kullanıldı. Naringinin gün aşırı orogastrik olarak 40 mg/kg düzeyinde uygulamaları yapıldı. Ratların karaciğer dokularında malondialdehit (MDA), Pb düzeyleri ve CaE enzim aktivite düzeyleri, NF- κ B ve Tnf- α düzeyleri, ALT ve AST değerleri, Karaciğer dokusundaki histopatolojik değişiklikler, mineral madde düzeylerinin tespiti yapıldı. P grubu MDA düzeyi K grubuna göre arttı ($p<0.001$). P grubu MDA düzeyinin ise PN grubunda azalmanın olduğu gözlemlendi ($p<0.01$). P grubu Pb düzeyi diğer gruplara göre en yüksek düzeyde tespit edildi ($p<0.001$). K grubu CaE enzim aktiviteleri P grubuna göre nispi azalma olduğu gözlenirken ($p>0.05$), PN grubu CaE enzim aktivitesi P grubuna göre arttığı tespit edildi ($p<0.001$). Karaciğer NF- κ B ve Tnf- α mRNA ekspresyon düzeyleri Real Time PCR ve immunhistokimya ile belirlenmiştir. Buna göre mRNA ekspresyon ve immunhistokimya düzeyleri naringin verilen gruplarda azaldığı, Pb grubunda ise arttığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, Pb asetatin oluşturduğu oksidatif strese karşı naringinin karaciğer dokularında koruyucu etkileri olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Pb asetat; Naringinin; NF- κ B; Tnf- α ; Karboksil esteraz

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE POSSIBLE PROTECTIVE EFFECT OF NARINGIN AGAINST LEAD ACETATE-INDUCED LIVER TOXICITY IN RATS: AN EXPERIMENTAL STUDY

Mehmet Fatih ALTINDAL

Department of Medical Biology,

Adiyaman University, Graduate Education Institute, September/2025, Page: 91

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Yusuf ÖZAY

Lead, an environmental toxin, is encountered in every aspect of our daily lives. Substances containing lead have numerous harmful effects on living organisms. Naringin, a natural compound, is found in the structure of many plants. Naringin has numerous beneficial effects on animal metabolism, including antioxidant, anticarcinogenic, and antilipidemic effects. In this study, the effects of naringin on lipid peroxidation, lead levels, and carboxyl esterase enzyme activities in rat liver tissues exposed to lead acetate were investigated. Enzymatic and non-enzymatic activation was determined by biochemical findings, Elemental analyses, Histological findings, Gene expression, and Immunohistochemical findings, including the expression levels of NF- κ B and Tnf- α . The study consisted of a Control (K), Lead acetate (P), Naringin (N), and Lead acetate + Naringin (PN) groups. Twenty-eight male rats, 7 adult male rats in each group, were used. Naringin was administered orogastrically at 40 mg/kg every other day. Malondialdehyde (MDA), Pb levels, CaE enzyme activity levels, NF- κ B and Tnf- α levels, ALT and AST values, histopathological changes in liver tissue, and mineral substance levels were determined in the rats' liver tissues of rats. MDA levels in group P increased compared to group K ($p < 0.001$). It was observed that the MDA level in the P group decreased in the PN group ($p < 0.01$). The Pb level in the P group was found to be the highest compared to the other groups ($p < 0.001$). While a relative decrease in CaE enzyme activities was observed in the K group compared to the P group ($p > 0.05$), the CaE enzyme activity in the PN group was found to increase compared to the P group ($p < 0.001$). Liver NF- κ B and Tnf- α mRNA expression levels were determined by Real Time PCR and immunohistochemistry. Accordingly, mRNA expression and immunohistochemistry levels were found to decrease in the naringin-administered groups and to increase in the Pb group. As a result, we think that naringin has protective effects on liver tissues against oxidative stress caused by lead acetate.

Keywords: Lead acetate; Naringin; NF- κ B; Tnf- α ; Carboxyl esterase

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve bu çalışmanın her aşamasında, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, akademik kişiliği ve çalışma prensipleri ile bana örnek olan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyacağım değerli danışmanım Doç. Dr. Yusuf ÖZAY' a, Histolojik incelemelerde emeği geçen Histoloji anabilim dalında görevli Dr. Öğr. Üyesi Ahmet TÜRK'e teşekkür ederim. Her ne kadar Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı olsada kendisi bir abla, bir akıl hocası olan değerli hocam Prof. Dr. Deniz TAŞTEMİR KORKMAZ'a, bir diğer yüksek lisans yol arkadaşımız ablamız Uzman Biyolog Ayşegül ACET'e teşekkürlerimi bir borç bilirim. Tez yazım aşamasında teknik bilgisi ile yanımda olan Uzman Veteriner Hekim Halil CİNOĞLU'na şükranlarımı sunarım.

Deneysel çalışmalarda ve laboratuvar analizlerinde desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen akademik kişiliği ve çalışma prensipleri ile bana örnek olan, başladığımız işi yarım bırakmamayı tekrardan hatırlatan, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyacağım Adıyaman Üniversitesi Teknik Bilimleri Meslek Yüksek Okulu Kimya ve Kimyasal İşleme Teknolojileri Bölümünde görevli değerli hocam Doç. Dr. Ahmet ÖZKAYA' ya şükranlarımı canı gönülden bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana desteklerini esirgemeyen, yorulduğumda destek olan, değerli eşim Seda ALTINDAL 'a, kıymetlilerim canımdan bir parçalarım olan kızlarım Nida ALTINDAL ve Elif Neva ALTINDAL 'a teşekkürlerimi sunarım. İyi ki varsınız...

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi, bu çalışmanın Adıyaman Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

.....

Mehmet Fatih ALTINDAL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Pb Asetat	3
2.2. Naringinin Genel Özellikleri, Doku ve Organlarda Emilimi / Birikimi	5
2.2.1. Naringinin kimyasal formülü	6
2.3. Karaciğer Dokusu	7
2.3.1 Karaciğer anatomi ve fizyolojisi	7
2.3.2 Karaciğerin fonksiyonları	8
2.3.3 Karaciğerin hasara karşı yanıtı	9
2.3.4 Rat karaciğer anatomisi	9
2.4. Enzim Fonksiyonları.....	10
2.4.1. Glutasyon (GSH) fonksiyonları.....	10
2.4.2.Glutasyon-S-transferaz (GST) enziminin fonksiyonları.....	11
2.4.3.Karboksil esteraz (CaE) enziminin fonksiyonları.....	12
2.4.4.Asetilkolinesteraz (AChE) enziminin fonksiyonları	12
2.4.5.Malondialdehit (MDA) özellikleri	12
2.4.6.Glutasyon redüktaz (GR) enziminin fonksiyonları.....	12
2.4.7. Aspartat aminotransferazlar (AST)-Alanin aminotransferaz (ALT) enzimleri.....	13
2.5. Element Özellikleri	14
2.5.1.Demir (Fe) özellikleri	14

2.5.2.Çinko (Zn) özellikleri	14
2.5.3. Bakır (Cu) özellikleri	15
2.5.4. Magnezyum (Mg) özellikleri	15
2.5.5. Manganez (Mn) özellikleri	16
2.5.6. Kalsiyum (Ca) özellikleri.....	17
2.6. Nuclear factor kappa b (NF-κB) özellikleri.....	17
2.7. Tümör nekrozis faktör alfa (Tnf-α) özellikleri.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Kullanılan Araç-Gereçler ve Kimyasallar.....	21
3.1.1. Araç-gereçler	21
3.1.2. Kimyasallar.....	22
3.2. Yöntemler	22
3.2.1. Etik kurul kararı.....	22
3.2.2. Deney hayvanlarının temini ve beslenmeleri.....	22
3.2.3 Deney gruplarının oluşturulması.....	23
3.2.4. Deneyin sonlandırılması ile doku ve serum örneklerinin alınması	23
3.2.5. Biyokimyasal testler	24
3.2.5.1. Toplam protein tayini.....	25
3.2.5.2. Enzim aktiviteleri tayini.....	25
<i>Glutasyon S-transferaz (GST) aktivitesi</i>	25
<i>Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi</i>	26
<i>Karboksil esteraz (CaE) tayini</i>	26
<i>Asetilkolinesteraz (AChE) tayini</i>	27
<i>Aspartat aminotransferans (AST) ve Alanin aminotransferans (ALT) tayini</i>	27
3.2.5.3. Non-enzimatik aktiviteler tayini	27
<i>Malondialdehit (MDA) tayini</i>	27
<i>Glutasyon (GSH) tayini</i>	28
3.2.6. Histolojik analizler	28
3.2.7. İmmünohistokimyasal analizler.....	29
3.2.8. Element analizler.....	30
3.2.8.1. Örneklerin çözünürleştirilmesi	30
3.2.9. Gen ekspresyonu	32
3.2.9.1. RNA izolasyonu	35

3.2.9.2. cDNA eldesi	36
3.2.9.3. Real Time PCR	36
3.2.10. İstatistiksel analiz	39
4. BULGULAR	41
4.1. Biyokimyasal Bulgular	41
4.1.1. Oksidatif stres parametreleri	41
4.1.2. Rat serum biyokimya parametreleri	41
4.2. Histolojik Bulgular	44
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	50
4.3.1. Karaciğer dokusunda NF-κB düzeyi	50
4.3.2. Karaciğer dokusunda Tnf-α düzeyi	52
4.4. Element Analiz Bulguları	54
4.5. Gen Ekspresyon Bulguları	57
4.5.1. Naringinin NF-κB gen ekspresyon düzeyine etkisi	57
4.5.2. Naringinin TNF α gen ekspresyon düzeyine etkisi	57
5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	59
5.1. Tartışma	59
5.2. Sonuç ve Öneriler	66
KAYNAKÇA	68
EKLER	
ÖZ GEÇMİŞ	

TABLÖLER DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3. 1. Histolojik inceleme serisi	29
Tablo 3. 2. HR CS-FAAS cihaz verileri	31
Tablo 3. 3. Kalibrasyon verileri	31
Tablo 3. 4. Thermo high-capacity cDNA reverse transcription kiti	36
Tablo 3. 5. cDNA reaksiyon ısıları	36
Tablo 3. 6. Real Time PCR reaksiyonu	37
Tablo 3. 7. Sıcaklık koşulları	37
Tablo 3. 8. Primer dizinler Tnf, mRNA.....	38
Tablo 3. 9. Primer dizinler Nfkb1- mRNA (Gene ID NM_001415012.1)	38
Tablo 3. 10. Primer dizinler Gapdh, mRNA	39
Tablo 4. 1. Karaciğer dokusu biyokimyasal parametreleri	42
Tablo 4. 2. Rat serum ALT ve AST seviyeleri	44
Tablo 4. 3. Histopatolojik skorlama.....	45
Tablo 4. 4. NF-κB Histoskoru	50
Tablo 4. 5. Tnf-α histoskoru	52
Tablo 4. 6. Karaciğer dokusu metal düzeyleri	55
Tablo 4. 7. TNF α ve NFκB mRNA seviyeleri.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2. 1. Sağlık üzerine Pb'nin etkileri (Kaynak: Özbolat ve Tuli, 2016)	5
Şekil 2. 2. Naringinin kimyasal formülü (Kaynak: Pari ve Amudha, 2011)	7
Şekil 2. 3. Rat karaciğerinin viseral yüzden görünümü (Kaynak: Maynard ve Downes, 2019).....	10
Şekil 2. 4. GSH-GSSG geri dönüşümü (Kaynak: Anjaneyulu vd., 2008).	11
Şekil 2. 5. Naringin, RAGE/NF-κB'nin tetiklediği inflamasyonu döngüsü (Kaynak: Syed vd., 2020).....	18
Şekil 3. 1. Ratlara gavaj yolu ile naringinin verilmesi.....	24
Şekil 3. 2. Ratlarda portal ven yoluyla kan alınması.....	24
Şekil 3. 3. Rat karaciğerinin alınması.....	24
Şekil 3. 4. LC96 Cihazı	32
Şekil 3. 5. Nanodrop spektrofotometre	32
Şekil 3. 6. Hettich Mikro 200 R Mikro santrifüj	33
Şekil 3. 7. T100 Termal döngü cihazı	33
Şekil 3. 8. TNFalfa erime eğrisi	34
Şekil 3. 9. Nfkb erime eğrisi	34
Şekil 3. 10. Gapdh erime eğrisi	34
Şekil 4. 1. Karaciğer dokusu biyokimyasal parametreleri (ortalama±SD).....	43
Şekil 4.2. Rat serum AST ve ALT parametreleri (ortalama±SD).	44
Şekil 4. 3. Kontrol grubu rat karaciğer histolojik görüntüsü.....	46
Şekil 4. 4. Naringinin grubu rat karaciğer histolojik görüntüsü.....	46
Şekil 4. 5. Pb asetat grubu rat karaciğer histolojik görüntüsü (A-D)	47
Şekil 4. 6. Pb+naringin grubuna ait rat karaciğer dokusunun farklı büyütmelerdeki histolojik görüntüleri.	48
Şekil 4. 7. Tüm gruplara ait ratların karaciğer histolojik görüntüsü (A-D).....	49
Şekil 4. 8. Tüm rat grubunun karaciğer dokusunda NF-κB immünreaktivitesi histolojik görüntüsü (A-D)	51
Şekil 4. 9. Tüm grubu rat karaciğer dokusunda Tnf-α immünreaktivitesi histolojik görüntüsü (A-D)	53
Şekil 4. 10. Karaciğer dokusundaki metal seviyeleri (ortalama±sd, µg/g).	56

Şekil 4. 11. Karaciğer dokusu NF-κB ve TNF α gen ekspresyonu parametreleri (ortalama±sd).....	58
---	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AChe	: Asetilkolinesteraz
ALT	: Alanin Aminotransferaz
AST	: Aminotransferaz
Bcs	: Biyofarmasötik Sınıflandırma
Ca	: Kalsiyum
CaE	: Karboksil Esteraz
CAT	: Katalaz
Dmt1	: İki Değerlikli Metal Taşıyıcı 1
Fe	: Demir
GR	: Glutasyon
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
GST	: Glutasyon-S-Transferaz
Hb	: Hemoglobinin
Hem	: Hemoglobinde Bulunan Demirli-Porfirin Protein
MDA	: Malonaldehit
Mg	: Magnezyum
Na	: Sodyum
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

Pb	: Kurşun
Rbc	: Kırmızı Kan Hücreleri Olan Eritrosit
Res	: Retiküloendotelyal Sistem
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
ROÜ	: Reaktif Oksijen Ürünleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz



1.GİRİŞ

İnsanoğlu yıllarca kimyasal içerikli ilaçların dışında, bitkisel kaynaklı bileşiklerden faydalanılarak yeni tedavi yöntemleri için çabalamıştır. Pek çok bilimsel çalışma, küresel sanayi sektörünün de ilgisini çekerek, bitkisel kaynaklı ilaçların yeni tedavi edici maddeler olarak pazara sunulmasının önünü açmıştır. Bitkisel bileşiklerin bulunabilirliği, etkinliği ve güvenliği nedeniyle son araştırmalar bitki kaynaklı biyoaktif bileşiklere eğilimin olduğu görülmüştür. İncelemeler doğrultusunda; kanser tedavisinde, yara iyileşmesinde, ağır metala sürekli mağruz kalınan durumlarda, karaciğer yağlanmalarında, karaciğer hastalıklarında, böbrek hastalıklarında, beyin-sinir sistemi iletim mekanizmalarının çalışma sistemlerinde olumlu katkıların var olup olmadığına odaklanılmıştır (Habibi vd., 2020; Shokrzadeh vd., 2013).

Flavonoidler; bitkisel içerikli bileşenlerden elde edilmektedir. Flavonoidlerin turunçgiller de bol miktarda bulunması, sağlığa faydalı rolünü üstlenmesi nedeniyle turunçgillerin üretiminde de önemli bir artış olduğu bildirilmiştir (Pereira Gonzatto, 2023; Rauf vd., 2022). Flavonoid ailesinden olan naringin (naringenin-7-O-rhamnoglukoze), flavonon glikozit ailesine aittir (Zeng vd., 2020). Naringin'in çok sayıda bilinen farmakolojik ve biyolojik aktivitesi bulunmaktadır. Canlı sistemler, içsel aracı maddelere (endojen medyatörler) yanıt olarak antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik gibi bir dizi tepki üretme kabiliyetine sahiptir. Bu yetenek, onlara fizyolojik bir avantaj sağlar (Bayram vd., 2023; Bi vd., 2016; Shilpa vd., 2023; D. Wang vd., 2017). Yapılan çalışmalarda nörodejenerasyona (Emran vd., 2022), astıma (Shi vd., 2019), epatotoksisteye (İleriturk vd., 2024), tardif diskineziye (Adebiyi ve Owira, 2017) ve güçlendirilmiş bağ dokusuna karşı koruyucu potansiyelinin olduğu gösterilmektedir (Cheng vd., 2023). Antikanser, anti-tümör, antioksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik, antiviral, analjezik, kardiyak ve nöroprotektif aktiviteleri açısından da kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır (Alam vd., 2022). Hali hazırda insanlar uzun yıllar boyunca besin takviyesi olarak üzüm ve turunçgiller tüketerek naringin almaktadırlar (Choe vd., 2001). Naringin antioksidan, metal şelatlayıcı ve serbest radikal temizleyici özelliklerine de sahiptir (Yuting vd., 1990). Naringin, lipid peroksidasyonuna ve mutageneze karşı koruma sağlamada da önemli bir işleve sahiptir (Francis, Shetty ve Bhattacharya, 1989). Klinik öncesi araştırmalardan elde edilen bulgular, naringinin sepsis ilişkili organa özgü yaralanmalarda, örneğin bağırsak

yaralanmasında (Li vd., 2021), kalp yaralanmasında (Sun vd., 2021) ve akciğer yaralanmasında (Zhang vd., 2022) koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmektedir.

Dünya üzerinde artan insan sayısı ile sanayi ürünlerine talep daha fazla olmuştur. Doğal yaşam alanlarının tahrip olması ve doğal flora'nın bozulması ile organizmaların çevre kirleticilerine maruz kalması engellenemez hale gelmiştir (Biser vd., 2004). Günümüzde en çok mağruz kalınan ağır metaller Pb, cıva ve kadmiyum dur. Bu ağır metaller belirli biyolojik fonksiyonlarda ve enzimatik reaksiyonlarda önemli bir rol üstlenirler. Organizmada yüksek seviyelerde bulunduklarında, fizyolojik sistemde dengesizliklere, bozukluklara ve bağışıklık sistemini bloke etmeye varacak güce erişebilmektedirler. Ağır metal veya polimetallik maddelere maruz kalan kişilerde bağışıklık sistemleri ciddi bir şekilde etkilenmektedir. Bunlardan bazıları akciğer, cilt, dalak ve karaciğerin çeşitli tümörlerinin Ağır metal ile bağlantısı olduğu düşünülmektedir (Bishayi ve Sengupta, 2006). Pb, Fe, Zn, Cu ve Mn gibi bazı metaller ve metaloidler, küçük dozlarda bile vücut işlevleri için temel öneme sahiptir. Bu metallerin terapötik miktarları aştıklarında, zehirlenmeye bağlı hasarlara neden olurlar bu doğrultuda kendileri için olmayan protein bölgelerine bağlanarak, orijinal metalleri doğal bağlanma bölgelerinden uzaklaştırır ve hücrelerin işlev bozukluğuna neticede toksisiteye neden olurlar (Shah, 2017). Karbonhidratlara, proteinlere ve nükleik asitlere verilen oksidatif hasar, esas olarak metallerin ve metaloidlerin DNA ve nükleer proteinlere bağlanmasından dolayı oluşan hasarlardır (Bishayi ve Sengupta, 2006; Shah, 2017).

Bu çalışmamızda Pb'na maruz kalmış rat karaciğer doku yapı taşlarındaki antioksidan enzim seviyeleri, biyokimyasal parametreler, gen ekspresyon düzeyleri ve immünohistopatolojik analizleri üzerine naringinin koruyucu etkinliği araştırıldı.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Pb Asetat

Yoğunluğu 5'in üzerinde olan ağır metallere örnek olarak Pb, Ni, Cu, Ag, Au, Fe, Zn, Cr, Co, Cd ve Hg verilebilir. Hg, Cd, Pb, Cr ve Ar gibi ağır metaller önemli biyolojik toksisiteye sebep olarak toksik kirletici görevini üstlenirler. Pb'nin bağışıklık sistemine oldukça olumsuz etkileri vardır (Bishayi ve Sengupta, 2006).

Tüm metaller ve yarı metaller arasında Pb, birçok yerde temas edilmesi ve doğada yarılanma ömrü nedeniyle son derece tehlikelidir (Wani vd., 2015). Endüstriyel alanda aşırı miktarda kullanımı nedeniyle, Pb seviyeleri kontrol edilemez seviyede yüksek olup ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. İnsan vücudunda Pb toksisitesinden etkilenmeyen neredeyse hiçbir doku ve organ yoktur. Bu toksisitenin şekillenmesinde taşıyıcı faktör olan kanın, hem yapısında bulunan bağışıklık hücreleri ile teması hemde kanın vücudumuzdaki farklı lenfoid organlarında bulunan bağışıklık hücreleriyle temas etmesi Pb veya arsenik gibi metallerin daha kolay taşınıp toksisite oluşturmaya gözlenmektedir (Li vd., 2021).

Pb, karaciğer, beyin, testis ve böbrekler gibi önemli organların çalışmasında olumsuz etkiye yol açmakta ve kötü huylu tümörlere neden olabilmektedir. Pb vücutta emiliminin ardından; hepatik konjugasyona uğrayıp böbrekler tarafından alınarak az miktarı idrar yoluyla atılır, büyük kısmı ise karaciğer gibi çok önemli organda birikir (Fan vd., 2020).

Pb; hücresel hasar, nekroza ve organ hasarlarının olduğu sinyal yollarına nüfuz ederek oksidatif strese ve inflamasyon, serbest radikal üretimine sebep olmaktadır. Bu doğrultuda değişen sitokin aktivitesi, DNA hasarı, oksijen kullanımının zayıflaması, lipid peroksidasyonunun, protein oksidasyonunun ve apoptozun açığa çıkması ile şekillenmektedir (Bhattacharjee vd., 2021; Mutlu vd., 2021).

Hücrelerdeki Pb zehirlenmesinde, kurşun iyonları (Pb^{2+}), Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ ve Fe^{2+} gibi temel iyonların bağlandığı noktalarda rekabet ederek onların yerini alır. Ortamda çok fazla kurşun olduğunda, bu kurşun iyonları, normalde bu faydalı katyonların bağlanması gereken yerlere bağlanır. Bu durum, hücrenin doğal iyon dengesini ve hücresel metabolizmasını ciddi şekilde bozar, çünkü gerekli olan iyonlar görevlerini yapamaz. Böyle bir sistemin oluşması ile hücre yapışması, hücre iletişimi ve olgunlaşması, protein katlanması, iyonik taşıma, apoptozis nörotransmitter salınımı ve enzim kontrolü gibi çeşitli hücre yollarında geri dönülmez bir etki oluşturur. Pb'un çok düşük konsantrasyonun da bile beyin hafıza

depolamasını yöneten protein kinaz C'yi değiştirerek Ca 'nın yerini alabildiği gösterilmektedir (Wani vd., 2015).

Günümüzde Pb ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda göstermiştir ki; Pb etkisinin vücuttaki birçok organı etkilediği (kemik, böbrek, akciğer, diş, karaciğer, dalak ve beyin) bilinmektedir (Deveci, 2006). Çalışma alanlarında maruz kalınan Pb zehirlenmeleri durumlarında solunum yoluyla emiliminin, diğer perkütan, yutma ve transdermal yollardan daha hızlı ve kesintisiz olduğu bildirilmiştir (Ericson vd., 2016).

Ağır metal olan Pbun tehlike arz etmesinin sebebi, vücuttan atılımının yavaş olmasıdır. Pb, kan plazmasından geçerek yumuşak dokulara ve oradan organlara kolayca nüfus eder. Doku ve organlarının çoğu için toksiktir ve metabolizmayı hücreler olarak işleviz bırakmaktadır (Usman vd., 2020).

Alwaleedi'ye göre, kurşun (Pb) insan vücuduna başlıca üç yolla girer; Deri: Doğrudan temasla ciltten emilir. Solunum: Kurşunlu toz veya buharların solunmasıyla akciğerlerden alınır. Sindirim: Kirlenmiş yiyecek, su veya ellerin ağza götürülmesiyle sindirim sisteminden emilir. Kandaki Pb seviyesinin 40 ug/dL üzeri olması toksisite seviyesinin yüksek düzeyde olabileceği kabul edilmektedir (Alwaleedi, 1970). Bağırsaklardan ve akciğerlerden emildikten sonra kan dolaşımına giren Pb'nin bir yetişkinin kanındaki yarılanma ömrü ortalama 28-36 gündür. Pb'nin kan plazmasına %1 lik, ise kırmızı kan hücrelerine %99'u bağlanır daha sonra vücutta dolaşarak organ hasarı ve doku hasarlarına neden olmaktadır (Lotfi ve Baghshani, 2016).

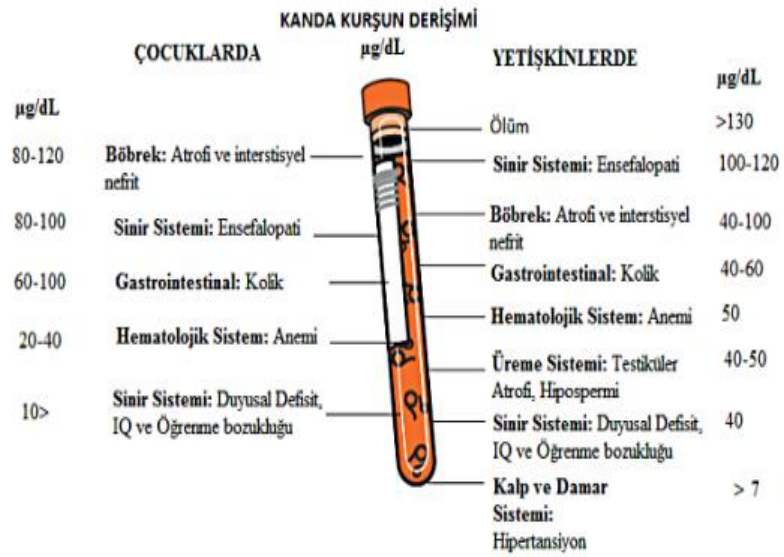
Pb, duodenum tarafından DMT1 yoluyla emilir ve burada eritrosit proteini ile birleşip daha sonra dokulara ve organlara yayılır (Garcia-Nino ve Pedraza-Chaverri, 2014). Emilen Pb'nin ortalama üçte biri hepatik konjugasyona bağlı olarak karaciğerde depolanır. Geri kalan kısmı ise böbrekler ve son olarak kalan miktar çeşitli dokularda ve organlarda birikerek biyomoleküllerde (DNA, lipid, protein, RNA) hasara, hücre hasarına ve hücre apoptozisine neden olur (Flora ve Saxena, 2006).

Kurşun (Pb) Toksisitesinin Hedefleri kurşun vücuda girdiğinde, özellikle kan yapımında rol alan enzimler ile antioksidan savunma sistemimizin önemli bileşenlerini hedef alır. Bu hedefler arasında glutatyon, katalaz, glutatyon peroksidaz, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler bulunur. Ayrıca tiyol içeren diğer antioksidanlar ve genel olarak oksidatif süreçlerde görev alan enzimler de kurşunun zarar verdiği noktalar arasındadır. Kısacası, kurşun vücudun savunma mekanizmalarını zayıflatarak hasara yol açar. (Fan vd., 2020; Ince, Curabeyoğlu, ve Akyol, 2019). Kandaki

düşük Pb konsantrasyonları bile oksidatif enzimlerin etkisini engelleyerek oksidatif strese yol açar (Nemsadze vd., 2009; Dos Santos vd., 2016).

Pb oksidasyonunun başlıca biyobelirteci lipid peroksidasyonudur (El-Boshy vd., 2019; G. Flora, Gupta, ve Tiwari, 2012; Kianoush vd., 2013). Oluşan serbest reaktif oksijen türleri hücre içi lipidlerden elektronları yakalayarak hücrel hasara yol açar. Pb hemoglobinin oksidasyonunu başlatır bunu sonucunda kırmızı kan hücrelerinin hemolizine sebep olur (G. Flora, Gupta, ve Tiwari, 2012).

2010 yılında, Kuzey Batı Nijerya'daki Zamfara Eyaletindeki Pb kontaminasyonu salgınının ardından, akut Pb zehirlenmesi nedeniyle tahmini dört yüz çocuğun öldüğü bildirilmiş ve diğer birçok kişinin ortalama kan Pb seviyelerinin 149 µg/dL'nin üzerinde çıkması ile uzun süre nörobilişsel hasarlar ortaya çıkmıştır (Tirima vd., 2016). Nüfusunun fazla olduğu Hindistan'da ise 275 milyondan fazla çocuk Pb zehirlenmesinin hafif ile şiddetli etkilerine maruz kalabilmektedir (Rees ve Fuller, 2020).



Şekil 2. 1. Sağlık üzerine Pb'nin etkileri (Kaynak: Özbolat ve Tuli, 2016)

2.2. Naringinin Genel Özellikleri, Doku ve Organlarda Emilimi / Birikimi

Naringin, biyolojik sistemlerde çeşitli faydalı etkilere sahip bir bileşiktir. Başlıca etkileri arasında antioksidan, anti-apoptotik (hücre ölümünü engelleyici) ve anti-inflamatuar (iltihap önleyici) özellikler bulunur. Buda naringinin hücreleri koruma, iltihaplanmayı

azaltma ve genel sağlığı destekleme potansiyeline sahip olduğunu gösterir. (Alam vd., 2022). Naringin, ilaçların biyofarmasötik sınıflandırmasına göre IV. sınıf ilaç grubuna aittir.

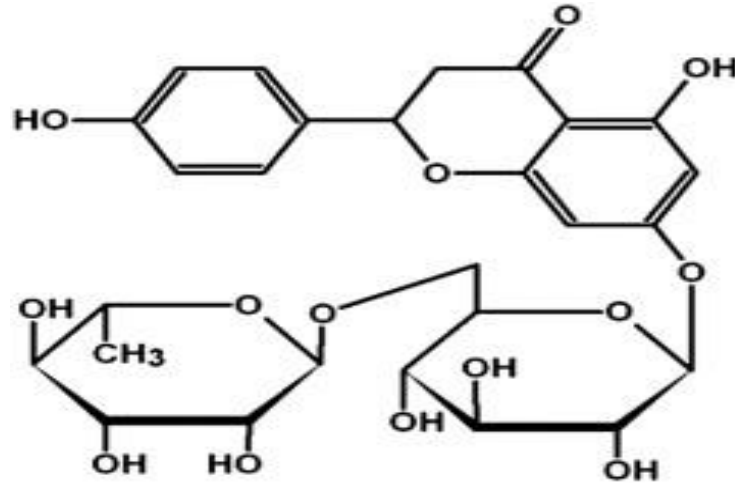
Oral yoldan uygulanması ile ilk emilim bağırsaklarda gerçekleşmektedir. Naringinin metabolizması bağırsakta bulunan bakteriler tarafından etkilenmektedir. Naringinin enzimatik bölünme için bağırsaktaki mikrobiyal faaliyete maruz kalması sonucunda, naringinazın ramnosidaz enziminin etkisiyle purin ve ramnoza hidrolize edilir. Midede, naringinazın bd-glikozidaz bileşeni tarafından naringenin ve glikoza daha fazla hidrolize edilmesi bağırsak florası tarafından emilmesi ile sonuçlanır.

Bulgular, naringinin farmakokinetik değerlendirmesinin, öğünlerde yüksek yağlı diyetlerden sonra etkilendiğini bilinmektedir (Rivoira vd., 2021; Yang vd., 2022). Yaşlanma, cinsiyet ve türler arasındaki farklılıklar, naringinin farmakokinetik süreçlerini etkileyebilecek faktörlerdendir. Yaşlı ratlara 42 mg/kg dozda saf naringin uygulanması Tmax'ı geciktirmiştir. Yaşlı ratlarda naringinin gastrointestinal'de uzun süre kalması nedeniyle $t_{1/2}$, Cmax ve AUC değerleri yetişkinlere kıyasla iki kat daha uzun sürede olmuştur, tam emilimde ise dokulardaki (akciğerler ve trakea) dağılımının artmasına veya metabolizmasının ve absorpsiyonunun azalmasına neden olduğu gözlenmiştir (Yang vd., 2022).

Türlere özgü, kilo veya vücut hacim alanına bağlı olarak metaboizmaya alınan naringinin plazmada ve mide/bağırsak sistemi emiliminde değerşkenlikler göstermesine sebep olmaktadır (Yang vd., 2022).

2.2.1. Naringinin kimyasal formülü

Naringin, turunçgillerde faza miktarda bulunan konformasyonel ve yapısal konfigrasyonundan da anlaşılacağı üzere güçlü bir biyoflavonoiddir. Naringin, C-7 pozisyonundaki aglikon kısmına bağlanan iki ramnoz gurubundan oluşur (Alam vd., 2022). Naringinin (4, 5, 7-trihidroksiflavanon-7- ramnoglukozid) ilk olarak 1928 yılında Inubuse ve Asahina tarafından tanımlanmıştır. Moleküler formülü $C_{27}H_{32}O_{14}$ 'tür ve moleküler kütlesi 580,4 g/mol'dür (Ghanbari-Movahed vd., 2021) (şekil 2.2).



Şekil 2. 2. Naringinin kimyasal formülü (**Kaynak:** Pari ve Amudha, 2011)

Domates, greyfurt, bergamot, ekşi portakal, üç yapraklı portakal, kumkuat limon, mandalin gibi turuncgiller ile *Citrus medica l.* ve *Citrus aurantium* gibi Çin otları naringinin en zengin olduğu kaynaklarıdır. Naringinin en yüksek içeriği, turuncgil meyvelerinin meyve suyunda ve çekirdeklerinde ihtiva edilir (Alam vd., 2022; Ghanbari-Movahed vd., 2021; Shilpa vd., 2023). Örneğin greyfurt çekirdeklerinde (517,2 g/ml), kabuğunda ise 29,2 g/ml yüksek miktarda naringin içerir (Shilpa vd., 2023).

2.3. Karaciğer Dokusu

2.3.1 Karaciğer anatomi ve fizyolojisi

Karaciğer vücudumuzdaki en büyük organdır. Karının üst kısmında yer almaktadır. İnsanlar da karaciğer ağırlığı 1300-1500 gr arasında değişmektedir. Karaciğer dokusu iki büyük ve iki küçük lobtan oluşur. Diğer karın boşluğunda yer alan organlar ile etkileşimde bu bölümler önemli yere sahiptir. Sağ lob toplam karaciğerin %50-70 hacmini oluşturmaktadır (Canbaz, 2018). Karaciğerin klinik bulguları değerlendirilirken yoğunluğu, kenarlarının keskinliği, yüzeyinin pürüzsüzlüğü ve solunum esnasındaki hareketlerine bakılmaktadır. Karaciğerin yüzeyi keskin sınırlarla ayrılmamıştır, göğüs açıldığında ilk önce karaciğerin ön yüzü karşımıza çıkar ve Glisson kapsülü dediğimiz fibröz bağ dokusundan oluşan yapı ile sarılı olduğu gözlemlenir.

Karaciğer parankimini polihedral olarak nitelendirilen hepatositler 1-2 nükleosu olan, hücrelerden oluşur. Mikroskop altında incelendiğinde, karaciğer hücreleri olan hepatositler, poligonal (çokgen) bir şekle sahiptirler. Bu hepatositler, genellikle bir araya gelerek

gruplaşmış yapılar oluştururlar ve bu gruplar karaciğer lobulu olarak adlandırılır. Karaciğerin yapısal ve fonksiyonel çekirdeğini oluşturan lobüller, organın kompleks faaliyetlerinin düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Karaciğerin işlevsel birimi olan hepatositler, endokrin ve ekzokrin hücreleridir. Sinüzoid boşluklar etrafında anastomoz yaparak hücre dizileri oluştururlar. Işık mikroskobunda, bu çok köşeli hücrelerin merkezinde yuvarlak çekirdekleri net bir şekilde görülür.

Sinüzoidler, karaciğerde bulunan, endotelial hücrelerden oluşan, genişlemiş ve düzensiz şekilli kan damarlarıdır. Sinüzoidler, alışılagelmiş kılcal damarlardan daha geniş bir yapıya sahiptir; bu damar boşluklarında, Kupffer hücreleri olarak bilinen özel bir makrofaj türü bulunur. Kupffer hücreleri, sinüzoidleri çevreleyen endotelial hücrelerin lümene (damar boşluğuna) bakan yüzeyinde yer alırlar. Görevleri, kanı filtrelemek ve yabancı maddeleri, bakterileri veya yaşlı kan hücrelerini temizlemektir (Rappaport vd., 1954).

2.3.2 Karaciğerin fonksiyonları

Karaciğer, yaşamsal birçok işlevi vardır. Karaciğerin temel görevleri arasında metabolizma düzenlemesi, hormon ve plazma proteinlerinin sentezlenmesi gibi yaşamsal fonksiyonlar yer alır. Ayrıca, A, D, B12 gibi vitaminlerin ve Fe gibi minerallerin depolanması da başlıca sorumlulukları arasındadır. Karaciğerin; hormonların, ilaçların ve toksik maddelerin parçalanması, esansiyel olmayan aminoasit yapımı ve protein metabolizması gibi görevleri vardır (Guyton ve Fizyoloji, 2001).

Karaciğer kendi proteinlerine ek olarak plazma proteinlerinden fibrinojen, albumin, protrombin, lipoproteinleri sentezleyen, gastrointestinal sistemden emilen besinlerin depolandığı ve işlendiği organdır. Karaciğerin büyük bir fonksiyonel yapısı ve yenilenme kapasitesi vardır. Karaciğer yetmezliği şekillendiren hastalıklar dışında bütün hastalıklarda yenilenme gerçekleşebilir.

Karaciğer, olağanüstü bir yenilenme kapasitesine sahiptir. Hacminin büyük bir kısmı kaybedilse bile, genellikle bir-iki hafta içinde kendini yenileyebilir. Bu şaşırtıcı iyileşme, özellikle organın temel yapısı olan bağ dokusu çatısı sağlam kaldığında gerçekleşir. Yani, hepatoselüler nekroz (karaciğer hücrelerinin ölümü) meydana gelse bile, eğer organın iskelet yapısı bozulmamışsa, karaciğerin önemli bir bölümü iyileşebilir ve işlevini geri kazanabilir. Bu durum, karaciğeri vücudun en dirençli organlarından biri yapar (Barrett vd., 2010).

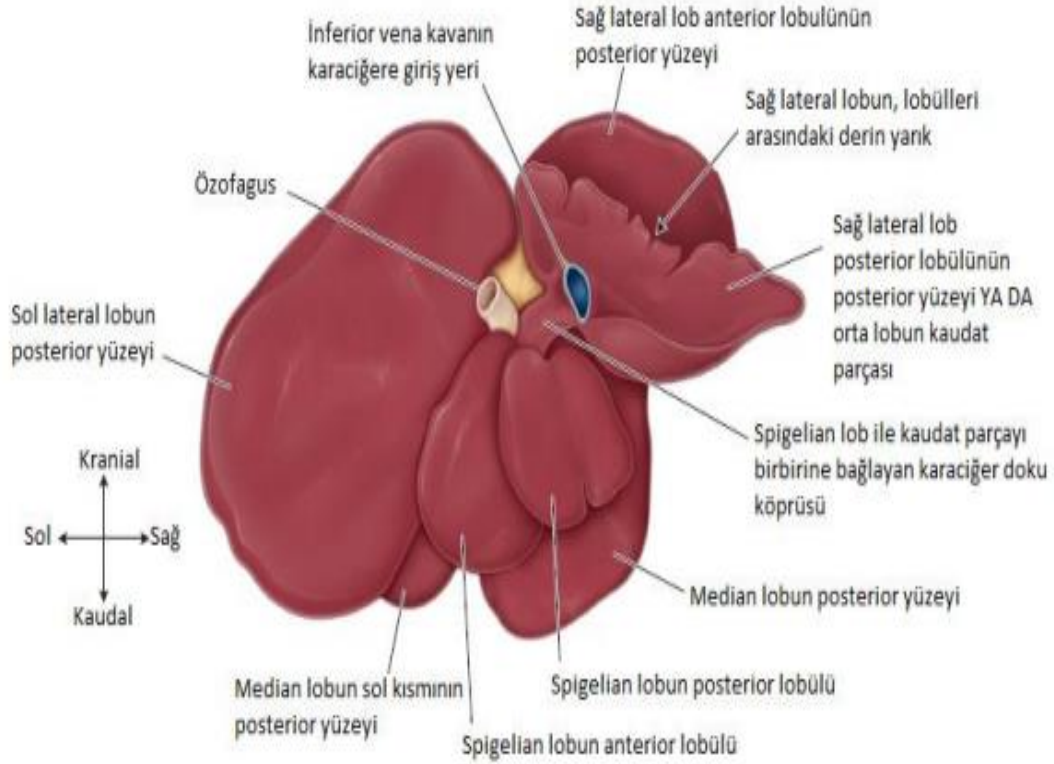
Metabolik faaliyetlere katılan safranın üretimi de Karaciğerdeki hepatositlerde gerçekleşmektedir. Vücutta üretilen safra, iki temel görevi üstlenir; Öncelikle yağların sindirimine ve emilimine yardımcı olurken, aynı zamanda kandan kolesterol ve bilirubin gibi çeşitli atık ürünlerinin uzaklaştırılmasını sağlar. Bu süreçlerle birlikte, serum kolesterol düzeyinin düzenlenmesi de safra tarafından gerçekleştirilir (Mushlin ve Gelman, 2010).

2.3.3 Karaciğerin hasara karşı yanıtı

Karaciğer, depolama işlevi sayesinde çeşitli mikrobiyolojik, metabolik, toksik ve neoplastik hastalıkların yanı sıra dolaşım bozukluklarından da etkilenebilir. Organın bu özelliği nedeniyle, hasar alsa bile klinik belirtileri uzun bir süre kendini göstermeyebilir. Karaciğerdeki hasarın kronikleştiği durumlarda; karaciğer parankiminin ileri seviyede kaybı ve safra akış hızında azalması ile karaciğer fonksiyonlarını gerçekleştiremez. Karaciğer; verilen zarara göre kendini; inflamasyon, Dejenerasyon, Nekroz, Fibrozis ve son olarak Siroz ile cevap vererek koruma altına alır (Barrett vd., 2010)

2.3.4 Rat karaciğer anatomisi

Rat karaciğeri, insanlardaki gibi karın boşluğunda bulunan bütünsel bir organdır. Bu organın dışbükey (konveks) olan ön-alt yüzeyi, genellikle büyük bir medial lobdan oluşur. Arka yüzeyi ise içbükey (konkav) bir yapıya sahiptir. Viseral yüzünde; sağ böbrek, mide ve sağ adrenal bezle yan yana olup ilaveten sol ve sağ lateral loblarında bulunmaktadır. Karaciğerin viseral yüzünden daha iyi görünen kısmı Medial lobun arkasında yer alan lateral loblardır (Maynard ve Downes, 2019)(Şekil 2. 3).



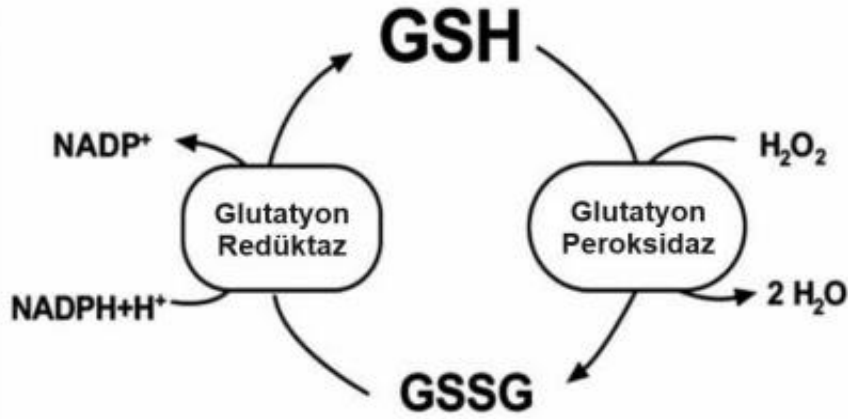
Şekil 2. 3. Rat karaciğerinin visceral yüzden görünümü (**Kaynak:** Maynard ve Downes, 2019).

2.4. Enzim Fonksiyonları

2.4.1. Glutasyon (GSH) fonksiyonları

GSH vücutta redükte GSH ve okside olan GSSG formlarında bulunur. GSH 'nin aktif kısmı da tiyol grubu vardır Şekil-5. Flavo proteini olan GSH; sistein ve glisinden sentezlenmektedir. Bu molekül oksidatif stres sonunda artan radikaller için savunucu bir antioksidandır (Caito vd., 2017; Diab vd., 2024; Fan vd., 2020; Mutlu vd., 2021).

Glutasyon peroksidaz (GPx), antioksidan bir enzim olarak işlev görür ve hidrojen peroksiti (H_2O_2) suya dönüştürür. Glutasyon redüktaz (GR) enzimi GSSG tekrar GSH' ye çevrilerek antioksidan tepkimelerde tekrardan kullanımını sağlamaktadır (Mutlu vd., 2021; Rivoira vd., 2021).



Şekil 2. 4. GSH-GSSG geri dönüşümü (**Kaynak:** Anjaneyulu vd., 2008).

Özellikle karaciğerde daha aktif olmasının yanı sıra, organizmanın bütün hücrelerinde bulunmaktadır. Hücredeki toksik metabolitleri uzaklaştırılmasında ve zararlı bileşiklerin etkisizleştirilmesinde önemli görev üstlenir. Hücrenin korunabilmesi için GSH' nin büyük bir kısmının etkisiz halde kalması elzemdir. GSH; antioksidan enzimlere substrat görevi yapar. Bu molekül radikalleri süpürür. GSH düzeyleri tespiti oksidatif stresin belirlenmesinde de bir araç olarak ön plandadır (Von Harsdorf vd., 1999).

GSH birçok hastalıkta oksidatif stres belirteci olarak incelenmiş ve GSH düzeyinin azaldığı gösterilmiştir. Özellikle kalp yetmezliği ve nörodejeneratif hastalıklarda GSH' ın azaldığı tespit edilmiştir. İlgili sistemlerde meydana getirdiği tahrifatlar sonucu oluşan oksidatif sistemdeki bozukluklar incelenerek tedavide aydınlatıcı yol izlenmeye çalışılmıştır (Mutlu vd., 2021).

2.4.2. Glutathion-S-transferaz (GST) enziminin fonksiyonları

GST, hücreden zararlı ve yabancı maddelerin atılmasında detoksifikasyon özelliği gösteren önemli bir enzimdir. Oksidasyon ürünlerini yok etmede, yabancı zararlı maddelerin diğer makromoleküller ile birleşmesini önleyen, hücre bileşenlerine tahrifat vermeden vücuttan atılımını sağlayan bir enzimdir (Fleury vd., 2002). GST' nin diğer bir görevi hücrenin lipid peroksidasyonunu engellemesidir. GST lipid peroksidasyonuna karşı hücre membranını korur. Çeşitli bileşikleri metabolize ederek parçalama yetenekleri de bulunmaktadır (Armstrong, 1997; Gyamfi vd., 2004). Ayrıca bu enzim antikanser ilaçları,

herbisid, kimyasal kanserojenler, pestisid ve ksenobiyotiklerin metabolizmadan atılma sürecinde önemli yer tutarlar (Reiter vd., 1998)

2.4.3.Karboksil esteraz (CaE) enziminin fonksiyonları

CaE enzimi birçok memeli canlıların dokularında bulunan serin hidrazlar sınıfında yer alıp ester substratlarının alkol bağının hidrolizini indükleyen bir enzimdir. Metabolizmada lipidlerin taşınması-depolanması, hormonların biyoaktivasyonu, ksenobiyotik, biyolojik esterlerin asimilasyonunda ve detoksifikasyonunda görevleri arasındadır (Barron vd., 1999).

2.4.4.Asetilkolinesteraz (AChE) enziminin fonksiyonları

AChE enzimi; asetilkolini kolin ve asetat'a dönüştürür. Bu enzim eritrositlerde, karaciğerde, dalakta ve beyin dokularında bulunmaktadır. Hücre de asetilkolini hidrolize etme işleminde görevlidir. Hücrenin yenilenmesinde ve oksidatif strese karşı rol almaktadır. Asetilkolin nörotransmitter olarak sinir hücreleri arasında görev yapar. Bu molekül kas liflerinde elektriksel akımın oluşmasını ve hücrelerinin kasılmasını sağlar (Güven, 2000).

2.4.5.Malondialdehit (MDA) özellikleri

MDA, hücrede meydana gelen oksidatif stres sonucunda oluşan lipit peroksidasyonun bir ürünüdür. Hücrenin ihtiva ettiği doymamış yağ asitleri, lipit peroksidasyonu sonucunda MDA oluşturmaktadır. Lipit peroksidasyon düzeyi, MDA düzeyinin ölçülmesi ile bulunur. Hücre zarının geçirgenliğinin artması, hücre içi iyon dengesini bozulması, enzim aktivite seviyelerinin değişmesi ve DNA'nın yapısının hasar görmesi; Oksidatif stres sonucundaki hücrede artan MDA düzeyindeki artış ile ilişkilendirilmektedir (Del Rio vd., 2005).

2.4.6.Glutatyon redüktaz (GR) enziminin fonksiyonları

Bu enzimin yapısı 1963 yılında çimlenmiş bezelyeler üzerinde yapılmış ve izole edilmiştir (Mapson ve Isherwood, 1963). GR; hayvansal hücrelerde, birçok bitki ve bakterilerde bulunduğu tespit edilmiştir (Meister, 1983).

Glutatyon; NADPH varlığında okside glutatyonun indirgenmesini kataliz eden, metal içermeyen, yapısında flavin grubu içeren bir enzim aile üyesidir (Angelucci vd., 2008). Glutatyon glutamat, tripeptit yapıdadır. Yapısında glutamatın γ -karboksil grubuna ve sistein

amino asit bulunmaktadır. Peptid bağı ile bağlanan bu iki molekül GSH la bağlantılı çalışmaktadır (G. Wu vd., 2004). Glutasyon, NADPH' ye bağımlı bir tepkime ile GSSG' nin indirgenip GSH' ye dönüşümünü kataliz eder (Carlberg ve Mannervik, 1985).

2.4.7. Aspartat aminotransferazlar (AST)-Alanin aminotransferaz (ALT) enzimleri

AST'nin en önemli görevi karbonhidrat ve nitrojen metabolizmasındaki amino ve ketoasitlerin dönüşümünü sağlamaktadır. ALT enziminin analizi, karaciğerdeki hasarı değerlendirmek ve karaciğer hastalıklarını teşhis etmek amacıyla gerçekleştirilir. AST ise siroz, hepatit ve karaciğer hasarı gibi olguların teşhisinde kullanılır. Bu enzim, sadece karaciğerde değil, beyinde ve kan hücrelerinde (eritrositlerde) de bulunur. Sağlıklı bireylerde AST düzeyleri çoğunlukla 30-40 U/L'nin altında olduğu bilinmektedir. Bu değer aralıkları, vücut kitle indeksi (VKİ) ve cinsiyet gibi çeşitli faktörlere göre değişkenlik gösterebilir. (Piton vd., 1998). AST' nin atılımı ALT' den daha hızlıdır. ALT' nin 47 ± 10 saat ve AST' nin ise 17 ± 5 saat yarılanma ömrü vardır (Lott ve Wolf, 1986). AST seviyelerinin yükselme dereceleri; AST enzimi seviyeleri, hasarın şiddetine göre üç ana düzeyde değerlendirilir; Çok yüksek: Normalin 15 katından fazla. Orta derece: Normalin 5 ila 15 katı arası. Hafif derece: Normalin 5 katından az. Bu derecelendirme, hastalığın ciddiyeti hakkında hızlı bir bilgi verir (Green ve Flamm, 2002).

ALT'ye karşı antikorların oluştuğu durumlarda, AST seviyeleri daha düşük seyredebilir. Bu durum, AST değerlerinin beklenenden daha düşük tespit edilmesine yol açabilir (Cohen vd., 1976). AST seviyesinin düşük derecede olduğu durumlarda canlının yaşam tarzlarında değişiklikler yapılması ve risk faktörlerinin düzeltilmesi (egzersiz yapmak veya kilo vermek) ile değerlerde düzelmeler olduğu gözlenmiştir (Ballew vd., 2001; Reid, 2001).

Çeşitli ilaçların, bitkilerin veya toksinlerin AST seviyesinin yükselmesine sebep olmaktadırlar. Bitki veya toksin kullanımı sonucu karaciğerde AST seviyesinde yükselme olur. Düşük seviyedeki bu artış 1-2 ay içerisinde devam etmesi durumunda karaciğerde hasarlar oluşumuna neden olur (Hoet vd., 1997; Redlich vd., 1988).

Alkolün aşırı tüketimi veya ağır metallere fazla miktara maruz kalma sonucunda AST yüksek seviyelerde gözlenmektedir (Zimmerman ve Maddrey, 1995). Ciddi derecede AST yüksekliğinin en önemli nedenleri arasında akut hepatitler ve toksik hepatitler ön plana çıkmaktadır (Whitehead vd., 1999).

2.5. Element Özellikleri

2.5.1.Demir (Fe) özellikleri

Fe, canlıların yaşamsal faaliyetleri için elzem olan bir elementtir. Günlük Fe ihtiyacı yaklaşık 10 mg. olup, yetişkin bir insan metabolizmasında ortalama 3-4 gram Fe bulunmaktadır. Canlı hücrelerde bulunan demir (Fe), farklı oranlarda dağılmıştır. Demirin yaklaşık %60-70'i eritrositlerde ve hemoglobinde yer alırken, %10'luk kısmı miyoglobin, sitokromlar ve demir içeren enzimlerde bulunur. Geriye kalan %20-30'luk kısım ise karaciğerde ve Retiküloendotelyal Sistem (RES) makrofajlarında kullanılmak üzere depolanır (Wu vd., 2002).

Fe'nin hücre içerisinde olmasının gereğinden fazla olması durumlarda toksik etkiye yol açar buda; DNA'da hasara, protein, lipid ve karbonhidrat metabolizmasında bozulmalara, hücre bölünmelerinde bozukluklar ile kendini gösterebilir (Türközü ve Şanlıer, 2014). Fe fazla olması ile prooksidan olarak görev yapıp, serbest oksijen radikallerinin oluşumuna neden olabilmektedir. Hemakromatozis olarak' ta bilinen Fe depolanma hastalığı sonucunda kalp yetmezliği ve aritmiler ile ölümlerin gerçekleştiği bildirilmiştir (Basta vd., 2005).

Fe, memeli hücrelerindeki Hemoglobin, miyoglobin gibi proteinlerin yapısında bulunarak oksijen taşınmasında rol almaktadır. Erkeklerdeki Fe ihtiyacı kadın ve çocuklara göre azdır. Fe; Katalaz, Sitokrom, peroksidaz gibi enzimler için yaşamsal öneme sahip olup, enzimlerin yapısında yer alarak önemli olaylarda bulunur. Tümör hücrelerinin Fe'yi kullanıp özellikle bağırsakta iltihaplanmayı başlatarak kolon kanserinin oluşum mekanizmasında etkili olabileceği raporlanmıştır (Çelen vd., 2011).

Hücresel düzeyde yapılan son yıllardaki çalışmalar ile Fe metabolizmasında çok büyük değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalar yeni proteinlerin keşfi, moleküler kontrol, Fe emilim/depolanma ve metabolizmada demir döngüsünün moleküler yolları ile ilgili yapılan çalışmalar bildirilmiştir (Ganz, 2004).

2.5.2.Çinko (Zn) özellikleri

Zn, metabolizma için yeterli ve dengeli seviyelerde dışarıdan alınması gereken, iki değerli bir katyondur. Zn temel bir mineral olup, organizma için elzem bir besin maddesidir. İnsan metabolizmasında 1-2,5 gr Zn bulunur (Willoughby ve Bowen, 2014; Wittsiepe vd., 2009). Zn besin zincirindeki önemli kaynakları arasında yağsız et, fındık, süt, kabuklu deniz ürünleri ve fasulye gibi gıdalar bulunmaktadır (Leonard vd., 2007). Bağışıklık sistemi için

gerekli enzimlerin işlevinde önemli rol oynamakta olup birçok araştırmalarda çinko eksikliğine bağlı hastalıkların görülme sıklığı gösterilmiştir (Willoughby ve Bowen, 2014).

Zn eksikliğinin nedenleri arasında diyet ile alınan fitat'ın inhibe edici etkisidir. Fitat; baklagiller ve rafine edilmemiş tahıllar, kabuklu bitkilerin kabuğunda yer alan diyetlerde bol miktarda bulunan gıda maddesidir. Zn emilimi duodenum ve proksimal jejunumdadır, atılımı ise çoğunlukla idrar ve ter ile gerçekleşir az miktarda da gastrointestinal sistemden gerçekleşmektedir. Fitat gastrointestinal sistemde çinko emilimini azaltır bunu ise çinko ile çözünmeyen kompleksler oluşturarak gerçekleştirir (Lönnerdal, 2000; Trumbo vd., 2001).

Zn; protein ve nükleik asit metabolizması, lipit transkripsiyonu ve gen transkripsiyonu gibi pek çok metabolik süreçte etkin bir rol oynar. Bağışıklık sistemi, üreme, yara onarımı, makrofaj/nötrofil gibi doğal öldürücü hücreler ve komplement sistemi aktivasyonunu sağlar (Cole vd., 2002).

2.5.3. Bakır (Cu) özellikleri

Cu; birçok protein için kofaktör özellik gösterdiğinden elzem olduğu kadar toksik'te olabilen bir mineraldir. Fe'nin kolay emilimini ve serbest hale geçmesi için hemoglobin sentezini sağlar. Cu'nun insanlardaki ortalama biyokimyasal değeri 1,5-2,5 mg kadardır. Organizmada Cu fazlalığının en fazla karaciğerde etkisinin olduğu raporlanmıştır (Parlakpınar vd., 2004). Cu'nun emilimi çok yavaş olup yüksek dozları toksik etki oluşturmaktadır.

Karaciğerde yüksek miktarda Cu birikimi kandaki serbest Cu miktarında artışa neden olacağı ve bu doğrultuda kırmızı kan hücrelerinin parçalanarak sarılık hastalığının oluşumunu tetikleyebileceği gösterilmiştir (Özkan, 2005). Ayrıca Cu; serbest oksijen detoksifikasyonunda, mitokondrial enerji üretiminde, Fe homeostazında ve bağ doku deformasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (Alpkent ve Demir, 2006; Güven vd., 2004).

2.5.4. Magnezyum (Mg) özellikleri

Mg, vücuttaki hücrelerin içinde en fazla bulunan iyon ve katyondur (Blaszczyk ve Duda-Chodak, 2013). DNA replikasyonu ve onarımı, ara metabolizma, iyon taşınması ve sinyal iletimi gibi hücresel faktörlerde önemli yere sahiptir (Larsson vd., 2005).

Mg her 100 mg alımında ki artışı, karaciğer hastalıklarına bağlı ölüm risklerini %49 oranında azalttığı görülmüştür (Wu vd., 2017). Vücuttaki birçok patolojik ve fizyolojik

olaylarda hayati önem taşıyan magnezyumun ana kaynakları arasında gıda ve yoğun su mineralleri gösterilmektedir (Delva, 2003).

Birçok karaciğer hastalığında, Mg seviyesindeki değişiklikler dikkat ile incelenmiştir (Adachi ve Brenner, 2006; Mazur vd., 2007; Romani, 2008). Mg eksikliğinin sonucunda; kardiyovasküler hastalıklar, ruhsal bozukluklar ve diyabet gibi birçok hastalığa yatkınlık oluşabileceği rapor edilmiştir (Blaszczyk ve Duda-Chodak, 2013). Karaciğerin Mg kaybında daha fazla kolajen birikiminin olduğu gözlemlenmiştir (Rayssiguier vd., 1985).

İnflamatuvar hücrelerin aktivasyonu, ilk olarak hücre içi Ca^{2+} 'nin hayati rol oynadığı sinyal iletim mekanizmasında gerçekleşir. Mg, Ca^{2+} 'a doğal bir antagonist olması; daha düşük bir ekstraselüler Mg konsantrasyonunda hücre içi Ca^{2+} 'da artışa yol açarak inflamasyonu tetikler (Malpuech-Brugere vd., 1998).

2.5.5. Manganez (Mn) özellikleri

Mn metabolik faaliyetler için gerekli olup vücutta sadece beyinde 4,5-6,2 mmol/kg kadarını ihtiva eden esansiyel bir elementtir (Gallez vd., 1997). Mn en önemli kaynakları; tahıl ürünleri, fındık, çay, içme suları, vitamin-mineral takviyeleri ve yeşil yapraklı bitkiler tüketerek sağlanabilmektedir (Pennington ve Young, 1991).

Farklı besin maddeleri ile alınan Mn vücutta sindirim kaynaklarının farklı kısımlarında çeşitli geri emilim mekanizmaları ile doku ve organlardaki ihtiyacın karşılandığı gözlenmiştir (Abrams vd., 1976). Diyet uygulanan çalışmalarda gözlenen bulgular arasında Mn geri emilimi ve atılımı çerçevesinde; sindirim kanalı dokuları ve karaciğerin geri emilimi/atılımı ile birlikte hareket ettikleri bu nedenle anemilerde Mn düzeylerinin düşük olduğu gözlenmiştir (Lee ve Johnson, 1988). Doku ve organlarda biriken Mn seviyesi, karaciğerden safra yolu ile atılım oranına göre değerlendirilmektedir (Zheng vd., 2000).

Mn eksikliğinde; büyümenin durması, iskelet anomaliler'i, karbonhidrat ve büyüme faktörleri, lipit, üreme performansı gibi metabolizmal bozuklukların olduğu gözlenmiştir. Diyetle alınan fazla miktardaki Mn alımı sonucunda; demir eksikliğinin görülmesi, Mn ve Fe emilimini inhibe etmesinden kaynaklandığını göstermektedir (Frumkin ve Solomon, 1997).

Yapılan çalışmalarda diyet uygulaması ile Mn düzeyi arttırılan ratlarda safra yolu ile atılım hızının da arttığı değerlendirilmiştir. Fazla miktarda alınan Mn'in ilgili yapılan

çalışmada; MSS de ve karaciğer emilim/atılım yollarının da tahrifata ve bu şekilde doku ve organlarda birikime yol açtığıdır (Malecki vd., 1996).

2.5.6. Kalsiyum (Ca) özellikleri

1920 yılında yapılan çalışmalar ile Ca' nın ne kadar değerli olduğu anlaşılmıştır (Akgün, 1987). Vücutta en fazla bulunan mineraldir. Ca'un; iskelette %99'u, %0.6'sı dişlerde, yumuşak dokularda %0.6'sı, plazmada %0.03'ü, ekstra selüler sıvılarda %0.06'sı bulunduğu tespit edilmiştir (Council vd., 1989; Nordin, 1997). Ca iyonu ile Na, K ve Mg iyonları arasındaki denge sonucu kalp kasının gevşemesini ve normal bir şekilde kasılmasını sağlamaktadır (Aksoy, 2000).

Yiyeceklerle alınan Ca çoğu ince bağırsakta, az miktarı ise midede emilmektedir. İnce bağırsağa alınan Ca, tuz halinde veya organik öğelerden uzaklaşarak serbest hale geçer. Bu arada Ca basit veya aktif difüzyon yolu ile emilebilmekte olup, İnce bağırsaktan emilen Ca suda eriyik halde kan yolu ile dokulara taşınmaktadır. Ca emiliminde metabolizmalar arasında farklılıklar olabilir (Akgün, 1987; Council vd., 1989; Nordin, 1997; Pugliese vd., 1998).

Karaciğer rejenerasyonu ve hepatik metabolizma arasındaki etkileşimde, Ca seviyeleri hepatik metabolizmanın kontrolüne katkıda bulunduğu ve bununda karaciğer yenilenmesi için temel bir faktör olduğu düşünülmektedir (Huang ve Rudnick, 2014).

2.6. Nuclear factor kappa b (NF-κB) özellikleri

NF-κB ilk olarak 1986'da tanımlanmıştır (Baldwin, 2001). Daha sonraki araştırmalar, bu proteinin B ve T lenfositleri, fibroblastlar ve monositik makrofaj soyları dâhil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde sentezlenen önemli bir düzenleyici olduğunu ortaya koymuştur (Baeuerle, 1998; Baeuerle ve Henkel, 1994; Blank vd., 1992).

Aktive olan NF-κB, immüno-inflamatuvar tepkiler, hücre adezyonu, apoptozis, hücre döngüsü ve anjiyogenez gibi çeşitli biyolojik olaylarda etkili olan genlerin transkripsiyonunu kontrol eder (Maeda ve Omata, 2008). Bu transkripsiyon faktörü, hem doğuştan gelen hem de sonradan kazanılan bağışıklık sistemi fonksiyonlarının birçok yönünü düzenlerken, aynı zamanda inflamatuvar yanıtların da önemli bir aracısı konumundadır. Dolayısıyla NF-κB, hücre çoğalması, hücre farklılaşması, programlanmış hücre ölümü (apoptozis) ve

2.7. Tümör nekrozis faktör alfa (Tnf- α) özellikleri

Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), ilk kez 1975 yılında tanımlandığında, tümör hücrelerini nekroza uğratma yeteneğinden dolayı bu ismi almıştır. (Empl vd., 2001). Polipeptit bir sitokinin olan Tnf-alfa ve Tnf-beta olmak üzere iki çeşittir. Kaşeksin olarak da bilinen TNF- α , genellikle monosit ve makrofajlardan salgılanır. Öte yandan, lenfotoksin olarak da adlandırılan TNF- β ise T lenfositleri ve doğal öldürücü hücrelerden açığa çıkar (Kirillova vd., 1999). Moleküler düzeyde büyük benzerlik gösteren bu iki form, benzer biyolojik aktivitelere sahiptir (Neta vd., 1987).

Tnf- α ; makrofajlar ve monositlerden sentezlenebildikleri gibi fibroblastlardan, endotel hücrelerden ve adipostlar tarafından da sentezlenebilmektedirler (Abbas, 1991). Tnf- α ; tümör hücrelerinin çoğalmasını baskılayan, inflamasyonda önemli bir rol alan sitokindir. Yapılan araştırmalarda beyindeki glia hücrelerinde ve kalpteki kardiyak myositlerdende üretildiği tespit edilmiştir (Ruuls ve Sedgwick, 1999).

TNF- α , etkilerini TNF-R1 ve TNF-R2 olmak üzere iki farklı reseptör aracılığıyla gösterir. (Vandenabeele vd., 1995). Tümör hücrelerinde gerçekleşen gen ekspresyonları Tnf-R1, immun sistem hücrelerinde gerçekleşen gen ekspresyonunu Tnf-R2 hücrelerinde gerçekleşir (Van Horssen vd., 2006). Tnf- α 'nın birçok otoimmun hastalığında etkisinin bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca apoptozis, hücre farklılaşması, sonradan veya doğal kazanılmış bağışıklıklar üzerinde de önemli etkileri bulunmaktadır (Sklavounou vd., 2000).

Çeşitli faktörler TNF- α üretimini tetikleyebilir ve artırabilir. Bunlar arasında mikrobakteriler, parazitler, virüsler, enterotoksin, endotoksinler ve hatta TNF- α 'nın kendisi de bulunmaktadır (Beutler, 1999). Karaciğer rejenerasyonunda kupffer hücrelerin den Tnf- α sentezi gerçekleşir. TNF- α 'nın kontrolsüz salınımı, karaciğerdeki hepatositlerin aşırı çoğalmasına (hiperplazi) neden olur ve bu durum, karaciğerin normalden daha ağır olmasına yol açar (Yamada ve Fausto, 1998).

Tnf- α ; karaciğer hasarlanmasının tüm tiplerinde anahtar konumundadır. Tnf- α 'nın karaciğerde üretiminin en yoğun yeri kupffer hücreleridir. Hasarlanmış hepatositlerden salınan çeşitli faktörler sonucunda kupffer hücreleri büyük miktarda Tnf- α üretir. Tnf- α hepatoselüler hasara ve Trail reseptörleri aracılığı ile hepatositlerin apoptozisine katkıda bulunmaktadırlar (Jaeschke vd., 2002).

Tnf- α 'nın uzun süreli düşük seviyelerde bulunması, anoreksiya, lipid tüketiminde artış, kilo kaybı, protein katabolizması ve insülin direnci gibi sorunlarla ilişkilendirilmektedir (Papadakis ve Targan, 2000). Optimal düzeydeki TNF- α , doku yenilenmesi ve onarımında

kilit rol oynar; aynı zamanda antitümöral bağışıklık gibi önemli yararlar da sağlar. (Papadakis ve Targan, 2000). TNF- α 'nın aşırı düzeyde üretimi, doku yaralanmaları, sitotoksiste, yaygın doku hasarı, septik şok, ateş, adrenal kanama (hemoraji) ve gastrointestinal nekroz gibi ciddi rahatsızlıklarla kendini gösterebilir (Shohami vd., 1999).

Tnf- α 'nın birçok iltihaplı olaylarda karşımıza çıktığı, enfeksiyöz ajan varlığında veya dokuda meydana gelen hasarlarda 4-8 saat içinde Tnf- α seviyesinde artışının olduğu, 16-24 saatte ise en üst düzeye ulaştığı ve uyarının devamlılığına göre salınımının devam ettiği raporlanmıştır (Neta vd., 1987). Tnf- α reseptörlerinin gen ekspresyonları; hücre tiplerine göre farklılık göstererek normal ya da hastalıklı dokularda farklı olabilmektedir.

TNF- α 'nın reseptörleriyle etkileşime girmesiyle, hücre içinde bir dizi sinyal iletim zinciri harekete geçer ve bu da inflamasyon ve apoptoz (programlanmış hücre ölümü) mekanizmalarını başlatır (Işık vd., 2008). Tnf- α ; enfeksiyon seviyesinin düşük olduğu durumlarda bağışıklıkta önemli etkiler sağlarken, yüksek olduğu durumlarda doku hasarı görülür (Çayakar, 2018).

Tnf- α ile ön uygulama ya da Tnf- α 'ya karşı antikor kullanılarak yapılan farelerdeki çalışmalarda Tnf- α 'nın septik şokta önemli olduğunu göstermiştir (Cerami ve Beutler, 1988; Tracey ve Cerami, 1989; Waage vd., 1987). Karaciğer enzimlerinin histolojik incelemelerinin yapıldığı başka bir çalışmada; karaciğer hasarının daha az olması için Tnf- α üretiminden sorumlu genin baskılanması gerektiği görülmüştür (Ponnappa vd., 2001).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç-Gereçler ve Kimyasallar

3.1.1. Araç-gereçler

- Abbott Labs Architect C16000 sistemleri (Abbott GmbH & Co, Germany)
- Chemiluminescence Analyz. UniCel DxI 800 Access Immunoassay System
- Çalkalayıcı (Cleaver Scientific Ltd. Orbital Shaker)
- Deney Tüpleri
- Derin dondurucu (Nuve DF 290, -80 °C)
- DNase & RNase free ddH₂O
- Doku Takip Cih. (LEICA TP 1020)
- Elüsyon Tüpleri
- Etüv (Nuve EN 055)
- Fotoğraf ataçmanlı mikroskop (Carl Zeiss Marka Axiocam ERc5)
- Güvenlik kabini (Bilser BLF2000)
- Hassas terazi (Radwag Wagi Elektroniczne)
- Homojenitör (Ultra-Turrax IKA T25 digital)
- Jena ContrAA 300 (GLE, Berlin, Almanya)
- Manyetik Karıştırıcı (Benchmark Hotplate Stirrer)
- Mikroplate Okuyucu Spektrofotometre (Biochrom EZ READ 400)
- Mikrosantrifüj
- Mikrotom (Thermo Scientific)
- pH Metre (Consort C1010)
- Roche LightCycler 96 Multiwell Plate
- Santrifüj (Thermo Scientific SL16)
- Soğutmalı Santrifüj (Nuve NF800R)
- Su banyosu (Nuve BM15)
- T100 Termal Döngü Cihazı
- UV spektrofotometre (A & E LAB)
- Vorteks (Pro Scientific 560-500-00)

3.1.2. Kimyasallar

- %10 luk Ketazol
- %10'luk Nötral Formaldehit
- 96-100% Etanol
- cDNA izolasyon kiti
- Hedef RNA Primerleri
- Kloroform
- Mirnaextractor
- mRNA qPCR mastermix
- Phosphate Buffered Saline
- Referans Gen Primerleri
- RNaz-free Water
- RPE solüsyon
- Total mRNA izolasyon kiti
- Total mRNA izolasyon kitinin içeriği

3.2. Yöntemler

3.2.1. Etik kurul kararı

Adıyaman Üniversitesine bağlı olan Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından incelenen bu çalışma 2023\018 protokol numarası ile onay alınmıştır. Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi (ADYÜDEHAM) biriminden ratlar temin edildi ve aynı merkezde çalışma yürütüldü.

3.2.2. Deney hayvanlarının temini ve beslenmeleri

8-10 haftalık yaşlarda *Wistar albino* cinsi erişkin 28 adet erkek ratlar, ADYÜDEHAM biriminden temin edildi. Hayvanlar ADYÜDEHAM hayvan laboratuvarında bulundukları ortamda sıcaklık 22–25°C arası sabit tutulup 12 saat ışıktaki ve 12 saat karanlıkta takip edildi. Ratlar özel yapılmış kafeslerde beslendi ve her gün altlıkları temizlendi. Tüm ratlara aynı standart rat yemi verilip çeşme suyu ve yiyecek alımları sağlandı. Su; cam biberonlarda çeşme suyu ile özel olarak hazırlandı rat yemleri ise; çelik kaplarda verildi.

3.2.3 Deney gruplarının oluşturulması

Otuz gün sürecek deneysel çalışma için, her biri 7 ratlardan oluşan 4 eşit grup oluşturuldu. Gruplar şu şekilde belirlendi:

I Kontrol (K) grubu;

Ratlara deney süresi boyunca sabit standartlarda yetiştirildi.

II Naringin (N) grubu;

Her gün deney bitene kadar 40 mg/kg naringin (Sigma/N136-25g/ SLCF9842) distile suda çözülürülerek orogastrik gavaj yol ile uygulandı Şekil 3. 1. (Golechha vd., 2011)

III Pb asetat (P) grubu;

Ratların cam biberonlarına normal çeşme suyu konulduktan sonra 500 ppm olacak şekilde Pb asetat (A0059675 008/Merck/Almanya) eklendi. Ayrıca Pb asetatin cam suluklarda çökmesinin önlenmesinde yaygın olarak kullanılan 0,5 ml asetik asit eklendi. Deney süresi boyunca suluklar gün aşırı kontrol edildi. Şekil 3.1. (Bennet vd., 2007)

IV Pb asetat + Naringin (PN) grubu;

Her gün deney bitene kadar 40 mg/kg Naringin (Sigma/N136-25g/ SLCF9842) distile suda çözülürülerek orogastrik gavaş yol ile verildi Şekil 3.1. Aynı zamanda Pb asetat grubunda olduğu gibi ratların cam biberonlarına normal çeşme suyu konulduktan sonra 500 ppm olacak şekilde Pb asetat (A0059675 008/Merck/Almanya) eklendi. Ayrıca 0,5 ml asetik asit eklendi. Deney süresi boyunca suluklar gün aşırı kontrol edildi (Golechha vd., 2011)

3.2.4. Deneyin sonlandırılması ile doku ve serum örneklerinin alınması

Deney takip süresi sonunda tüm ratlardan anestezi (ketasol %10 luk, 0.5 – 1 ml/5 kg vücut ağırlığı) altında intrakardiak olarak kan alındıktan sonra aneztezi altında sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilmiş karaciğer dokuları serum fizyolojik ile temizlendikten hemen sonra formaldehit %10'luk içine konularak immunohistokimyasal ve histolojik çalışmalar için uygun koşullarda muhafaza edildi (Şekil 3. 2).



Şekil 3. 1. Ratlara gavaj yolu ile naringinin verilmesi



Şekil 3. 2. Ratlarda portal ven yoluyla kan alınması



Şekil 3. 3. Rat karaciğerinin alınması

3.2.5. Biyokimyasal testler

Deneyde kullanılan sıçan karaciğer dokuları, öncelikle ensize edildi. Tartılan karaciğer dokuları, 0.1 M (0.5 M K_2HPO_4 + 0.5 M KH_2PO_4) pH 7.4 potasyum fosfat tamponu içerisinde 1:4 (w/v) oranında eklenerek Heidolph RZR 2021 model teflon başlı bir homojenizatör ile homojenize edildi. Hazırlanan homojenat, 4 °C'de 20 dakika boyunca 16.000xg'de (Hettich 460 R) santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar, toplam protein konsantrasyonu ölçümü ve enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla ependorf tüplerine

aktarıldı. Ölçümler, Thermo Varioscan Flash 2000 model mikrolaka okuyucu spektrofotometrede her örnek için üçer tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

3.2.5.1. Toplam protein tayini

Toplam protein konsantrasyonları (Bradford, 1976) yılındaki yöntemine göre belirlendi. Bu yöntemde, numunelerin süpernatantları seyreltildikten sonra 5 µL'si mikrolaka kuyucuklarına pipetlendi. Üzerine 250 µL Bradford çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 15 dakika inkübe edildi. Renk değişimine paralel olarak, absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda ölçüldü. Süpernatantlardaki toplam protein miktarı, seyreltme faktörü de göz önünde bulundurularak hesaplandı. Tüm enzim aktiviteleri ve toplam protein seviyeleri ölçüldükten sonra, sonuçlar spesifik aktivite ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}$ toplam protein $^{-1}$) cinsinden ifade edildi.

3.2.5.2. Enzim aktiviteleri tayini

Enzim aktivite değerleri, dokuların homojenizasyonu ve santrifüj işleminin hemen ardından, örnekler bekletilmeden Thermo Varioscan Flash 2000 mikrolaka okuyucu sistem kullanılarak belirlendi. Her bir örnek için enzim aktivitesi ölçümlerinde dörder tekrarlı absorbans okuması yapıldı. Aynı örneğe ait değerler arasında %10'dan daha büyük bir korelasyon farkı tespit edildiğinde, okuma işlemi tekrarlanarak doğruluk sağlandı. Tüm enzimlerin aktiviteleri, örneklerdeki toplam protein miktarları ölçüldükten sonra spesifik aktivite (nmol/dk/mg toplam protein) cinsinden ifade edildi.

Glutasyon S-transferaz (GST) aktivitesi

GST aktivitesi tayini S16 fraksiyonlarında mikrolaka okuyucu sistem kullanılarak yapılmıştır. Bu analiz için (Habig, Pabst, & Jakoby, 1974)'te geliştirdiği yöntem, bazı modifikasyonlarla uygulandı. Substrat olarak, %96'luk etanol içinde hazırlanan 20 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) kullanıldı. Reaksiyonda kofaktör görevi için 0.002 M redükte glutasyon (GSH) tercih edildi. Mikrolaka kuyucuklarına sırasıyla 10 µL süpernatant, 100 µL fosfat tamponu (0.1 M, pH 6.5) ve 100 µL GSH karışımı eklendi. Son olarak 10 µL CDNB pipetlendi. Oluşan karışım, mikrolaka okuyucu sisteme yerleştirilerek 15 saniye süreyle karıştırıldı ve ardından 25°C'de 2 dakika boyunca 344 nm dalga boyunda

absorbans değişimi kaydedildi. GST aktivitesi, nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı (344 nm'de CDNB için molar absorptivite katsayısı (ϵ) $9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak kabul edildi).

Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi

Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesi, (Cribb, Leeder, & Spielberg, 1989) tarafından tanımlanan mikropılaka ölçüm yöntemine göre S16 fraksiyonlarında belirlenmiştir. Reaksiyon Karışımı ve Başlatma Her bir reaksiyon çözeltisi aşağıdaki bileşenleri içermiştir: 0.1 mM 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB): 150 μL , 1.2 mM NADPH: 20 μL , Örnek: 20 μL , Reaksiyon, 20 μL 3.25 mM oksitlenmiş glutasyon (GSSG) ilavesiyle başlatılmıştır. Tampon Çözelti ve Ölçüm tüm çözeltiler için 1 mM EDTA içeren 0.1 M potasyum fosfat tamponu (pH 7.5) kullanılmıştır.

Reaksiyon ilerledikçe, GSSG'den indirgenmiş glutasyon (Fan vd., 2020) oluşumuna bağlı olarak azalan DTNB miktarı, oda sıcaklığında 3 dakika boyunca 405 nm dalga boyunda gözlenmiştir. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak, spesifik GR aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplanmıştır. DTNB için 405 nm'deki molar absorptivite katsayısı (ϵ) $14151 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olarak kabul edilmiştir.

Karboksil esteraz (CaE) tayini

Karboksilesteraz (CaE) Enzim Aktivitesi Ölçüm Protokolü Karboksilesteraz (CaE) enzim aktivitesini belirlemek için aşağıdaki standartlaştırılmış protokol izlenmiştir: Reaktiflerin hazırlanması: İlk olarak, %96'lık etil alkol içinde 26 mM p-nitrofenil asetat (PNPA), enzim aktivitesi için substrat olarak hazırlandı (Santhoshkumar ve Shivanandappa, 1999). Örnek ve Tampon Eklenmesi: Mikropılakalara her bir örnekten 5 μL örnek çözeltisi ve pH 7.4'te 0.05 M Trizma çözeltisinden 250 μL aktarıldı. Ön İnkübasyon: Karışım, reaksiyonun başlaması için 25°C'de 3 dakika boyunca inkübe edildi. Substrat Eklenmesi ve Kinetik Ölçüm: İnkübasyonun ardından, mikropılakalara son konsantrasyonu 0.5 mM olacak şekilde 5 μL p-nitrofenol asetat eklendi. Bu adımdan hemen sonra, 405 nm dalga boyunda 2 dakika boyunca absorbans değerleri kaydedildi. Cihaz ve Veri Hesaplama: CaE enzim aktivitesi ölçümleri, Thermo-3001 mikropılaka ataçmanlı UV/VIS spektrofotometre cihazında yapıldı. Elde edilen aktivite değerleri nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı. Bu detaylı protokol, CaE enzim aktivitesinin güvenilir ve tekrarlanabilir bir şekilde ölçülmesini sağladı.

Asetilkolinesteraz (AChE) tayini

AChE aktivitesi S16 fraksiyonlarında spektrofotometrik yöntem ile tespit edilmiştir. (Ellman vd., 1961) tarafından bulunan bu yöntem, (Özmen vd., 1998) tarafından geliştirilmiş olup mikrolaka okuyucu sistemine uyarlanacak şekli kullanılmıştır. Enzim aktivitesini ölçmek için asetiltiyokolin iodid (Santhoshkumar ve Shivanandappa) substrat olarak kullanılmış ve renk değişimine bağlı olarak ürün olduğu saptanmıştır. Doku süpernatantları, 10 µL hacminde mikrolaka kuyucuklarına dağıtıldı. Üzerine 0.1 M Trizma pH 8.0 tamponunda (Sigma-Aldrich, T8483) hazırlanan ve son reaksiyon karışımında 0.701 mM ACTI ile 0.136 mM DTNB içerecek şekilde ayarlanan 200 µL reaksiyon karışımı eklendi. Mikrolaka okuyucuda 10 saniyelik çalkalamanın ardından, 25°C'de 1 dakika boyunca 412 nm'deki absorbans değişiklikleri izlendi. Spesifik AChE aktivitesi, nmol/dk/mg protein olarak belirlendi. (412 nm'de DTNB için $\epsilon=13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Aspartat aminotransferans (AST) ve Alanin aminotransferans (ALT) tayini

Serumlada AST ve ALT değerleri enzimatik kinetik olarak Abbott Labs Architect C16000 sistemleri (Abbott GmbH & Co, Germany) ve ticari Abbott kitleri kullanılarak fotometrik yöntemlerle değerlendirildi.

3.2.5.3. Non-enzimatik aktiviteler tayini

Malondialdehit (MDA) tayini

Karaciğer dokusundan alınan örnekler MDA analizi için mikrolake ataçmanlı UV/VIS spektrofotometre özellikli cihaz kullanıldı. Bu yöntem Thiobarbiturik asit ile MDA'nın asidik ve sıcak ortamda tepkimelerin sonucu oluşturduğu pembe renkli pigmentin spektrofotometrede okunması ile değerlendirilir. Bu MDA analiz yöntemi 1966 Placer vd. tarafından bulunmuştur (Placer vd., 1966). Reaksiyon karışımı olarak %15 Trikloroasetik asit, %0.375 Thiobarbiturik asit, 0.25 N HCl kimyasallarından oluşan çözelti kullanıldı. Analiz için 500 µl doku homojeni ve 1,5 ml reaksiyon karışımı ağzı kapaklı tüp içerisine konulup 100 °C' de kaynar su banyosu içinde 30 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı daha sonra oda sıcaklığına soğutuldu. 16000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant kısmın 250 µl u alınarak mikropipet yardımıyla mikrolakara pipetlendi.

Cihazda 532 nm dalga boyunda köre karşı okuma işlemi yapılarak sonuçlar 3 defa ardı ardına okutuldu. MDA düzeyleri nmol/mg protein olarak hesaplandı.

Glutasyon (GSH) tayini

Redükte Glutasyon düzeyinin ölçülmesi için, (Moron vd., 1979) tarafından geliştirilen metod ile mikroparka okuyucu sisteminde uygun okuma ölçülerine getirilerek yapılmıştır. GSH düzeyleri, bir GSH standart eğrisine karşı örneklerin 412 nm'deki absorbans değerleri okunarak nmol mg protein⁻¹ cinsinden hesaplandı (Fan vd., 2020).

3.2.6. Histolojik analizler

Kurşun asetat maruziyetine bırakılan sıçanlara naringin uygulandıktan sonra gerçekleştirilen histopatolojik incelemeler, Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışma sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan alınan karaciğer doku örnekleri, %10'luk nötral formaldehit çözeltisinde bir hafta süreyle post-fikse edildi. Fiksasyon işleminin ardından, ışık mikroskopik analizler için rutin doku takip işlemleri uygulandı (Tablo 3.1). Dokuların rutin histolojik takibi, Leica TP1020 (Nussloch, Almanya) otomatik doku takip cihazı kullanılarak, alkol, ksilen ve parafin serilerinden geçirilmesiyle gerçekleştirildi. Hazırlanan parafin bloklardan, Thermo Shandon Finesse ME mikrotom cihazı (Thermo Fisher Scientific, Cheshire, Birleşik Krallık) aracılığıyla 4-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler, daha sonra Hematoksilen & Eozin ve Masson Trikrom boyama yöntemleri ile boyandı. Boyanmış preparatlar, ışık mikroskobu altında semikantitatif olarak değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi. Histopatolojik hasarın derecesini belirlemek amacıyla aşağıdaki semikantitatif skorlama sistemi kullanıldı: 0: Hasar yok, 1: %10'u histopatolojik hasar, 2: %10-25 arası hasar, 3: %25-50 arası hasar, 4: %50-75 arası hasar, 5: >%75 hasar.

Tablo 3. 1. Histolojik inceleme serisi

Sıra	İşlem	Süresi
1	Etil Alkol %70	2 saat
2	Etil Alkol %80	2 saat
3	Etil Alkol I %96	1 saat
4	Etil Alkol II %96	1 saat
5	Etil Alkol I %100	1 saat
6	Etil Alkol II %100	1 saat
7	Etil Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	45 dakika
9	Xylol II	45 dakika
10	Parafin	1 saat
11	Parafin	1 saat
12	Gömme	

3.2.7. İmmünohistokimyasal analizler

İmmünohistokimyasal Analiz Protokolü İmmünohistokimyasal analizler için parafine gömülü bloklardan kesitler 4-6 µm kalınlığında alınmıştır. Bu kesitler polilizinli lamlara yerleştirildikten sonra deparafinize edilmiştir. Antijen Geri Kazanımı ve Peroksidaz İnhibisyonu dereceli alkol serilerinden geçirilen kesitler, antijen geri kazanımı (antigen-retrieval) için pH 6'da sitrat tampon solüsyonunda, 750W mikrodalga fırında 12 dakika kaynatılmıştır. Kaynatma işleminin ardından kesitler oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış ve PBS (Fosfat Tamponlu Salin) ile yıkanmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesini engellemek amacıyla 6 dakika boyunca hidrojen peroksit solüsyonu uygulanmıştır.

Primer ve Sekonder Antikor İnkübasyonu PBS ile 3x5 dakika yıkanan dokulara, 5 dakika boyunca blok solüsyonu uygulandıktan sonra, 1/200 oranında dilüe edilmiş primer antikorlar ile oda sıcaklığında nemli ortamda 60 dakika inkübe edilmiştir. Primer antikor uygulamasının ardından dokular PBS ile 3x5 dakika yıkanmış ve primer antikora uyumlu sekonder antikorlar ile oda sıcaklığında nemli ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. Streptavidin Peroksidaz ve Kromojen Uygulaması Sekonder antikor inkübasyonundan sonra dokular tekrar PBS ile 3x5 dakika yıkanmış ve Streptavidin Peroksidaz ile oda sıcaklığında nemli ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu adımın ardından dokular PBS içerisine alınmıştır.

Ardından, 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) Substrat + AEC Kromojen solüsyonu damlatılarak ışık mikroskopunda görüntü sinyali alınana kadar beklenmiş ve eş zamanlı olarak tüm gruplar PBS ile yıkanmıştır.

Zıt Boyama ve Değerlendirme Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solüsyonu ile kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskopunda incelenmiş, değerlendirilmiş ve fotoğraflanmıştır (Leica DFC295). Histoskor Oluşturma Boyamada immünreaktivitenin değerlendirilmesi için bir histoskor oluşturulmuştur. Bu skor, immünreaktivitenin yaygınlığı ve şiddeti temel alınarak hesaplanmıştır: Yaygınlık Değerleri: 0.1: <%25, 0.4: %26-50, 0.6: %51-75, 0.9: %76-100, Şiddet Değerleri: 0: Yok, +0.5: Çok az, +1: Az, +2: Orta, +3: Şiddetli; Histoskor = Yaygınlık x Şiddet formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2.8. Element analizler

Kullanılan tüm reaktifler analitik saflıktadır. 18,2 MΩ dirençli ultra saf deiyonize su, Milli-Q Plus su arıtma sisteminden (Millipore, Bedford, MA, ABD) elde edildi. Tüm kaplar, 24 saat boyunca %10 (v/v) nitrik asitte bekletilerek temizlenmiş ve kullanılmadan önce deiyonize su ile iyice durulanmıştır. Kalibrasyon standartlarını hazırlamak için 1000 µg mL⁻¹ stok çözelti %0,2 (v/v) HNO₃ içinde seyreltilerek hazırlanmıştır. Metal analizleri Analitik Jena Contra_{AA} 300 (GLE, Berlin, Almanya) yüksek çözünürlüğü olan sürekli alevli kaynaklı atomik absorpsiyon spektrometresinde (HR CS FAAS) yapılmıştır.

3.2.8.1. Örneklerin çözünürleştirilmesi

Karaciğer dokularının element analizi için örneklerin (0,35g - 0,40g) çözünürleştirilmesi, 100 mL hacimli bir mikrodalga fırında sıcaklık ve basınca dayanıklı PTFE (politetrafloretilen) kaplar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir numune PTFE kaplara yerleştirildi ve 5 mL nitrik asit (%65 HNO₃ (w/w)), 1 mL perklorik asit (%72 HClO₄ (w/w)) ve 1 mL hidrojen peroksit (%30 H₂O₂ (w/w)) çözeltileri eklenerek mikrodalga prosedürün de çözünmesi için 30 dakika bekletildi. PTFE kaplar oda sıcaklığında soğutulup, elde edilen berrak karışımın hacmi 0,1 mol/L HNO₃ çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlanmıştır (Ciftci vd., 2024). Çözünmeyen örneklerle tekrar mikrodalga çözünürleştirme işlemi uygulanmıştır (Ciftci vd., 2009).

Berrak bir çözelti haline gelen doku örnekleri Analytik Jena ContrAA 300 (GLE, Berlin, Almanya) yüksek çözünürlüğü olan sürekli alevli kaynaklı atomik absorpsiyon spektrometresinde (HR CS FAAS) yapılmıştır. HR-CS FAAS cihaz değişkenleri sırasıyla Tablo 3. 2. de gösterilmiştir.

Tablo 3. 2. *HR CS-FAAS cihaz verileri*

Veriler	Cu	Fe	Zn	Pb	Mn	Mg	Ca
Dalga boyu, nm	324.75	248.32	213.85	217	279.48	285.2	422.67
N ₂ O-C ₂ H ₂ akış hızı, L/h	0	0	0	0	0	0	210
C ₂ H ₂ -Hava akış hızı, L/h	50	60	55	70	80	70	80
Alev başlığı yüksekliği, mm	6	5	9	8	8	5	6
Değerlendirme pikselleri, pm	3	3	3	3	3	3	3

Kalibrasyon tablosundaki verileri elde etmek için 1000 mg/L konsantrasyona sahip metal stok çözeltileri (Merck) belirli uygun hacimlere getirilmiştir. Çalışılan metaller için tespit edilen kalibrasyon değişkenleri Tablo 3.3.'te gösterilmiştir.

Tablo 3. 3. *Kalibrasyon verileri*

Metal	Kalibrasyon Eşitliği (mg/L)	Korelasyon Katsayısı (R ²)
Cu	$y=0,1336X+0,0032$	0,9984
Fe	$y = 0,028x + 0,0014$	0,9989
Zn	$y = 0,3227x + 0,0279$	0,9959
Pb	$y = 0,0223x + 0,0007$	0,9992
Mn	$y = 0,0759x + 0,0005$	0,9995
Mg	$y = 0,3151x + 0,0515$	0,9847
Ca	$y = 0,0982x + 0,0144$	0,9959

3.2.9. Gen ekspresyonu



Şekil 3. 4. LC96 Cihazı

LC96 Cihazı ile gerçekleştirilen Analizler 96 örneklik kapasiteye sahip Plaka bazlı LC96 Cihazı, nükleik asitlerin kalitatif / kantitatif tayinini ve SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi) analizlerini gerçekleştirmek için tasarlanmıştır. Bunlar arasında miRNA araştırmaları, mutasyon saptama, gen ekspresyonu analizi, gen saptama, metilasyon analizi ve hedef genlerin bağıl kantifikasyonu yer almaktadır.

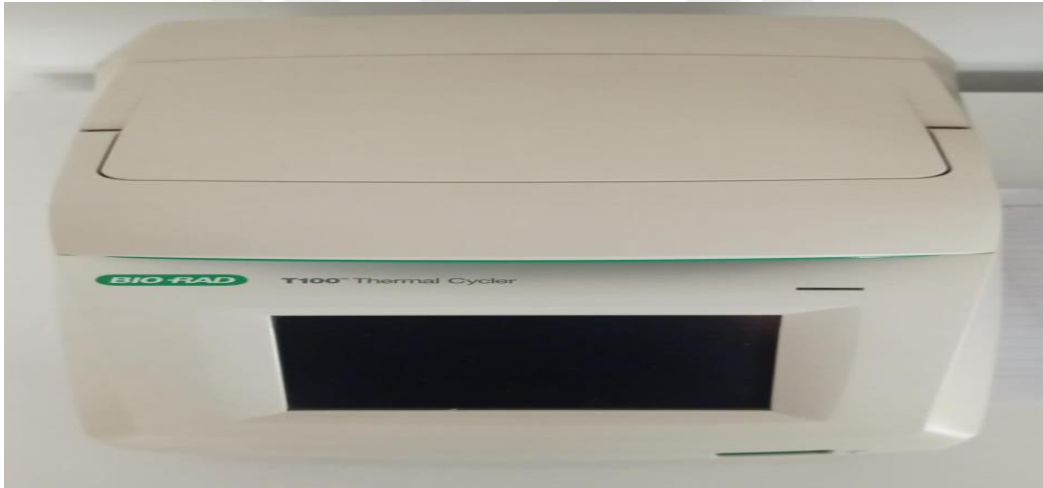


Şekil 3. 5. Nanodrop spektrofotometre



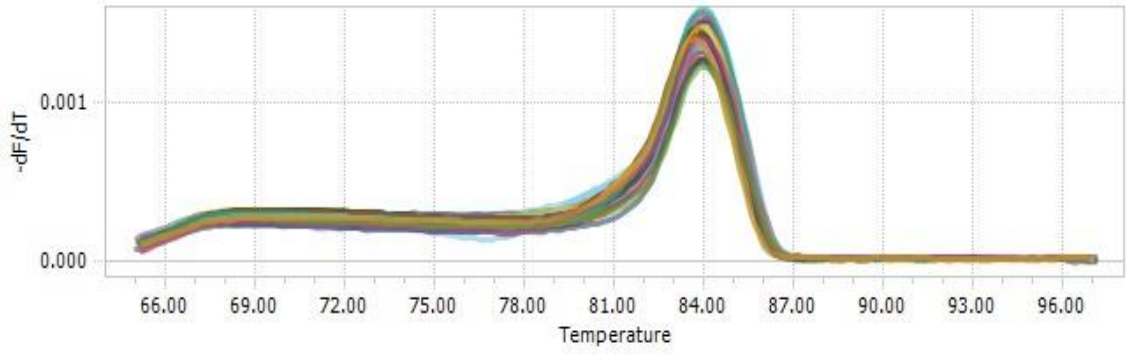
Şekil 3. 6. *Hettich Mikro 200 R Mikro santrifüj*

Dalga boyu 260nm ve 280nm, Örnek hacmi 1~2.0ul, Işık kaynağı UV LED, Dedektör UV silicon photocell, Absorbans aralığı 0.02 – 80A

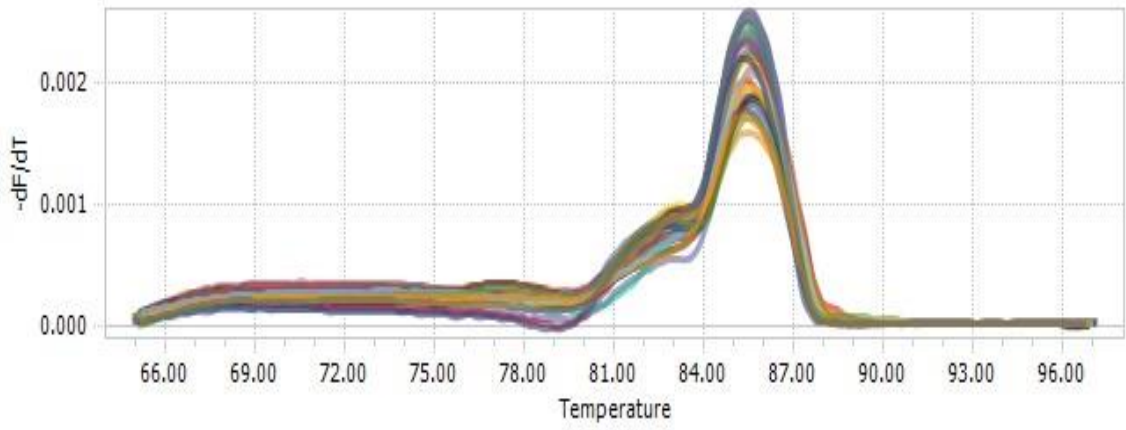


Şekil 3. 7. *T100 Termal döngü cihazı*

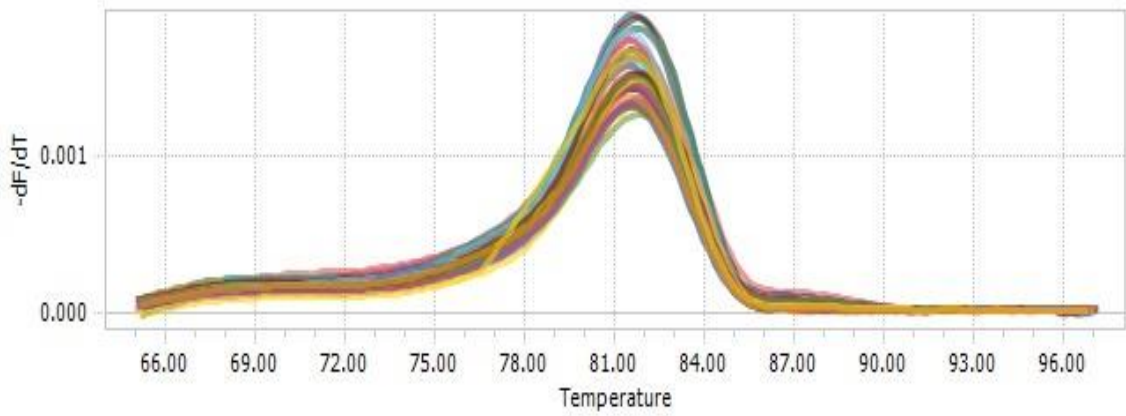
Nükleik asit amplifikasyonu (PCR), Gen klonlama ve analizi, Gen ifadesi analizi, Mutasyonel analiz, Döngü dizilimi gibi işlemlerde kolay optimizasyon, Gradyan termal döngü cihazı, benzersiz bir termal gradyan kullanarak hızlı PCR optimizasyonuna olanak tanır.



Şekil 3. 8. *TNF α erime eğrisi*



Şekil 3. 9. *Nfkb erime eğrisi*



Şekil 3. 10. *Gapdh erime eğrisi*

3.2.9.1. RNA izolasyonu

miRNA İzolasyon Protokolü: adım adım rehber bu prosedür, 28 ayrı numuneden miRNA elde edilmesi sürecini aşamalı olarak açıklamaktadır.

1. **Homojenizasyon ve Bekletme:** Her bir numune, bir miRNA Extractor kullanılarak homojenize edildikten sonra, oda sıcaklığında 5 ila 10 dakika süreyle inkübe edildi.
2. **Kloroform İlavesi:** Homojenize edilmiş numunelere 0.2 mL kloroform eklenerek 30 saniye boyunca vorteks işlemi uygulandı.
3. **Santrifüjleme (Faz Ayrımı):** Elde edilen karışım, 4°C'de ve 12.000 x g'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Bu işlem sonucunda numune üç belirgin faza ayrıldı; üstte yer alan renksiz sulu faz, RNA içeriğini barındırıyordu.
4. **Süpernatantın Aktarılması:** En üstteki sulu fazdan yaklaşık 540 µL süpernatant, özenle temiz, 1.5 mL'lik RNaz içermeyen yeni bir santrifüj tüpüne transfer edildi.
5. **Etanol Eklenmesi ve Karıştırma:** Transfer edilen süpernatanta, 1.5 hacim oranında (yaklaşık 810 µL) %100 etanol ilave edildi ve içeriği homojenleştirmek amacıyla birkaç kez yukarı-aşağı pipetleme yapıldı.
6. **Spin Kolonuna Geçiş ve Santrifüjleme:** Hazırlanan karışım bir Spin Column TR'ye aktarıldı. 12.000 x g'de 2 dakika santrifüj edildikten sonra akış fazı atıldı. (Eğer başlangıç lizat hacmi 750 µL'yi aşıyorsa, kolona önce 750 µL eklendi, 30 saniye santrifüj edildi ve kalan lizat aynı kolona yeniden eklenerek işlem tekrarlandı.)
7. **Yıkama (Birinci RPE Solüsyonu ile):** Spin Column TR'ye 0.5 mL RPE Solüsyonu eklendi. 12.000 x g'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra akış atıldı.
8. **Yıkama (İkinci RPE Solüsyonu ile):** Spin Column TR'ye bir kez daha 0.5 mL RPE Solüsyonu ilave edildi. Bu adım da 12.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilip akış atılarak tekrarlandı.
9. **Kurulama Santrifüjü:** Kolon, içerisinde kalabilecek etanol kalıntılarını tamamen gidermek için 12.000 x g'de 30 saniye süreyle tekrar santrifüj edildi.
10. **Elüsyon ve Depolama:** Kolon yeni bir 1.5 mL'lik santrifüj tüpüne yerleştirildi. Kolon zarına 30-50 µL RNaz içermeyen Su eklendikten sonra 2 dakika beklendi. Ardından 12.000 x g'de 30 saniye santrifüj edilerek elüt edilen RNA çözeltisi toplandı ve uzun süreli saklama için -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.9.2. cDNA eldesi

Aşağıda verilen Thermo High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (4368814)'ne ait aşağıda verilen Tablo 3.4. ile cDNA reaksiyonu kuruldu.

Tablo 3. 4. *Thermo high-capacity cDNA reverse transcription kiti*

Component	Volume
10X RT Buffer	2.0 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 µL
10X RT Random Primers	2.0 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0 µL
Nuclease-free H ₂ O	4.2 µL
Total per reaction	10.0 µL

Aşağıda verilen Tablo 3.5. ile ısı koşulları sağlanarak cDNA reaksiyonu kuruldu.

Tablo 3. 5. *cDNA reaksiyon ısıları*

Settings	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
Temp.	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Time	10 minutes	120 minutes	5 minutes	Hold

3.2.9.3. Real Time PCR

Primerler için FastStart Essential DNA Green Master mix (Roche) kiti içerisinde verilen koşullar sağlanarak Tablo 3.6. da ki Real time PCR reaksiyonu kuruldu.

Tablo 3. 6. *Real Time PCR reaksiyonu*

Master Mix	10 ul
F-primer	1 ul
R-primer	1 ul
ddH ₂ O	3 ul
cDNA	5 ul
Toplam Hacim	20 ul

Hazırlanan reaksiyon aşağıdaki Tablo 3.7. de ki sıcaklık koşulları sağlanarak kuruldu.

Tablo 3. 7. *Sıcaklık koşulları*

Denaturasyon	95°C de 600 sn.
Amplifikasyon Bu döngü 40 kez sağlanır.	95°C de 10 sn. x°C de 10 sn. 72 °C de 10 sn.
Melting Curve	95°C de 10 sn. 65 °C de 60 sn. 97 °C de continue (Acquisitions 3 per/°C)
Cooling	37 °C de 30 sn.

X:Primer bağlanma sıcaklığı

Tablo 3. 8. Primer dizinler *Tnf*, mRNA

	Sequence(5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complemantarity	Self 3'complemantarity
Forward primer	TCTACTCCCAGG TTCTCTTC	20	55.29	50.00	3.00	0.00
Reverse primer	GCTGACTTTCTC CTGGTATG	20	55.55	50.00	3.00	0.00

Products on target templates Gen bankası no:>NM_01267.3NM_01267.3 Rattus norvegicus tumor necrosis factor, mRNA

Product length = 101

Forward primer 1 TCTACTCCCAGGTTCTCTTC 20

Template 554 573

Reverse primer 1 GCTGACTTTCTCCTGGTATG 20

Template 654 635

Tablo 3. 9. Primer dizinler *Nfkb1*- mRNA (Gene ID NM_001415012.1)

	Sequence(5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3'complemantarity
Forward primer	GGTTACGGGAGAT GTGAAGATG	22	58.54	50.00	3.00	0.00
Reverse primer	GTGGATGATGGCT AAGTGTAGG	22	58.27	50.00	3.00	1.00

Products on target templates Gen bankası no:>NM_001415012.1 Rattus norvegicus tumor factor kappa B subunit 1, transcript variant 1,mRNA

Product length = 100

Forward primer 1 GGTTACGGGAGATGTGAAGATG 22

Template 2014 2035

Reverse primer 1 GTGGATGATGGCTAAGTGTTAGG 22
 Template 2113 2092

Tablo 3. 10. *Primer dizinler Gapdh, mRNA*

	Sequence(5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complem antarity	Self 3'complem antarity
Forward primer	GACCCCTTCATTG ACCTCAA	27	58	50	3.00	0.00
Reverse primer	CTCCTGGAAGATG GTGAT	27	58	50	3.00	0.00

Gen bankası no:>NM_017008.4 Rattus norvegicus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh), mRNA

Product length = 135

Forward primer 1 GACCCCTTCATTGACCTCAA 20

Template 172 191

Reverse primer 1 CTCCTGGAAGATGGTGAT 18

Template 306 289

3.2.10. İstatistiksel analiz

Bu tez çalışmasında GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, ABD) ve Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 25.0 (Chicago, IL, ABD) istatistik programları kullanıldı. Çalışmada elde edilen bulgular, ortalama ± standart sapma (SS) olarak verildi. Tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve ardından Tukey post-hoc istatistik testleri; enzimatik, non-enzimatik ve element aktivitelerinin ölçümlerinde gruplar arası kıyaslamalarda uygulandı. Gen ekspresyonu ve biyokimyasal deneylerinin analizlerinde ise tek yönlü ANOVA, devamında LSD testi uygulandı ve istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Histolojik ve immünohistolojik değerlendirmelerde gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirmek için çeşitli istatistiksel yöntemler kullanılmıştır. İki'den fazla grubun genel farklılıklarını belirlemek amacıyla

Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. İki grup arasındaki karşılaştırmalarda ise Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. Bu testler, verilerin parametrik test varsayımlarını karşılamadığı durumlarda tercih edilen non-parametrik yaklaşımlardır. Çoklu karşılaştırmaların getirebileceği Tip I hata riskini kontrol altına almak için Bonferroni düzeltmesi yapılmış ve bu non-parametrik testlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi 0.01 ($\alpha=0.01$) olarak kabul edilmiştir. Bağımlı değişkenlerin analizi için ise eşleştirilmiş örneklem t-testi (paired samples t-test) kullanılmıştır. Bu analizde istatistiksel anlamlılık düzeyi 0.05 ($\alpha=0.05$) olarak belirlenmiştir (Chen vd., 1999).



4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

4.1.1. Oksidatif stres parametreleri

Pb asetata 30 gün maruz kalmış uygulama grupları ile uygulama yapılmayan kontrol gruplarına ait karaciğer biyokimyasal değerleri Şekil 4.1. de ve Tablo 4.1. te dir.

Çalışma gruplarında biyokimyasal parametrelerden olan doku MDA seviyelerine ait sonuçlara bakıldığında; Kontrol grubu MDA düzeyine göre P ve PN gruplarında istatistiksel olarak önemli artışlar tespit edildi ($p<0.001$). PN grubu MDA düzeyi P grubuna göre ise istatistiksel olarak önemli anlamda düşüş olduğu gözlemlendi ($p<0.01$).

Karaciğer doku GSH düzeylerine ait sonuçlar incelendiğinde P grubunda GSH düzeyine göre K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan nispi azalma tespit edildi ($p>0.05$). N ve PN gruplarında ise K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlendi ($p<0.05$). NP grubu da P grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Karaciğer doku AChe enzim düzeylerine ait sonuçlar değerlendirildiğinde; P ve PN gruplarının K grubuna göre istatistiksel olarak önemli miktarda artışlar tespit edildi ($p<0.01$).

Karaciğer doku GST enzim aktivite düzeylerine ait sonuçlar değerlendirildiğinde; N ve PN grupları K grubuna göre istatistiksel olarak önemli miktarda yükseldiği tespit edildi ($p<0.01$, $p<0.001$). P grubunda ise PN grubuna kıyasla önemli derecede düşüş tespit edildi ($p<0.001$).

Karaciğer doku CaE enzim aktivite düzeylerine ait sonuçlar değerlendirildiğinde; CaE enzim aktivitesine göre P grubu ile K grubu karşılaştırıldığında P grubunun K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). PN grubunun K, N ve P gruplarına kıyasla istatistiksel olarak artmış olduğu gözlemlendi ($p<0.001$).

Karaciğer doku GR enzim aktivite düzeylerine ait sonuçlar değerlendirildiğinde; N grubunun K grubuna kıyasla GR enzim düzeyinin artmış olduğu tespit edildi ($p<0.01$), P grubunun ise K ve N gruplarına kıyasla GR enzim aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p<0.001$).

4.1.2. Rat serum biyokimya parametreleri

Pb asetata 30 gün maruz kalmış uygulama grupları ile uygulama yapılmayan kontrol gruplarına ait rat serum ALT ve AST değerleri Tablo 4.2. ve Şekil 4.2. de verilmiştir.

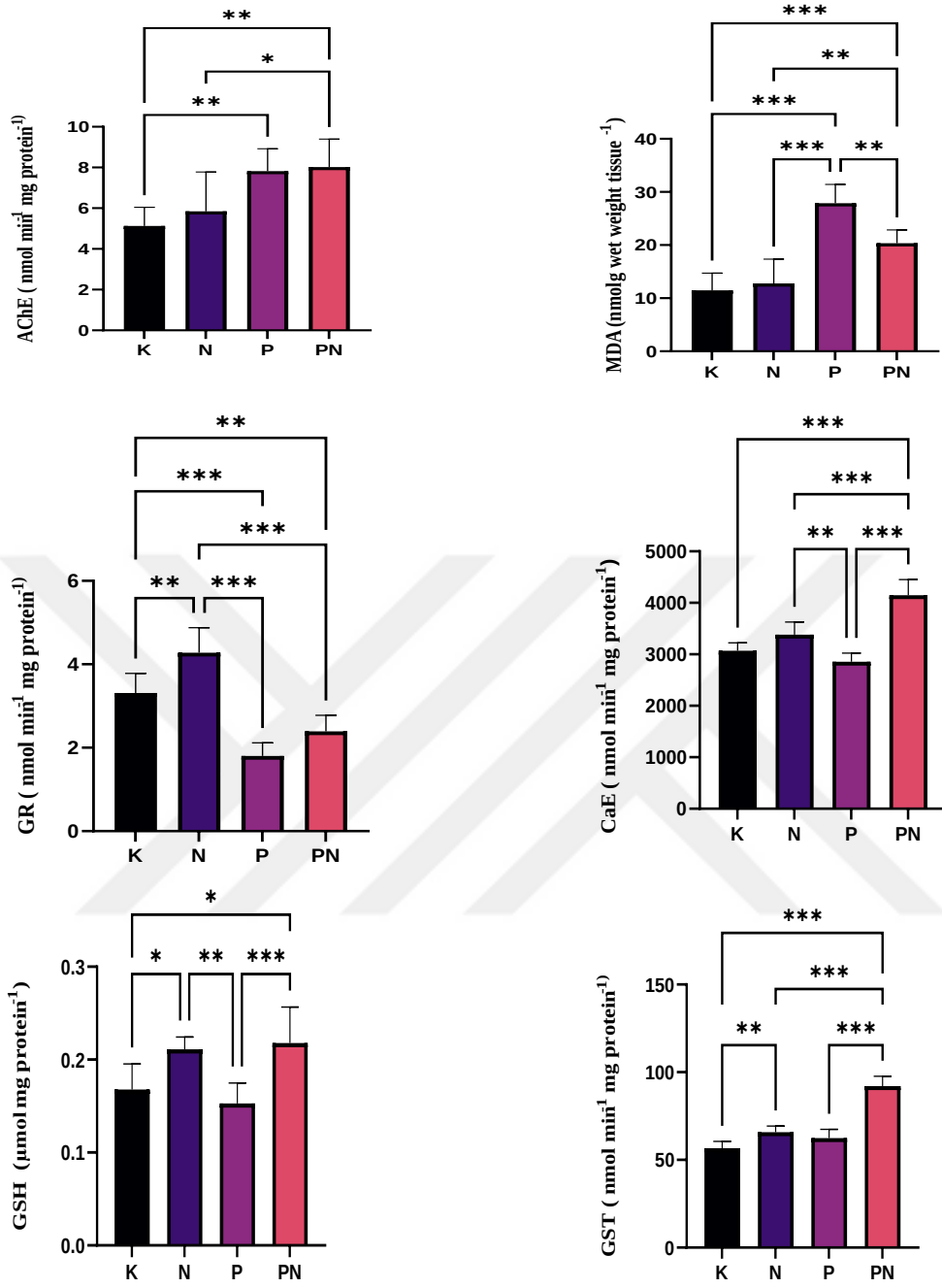
Rat serum AST seviyeleri kontrol grubu, naringinin ve Pb+naringinin gruplarında birbirine benzer ve Pb grubuna göre anlamlı olarak düşüktür. ($p<0.01$).

Rat Serum ALT Seviyeleri Analizi yapılan analizlerde, Pb grubundaki sıçanların serum ALT (Alanin Aminotransferaz) seviyelerinin diğer tüm gruplarla karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.0001$). Bu bulgu, kurşunun karaciğerde önemli bir hasara yol açtığını ve karaciğer fonksiyonlarını bozduğunu açıkça göstermektedir, zira ALT seviyeleri karaciğer hasarının önemli bir göstergesidir.

Tablo 4. 1. *Karaciğer dokusu biyokimyasal parametreleri*

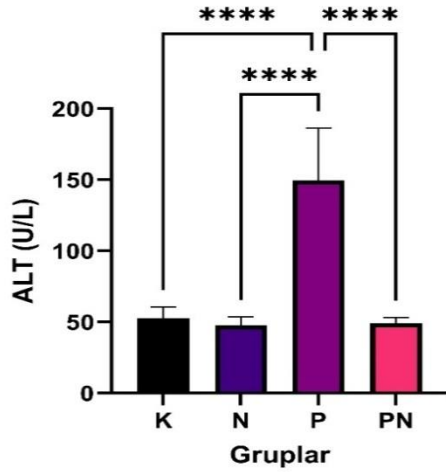
Group	K	N	P	N+P
AChE	5,13±0,92	5,84±1,94	7,82±1,10	8,02±1,37
GST	56,70±3,94	65,80±3,60	62,50±4,99	92,10±5,65
CaE	3067±157	3382±246	2856±165	4147±306
GR	3,3±0,47	4,28±0,60	1,80±0,32	2,39±0,39
MDA	11,5±3,25	12,8±4,55	27,9±3,56	20,3±2,51
GSH	0,17±0,03	0,21±0,01	0,15±0,02	0,22±0,04

Karaciğer dokusu (ortalama±SD, nmol min⁻¹ mg protein⁻¹)

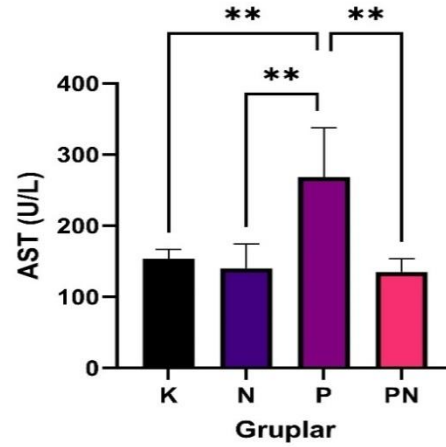


Şekil 4. 1. Karaciğer dokusu biyokimyasal parametreleri (ortalama±SD).
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

A



B



Şekil 4.2. Rat serum AST ve ALT parametreleri (ortalama±SD).

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

Tablo 4. 2. Rat serum ALT ve AST seviyeleri

Gruplar	Kontrol Mean±SD	Naringin Mean±SD	Pb Mean±SD	Pb+Naringin Mean±SD	P degeri
ALT (U/L)	52,57±8,10 ^c	47,80±5,71 ^c	149,50±37,08 ^{a,b,d}	49,01±4,08 ^c	0,000
AST (U/L)	153,50±1,27 ^c	140,25±34,02 ^c	268,01±69,40 ^{a,b,d}	135,02±18,77 ^c	0,001

Her grup ortalama ± SD'yi temsil eder, a: Kontrol'den anlamlı, b: Naringin'den anlamlı, c: Pb'dan anlamlı, d: Pb+Naringin'den anlamlı

4.2. Histolojik Bulgular

Hematoksilen&Eozin ve Masson Trikrom boyamalarının ışık mikroskobu altında incelenmesiyle, Kontrol ve Naringin gruplarının karaciğer dokularında normal histolojik yapılar gözlemlendi. Bu gruplarda portal alanlar, hepatositler, sinüzoidler ve sinüzoidlerdeki Kupffer ile endotel hücreleri tamamen normaldi ($p>0.05$).

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, Pb asetat grubunda belirgin konjesyon, hepatositlerde dejenerasyon, inflamatuvar hücre artışı, hepatosit kordonlarında dilatasyon ve bağ dokusu artışı tespit edildi. Bu bulguların tümü istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.001$).

Pb asetat grubuyla kıyaslandığında, Pb asetat + Naringin grubunun karaciğer dokusunda önemli iyileşmeler gözlemlendi. Bu grubun görünümü, kontrol grubuna benzerlik gösteriyordu ve aşağıdaki parametrelerde istatistiksel olarak belirgin azalmalar kaydedildi;

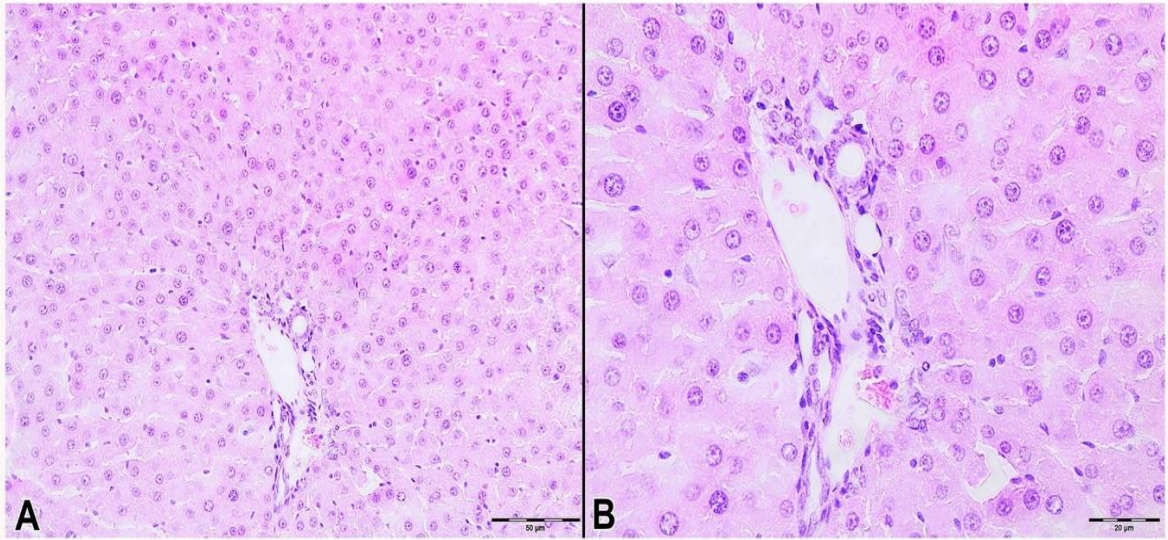
Hemoraji (siyah ok ile belirtilen): $p<0.001$, İnflamatuvar hücre artışı: $p<0.001$, Sinüzoidal dilatasyon: $p<0.001$, Bağ dokusu artışı: $p<0.001$, Bu sonuçlar, naringinin kurşun asetatın neden olduğu karaciğer hasarına karşı önemli bir koruyucu etki sergilediğini düşündürmektedir (Tablo 4.3).

Tablo 4. 3. Histopatolojik skorlama

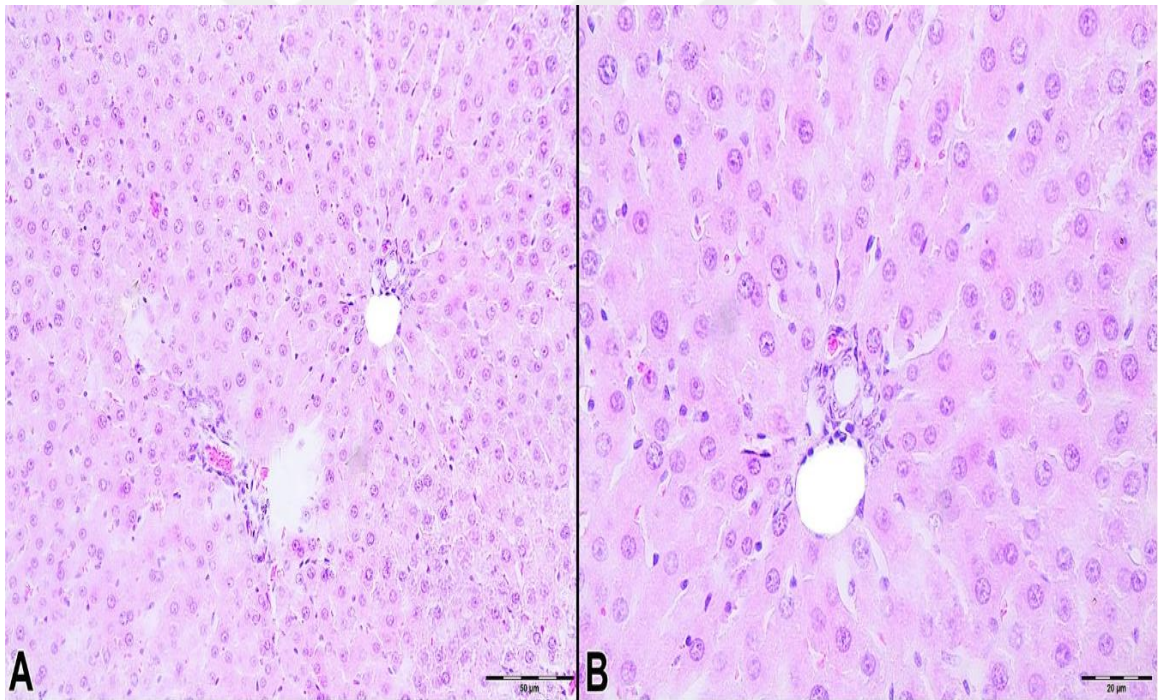
	Hepatositlerde dejenerasyon Median (min-maks)	Konjesyon Median (min- maks)	İnflamatuvar hücre artışı Median (min-maks)	Hepatosit kordonlarında dilatasyon Median (min-maks)	Bağ dokusu artışı Median (min- maks)
Kontrol	0,00 (0,0-1,00)	0,00 (0,0-1,0)	0,00 (0,0-0,0)	0,00 (0,0-1,00)	0,00 (0,0-0,0)
Naringin	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pb asetat	3,0 (2,0-3,0) ^a	3,0 (1,0-4,0) ^a	3,0 (2,0-3,0) ^a	2,0 (1,0-3,0) ^a	2,0 (2,0-3,0) ^a
Pb asetat+Naringin	0,0 (0,0-1,0) ^b	0,0 (0,0-1,0) ^b	0,0 (0,0-0,0) ^b	0,0 (0,0-1,0) ^b	0,0 (0,0-0,0) ^b

Değerler median (min-maks) olarak verilmiştir. ^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

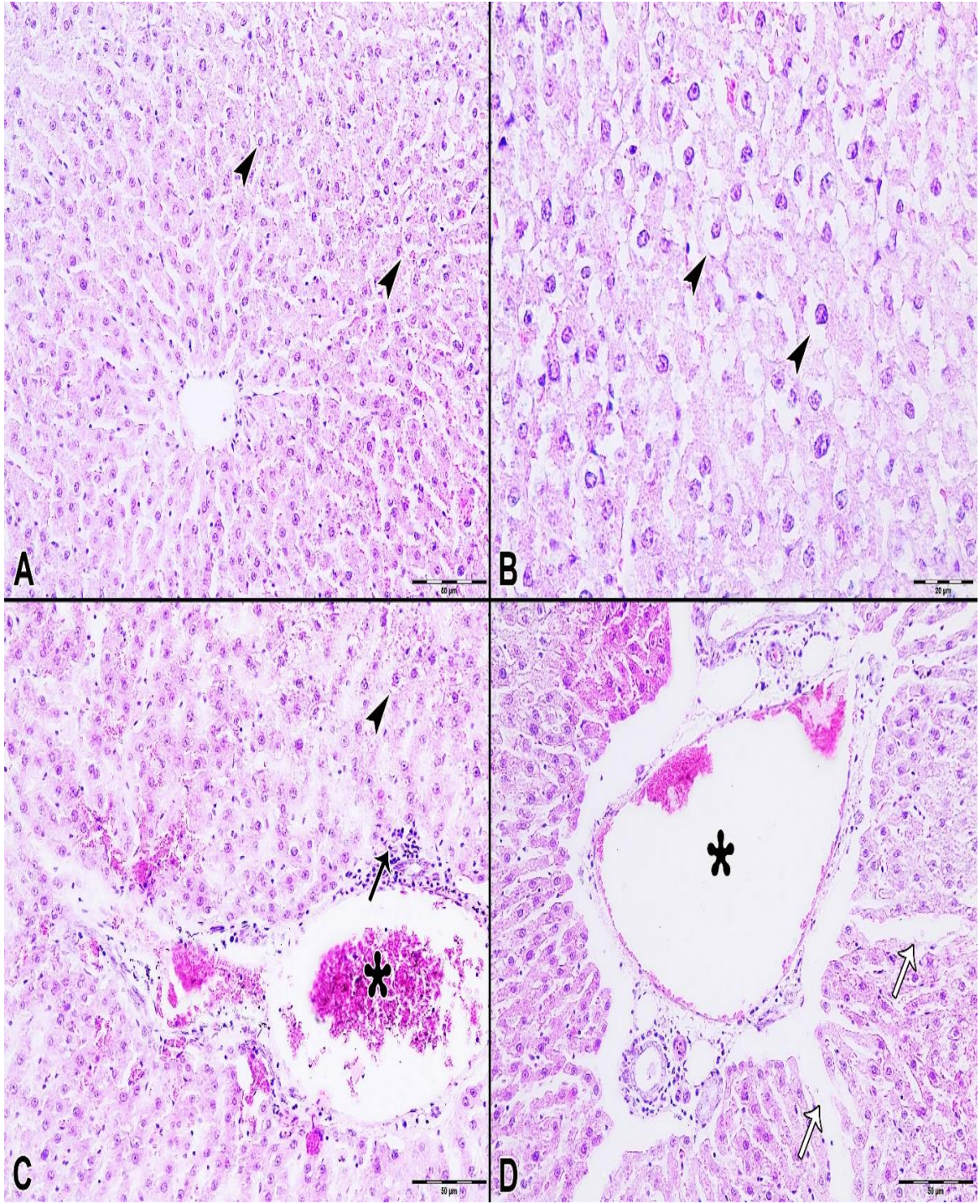
^b Pb asetat grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı ($p<0,01$).



Şekil 4. 3. *Kontrol grubu rat karaciğer histolojik görüntüsü*
Normal histolojik yapıda görülmektedir (A: X200, Scala bar: 50µm, B: Scala bar: 20µm X400. H & E boyama).

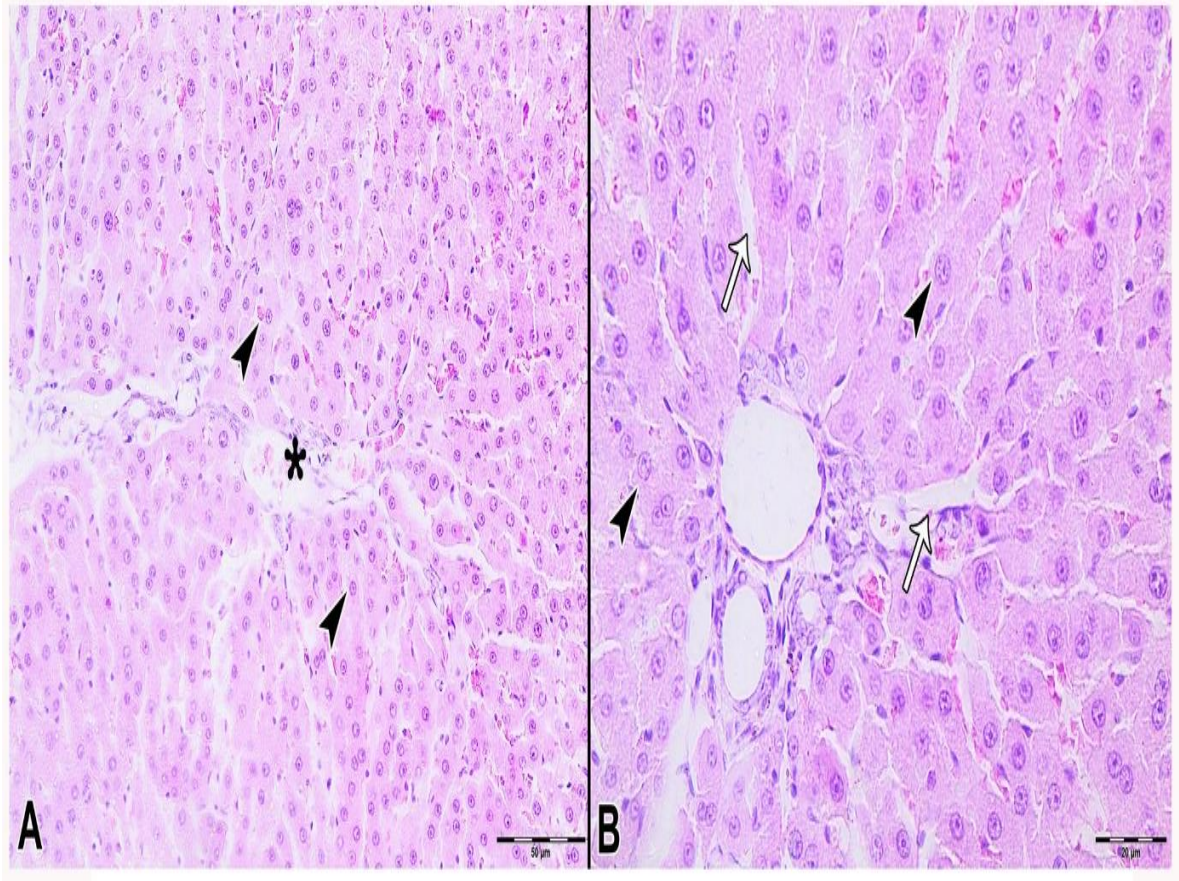


Şekil 4. 4. *Naringinin grubu rat karaciğer histolojik görüntüsü*
Normal histolojik yapıda görülmektedir. (A: X200, Scala bar: 50µm, B: Scala bar: 20µm X400. H & E boyama).



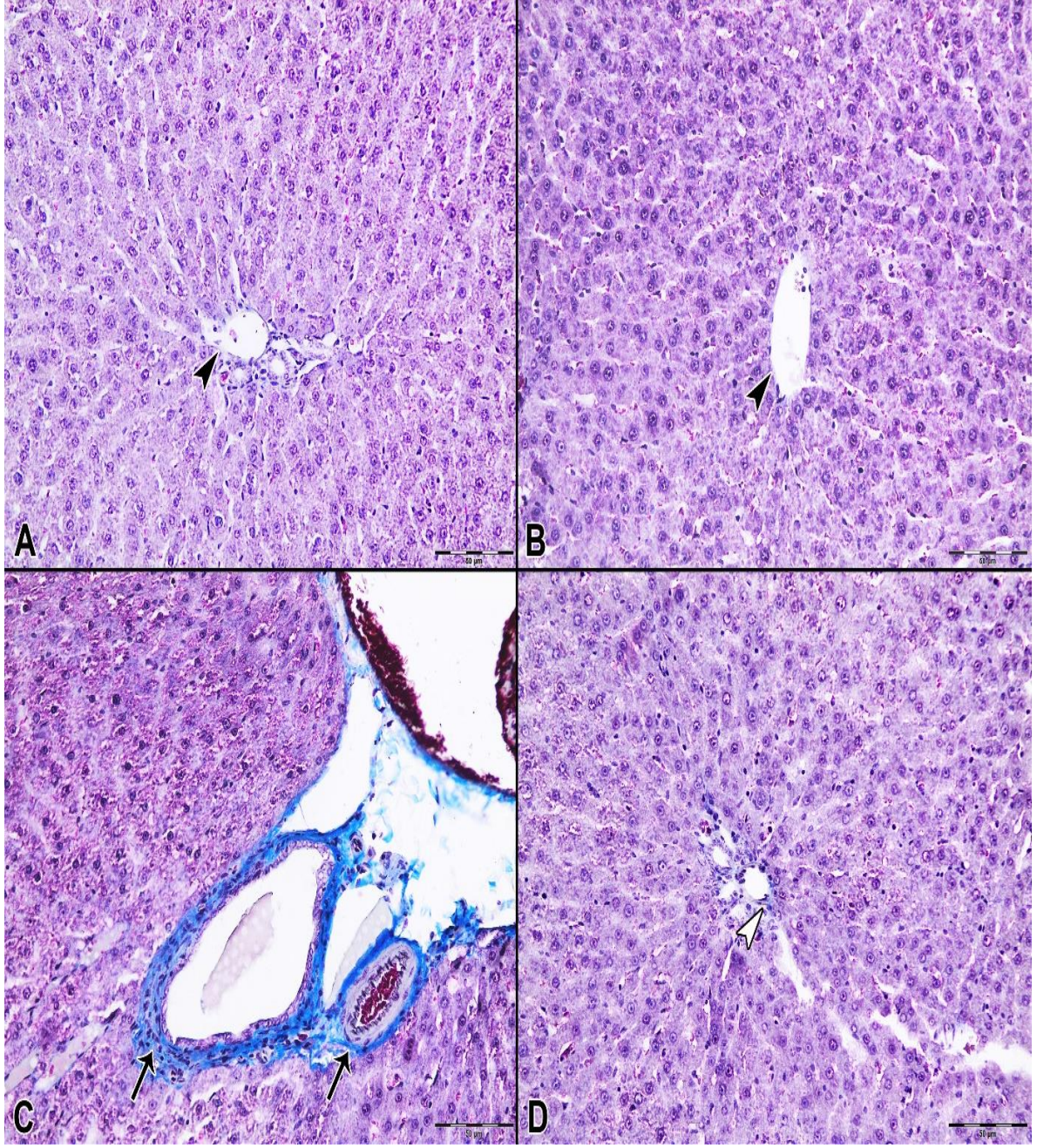
Şekil 4. 5. *Pb asetat grubu rat karaciğer histolojik görüntüsü (A-D)*

Kontrol ve Naringinin gruplarına göre histopatolojik hasarın olduğu izlenmekte (**Siyah ok başı:** Hepatositlerde dejeneratif ve intraselüler vakuoller, **Siyah ok:** inflamatuvar hücre infiltrasyonu, **Siyah yıldız:** vasküler konjesyon, **Beyaz ok:** hepatik kordonlar arasında dilatasyon). (Scala bar: 50µm, A, C ve D X200. Scala bar: 20µm B X400. H & E boyama).



Şekil 4. 6. *Pb+naringin grubuna ait rat karaciğer dokusunun farklı büyütmelerdeki histolojik görüntüleri.*

Pb asetat grubuna göre tedavi olarak uygulanan Naringin'in histopatolojik hasarı hafiflettiği izlenmektedir; Buna göre hepatositlerde dejenerasyon (siyah ok başı), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (siyah ok), ile vasküler konjesyonun hafiflediği ve bununla birlikte (vasküler yıldız), hepatik kordonlar arasında dilatasyonun (Beyaz ok) azaldığı görülmektedir. (A: Scala bar: 50µm, X200 B: Scala bar: 20µm B X400. H & E boyama)



Şekil 4. 7. *Tüm gruplara ait ratların karaciğer histolojik görüntüsü (A-D).*
(Kontrol grubu: A, Naringenin grubu: B, Pb asetat grubu: C, Pb asetat+ Naringenin grubunda: D, Scala bar: 50µm, A, B, C, D X200, Masson Trikom boyama).

Kontrol grubu ve Naringenin gruplarındaki damar çevrelerinde normal morfolojiye ye sahip bağ dokusu (siyah ok başı) izlenmekle birlikte, Pb asetat grubunda damar çevresinde bağ dokusu liflerinin (siyah ok), Kontrol ve Naringenin gruplarına göre arttığı tedavi grubu olan Pb asetat+Naringenin grubunda ise damar çevrelerinde bağ dokusu artışının Pb asetat grubuna göre azaldığı (beyaz ok başı) görüldü.

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.3.1. Karaciğer dokusunda NF-κB düzeyi

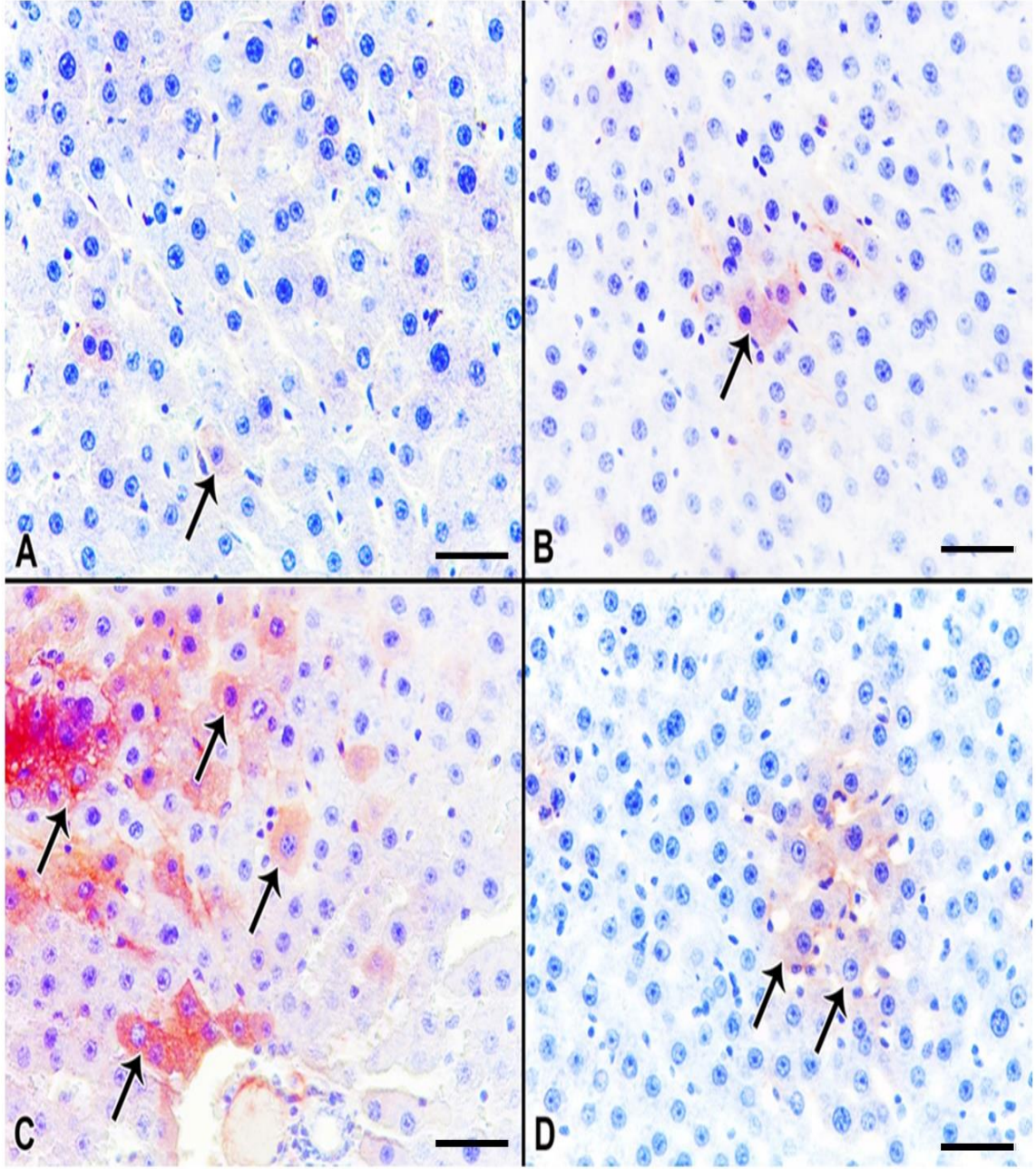
Karaciğer Dokusunda NF-κB İmmünreaktivitesi bulguları Işık mikroskobu altında yapılan immünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre, NF-κB immünreaktivitesi karaciğer dokusunda (siyah ok ile belirtilen bölgeler) gözlemlenmiştir. Bu bulgular Şekil 4.6 ve Tablo 4.4'de ayrıntılı olarak sunulmuştur. Kontrol ve Naringinin grupları arasında NF-κB immünreaktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir ($p=0,446$). Elde edilen bulgular, naringinin tek başına NF-κB seviyeleri üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Buna karşın, Pb asetat grubunda NF-κB immünoreaktivitesi, kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış kaydetmiştir. Bu durum, kurşun asetatın karaciğerde güçlü bir inflamatuvar yanıtı tetiklediğini ve NF-κB aktivasyonunu artırdığını açıkça ortaya koymaktadır.

Sevindirici bir bulgu olarak, P grubuyla kıyaslandığında PN grubunda NF-κB immünoreaktivitesinde istatistiksel açıdan belirgin bir düşüş gözlenmiştir ($p<0,001$). Bu sonuç, Naringinin'in kurşun asetatın neden olduğu NF-κB aktivasyonunu baskılayarak inflamasyonu azaltma potansiyeline sahip olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Tablo 4. 4. NF-κB Histoskoru

	NF-κB histoskoru Median (min-maks)
Kontrol	0,20 (0,10-0,40)
Naringinin	0,30 (0,10-0,30)
Pb asetat	1,20 (1,20-2,40)
Pb asetat +Naringinin	0,40 (0,20-0,40) ^b

Değerler ortalama $\pm$ Median (min-maks) olarak verilmiştir.^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ^b Pb asetat grubu ile karşılaştırıldığında, ($p<0.001$).



Şekil 4. 8. *Tüm rat grubunun karaciğer dokusunda NF-κB immünreaktivitesi histolojik görüntüsü (A-D)*

Kontrol ve Naringin gruplarına göre NF-κB immünreaktivitesi, Pb grubunda arttığı bununla birlikte tedavi grubunda ise azaldığı görülmekte (siyah ok ile izlenmekte). (A: Kontrol grubu, B: Naringinin grubu C: Pb grubu, D: Pb+naringinin grubu, İmmünohistokimyasal boyama, AEC kromojen, Mayers Hematoksilen, Scala bar: 50 µm, X400 büyütme).

4.3.2. Karaciğer dokusunda Tnf- α düzeyi

Karaciğer Dokusunda TNF- α İmmünreaktivitesi Bulguları Işık mikroskobu altında yapılan immünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre, TNF- α immünreaktivitesi karaciğer dokusunda (kırmızı ok ile belirtilen bölgeler) gözlemlenmiştir. Kontrol ve Naringin grupları arasında TNF- α immünoreaktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0.446$). Bu bulgu, naringininin tek başına TNF- α düzeyleri üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını göstermektedir. Ancak, Pb asetat grubunda TNF- α immünoreaktivitesi, kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p<0.001$). Bu bulgu, kurşun asetatın karaciğerde önemli bir inflamatuvar yanıt tetiklediğini ve TNF- α üretimini artırdığını açıkça ortaya koymaktadır. Pb asetat grubu ile kıyaslandığında ise Pb asetat + Naringinin grubunda Tnf- α immünreaktivitesi azalmıştı ($p<0,001$), (Tablo 4.5.).

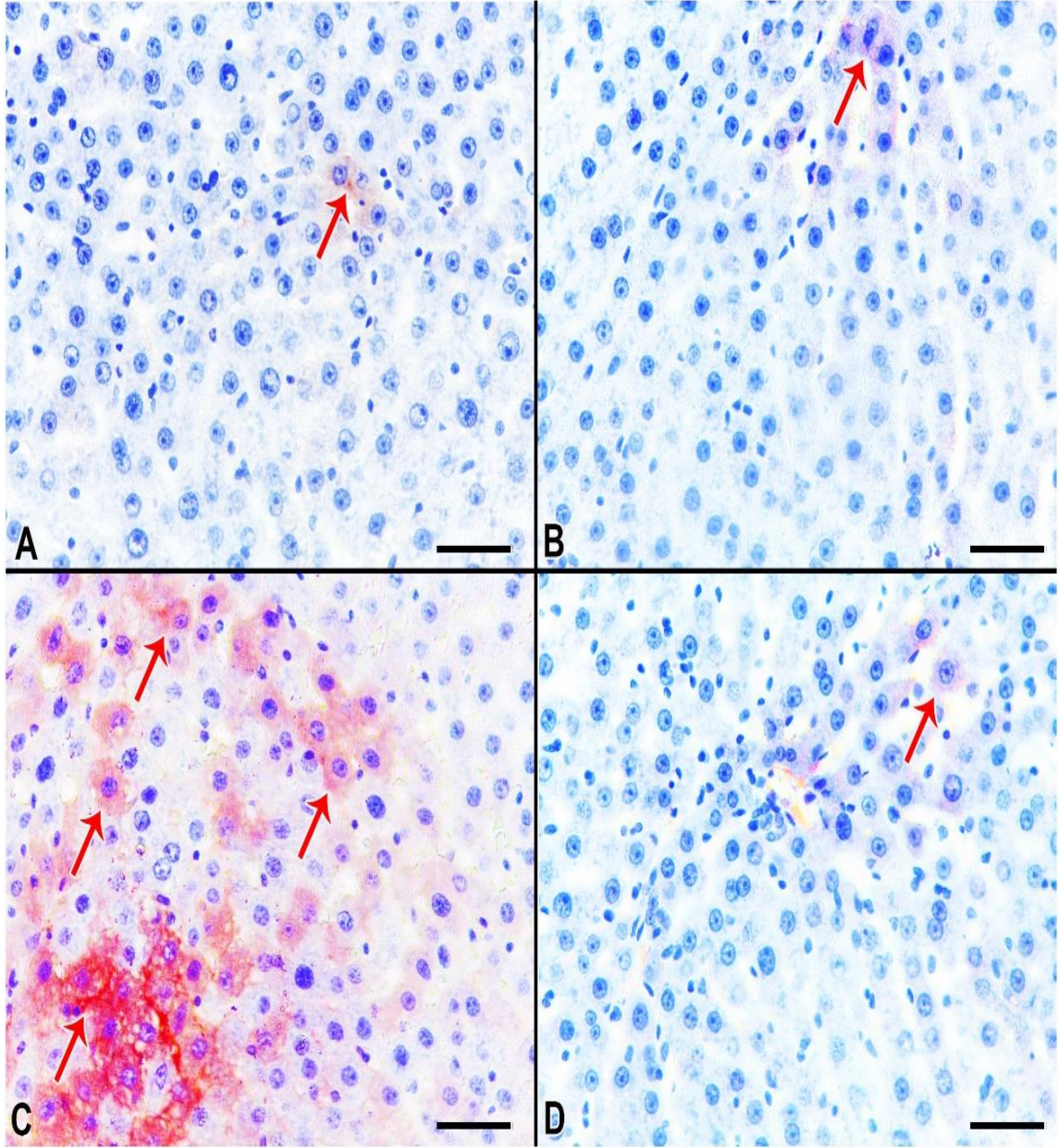
Tablo 4. 5. *Tnf- α histoskoru*

	Tnf- α histoskoru
	Median (min-maks)
Kontrol	0, 20(0,10-0,20)
Naringinin	0, 20(0,10-, 0,30)
Pb asetat	1,20(0,90-2,40) ^a
Pb asetat +Naringinin	0, 20(0,20-0,30) ^b

Değerler ortalama $\pm$ Median (min-maks) olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b Pb asetat grubu ile karşılaştırıldığında, ($p<0.001$).



Şekil 4. 9. *Tüm grubu rat karaciğer dokusunda Tnf- α immünreaktivitesi histolojik görüntüsü (A-D)*

Kontrol ve Naringin gruplarına göre Tnf- α immünreaktivitesi, Pb grubunda arttığı bununla birlikte tedavi grubunda ise azaldığı görülmekte (siyah ok ile izlenmekte). (A: Kontrol grubu, B: Naringinin grubu C: Pb grubu, D: Pb+naringinin grubu, İmmünohistokimyasal boyama, AEC kromojen, Mayers Hematoksilen, Scala bar: 50 μ m, X400 büyütme)

4.4. Element Analiz Bulguları

Pb'ye maruz bırakılan ratların karaciğer dokularındaki metal seviyeleri Tablo 4.6. ve Şekil 4.10. da verilmiştir. Karaciğer dokusunda eser element ve mineral seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.10.),

Cu seviyesinin P grubu K ve N grubuna kıyasla azaldığı istatistiksel olarak gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

Demir (Fe) Seviyeleri Analizi yapılan analizlerde, demir (Fe) seviyelerinin N grubunda K grubuna kıyasla nispeten artış gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşılık, P grubunda ($p<0,001$) ve PN grubunda ($p<0,05$) anlamlı azalma vardır. Bu bulgular, farklı grupların demir metabolizması üzerindeki etkilerini ortaya koymaktadır.

Zn seviyeleri kıyaslandığında, N ve P grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ve N uygulamasının çinko seviyesini yükselttiği tespit edilmiştir ($p<0,01$).

Manganez seviyeleri analizi yapılan değerlendirmelerde, manganez seviyeleri açısından K ve N grupları, P ve PN gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$). Bu sonuç, kurşun maruziyetinin ve naringinin kurşunla birlikte uygulanmasının manganez seviyeleri üzerinde belirgin bir düşüşe neden olduğunu göstermektedir.

Pb düzeyleri incelendiğinde, P ve PN gruplarının K ve N gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir ($p<0.001$). Dikkat çekici bir şekilde, PN grubundaki Pb seviyesi, P grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmıştır ($p<0.001$).

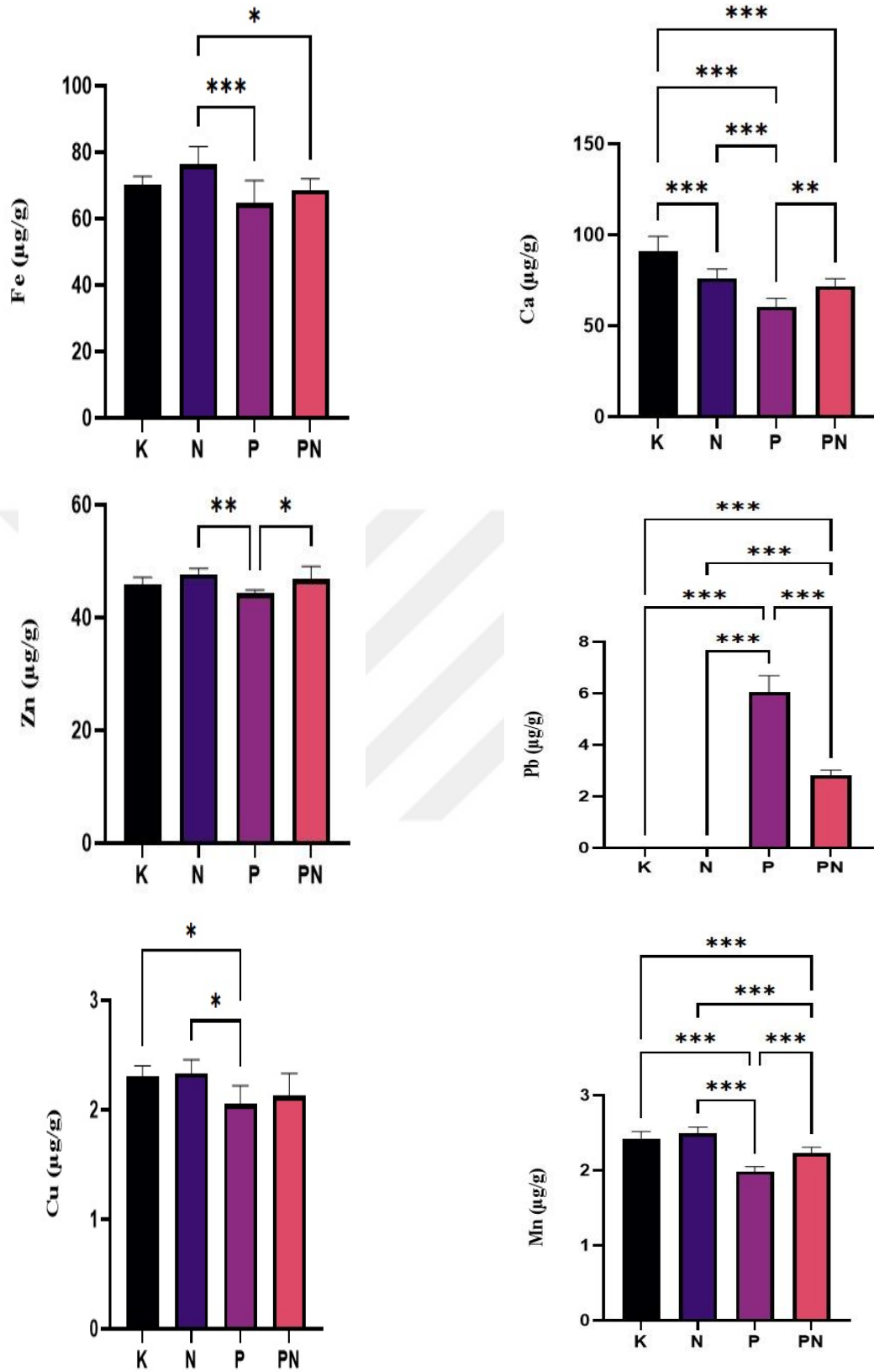
Mg seviyeleri ölçüldüğünde, N grubunun seviyesi, P ve PN gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Yapılan analizlerde, P grubundaki kalsiyum (Ca) seviyelerinin, K ve N gruplarına kıyasla istatistiksel olarak düşük olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.001$). Bu bulgu, kurşun maruziyetinin vücuttaki kalsiyum düzeylerini belirgin şekilde olumsuz etkilediğini göstermektedir.

Tablo 4. 6. *Karaciğer dokusu metal düzeyleri*

Elements/Group	K	N	P	N+P
Cu±	2,30±0,10	2,33±0,12	2,05±0,17	2,13±0,20
Fe	70,20±2,53	76,30±5,37	64,80±6,66	68,70±3,32
Zn	45,80±1,33	47,70±1,02	44,30±0,64	46,80±2,34
Mn	2,42±0,09	2,49±0,08	1,98±0,06	2,23±0,08
Pb	ND	ND	6,05±0,63	2,81±0,20
Mg	143,39±6,18	157,22±7,85	116,24±10,8	125,03±8,53
Ca	91,10±7,98	76,10±5,09	60,40±4,70	71,80±4,07

(ortalama±SD, µg/g)



Şekil 4. 10. Karaciğer dokusundaki metal seviyeleri (ortalama±sd, µg/g).

İstatistiksel veriler ns: anlamlı değil, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

4.5. Gen Ekspresyon Bulguları

4.5.1.Naringinin NF-κB gen ekspresyon düzeyine etkisi

Karaciğer Dokusunda NF-κB Gen Ekspresyonu Analizi çalışmanın 28. gününde sıçanlardan alınan karaciğer dokularından izole edilen RNA ve cDNA örnekleri kullanılarak NF-κB gen ekspresyonu analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki NF-κB ekspresyon düzeyleri Şekil 4.11 ve Tablo 4.7' de detaylı olarak sunulmuştur.

Gerçekleştirilen analizler sonucunda, Pb grubunda NF-κB ekspresyon düzeylerinin, diğer tüm gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.0001$). Bu bulgu, kurşun maruziyetinin karaciğerde NF-κB sinyal yolunu önemli ölçüde aktive ettiğini ve inflamatuvar yanıtı tetiklediğini göstermektedir.

Diğer uygulama ve kontrol gruplarının NF-κB ekspresyon düzeylerinde farklılıklar gözlemlenmesine rağmen, bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Bu durum, kurşun dışındaki müdahalelerin NF-κB ekspresyonu üzerinde belirgin bir etki yaratmadığını düşündürmektedir.

4.5.2.Naringinin TNF α gen ekspresyon düzeyine etkisi

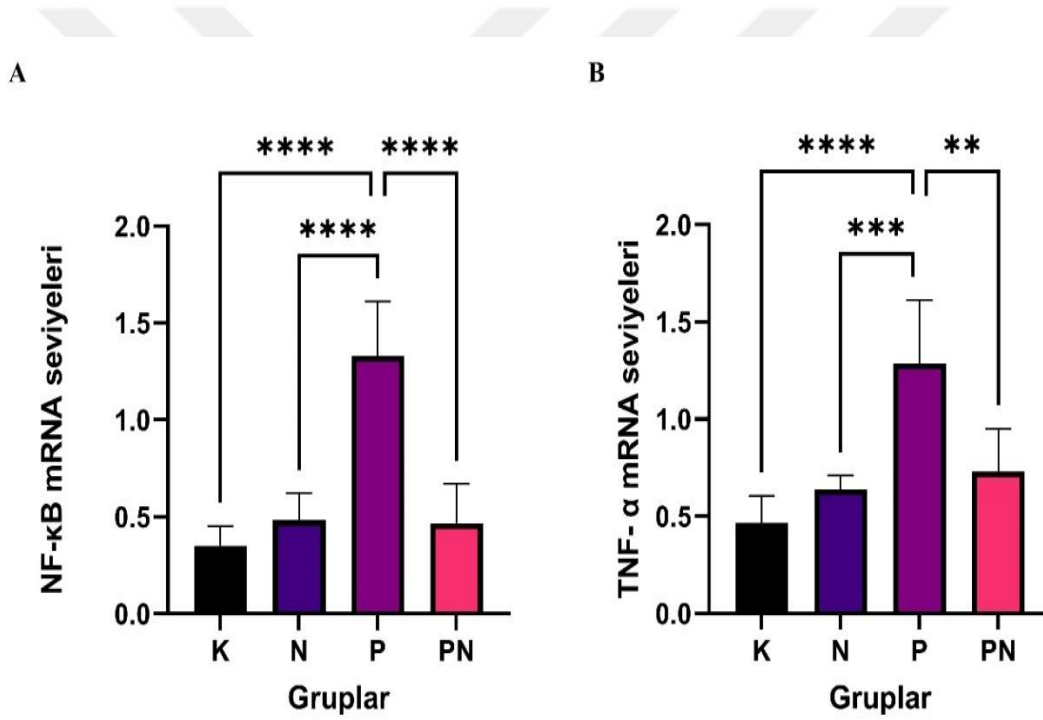
Karaciğer Dokusunda TNF-α Gen Ekspresyonu Analizi Çalışmanın 28. gününde sıçanlardan alınan karaciğer dokularından elde edilen RNA ve cDNA örnekleri kullanılarak TNF-α gen ekspresyonu analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki TNF-α ekspresyon düzeyleri Şekil 4.11 ve Tablo 4.7'de ayrıntılı olarak sunulmuştur. Yapılan analizler sonucunda, Pb grubunda TNF-α ekspresyon düzeylerinin diğer tüm gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (**** $p < 0.0001$). Bu bulgu, kurşun maruziyetinin karaciğerde güçlü bir inflamatuvar yanıtı tetikleyerek TNF-α üretimini önemli ölçüde artırdığını göstermektedir.

Diğer uygulama ve kontrol gruplarının TNF-α ekspresyon düzeyleri arasında gözlemlenen farklılıklar ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Bu durum, kurşun dışındaki müdahalelerin TNF-α ekspresyonu üzerinde belirgin bir etki yaratmadığını düşündürmektedir.

Tablo 4. 7. *TNF α ve NFκB mRNA seviyeleri*

Gruplar	Kontrol Mean±SD	Naringin Mean±SD	Pb Mean±SD	Pb+Naringin Mean±SD	P değeri
TNF α	0,46±0,14 ^c	0,63±0,07 ^c	1,28±0,32 ^{a,b,d}	0,73±0,22 ^c	0,000
NF-κB	0,35±0,10 ^c	0,48±0,14 ^c	1,32±0,28 ^{a,b,d}	0,46±0,21 ^c	0,000

Her grup ortalama ± SD'yi temsil eder, a; Kontrol'den anlamlı; b; Naringin'den anlamlı; c; Pb'dan anlamlı; d; Pb+Naringin'den anlamlı



Şekil 4. 11. *Karaciğer dokusu NF-κB ve TNF α gen ekspresyonu parametreleri (ortalama±sd).*

İstatistiksel veriler *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, **** p< 0.0001

5. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

5.1. Tartışma

İnsanlar yaşamları boyunca ağır metalleri; tükettikleri gıdalardan, çevre koşullarından ve soludukları havadan alarak dokularında biriktirirler, bu biriken ağır metaller ilerleyen zaman dilimlerinde hücrelerde oksidatif strese bağlı serbest radikal oluşturmaktadır. Dokularda biriken ağır metaller sonucunda serbest radikallerin oluşum ve miktarının artması hücrelerde zarara neden olabilir. Bu ağır metallerden özellikle Pb, Fe, Cd ve Cu'nun dokularda birikimi sonucu hücrelerde inflamasyon ve toksik etki görülebilmektedir (Järup, 2003).

Çalışmamızda karaciğer toksisitesine karşı kullanılan molekül olan Naringinin, lipofilik karakterde olduğundan hücre membranına kolayca bağlanarak serbest radikallerin oluşumunu en aza indirdiği ve bu sayede hücre membranını koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca naringinin molekülü toksisite ve inflamasyon çalışmalarında da konservatif özellikler gösterdiği bilinmektedir (Chtourou vd., 2015; Hermenean vd., 2014; Lee vd., 2004; Renugadevi ve Prabu, 2009; Singh vd., 2004)

Bu tez çalışmasında, Pb asetat ile oksidatif stres oluşturan rat karaciğer dokuları üzerine naringin molekülünün antioksidan enzimler, MDA, GSH, bazı mineraller, histopatolojik ve immünohistokimyasal parametreler ile NF- κ B ve TNF α gen ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri araştırıldı.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki ağır metal olan Pb özellikle hücrelerde antioksidatif mekanizmanın değerli yolaklarından olan sülfidril grubu enzimlerin etkinliğini inhibe ederek linoleik, linolenik ve araşidonik asit, gibi yağların peroksidasyonunu yukarı doğru regüle ederek hücreler de MDA artmasına neden olur (Dua vd., 2016; Kim vd., 2015; Patrick, 2006)

2007 yılında berrehal ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Pb uygulanan grupta MDA enzimi seviyesinin yukarı doğru regüle olduğunu bildirmişlerdir (Annabi vd., 2007). Bizim çalışmada litaretür'e uygun olarak Pb grubu MDA düzeyinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artış olduğu gözlemlendi. Naringinin antioksidan etkisiyle kombinasyonlu grupta (PN) MDA düzeyi P grubuna göre azalttığı tespit edildi.

Naringinin asetaminofen kaynaklı karaciğer ve böbrek toksisitesinde iyileştirici etkisine bakıldığı çalışmada karaciğer ve böbrek gibi organlarda SOD ve GSH düzeylerinde önemli ölçüde arttırırken MDA'yı düşürdüğünü tespit etmişlerdir. 2016 yılında yapılan bu çalışmada naringinin karaciğer ve böbrek hücrelerinde asetaminofen kaynaklı hasara karşı

membran bütünlüğünü koruduğunu tespit etmişlerdir (Adil vd., 2016). Daha önce rapor edilen asetaminofen kaynaklı hasara karşı koruyucu etkisi gösterilen naringinin bizim çalışmamızda da Pb asetata bağlı oluşturulmuş bu karaciğer hasarını ve oksidatif stresi önemli ölçüde azalttığını tespit ettik.

Sprague- Dawley ratlara 8 hafta süresince ve 500 ppm konsantrasyonunda Pb asetata maruz bırakılan rat böbrek ve karaciğer dokularında MDA düzeyinin arttığı bu artış Naringenin molekülünün azalttığı rapor edilmiştir (Wang vd., 2012). (Ozkaya vd., 2016) tarafından yapılan çalışmada, dört hafta boyunca 500ppm uygulanan Pb asetatin Rat karaciğer dokularında MDA düzeylerini arttırdığı bildirilmiştir. Pb karaciğer dokusunda serbest radikallerden hidroperoksit, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve süperoksit radikallerini önemli düzeyde arttırdığı rapor edilmiştir (Liu vd., 2011), (Liu vd., 2012).

Çalışmada Pb gurubu GSH düzeyi kontrol grubuna göre nispi azalma gözlenirken, Kontrol ve Pb gurubu kombinsayonlu grupta (PN) önemli düzeyde arttığı tespit edildi.

Pb maddesi hücrede GSH nın yapısındaki tiyol gruplara bağlanarak yapısını bozmaktadır ve işlevini engellemektedir. Yapılan bir çalışmada Pb verilen Rat karaciğer dokularında GSH seviyesini azaltarak oksidatif strese neden olduğu rapor edilmiştir. Bu zararlı etkiyi ise naringenin düzelttiği rapor edilmiştir (Liu vd., 2011),(Wang vd., 2012). Yapılan çalışmada, Pb'un lipit peroksidasyonu arttırdığı ve azalan GSH düzeyinin naringin molekülü düzelttiği bulundu ilgili litaretürlerle uyumlu sonuçlar olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmada Pb grubu GR enzim aktivitesi istatistiksel olarak kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilirken CaE enzim aktivitesi ise Pb grubunda nisbi azaldığı gözlemlendi. Kontrol grubu AChe enzim aktivitesine göre Pb grubunda çok önemli artış saptandı. Ayrıca, kontrol grubu GST enzim aktivitesine göre Pb grubunda nispi artış gözlemlendi. Pb asetata maruz bırakılan Rat karaciğer dokuları üzerine geraniol'ün etkileri çalışmalarında, Pb grubu CaE ve GR enzim aktivitelerinin kontrol grubuna göre azaldığı rapor edilmiştir.

ALT ve AST, karaciğer toksisitesi için önemli endojen tanısal biyobelirteçlerdir. Sitoplazmada ve karaciğer hasarı sırasında yüksek konsantrasyonlarda bulunan bu iki önemli enzim, hepatotoksitenin derecesiyle uyumlu olarak kan dolaşımına sızar. Serumda AST ve ALT konsantrasyonunun artması, karaciğerde hücresel sızıntının ve hücre zarının işlevsel bütünlüğünün kaybının bir göstergesidir (Drotman, Lawhorn, & toxicology, 1978). Mevcut çalışmamızda serumdaki yüksek ALT ve AST değerleri Pbasetat kaynaklı karaciğer yetmezliğinin bir sonucudur. Çalışmamızda naringinin uygulanan guruplarda serumdaki

yüksek ALT ve AST değerleri kontrol grubundaki benzer değerlere düşürmüştür. Buda naringinin karaciğer toksisitesi biyobelirteci olan ALT ve AST' yi normal serum fizyolojik değerlerine düşürdüğünü tespit ettik.

Belirtilen çalışmada Pbun MDA seviyesini artırırken GSH ve GST düzeylerini azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca Pb grubu serum AST ve ALT düzeyindeki artışlar bir monoterpenoid türevli molekül olan geraniol'ün azalttığı bildirilmiştir (Ozkaya vd., 2018)

Hücre içerisinde GSH molekülü antioksidan sistem enzimleri ile birlikte önemli görevleri bulunmaktadır. Bu sistemde GSH ile birlikte savunma görevi yapan Glutatyon Peroksidaz (GP_x) GST ve GR enzimleri bulunmaktadır (Chen vd., 2009; McConnachie vd., 2007).

Pba maruz kalan Rat karaciğer dokularında, reaktif oksijen türleri ve TBARS düzeylerindeki önemli artış GP_x, GST ve GR aktivitelerindeki önemli azalış sonucunda dokudaki hepatotoksisite arasındaki ilişkiyi desteklemektedir (Liu vd., 2011).

Pb vücuda genellikle birkaç yolla girer: sindirim yoluyla (sindirim sistemi yoluyla), solunum yoluyla (solunum yolları yoluyla) ve az miktarda deri yoluyla. Pbun gastrointestinal yoldan alındığında, emilimin etkinliği, birçok nedenlerden dolayı farklı olsada, suda çözünen Pbun gastrointestinal emiliminin verimliliğinin önemli ölçüde yüksek olduğu iyi bilinmektedir (Rădulescu ve Lundgren, 2019). Bizim çalışmamızda suda çözünmüş Pbun diyet olarak verilmiş olması ve Pb ile kombinasyonlu gruplarda Pb metalinin karaciğer dokusunda yüksek oranda tespit edilmiş olması literatür bilgilerini desteklemektedir. Pb kontaminasyonunun etkileri; organizmadaki dinamik yörüngelerinin çoğu noktasında açıkça belirlenmiş olan kalsiyum farmakokinetiğiyle sıkı bir şekilde ilişkilidir.

Pb, hücre zarından transportunda kalsiyumla (Ca) rekabet ettiğinden, kalsiyumun yerini de alabilir ve bu durum birçok biyolojik fonksiyon üzerinde ciddi sonuçlar doğurabilir. Son yıllarda yapılan araştırmalar sadece Ca değil aynı zamanda Fe ve Zn gibi elementler ile de transprot sırasında taşıyıcı proteinlere Pb'un bağlandığı görülmüştür (Rădulescu ve Lundgren, 2019) Bizim çalışmamızda su diyetlerine Pb eklenmiş ratların karaciğer dokularında kalsiyum, demir ve çinkonun Pb grubu ile kombinasyonlu grupta naringin ve kontrol grubuna kıyasla istatistiksel anlamda önemli düşüşler göstermiş olması yüksek toksisiteye ulaşan Pb'un bu elementlerin yerini almış olabileceğini göstermektedir.

Altura ve arkadaşlarının 2003 yılında yapmış olduğu çalışmada magnezyum eksikliği NF-κB aktivasyonu aktive ederek inflamatuvar bir yanıtın başlatıldığını tespit etmişlerdir. İn

vitro koşullarda yapılan bu çalışmada hücre dışı Mg konsantrasyonlarındaki azalma NF-κB aktivasyonunu indüklendiğini tesit etmişlerdir (Altura vd., 2003). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada Pb asetata maruz bırakılmış ratların karaciğerinde Mg seviyeleri P gurubunda K ve N grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir ayrıca NF-κB ve TNF α gen ekspresyon seviyeleri K ve N grubuna göre yüksek bulunmuştur.

Cu vücutta hemoglobin sentezi için gerekli olup Fe'nin serbest hale geçmesini ve kolay emilimini sağlar (Parlakpınar vd., 2004). Çalışmamızdaki bulgular ışığında Fe ve Cu ın uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Liu ve arkadaşlarının 2019 yılında yapmış oldukları çalışmada; Cu eksikliği ile Karaciğer hastalığı arasındaki bağlantıyı kanıtlamışlardır. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada P grupta Cu seviyesinin diğer gruplara düşük olduğu grlmştir.

2015 yılında Demir ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada Pb asetat verilen ratlarda karaciğerde Mn seviyesini düşmesine neden olan enzimleri tetiklediği ve bu doğrultuda karaciğer hasarına yol açtığı belirtilmiştir (Demir vd., 2015). Bizim alışmamızdaki bulgularda göstermiştir ki; N gurubunun K gurubuna göre Mn seviyesinin yüksek olduğu fakat P gurubun Mn seviyesi K ve N gurubun göre düştüğü tespit edilmiştir. PN gurubunun Mn seviyesini K grubuna yakın olduğu gözlenmiştir.

TNF-α dokularda başlıca makrofajlar tarafından üretilen karaciğerde ise, ilk olarak safra kanalı hücreleri ile Kupffer hücreleri tarafından üretilen bir sitokindir (Seino vd., 1998; Wajant vd., 2003). Son alışmalar, NF-κB sinyal yolunun bağışıklık iltihabı, lenfoid organların gelişimi ve B ve T hücrelerinin sağ kalımı ve olgunlaşması gibi birçok önemli biyolojik sürecin düzenlenmesinde rol oynadığını ileri srmştir. (Sun, 2017). Ek olarak, kanonik olmayan NF-κB yolunun iyi karakterize edilmiş işlevlerinin metabolik karaciğer hastalığı, otoimmün karaciğer hastalığı ve viral hepatit dâhil olmak üzere çeşitli karaciğer hastalıklarının patogenezinde de düzensiz olduğu bulunmuştur (Chen vd., 2021)

Çalışmamızın Pb asetata maruz bırakılmış ratlarda naringinin koruyucu etkilerini belirlemek için antioksidan parametreler ile birlikte TNF-α ve NF-κβ gibi önemli biyolojik rolleri olan moleküllerin immunhistokimyasal ve gen ekspresyon seviyeleri incelenerek, naringinin karaciğer toksisitesine karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Elde edilen veriler de de görüldüğü üzere P verilen rat karaciğer dokularında TNF-α ve NF-κβ gibi önemli faktörler seviyesinin yükseldiği PN gurubunda TNF-α ve NF-κβ seviyesinin düştüğü, N

gurubunun TNF- α ve NF-k β seviyelerinin K gurubuna göre bir miktar arttığı tespit edilmiştir.

2015 yılında Adil ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada naringinin molekülünün arsenik kaynaklı böbrek ve karaciğer toksisitesine karşı koruyucu etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar çalışmada naringin tedavisinin, antioksidan ve anti-inflamatuar özellikleri sayesinde, yüksek oksidatif stresi, KIM-1, Kaspaz-3, TGF- β ve TNF- α düzeylerini düşürerek sıçanlarda arsenik kaynaklı böbrek ve karaciğer hasarını iyileştirdiklerini tespit etmişlerdir (Adil vd., 2015). Bizim çalışmamızdaki TNF- α ve NF-k β gen ekspresyon bulguları yukarıda bahsi geçen çalışmalarla paralellik göstermiştir.

Yue ve arkadaşlarının 2020 yılında farelerde karbon tetraklorür ile indüklenen akut karaciğer hasarına karşı bir bitki flavonoidi olan apigenin molekülünün oksidatif strese karşı anti-inflamatuar ve anti-oksidatif aktivitesini ve olası mekanizmalarını çalışmışlardır. Yue ve arkadaşları karaciğer toksisitesinin biyobelirteçleri olan MDA, ALT ve AST aktivitelerini apigenin molekülünün önemli ölçüde azalttığını yine aynı çalışmada reel time- qPCR ile değerlendikleri TNF- α ve NF-k β yolağını da baskılayarak inflamasyonu ve oksidatif stresini azaltarak karaciğer hasarını hafiflettiğini tespit etmişlerdir (Yue vd., 2020). Bizim çalışmamızda da Pb asetat ile oluşturulan karaciğer hasarına karşı kullanılan bir narenciye flavonoidi olan naringin koruyucu etkilerini bu literatüre benzer şekilde gösterdiği görülmüştür.

Costus speciosus bitkisinin farklı özütlerinin erkek sıçanların karaciğer ve böbrekleri üzerindeki Pb asetatın toksik etkileri üzerindeki iyileştirici etkisinin değerlendirildiği çalışmada AST, ALT, MDA ve karaciğer antioksidan enzimlerinin (SOD, CAT, GPx) ve GSH seviyelerine bakılmıştır. Çalışmanın sonucunda bitki özütlerinden metanolik olanın MDA, AST ve ALT düzeylerini düşürdüğünü ve karaciğer antioksidan enzimlerinin (SOD, CAT, GPx) GSH yükseldiğini tespit etmişlerdir. PbAc zehirlenmesine karşı, metanolik özüt ile önemli koruma görüldüğünün. Oksidatif stresin inhibisyonu ve antioksidan enzim aktivitesinin artması, PbAc kaynaklı hepato- ve renal-toksisiteleri iyileştirebileceği iki mekanizma olarak değerlendirmişlerdir. (Diab vd., 2024). Bu literatürde Pb asetat harabiyetinin üzerindeki iyileştirici etkisinin bulguları olan AST, ALT, MDA ve karaciğer antioksidan enzimlerinin (SOD, CAT, GPx) ve GSH seviyeleri sonuçları bizim yapmış olduğumuz çalışmamızda da gözlemlenmiştir.

Moringa oleifera bitki yaprak sulu özütünün koruyucu etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada Pb asetat ile oluşturulan hasarlı karaciğerde, NF- κ B ve TNF- α 'nın iyileştirilmesi yoluyla oksidatif stres kaynaklı DNA hasarını azaltarak Pb bozukluklarını önemli ölçüde düzeltildiğini tespit etmişlerdir (Abdel Fattah vd., 2020). Yine bizim çalışmamızda NF- κ B ve TNF- α 'nın istatistiksel olarak anlamlı şekilde Pb grubuna göre iyileştirilmiş olması oksidatif kaynaklı karaciğer hasarının onarılmasında ve korunmasında naringin molekülünün rol oynadığını göstermiştir.

2024 yılında yayınlanan bir çalışmada araştırmacılar, 1,8-sineolün (okaliptol) yetişkin erkek Wistar sıçanlarının karaciğerinde Pb asetatın neden olduğu biyokimyasal, moleküler ve histolojik değişiklikler üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Araştırmada TLR4/MyD88/NF- κ B sinyal yolunun ve AST-ALT değerlerinin bu etkideki olası rolü değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda 1,8-sineol, serum AST-ALT enzimlerindeki artışı durdurduğu, oksidatif stresi ile inflamasyonu azalttığı ve Pb asetatın neden olduğu karaciğer hasarını önlediğini göstermişlerdir. Bu hepatoproteksiyon etkinin ise muhtemelen TLR4/MyD88/NF- κ B sinyal iletimini inhibe ederek sağlandığını belirtmişlerdir. (Abdollahi vd., 2024).

Naringinin'in Karaciğer Karsinogenezinde Antioksidan Etkisi Yapılan bir araştırmada, N-Nitrosodietilamin (DEN) ile sıçan karaciğer dokularında oluşturulan karsinogenez modeli üzerinde naringinin antioksidan etkinliği incelenmiştir. DEN indüksiyonu sonucunda, karaciğer hasarının göstergesi olan bazı enzimlerin ve belirteçlerin düzeylerinde artış gözlenmiştir. Bunlar arasında alkalen fosfataz (ALP), aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), bilirubin ve albümin yer almaktadır. Ayrıca, lipid peroksidasyon düzeylerinde de artış saptanmıştır. Bu durum, DEN'in karaciğerde oksidatif strese ve hasara yol açtığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, DEN uygulamasıyla antioksidan enzimlerden katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), indirgenmiş glutatyon, glutatyon S-transferaz (GST) ve glutatyon peroksidaz (GPX) düzeylerinde azalma kaydedilmiştir. Bu bulgu, karaciğerin antioksidan savunma mekanizmalarının DEN tarafından olumsuz etkilendiğini göstermektedir. Araştırma, naringinin tedavisiyle antioksidan enzim sisteminin yükseldiğini ve lipid peroksidasyon düzeylerinde azalma olduğunu rapor etmiştir. Bu sonuçlar, naringininin oksidatif stresi azaltarak ve antioksidan savunmayı güçlendirerek etki gösterdiğine işaret etmektedir. Genel olarak, naringinin tedavisinin DEN kaynaklı karaciğer karsinogenezinde karaciğer hasarını

engellediği bildirilmiştir. Bu da naringinin karaciğer kanserinin gelişimini önlemede potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir (Thangavel vd., 2012).

Naringinin'in Nikel Sülfatın neden olduğu karaciğer toksisitesine karşı koruyucu etkisi bir araştırmada, sıçan karaciğerinde nikel sülfatın (NiSO_4) yol açtığı toksisiteyi hafifletmede naringinin koruyucu etkisi incelenmiştir. Çalışmada, 20 mg/kg nikel sülfat uygulanan sıçanların karaciğer dokularında katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), indirgenmiş glutatyon, glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) gibi antioksidan enzimlerin aktivitesinde belirgin azalmalar olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, nikel toksisitesinin GSH, C Vitamini ve E Vitamini düzeylerinde de düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir. Tedavi grubunda ise, 80 mg/kg naringinin verilen sıçanların karaciğer dokularında antioksidan enzim sisteminin güçlendiği ve lipid peroksidasyon düzeylerinin azaldığı rapor edilmiştir. Deney sonuçları, 80 mg/kg naringinin dozunun hem antioksidan sistemi destekleyerek hem de histopatolojik belirteçler üzerinde nikelin oluşturduğu hasara karşı önemli bir koruyucu etki gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, naringinin nikel kaynaklı karaciğer hasarına karşı potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmektedir (Pari ve Amudha, 2011).

Karaciğer, memelilerde ksenobiyotik metabolizmasının başlıca merkezi olup ksenobiyotik kaynaklı toksisitenin hedefindeki bir organdır (Steensma vd., 1994). Birçok yapılan çalışma ile Pbun karaciğer hasarına neden olabileceğini ve çeşitli antioksidan tedaviler ile bu hasarın hafifletilebileceği gösterilmiştir (Shaban El-Neweshy, M., ve Said El-Sayed, Y., 2011; Liu vd., 2010)

Yapılan bir çalışmada flavonoid grubunda yer alan Kuersetinin, karaciğerin fazla miktarda Pb'a maruz kaldığı durumlarda, karaciğerdeki perivasküler ve periportal inflamatuvar hücrelerinde infiltrasyon ve sinüzoidal dilatasyon ile konjesyona neden olarak histopatolojik hasarı artırdığı, tedavi olarak antioksidan karakterde olan Kuersetinin uygulanarak bu hasarın baskılandığı tespit edilmiştir (Liu vd., 2013).

Yine başka bir çalışmada ise Pb'un neden olduğu histopatolojik hasar ve bağ doku artışına karşı uygulanan antioksidan ve antiapoptotik bir bileşik olan l-karnitin tedavisinin bu hasarı azalttığı bildirilmiştir (Liu vd., 2013)

Pb kaynaklı oksidatif strese nar suyunun koruyucu potansiyelinin araştırıldığı bir çalışmada ise, Pbun böbrek, karaciğer ve kalp dokularında oluşturduğu hücresel hasar da nar suyu ile tedavinin koruyucu olabileceği bildirilmiştir (Aksu vd., 2017)

Bu çalışmada Pb'un neden olduğu hepatotoksisiteye bağlı olarak karaciğerde meydana gelen hasarın belirlenmesi için yapılan histopatolojik analizde; belirgin konjesyon ve hepatositlerde dejenerasyon olduğu inflamatuvar hücre artışı ile Hepatosit kordonlarda dilatasyonun meydana geldiği ve karaciğer dokusunda bağ dokusu artışı olduğu tespit edilmiş olup tedavi olarak uygulanan naringinin ise bu histopatolojik hasarı baskıladığı görülmüştür.

Pbun karaciğer dokusunda inflamatuvar yanıtı tetiklediği ve bu yanıtın baskılanması için etkili sinyal yolları üzerinde çalışmaların hala devam ettiği bildirilmiştir. (Al-Megrin vd., 2019; Barkaoui vd., 2020; Mohammed vd., 2019)

Reaktif oksijen türleri, enflamasyonu ortaya çıkarmak için aktive edilmiş makrofajlardan IL-1 β ve TNF- α gibi pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimini artıran redoksa duyarlı bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör- κ B'nin (NF- κ B) aktivasyonunda rol oynamaktadır (Turner vd., 2014)

Yapılan çalışmalarda Pb maruziyetine bağlı dokuda TNF- α nf-Kb düzeylerini arttığı ve nükleer faktör- κ B'nin hepatik enflamasyonu artırmak için inflamatuvar hücreler içinde indüklenebildiği, TNF- α ve interleükinler gibi sitokinlerin düzenleyici olduğudur (Li vd., 2019)

Pb asetat ile indüklenen hepatotoksisitede enflamasyonun belirlenmesi için yapılan immünohistokimyasal çalışmada; TNF- α ve nf-Kb'nin kurşu maruziyetine bağlı olarak arttığı tedavi olarak verilen naringinin ile bu biyomarker düzeylerinin azaldığı dolayısıyla enflamasyonun hafiflediği tespit edilmiştir.

5.2. Sonuç ve Öneriler

Günümüzde gelişen ve gelişmekte olan teknoloji, genetik bilimi ve tıp ile birlikte, sağlık alanında birçok hastalık olgularının erken teşhisinde ve tedavisinde alternatif olarak maddelerin kullanımı literatürün ve ilaç sanayisinin önemli araştırma alanı haline gelmiştir. Bu amaçlar doğrultusunda yapılmış olan bu tez çalışmasında naringin molekülünün Pbun maruziyetine kalmış rat karaciğer dokularında biyokimyasal parametreler, antioksidan enzim seviyeleri, gen ekspresyon düzeyleri ve immünohistopatolojik analizler üzerine koruyucu etkinliği araştırıldı. Çalışmamızın sonucunda karaciğer toksisitesinin biyobelirteçleri olan enzimler, antioksidanlar, enflamasyon yolağı göstergesi TNF- α ve NF- κ B gen ekspresyonu gibi verilerin analizi yapıldığında naringin grubunun Pb grubuna

kıyasla iyileşmeler gösterdiği saptanmıştır. Yapmış olduğumuz bu çalışma toksikoloji alanındaki bilimsel literatüre katkı sağlayacağı gibi alternatif sağlık yaklaşımı için de önemli bir katkı sağlayacaktır.



KAYNAKÇA

Abbas, A., (1991). "Cellular and Molecular Immunology". 226-242.

Abdel Fattah, M. E., Sobhy, H. M., Reda, A., & Abdelrazek, H. M. A. (2020). "Hepatoprotective effect of Moringa oleifera leaves aquatic extract against lead acetate-induced liver injury in male Wistar rats". *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(34), 43028–43043.

Abdollahi, M., Asle-Rousta, M., & Mahmazi, S. (2024). "Protective effect of 1, 8-cineole (eucalyptol) against lead-induced liver injury by ameliorating oxidative stress and inflammation and modulating TLR4/MyD88/NF- κ B signaling". *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 27(10), 1293–1299.

Abrams, E., Lassiter, J. W., Miller, W. J., Neathery, M. W., Gentry, R. P., & Scarth, R. D. (1976). "Absorption as a factor in manganese homeostasis". *Journal of Animal Science*, 42(3), 630–636.

Adachi, M., & Brenner, D. A. (2005). "Clinical syndromes of alcoholic liver disease". *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 23(3-4), 255–263.

Adebiyi, O. O., Adebiyi, O. A., & Owira, P. (2017). "Naringin improves zidovudine- and stavudine-induced skeletal muscle complications in rats". *Human & Experimental Toxicology*, 36(1), 93–105.

Adil, M., Kandhare, A. D., Ghosh, P., Venkata, S., Raygude, K. S., & Bodhankar, S. L. (2016). "Ameliorative effect of naringin in acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity in laboratory rats: role of FXR and KIM-1". *Renal Failure*, 38(6), 1007–1020.

Adil, M., Kandhare, A. D., Visnagri, A., & Bodhankar, S. L. (2015). "Naringin ameliorates sodium arsenite-induced renal and hepatic toxicity in rats: decisive role of KIM-1, Caspase-3, TGF- β , and TNF- α ". *Renal Failure*, 37(8), 1396–1407.

Akgün, B., Yücecan, S., & Kayakırılmaz, K. (1988). "Çeşitli Islatma ve Haşlama İşlemlerinin Kuru Baklagillerin Çinko, Demir ve Kalsiyum Değerlerine Etkisi-II: Haşlama İşlemleri Sırasında Oluşan Mineral Kayıpları". *Gıda*, 13(1).

Aksu, D. S., Sağlam, Y. S., Yildirim, S., & Aksu, T. (2017). "Effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice on kidney, liver, heart and testis histopathological changes, and the tissues lipid peroxidation and antioxidant status in lead acetate-treated rats". *Cellular and Molecular Biology* (Noisy-le-Grand, France), 63(10), 33–42.

Al-Megrin, W. A., Alkhuriji, A. F., Yousef, A. O. S., Metwally, D. M., Habotta, O. A., Kassab, R. B., Abdel Moneim, A. E., & El-Khadragy, M. F. (2019). "Antagonistic Efficacy of Luteolin against Lead Acetate Exposure-Associated with Hepatotoxicity is Mediated via Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anti-Apoptotic Activities". *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 9(1), 10.

Alam, M., Ahsan, F., Mahmood, T., Shamim, A., Parveen, S., Shariq, M., & Ansari, V. A. (2022). "Meticulous parade on naringin respecting its pharmacological activities and novel formulations". *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 12(5), 457–474.

Alpkent, Z., & Demir, M. "Gıdalarda bulunan antioksidan maddeler ve insan sağlığı üzerine etkileri". *Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bolu*, 24-26.05.2006, s. 9.

Altura, B. M., Gebrewold, A., Zhang, A., & Altura, B. T. (2003). "Low extracellular magnesium ions induce lipid peroxidation and activation of nuclear factor-kappa B in canine cerebral vascular smooth muscle: possible relation to traumatic brain injury and strokes". *Neuroscience Letters*, 341(3), 189–192.

Alwaleedi, S. A. (1970). "Hematobiochemical changes induced by lead intoxication in male and female albino mice". *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 6(1), 46-46.

Angelucci, F., Miele, A. E., Boumis, G., Dimastrogiovanni, D., Brunori, M., & Bellelli, A. (2008). "Glutathione reductase and thioredoxin reductase at the crossroad: the structure of *Schistosoma mansoni* thioredoxin glutathione reductase". *Proteins*, 72(3), 936–945.

Anjaneyulu, M., Berent-Spillson, A., & Russell, J. W. (2008). "Metabotropic glutamate receptors (mGluRs) and diabetic neuropathy". *Current Drug Targets*, 9(1), 85–93.

Annabi Berrahal, A., Nehdi, A., Hajjaji, N., Gharbi, N., & El-Fazâa, S. (2007). "Antioxidant enzymes activities and bilirubin level in adult rat treated with lead". *Comptes Rendus Biologies*, 330(8), 581–588.

Armstrong, R. N. (1997). "Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases". *Chemical Research in Toxicology*, 10(1), 2-18.

Baeuerle, P. A. (1998). "Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF- κ B puzzle?" *Current Biology: CB* 8(1), R19-R22.

Baeuerle, P. A., & Henkel, T. (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system". *Annual Review of Immunology*, 12, 141-179.

Baldwin, A. S. (2001). "Series introduction: the transcription factor NF- κ B and human disease". *The Journal of Clinical Investigation*, 107(1), 3-6.

Baldwin Jr, A. S. (1996). "The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights". *Annual Review of Immunology*, 14(1), 649-681.

Ballew, C., Bowman, B. A., Russell, R. M., Sowell, A. L., & Gillespie, C. (2001). "Serum retinyl esters are not associated with biochemical markers of liver dysfunction in adult participants in the third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), 1988–1994". *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(5), 934-940.

Barkaoui, T., Hamimed, S., Bellamine, H., Bankaji, I., Sleimi, N., & Landoulsi, A. (2020). "Alleviated Actions of *Plantago albicans* Extract on Lead Acetate-Produced Hepatic

Damage in Rats Through Antioxidant and Free Radical Scavenging Capacities". *Journal of Medicinal Food*, 23(11), 1201–1215.

Barrett, K., Barman, S., Boitano, S., & Brooks, H. (2010). "Transport and Metabolic Functions of liver". *Ganong's Review of Medical Physiology*, Barrett, KE, SM Barman, S. Boitano and HL Brooks (Eds.). 23rd Edn., McGraw-Hill, New Delhi, 479-487.

Barron, M. G., Charron, K. A., Stott, W. T., & Duvall, S. E. (1999). "Tissue carboxylesterase activity of rainbow trout". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(11), 2506-2511.

Basta, G., Lazzerini, G., Del Turco, S., Ratto, G. M., Schmidt, A. M., & De Caterina, R. (2005). "At least 2 distinct pathways generating reactive oxygen species mediate vascular cell adhesion molecule-1 induction by advanced glycation end products". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(7), 1401-1407.

Baud, V., & Karin, M. (2009). "Is NF- κ B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls". *Nature Reviews Drug Discovery*, 8(1), 33-40.

Bayram, P., Aksak Karamese, S., Ozdemir, B., Salum, C., Erol, H. S., & Karamese, M. (2023). "Two flavonoids, baicalein and naringin, are effective as anti-inflammatory and antioxidant agents in a rat model of polymicrobial sepsis". *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 45(5), 597-606.

Bennet, C., Bettaiya, R., Rajanna, S., Baker, L., Yallapragada, P. R., Brice, J. J., White, S. L., & Bokara, K. K. (2007). "Region specific increase in the antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in the brain of rats exposed to lead". *Free Radical Research*, 41(3), 267–273.

Beutler, B. A. (1999). "The role of tumor necrosis factor in health and disease". *The Journal of Rheumatology. Supplement*, 57, 16-21.

Bharti, A. C., & Aggarwal, B. B. (2002). "Nuclear factor-kappa B and cancer: its role in prevention and therapy". *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6), 883-888.

Bhattacharjee, A., Kulkarni, V. H., Chakraborty, M., Habbu, P. V., & Ray, A. (2021). "Ellagic acid restored lead-induced nephrotoxicity by anti-inflammatory, anti-apoptotic and free radical scavenging activities". *Heliyon*, 7(1).

Bi, C., Jiang, Y., Fu, T., Hao, Y., Zhu, X., & Lu, Y. (2016). "Naringin inhibits lipopolysaccharide-induced damage in human umbilical vein endothelial cells via attenuation of inflammation, apoptosis and MAPK pathways". *Cytotechnology*, 68, 1473-1487.

Biser, J. A., Vogel, L. A., Berger, J., Hjelle, B., & Loew, S. S. (2004). "Effects of heavy metals on immunocompetence of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*)". *Journal of Wildlife Diseases*, 40(2), 173-184.

Bishayi, B., & Sengupta, M. (2006). "Synergism in immunotoxicological effects due to repeated combined administration of arsenic and lead in mice". *International Immunopharmacology*, 6(3), 454-464.

Blank, V., Kourilsky, P., & Israël, A. (1992). "NF- κ B and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats". *Trends in Biochemical Sciences*, 17(4), 135-140.

Błaszczuk, U., & Duda-Chodak, A. (2013). "Magnesium: its role in nutrition and carcinogenesis". *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 64(3), 165–171

Bonizzi, G., & Karin, M. (2004). "The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity". *Trends in Immunology*, 25(6), 280-288.

Bradford M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.

Caito, S., Lopes, A. C. B. A., Paoliello, M. M. B., & Aschner, M. (2017). "Toxicology of Lead and Its Damage to Mammalian Organs". *Metal Ions in Life Sciences*, 17, /books/9783110434330/9783110434330-016/9783110434330-016.xml.

Canbaz, H. T. "Sıçanlarda siklofosamid ile oluşturulan hepatotoksositeye geraniolün olası koruyucu etkilerinin araştırılması". Necmettin Erbakan Üniversitesi, Konya, 2018, s.1-3.

Carlberg, I., & Mannervik, B. (1985). "Glutathione reductase". *Methods in Enzymology*, 113, 484–490.

Cerami, A., & Beutler, B. (1988). "The role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia". *Immunology Today*, 9(1), 28-31.

Chen, F., Castranova, V., Shi, X., & Demers, L. M. (1999). "New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases". *Clinical Chemistry*, 45(1), 7-17.

Chen, Q., Lu, X., & Zhang, X. (2021). "Noncanonical NF- κ B Signaling Pathway in Liver Diseases". *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 9(1), 81–89.

Chen, Y., Ji, L., Wang, H., & Wang, Z. (2009). "Intracellular glutathione plays important roles in pyrrolizidine alkaloids-induced growth inhibition on hepatocytes". *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28(3), 357–362.

Cheng, C., Peng, X., Xi, L., Luo, Y., Wang, Y., Zhou, Y., & Yu, X. (2023). "Feasibility study of oxidized naringin as a novel crosslinking agent for crosslinking decellularized porcine Achilles tendon and its potential application for anterior cruciate ligament repair". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 111(2), 170-184.

Choe, S. C., Kim, H. S., Jeong, T. S., Bok, S. H., & Park, Y. B. (2001). "Naringin has an antiatherogenic effect with the inhibition of intercellular adhesion molecule-1 in hypercholesterolemic rabbits". *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 38(6), 947–955.

Chtourou, Y., Slima, A. B., Makni, M., Gdoura, R., & Fetoui, H. (2015). "Naringenin protects cardiac hypercholesterolemia-induced oxidative stress and subsequent necroptosis in rats". *Pharmacological Reports* : 67(6), 1090–1097.

Ciftci, H., Caliskan, C. E., Koc, H., Ozturk, K., Ozkaya, A., & Erbesler, Z. A. (2024). "Alleviation of Aluminum-Induced Oxidative Stress, Trace Element, and Mineral Levels in Rat Tissues Protective Role of Pomegranate Juice (*Punica Granatum L.*)". *Biological Trace Element Research*, 202(9), 4146–4157.

Ciftci, H., Ozkaya, A., Dayangac, A., Oelcuecue, A., Celik, S., Sahin, Z., & Ates, S. (2009). "Effect of lipoic acid on the some elements in brain tissue of DMBA-induced Guinea pigs". *Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(4), 569-573.

Cohen, G. A., Goffinet, J. A., Donabedian, R. K., & Conn, H. O. (1976). "Observations on decreased serum glutamic oxalacetic transaminase (SGOT) activity in azotemic patients". *Annals of Internal Medicine*, 84(3), 275-280.

Cole, A. C., Shay, N. F., O'Brien, S., & Beverly, J. L. (2002). "Zinc-deficient rats are insensitive to glucoprivation caused by 2-deoxy-D-glucose". *Nutritional Neuroscience*, 5(1), 59–64.

Cribb, A. E., Leeder, J. S., & Spielberg, S. P. (1989). "Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)". *Analytical Biochemistry*, 183(1), 195–196.

Çayakar, A. (2018). "Nedir Bu Tümör Nekrozis Faktör Alfa? "Türkiye Klinikleri Journal of Internal Medicine, 3(2).

Çelen, İ., Şenol, F., & Müezzinoğlu, T. (2011). "Prostat kanserinde eser elementlerin rolü". *Üroonkoloji Bülteni*, 2, 27-35.

Del Rio, D., Stewart, A. J., & Pellegrini, N. (2005). "A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress". *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 15(4), 316-328.

Delva, P. (2003). "Magnesium and coronary heart disease". *Molecular Aspects of Medicine*, 24(1-3), 63-78.

Demir, F., Ozan, G., & Temizer Ozan, PS. (2015). "Ratlara uygulanan kurşun asetatın karaciğer arginazına etkisi ve enzimin bazı kinetik özellikleri". Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ, 29(1), 37-43.

Deveci, E. (2006). "Ultrastructural effects of lead acetate on brain of rats". Toxicology and Industrial Health, 22(10), 419-422.

Diab, A. E. A. A., Al-Mathal, E. M., Zahra, M. H., Dowidar, M. F., El-Sherbeny, S. A., & Abu El-Magd, M. (2024). "Ameliorative effect of costus speciosus extracts on toxic effects of lead acetate on liver and kidney of male rats". Egyptian Journal of Veterinary Sciences, 55(4), 895-901.

Drotman, R. B., & Lawhorn, G. T. (1978). "Serum enzymes as indicators of chemically induced liver damage". Drug and Chemical Toxicology, 1(2), 163–171.

Dua, T. K., Dewanjee, S., Khanra, R., Joardar, S., Barma, S., Das, S., Zia-Ul-Haq, M., & De Feo, V. (2016). "Cytoprotective and Antioxidant Effects of an Edible Herb, *Enhydra fluctuans* Lour. Asteraceae, against Experimentally Induced Lead Acetate Intoxication". Plos One, 11(2), e0148757.

Dos Santos, C. R., Cavalcante, A. L., Hauser-Davis, R. A., Lopes, R. M., & Mattos, R.deC. (2016). "Effects of sub-lethal and chronic lead concentrations on blood and liver ALA-D activity and hematological parameters in Nile tilapia". Ecotoxicology and Environmental Safety, 129, 250–256.

El-Boshy, M. E., Refaat, B., Qasem, A. H., Khan, A., Ghaith, M., Almasmoum, H., Almainani, R. A. (2019). "The remedial effect of *Thymus vulgaris* extract against lead toxicity-induced oxidative stress, hepatorenal damage, immunosuppression, and hematological disorders in rats". Environmental Science and Pollution Research, 26, 22736-22746.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity". Biochemical Pharmacology, 7(2), 88-95.

Empl, M., Renaud, S., Erne, B., Fuhr, P., Straube, A., Schaeren–Wiemers, N., & Steck, A. (2001). "TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies". *Neurology*, 56(10), 1371-1377.

Emran, T. B., Islam, F., Nath, N., Sutradhar, H., Das, R., Mitra, S., Sharma, R. (2022). "Naringin and naringenin polyphenols in neurological diseases: understandings from a therapeutic viewpoint". *Life*, 13(1), 99.

Ericson, B., Landrigan, P., Taylor, M. P., Frostad, J., Caravanos, J., Keith, J., & Fuller, R. (2016). "The global burden of lead toxicity attributable to informal used lead-acid battery sites". *Annals of Global Health*, 82(5), 686-699.

Fan, Y., Zhao, X., Yu, J., Xie, J., Li, C., Liu, D., Tang, C., & Wang, C. (2020). "Lead-induced oxidative damage in rats/mice: A meta-analysis". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology : Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 58, 126443.

Fleury, C., Mignotte, B., & Vayssière, J.-L. (2002). "Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling". *Biochimie*, 84(2-3), 131-141.

Flora, G., Gupta, D., & Tiwari, A. (2012). "Toxicity of lead: a review with recent updates". *Interdisciplinary Toxicology*, 5(2), 47.

Flora, S. J., Flora, G., & Saxena, G. (2006). "Environmental occurrence, health effects and management of lead poisoning". In *Lead* (pp. 158-228): Elsevier.

Francis, A., Shetty, T., & Bhattacharya, R. (1989). "Modulating effect of plant flavonoids on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine". *Carcinogenesis*, 10(10), 1953-1955.

Frumkin, H., & Solomon, G. (1997). "Manganese in the US gasoline supply". *American Journal of Industrial Medicine*, 31(1), 107-115.

Gallez, B., Baudelet, C., Adline, J., Geurts, M., & Delzenne, N. (1997). "Accumulation of manganese in the brain of mice after intravenous injection of manganese-based contrast agents". *Chemical Research in Toxicology*, 10(4), 360-363.

Ganz, T. (2004). "Hepcidin in iron metabolism". *Current Opinion in Hematology*, 11(4), 251-254.

Garcia-Nino, W. R., & Pedraza-Chaverri, J. (2014). "Protective effect of curcumin against heavy metals-induced liver damage". *Food and Chemical Toxicology*, 69, 182-201.

Ghanbari-Movahed, M., Jackson, G., Farzaei, M. H., & Bishayee, A. (2021). "A systematic review of the preventive and therapeutic effects of naringin against human malignancies". *Frontiers in Pharmacology*, 12, 639840.

Golechha, M., Chaudhry, U., Bhatia, J., Saluja, D., & Arya, D. S. (2011). "Naringin protects against kainic acid-induced status epilepticus in rats: evidence for an antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective intervention". *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34(3), 360–365.

Green, R. M., & Flamm, S. (2002). "AGA technical review on the evaluation of liver chemistry tests". *Gastroenterology*, 123(4), 1367-1384.

Guyton, H., & Fizioloji, T. (2001). çev. Çavuşoğlu H, 10. baskı. İstanbul, Nobel, 724,749-752.

Güven, A. (2000). "Importance of acetylcholinesterase and its inhibitors". *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(2), 145-151.

Güven, A., Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Timur, S., & Metalurji, İ. (2004). "Metallerin çevresel etkileri-III". *Metalurji Dergisi*, 138, 64-71.

Gyamfi, M. A., Ohtani, I. I., Shinno, E., & Aniya, Y. (2004). "Inhibition of glutathione S-transferases by thoningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, in vitro". *Food and Chemical Toxicology*, 42(9), 1401-1408.

Habibi, E., Shokrzadeh, M., Ahmadi, A., Chabra, A., Naghshvar, F., Haghi-Aminjan, H., & Salehi, F. (2020). "Pulmonoprotective action of *Zataria multiflora* ethanolic extract on cyclophosphamide-induced oxidative lung toxicity in mice". *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 26, 1-8.

Habig, W. H., Pabst, M. J., & Jakoby, W. B. (1974). "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation". *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130–7139.

Hermenean, A., Ardelean, A., Stan, M., Hadaruga, N., Mihali, C. V., Costache, M., & Dinischiotu, A. (2014). "Antioxidant and hepatoprotective effects of naringenin and its β -cyclodextrin formulation in mice intoxicated with carbon tetrachloride: a comparative study". *Journal of Medicinal Food*, 17(6), 670–677.

Hoet, P., Graf, M. L. M., Bourdi, M., Pohl, L. R., Duray, P. H., Chen, W., Lison, D. (1997). "Epidemic of liver disease caused by hydrochlorofluorocarbons used as ozone-sparing substitutes of chlorofluorocarbons". *The Lancet*, 350(9077), 556-559.

Huang, J., & Rudnick, D. A. (2014). "Elucidating the metabolic regulation of liver regeneration". *The American Journal of Pathology*, 184(2), 309-321.

Ikebe, T., Takeuchi, H., Jimi, E., Beppu, M., Shinohara, M., & Shirasuna, K. (1998). "Involvement of proteasomes in migration and matrix metalloproteinase-9 production of oral squamous cell carcinoma". *International Journal of Cancer*, 77(4), 578-585.

Ileriturk, M., Ileriturk, D., Kandemir, O., Akaras, N., Simsek, H., Erdogan, E., & Kandemir, F. M. (2024). "Naringin attenuates oxaliplatin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity: A molecular, biochemical, and histopathological approach in a rat model". *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 38(1), e23604.

Ince, E., Curabeyoğlu, F., & Akyol, S. (2019). "Oxidative stress in lymphoid tissues and complement activation in alcoholic mother rats and their newborns". *General Physiology and Biophysics*, 38(1), 91-100.

Işık, G., Demirezen, Ş., & Beksaç, M. S. (2008). "Tümör nekroz faktör ve servikal kanser bağlantısı". *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*(2), 55-61.

Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D., & Lemasters, J. J. (2002). "Mechanisms of hepatotoxicity". *Toxicological Sciences*, 65(2), 166-176.

Järup L. (2003). "Hazards of heavy metal contamination". *British Medical Bulletin*, 68, 167–182.

Kianoush, S., Balali-Mood, M., Mousavi, S. R., Shakeri, M. T., Dadpour, B., Moradi, V., & Sadeghi, M. (2013). "Clinical, toxicological, biochemical, and hematologic parameters in lead exposed workers of a car battery industry". *Iranian Journal of Medical Sciences*, 38(1), 30.

Kim, H. C., Jang, T. W., Chae, H. J., Choi, W. J., Ha, M. N., Ye, B. J., Kim, B. G., Jeon, M. J., Kim, S. Y., & Hong, Y. S. (2015). "Evaluation and management of lead exposure". *Annals of Occupational and Environmental Medicine*, 27, 30.

Kirillova, I., Chaisson, M., & Fausto, N. (1999). "Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation". *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 10(12), 819–828.

Larsson, S. C., Bergkvist, L., & Wolk, A. (2005). "Magnesium intake in relation to risk of colorectal cancer in women". *Jama*, 293(1), 86-89.

Lee, D.-Y., & Johnson, P. E. (1988). "Factors affecting absorption and excretion of ⁵⁴Mn in rats". *The Journal of Nutrition*, 118(12), 1509-1516.

Lee, M. H., Yoon, S., & Moon, J. O. (2004). "The flavonoid naringenin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats". *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27(1), 72–76.

Leonard, D., Koca, R., Acun, C., Cinar, S., Estürk, E., Ustündag, G., Herron, S., Butterfly, M. M., & Zenel, J. A. (2007). "Visual diagnosis: three infants who have perioral and acral skin lesions". *Pediatrics in Review*, 28(8), 312–318.

Li, M., Xu, S., Geng, Y., Sun, L., Wang, R., Yan, Y., Wang, H., Li, Y., Yi, Q., Zhang, Y., Hao, J., Deng, C., Li, W., & Xue, L. (2019). "The protective effects of L-carnitine on myocardial ischaemia-reperfusion injury in patients with rheumatic valvular heart disease undergoing CPB surgery are associated with the suppression of NF- κ B pathway and the activation of Nrf2 pathway". *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 46(11), 1001–1012.

Li, N., Zhao, Y., Shen, Y., Cheng, Y., Qiao, M., Song, L., & Huang, X. (2021). "Protective effects of folic acid on oxidative damage of rat spleen induced by lead acetate". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111917.

Li, Z. L., Yang, B. C., Gao, M., Xiao, X. F., Zhao, S. P., & Liu, Z. L. (2021). "Naringin improves sepsis-induced intestinal injury by modulating macrophage polarization via PPAR γ /miR-21 axis". *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 25, 502–514.

Liu, C.-M., Ma, J.-Q., Sun, Y.-Z. (2012). "Puerarin protects the rat liver against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead". *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(6), 575-582.

Liu, C. M., Ma, J. Q., & Sun, Y. Z. (2011). "Protective role of puerarin on lead-induced alterations of the hepatic glutathione antioxidant system and hyperlipidemia in rats". *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(12), 3119–3127.

Liu, C. M., Zheng, G. H., Ming, Q. L., Sun, J. M., & Cheng, C. (2013). "Protective effect of quercetin on lead-induced oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in rat liver via the IRE1/JNK and PI3K/Akt pathway". *Free Radical Research*, 47(3), 192–201.

Liu, C. M., Zheng, Y. L., Lu, J., Zhang, Z. F., Fan, S. H., Wu, D. M., & Ma, J. Q. (2010). "Quercetin protects rat liver against lead-induced oxidative stress and apoptosis". *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 29(2), 158–166.

Lotfi, G. M., & Baghshani, H. (2016). "Ameliorative effects of caffeic acid on lead accumulation and oxidative stress in lead-exposed mice". *Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine*, 4, 6-16.

Lott, J., & Wolf, P. (1986). "Alanine and aspartate aminotransferase (ALT and AST). *Clinical enzymology: a case-oriented approach*". Chicago: Year Book Medical Publishers, 111-138.

Lönnerdal B. (2000). "Dietary factors influencing zinc absorption". *The Journal of Nutrition*, 130(5S Suppl), 1378S–83S.

Maeda, S., & Omata, M. (2008). "Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation". *Cancer Science*, 99(5), 836-842.

Malecki, E. A., Radzanowski, G. M., Radzanowski, T. J., Gallaher, D. D., & Greger, J. L. (1996). "Biliary manganese excretion in conscious rats is affected by acute and chronic manganese intake but not by dietary fat". *The Journal of Nutrition*, 126(2), 489–498.

Malpuech-Brugere, C., Rock, E., Astier, C., Nowacki, W., Mazur, A., & Rayssiguier, Y. (1998). "Exacerbated immune stress response during experimental magnesium deficiency results from abnormal cell calcium homeostasis". *Life Sciences*, 63(20), 1815-1822.

Mapson, L., & Isherwood, F. (1963). "Glutathione reductase from germinated peas". *Biochemical Journal*, 86(1), 173.

Maynard, R. L., & Downes, N. "Anatomy and histology of the laboratory rat in toxicology and biomedical research". Academic Press. 2019, 1(2), 7-9.

Mazur, A., Maier, J. A., Rock, E., Gueux, E., Nowacki, W., & Rayssiguier, Y. (2007). "Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 458(1), 48-56.

McConnachie, L. A., Mohar, I., Hudson, F. N., Ware, C. B., Ladiges, W. C., Fernandez, C., Chatterton-Kirchmeier, S., White, C. C., Pierce, R. H., & Kavanagh, T. J. (2007). "Glutamate cysteine ligase modifier subunit deficiency and gender as determinants of acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice". *Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology*, 99(2), 628–636.

Meister, A. (1983). "Selective modification of glutathione metabolism". *Science*, 220(4596), 472-477.

Mohammed, S. M., Ibrahim, M. N., & Ahmed, M. "Physiological and histological effects of broccoli on lead acetate induced hepatotoxicity in young male albino rats". *Biology Department, College of Science, University of Kirkuk*, 2019, 33(1).

Moron, M. S., Depierre, J. W., & Mannervik, B. (1979). "Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in rat lung and liver". *Biochimica et Biophysica Acta*, 582(1), 67–78.

Mushlin, P. S., & Gelman, S. (2010). "Hepatic physiology and pathophysiology". *Miller's Anesthesia*. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 412-424.

Mutlu, S. I., Seven, I., Arkali, G., Birben, N., Arslan, A. S., Aksakal, M., & Seven, P. T. (2021). "Ellagic acid plays an important role in enhancing productive performance and alleviating oxidative stress, apoptosis in laying quail exposed to lead toxicity". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111608.

Nakshatri, H., Bhat-Nakshatri, P., Martin, D. A., Goulet, R. J., Jr, & Sledge, G. W., Jr (1997). "Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth". *Molecular and Cellular Biology*, 17(7), 3629–3639.

National Research Council (US) Committee on Diet and Health. (1989). "Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk". National Academies Press (US), 1222.

Nemsadze, K., Sanikidze, T., Ratiani, L., Gabunia, L., & Sharashenidze, T. (2009). "Mechanisms of lead-induced poisoning". Georgian Medical News(172-173), 92-96.

Neta, R., Sztein, M., Oppenheim, J., Gillis, S., & Douches, S. D. (1987). "The in vivo effects of interleukin 1. I. Bone marrow cells are induced to cycle after administration of interleukin 1". Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950), 139(6), 1861-1866.

Nordin, B. (1997). "Calcium in health and disease". Food Nutrition and Agriculture, 13-26.

Ozkaya, A., Sahin, Z., Dag, U., & Ozkaraca, M. (2016). "Effects of Naringenin on Oxidative Stress and Histopathological Changes in the Liver of Lead Acetate Administered Rats". Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 30(5), 243–248.

Ozkaya, A., Sahin, Z., Kuzu, M., Saglam, Y. S., Ozkaraca, M., Uckun, M., Yologlu, E., Comakli, V., Demirdag, R., & Yologlu, S. (2018). "Role of geraniol against lead acetate-mediated hepatic damage and their interaction with liver carboxylesterase activity in rats". Archives of Physiology and Biochemistry, 124(1), 80–87.

Özbolat, G., & Tuli, A. "Ağır metal toksisitesinin insan sağlığına etkileri". Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 25(4), 2016, s.502-521.

Özkan, T. B. "Çocuklarda wilson hastalığı". Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 31(3), 2005, s.163-170.

Papadakis, K. A., & Targan, S. R. (2000). "The role of chemokines and chemokine receptors in mucosal inflammation". Inflammatory Bowel Diseases, 6(4), 303-313.

Pari, L., & Amudha, K. (2011). "Hepatoprotective role of naringin on nickel-induced toxicity in male Wistar rats". European Journal of Pharmacology, 650(1), 364-370.

Parlakpınar, H., Koç, M., & Acet, A. (2004). "Yaşlanmada Apoptozis ve Melatoninin Etkisi". *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 24(1), 62-67.

Patrick, L. J. A. m. r. (2006). "Lead Toxicity, a review of the literature". Part I: Exposure, Evaluation, and Treatment. 11(1).

Pennington, J., & Young, B. E. (1991). "Total diet study nutritional elements, 1982-1989". *Journal of the American Dietetic Association*, 91(2), 179-183.

Pereira Gonzatto, M., & Scherer Santos, J. (2023). "Citrus Research - Horticultural and Human Health Aspects IntechOpen". doi: 10.5772/intechopen.110519.

Piton, A., Poynard, T., Imbert-Bismut, F., Khalil, L., Delattre, J., Pelissier, E., Sansonetti, N., & Opolon, P. (1998). "Factors associated with serum alanine transaminase activity in healthy subjects: consequences for the definition of normal values, for selection of blood donors, and for patients with chronic hepatitis C. MULTIVIRC Group". *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 27(5), 1213–1219.

Placer, Z. A., Cushman, L. L., & Johnson, B. C. (1966). Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems". *Analytical Biochemistry*, 16(2), 359–364.

Ponnappa, B. C., Dey, I., Tu, G.C., Zhou, F., Aini, M., Cao, Q.N., & Israel, Y. (2001). "In vivo delivery of antisense oligonucleotides in pH-sensitive liposomes inhibits lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor- α in rats". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 297(3), 1129-1136.

Pugliese, M. T., Blumberg, D. L., Hludzinski, J., & Kay, S. (1998). "Nutritional rickets in suburbia". *Journal of the American College of Nutrition*, 17(6), 637-641.

Rădulescu, A., & Lundgren, S. (2019). "A pharmacokinetic model of lead absorption and calcium competitive dynamics". *Scientific Reports*, 9(1), 14225.

Rappaport, A., Borowy, Z., Loughed, W., & Lotto, W. (1954). "Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit". *Bole in Hepatic Physiology and Pathology*, 119, 11-33.

Rauf, A., Shariati, M. A., Imran, M., Bashir, K., Khan, S. A., Mitra, S., Mubarak, M. S. (2022). "Comprehensive review on naringenin and naringin polyphenols as a potent anticancer agent". *Environmental Science and Pollution Research*, 29(21), 31025-31041.

Rayssiguier, Y., Chevalier, F., Bonnet, M., Kopp, J., & Durlach, J. (1985). "Influence of magnesium deficiency on liver collagen after carbon tetrachloride or ethanol administration to rats". *The Journal of Nutrition*, 115(12), 1656-1662.

Redlich, C. A., Beckett, W. S., Sparer, J., Barwick, K. W., Riely, C. A., Miller, H., Cullen, M. R. (1988). "Liver disease associated with occupational exposure to the solvent dimethylformamide". *Annals of Internal Medicine*, 108(5), 680-686.

Rees, N., & Fuller, R. (2020). "The toxic truth: children's exposure to lead pollution undermines a generation of future potential: Unicef". *Pure Eart*, 9(1), 8-33.

Reid, A. E. (2001). "Nonalcoholic steatohepatitis". *Gastroenterology*, 121(3), 710-723.

Reiter, R. J., Guerrero, J. M., Garcia, J. J., & Acuna-Castroviejo, D. (1998). "Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging: relation to melatonin". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1), 410-424.

Renugadevi, J., & Prabu, S. M. (2009). "Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats". *Toxicology*, 256(1-2), 128–134.

Rivoira, M. A., Rodriguez, V., Talamoni, G., & de Talamoni, N. T. (2021). "New perspectives in the pharmacological potential of naringin in medicine". *Current Medicinal Chemistry*, 28(10), 1987-2007.

Romani A. M. (2008). "Magnesium homeostasis and alcohol consumption". *Magnesium Research*, 21(4), 197–204.

Ruuls, S. R., & Sedgwick, J. D. (1999). "Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models". *The American Journal of Human Genetics*, 65(2), 294-301.

Santhoshkumar, P., & Shivanandappa, T. (1999). "In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver". *Chemico-Biological Interactions*, 119-120, 277–282.

Seino, K., Iwabuchi, K., Kayagaki, N., Miyata, R., Nagaoka, I., Matsuzawa, A., Fukao, K., Yagita, H., & Okumura, K. (1998). "Chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes". *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(9), 4484–4488.

Shaban El-Neweshy, M., & Said El-Sayed, Y. (2011). "Influence of vitamin C supplementation on lead-induced histopathological alterations in male rats". *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie*, 63(3), 221–227.

Shah, A. I. (2017). "Heavy metal impact on aquatic life and human health—an over view". *International Association For Impact Assessment*, 17, 37.

Shi, R., Xu, J. W., Xiao, Z. T., Chen, R. F., Zhang, Y. L., Lin, J. B., Cheng, K. L., Wei, G. Y., Li, P. B., Zhou, W. L., & Su, W. W. (2019). "Naringin and Naringenin Relax Rat Tracheal Smooth by Regulating BKCa Activation". *Journal of Medicinal Food*, 22(9), 963–970.

Shilpa, V., Shams, R., Dash, K. K., Pandey, V. K., Dar, A. H., Ayaz Mukarram, S., Kovács, B. (2023). "Phytochemical properties, extraction, and pharmacological benefits of naringin: a review". *Molecules*, 28(15), 5623.

Shishodia, S., & Aggarwal, B. B. (2004). "Nuclear factor- κ B: a friend or a foe in cancer?" *Biochemical Pharmacology*, 68(6), 1071-1080.

Shohami, E., Ginis, I., & Hallenbeck, J. M. (1999). Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury". *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 10(2), 119-130.

Shokrzadeh, M., Chabra, A., Naghshvar, F., & Ahmadi, A. (2013). "The mitigating effect of *Citrullus colocynthis* (L.) fruit extract against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells". *The Scientific World Journal*, 2013(1), 980480.

Singh, D., Chander, V., & Chopra, K. (2004). "Protective effect of naringin, a bioflavonoid on ferric nitrilotriacetate-induced oxidative renal damage in rat kidney". *Toxicology*, 201(1-3), 1–8.

Sklavounou, A., Chrysomali, E., Scorilas, A., & Karameris, A. (2000). "TNF- α expression and apoptosis-regulating proteins in oral lichen planus: a comparative immunohistochemical evaluation". *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 29(8), 370-375.

Steensma, A., Beamand, J. A., Walters, D. G., Price, R. J., & Lake, B. G. (1994). "Metabolism of coumarin and 7-ethoxycoumarin by rat, mouse, guinea pig, cynomolgus monkey and human precision-cut liver slices". *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 24(9), 893–907.

Sun, L. J., Qiao, W., Xiao, Y. J., & Ren, W. D. (2021). "Layer-specific strain for assessing the effect of naringin on systolic myocardial dysfunction induced by sepsis and its underlying mechanisms". *The Journal of International Medical Research*, 49(1), 300060520986369.

Sun S. C. (2017). "The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. *Nature reviews*". *Immunology*, 17(9), 545–558.

Syed, A. A., Reza, M. I., Shafiq, M., Kumariya, S., Singh, P., Husain, A., Hanif, K., & Gayen, J. R. (2020). "Naringin ameliorates type 2 diabetes mellitus-induced steatohepatitis by inhibiting RAGE/NF- κ B mediated mitochondrial apoptosis". *Life Sciences*, 257, 118118.

Thangavel, P., Muthu, R., Vaiyapuri, M. J. B., & Nutrition, P. (2012). "Antioxidant potential of naringin—a dietary flavonoid—in N-nitrosodiethylamine induced rat liver carcinogenesis". *Biomedicine & Preventive Nutrition* 2(3), 193-202.

Tirima, S., Bartrem, C., von Lindern, I., von Braun, M., Lind, D., Anka, S. M., & Abdullahi, A. (2016). "Environmental remediation to address childhood lead poisoning epidemic due to artisanal gold mining in Zamfara, Nigeria". *Environmental Health Perspectives*, 124(9), 1471-1478.

Tracey, K., & Cerami, A. (1989). "Cachectin/tumor necrosis factor and other cytokines in infectious disease". *Current Opinion in Immunology*, 1(3), 454-461.

Trinh, D. V., Zhu, N., Farhang, G., Kim, B. J., & Huxford, T. (2008). "The nuclear I kappaB protein I kappaB zeta specifically binds NF-kappaB p50 homodimers and forms a ternary complex on kappaB DNA". *Journal of Molecular Biology*, 379(1), 122–135.

Tripathi, P., & Aggarwal, A. (2006). "NF-kB transcription factor: a key player in the generation of immune response". *Current Science*, 519-531.

Trumbo, P., Yates, A. A., Schlicker, S., & Poos, M. (2001). "Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc". *Journal of the American Dietetic Association*, 101(3), 294–301.

Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). "Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease". *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(11), 2563–2582.

Türküzü, D., & Şanlıer, N. (2014). "Gıdalardaki Ağır Metal Kontaminasyonları Bulaşma Kaynakları Sağlık Riskleri ve Ulusal Uluslararası Standartlar". *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9(3).

Usman, K., Abu-Dieyeh, M. H., Zouari, N., & Al-Ghouti, M. A. (2020). "Lead (Pb) bioaccumulation and antioxidative responses in *Tetraena qataranse*". *Scientific Reports*, 10(1), 17070.

- Van Horssen, R., Ten Hagen, T. L., & Eggermont, A. M. (2006). "TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility". *The Oncologist*, 11(4), 397-408.
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R., & Fiers, W. (1995). "Two tumour necrosis factor receptors: structure and function". *Trends in Cell Biology*, 5(10), 392-399.
- Von Harsdorf, R. d., Li, P.-F., & Dietz, R. (1999). "Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis". *Circulation*, 99(22), 2934-2941.
- Waage, A., Halstensen, A., & Espevik, T. (1987). "Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease". *Lancet* (London, England), 1(8529), 355-357.
- Wang, D., Shi, L., Xin, W., Xu, J., Xu, J., Li, Q., Yao, W. (2017). "Activation of PPAR γ inhibits pro-inflammatory cytokines production by upregulation of miR-124 in vitro and in vivo". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(3), 726-731.
- Wani, A. L., Ara, A., & Usmani, J. A. (2015). "Lead toxicity: a review". *Interdisciplinary Toxicology*, 8(2), 55-64.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., & Scheurich, P. (2003). "Tumor necrosis factor signaling". *Cell Death and Differentiation*, 10(1), 45-65.
- Wang, J., Yang, Z., Lin, L., Zhao, Z., Liu, Z., & Liu, X. (2012). "Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats". *Biological Trace Element Research*, 146(3), 354-359.
- Whitehead, M., Hawkes, N., Hainsworth, I., & Kingham, J. (1999). "A prospective study of the causes of notably raised aspartate aminotransferase of liver origin". *Gut*, 45(1), 129-133.
- Willoughby, J. L., & Bowen, C. N. (2014). "Zinc deficiency and toxicity in pediatric practice". *Current Opinion in Pediatrics*, 26(5), 579-584.

- Wittsiepe, J., Schnell, K., Hilbig, A., Schrey, P., Kersting, M., & Wilhelm, M. (2009). "Dietary intake of nickel and zinc by young children—Results from food duplicate portion measurements in comparison to data calculated from dietary records and available data on levels in food groups". *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23(3), 183-194.
- Wu, A. C., Lesperance, L., & Bernstein, H. (2002). "Screening for iron deficiency". *Pediatrics in Review*, 23(5), 171-178.
- Wu, G., Lupton, J. R., Turner, N. D., Fang, Y.-Z., & Yang, S. (2004). "Glutathione metabolism and its implications for health". *The Journal of Nutrition*, 134(3), 489-492.
- Wu, J. T., & Kral, J. G. (2005). "The NF- κ B/I κ B signaling system: a molecular target in breast cancer therapy". *Journal of Surgical Research*, 123(1), 158-169.
- Wu, L., Zhu, X., Fan, L., Kabagambe, E. K., Song, Y., Tao, M., Liu, J. (2017). "Magnesium intake and mortality due to liver diseases: Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey Cohort". *Scientific Reports*, 7(1), 17913.
- Yamada, Y., & Fausto, N. (1998). "Deficient liver regeneration after carbon tetrachloride injury in mice lacking type 1 but not type 2 tumor necrosis factor receptor". *The American Journal of Pathology*, 152(6), 1577.
- Yang, Y., Trevethan, M., Wang, S., & Zhao, L. (2022). "Beneficial effects of citrus flavanones naringin and naringenin and their food sources on lipid metabolism: An update on bioavailability, pharmacokinetics, and mechanisms". *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 104, 108967.
- Yue, S., Xue, N., Li, H., Huang, B., Chen, Z., & Wang, X. (2020). "Hepatoprotective Effect of Apigenin Against Liver Injury via the Non-canonical NF- κ B Pathway In Vivo and In Vitro". *Inflammation*, 43(5), 1634–1648.
- Yuting, C., Rongliang, Z., Zhongjian, J., & Yong, J. (1990). "Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants". *Free Radical Biology and Medicine*, 9(1), 19-21.

Zeng, X., Su, W., Liu, B., Chai, L., Shi, R., & Yao, H. (2020). "A review on the pharmacokinetic properties of naringin and its therapeutic efficacies in respiratory diseases". *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 20(4), 286-293.

Zhang, H. H., Zhou, X. J., Zhong, Y. S., Ji, L. T., Yu, W. Y., Fang, J., Ying, H. Z., & Li, C. Y. (2022). "Naringin suppressed airway inflammation and ameliorated pulmonary endothelial hyperpermeability by upregulating Aquaporin1 in lipopolysaccharide/cigarette smoke-induced mice". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 150, 113035.

Zheng, W., Kim, H., & Zhao, Q. (2000). "Comparative toxicokinetics of manganese chloride and methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl (MMT) in Sprague-Dawley rats". *Toxicological Sciences*, 54(2), 295-301.

Zimmerman, H. J., & Maddrey, W. C. (1995). "Acetaminophen (paracetamol) hepatotoxicity with regular intake of alcohol: analysis of instances of therapeutic misadventure". *Hepatology*, 22(3), 767-773.