

**T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RATLARDA BİSFENOL A İLE OLUŞTURULAN
KARDİYOTOKSİSİTE ÜZERİNE 18 β –GLİSİRETİNİK ASİD’İN
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İBRAHİM BAYAV

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ekrem DARENDELİOĞLU**

**İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN**

BİNGÖL-2022

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince kendileriyle çalışmaktan onur duyduğum; tez çalışmamın planlanması, yönlendirme ve hazırlanmasındaki katkıları ve bana gösterdikleri sabırlarından dolayı değerli danışman hocamlarım Doç. Dr. Ekrem DARENDELİOĞLU ve Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Prof. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR, Doç. Dr. Adnan AYNA ve Arş. Gör. Gürkan AYKUTOĞLU'na ve bana yol gösterip tavsiyelerde bulunan diğer kıymetli hocalarıma ayrıca Bingöl Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarı, Veteriner Fakültesi Biyokimya Bölümü Araştırma Laboratuvarı, Bingöl Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (BÜDAM), Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı Araştırma Laboratuvarı çalışanları ve Bingöl Üniversitesi BAP birimine desteklerinden dolayı (BAP Proje No: BAP-FEF.2020.00.006) çok teşekkür ederim.

Tez aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Sevda SAĞ'a ve çalışmalarım boyunca benden dua ve desteklerini esirgemeyen başta anne ve babam olmak üzere sevgili ablam Leyla BAYAV'a ve tüm aile fertlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İbrahim BAYAV

Bingöl 2022

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Çevresel Kirletici Maddeler	1
1.2. Bisfenol A (BPA)	2
1.3. BPA'nın Kullanım Alanları.....	4
1.4. BPA'nın Alternatif Formları	4
1.5. BPA'nın Toksik Etkileri.....	5
1.5.1. BPA'nın Karaciğer ve Böbrek Dokuları Üzerindeki Etkileri	6
1.5.2. BPA'nın Kardiyovasküler Etkileri	6
1.5.3. BPA'nın Metabolizması.....	8
1.6. Apoptoz	9
1.6.1. Apoptoz İçsel Yolak.....	11
1.6.2. Apoptoz Dışsal Yolak	12
1.7. Serbest Radikaller.....	12
1.7.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	14
1.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	14
1.7.1.2. Katalaz (KAT).....	14
1.7.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	14
1.7.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	14
1.7.2.1. Glutasyon (GSH)	14
1.7.3. 18β -Glisiretinik Asit.....	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	17

3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Deney Hayvanları.....	21
3.2. Deneyde Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar	21
3.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar ve Bazı Sarf Malzemeler	22
3.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması.....	24
3.4.1. pH Ayarlama İçin Kullanılan Çözeltiler	24
3.4.2. PBS ve TBS Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	24
3.4.3. TBA ve TCA Solüsyonlarının Hazırlanması	24
3.4.4. Protein Yükleme (Sample Buffer) ve Yürütme (Running Buffer) Tamponlarının Hazırlanması.....	25
3.4.5. BPA ve GA'nın Hazırlanması.....	25
3.5. Yöntem	26
3.5.1. Deneysel Uygulamalar	26
3.5.1.1. Deneysel Tasarım ve Numunelerin Alınması	26
3.5.2. Biyokimyasal Parametrelerin Analizi	27
3.5.2.1. LDH ve CK-MB Parametrelerinin Ölçülmesi.....	27
3.5.2.2. Kalp Dokularının Analiz İçin Hazırlanması (MDA, KAT, GSH, GPx, SOD ve Protein Miktar Analizi).....	28
3.5.2.3. MDA Ölçümü.....	28
3.5.2.4. KAT Ölçümü.....	29
3.5.2.5. GSH Ölçümü	29
3.5.2.6. GPx Ölçümü	30
3.5.2.7. SOD Ölçümü	31
3.5.2.8. Protein Miktar Ölçümü.....	32
3.5.3. Hedef Proteinlerin Analizi	32
3.5.3.1. Dokulardan Protein İzolasyonu	32
3.5.3.2. Western Blot Tekniği	33
3.5.4. İstatiksel Analiz.....	34
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	35
4.1. Kalp Dokusu Serum Biyokimyasal Parametreleri (LDH, CK-MB).....	35
4.2. BPA İle İndüklenmiş Lipit Peroksidasyonu Üzerine GA'nın Etkileri	38
4.3. BPA ve GA'nın Antioksidan Parametreler (GSH, GPx, SOD ve KAT) Üzerine Etkileri	39

4.4. BPA ve GA'nın Bazı Apoptozla İlişkili Proteinlerin Ekspresiyon Seviyeleri Üzerine Etkileri	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	50



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AChE	: Asetilkolin Esteraz
AFİ	: Apoptotik Faktör İnhibitörü
AİF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
AME	: Miyokard Enfarktüsü
APAF-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
BPA	: Bisfenol A
BPAF	: Bisfenol AF
BPB	: Bisfenol B
BPF	: Bisfenol F
BPS	: Bisfenol S
BSA	: Sığır Serum Albümin
CK-MB	: Kreatin Kinaz MB
DISC	: Ölüme Neden Olan Sinyal Kompleksi
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ECL	: Enhanced Chemiluminescence
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
GA	: 18β Glisiretinik Asit
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Glutasyon
HCl	: Hidroklorik Asit
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
ISP	: İzopreterenol
KAT	: Katalaz
KCl	: Potasyum Klorür
KH	: Kardiyovasküler Hastalıklar

LDH	: Laktat Dehidrojenaz
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
NBT	: Nitroblue Tetrazolyum
PBS	: Fosfat Tuzu Tamponu
PMSF	: Fenil Metan Sülfonit Florit
PVDF	: Poliviniliden Florür
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
SDS-PAGE	: Sodyum Dedosil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SMAC	: İkincil Mitokondri Kaynaklı Kaspaz Aktivatörü
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TBA	: Tiyobarbütirik Asit
TBS-T	: Tris Tampon Tuzu-Tween 20
TCA	: Trikloroasetik Asit
μ M	: Mikro Molar

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	BPA'nın sentetik olarak elde edilme reaksiyonu	2
Şekil 1.2.	BPA ve alternatiflerinin (BPAF, BPB, BPF ve BPS) kimyasal yapısı....	5
Şekil 1.3.	BPA'nın kardiyotoksik etkisinin olası metabolik hedefleri	7
Şekil 1.4.	BPA'nın metabolizması	9
Şekil 1.5.	Apoptozda içsel ve dışsal yolağında görev alan bazı apoptotik elemanlar	11
Şekil 1.6.	GA'nın kimyasal yapısı	15
Şekil 3.1.	DeneySEL tasarım	27
Şekil 3.2.	MDA standart grafiğı	29
Şekil 3.3.	GSH standart grafiğı	30
Şekil 4.1.	LDH sonuç grafik	36
Şekil 4.2.	CK-MB sonuç grafik	37
Şekil 4.3.	MDA sonuç grafik	39
Şekil 4.4.	GSH sonuç grafik	41
Şekil 4.5.	GPx sonuç grafik	42
Şekil 4.6.	SOD sonuç grafik	43
Şekil 4.7.	KAT sonuç grafik	44
Şekil 4.8.	Western blot sonuç grafik ve görsel	47

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1.	Bazı antiapoptotik ve proapoptotik proteinler.....	10
Tablo 1.2.	Bazı ROS ve RNS türleri	13
Tablo 3.1.	Kullanılan cihazlar ve ekipmanlar	21
Tablo 3.1. (Devam)	Kullanılan cihazlar ve ekipmanlar	22
Tablo 3.2.	Kullanılan kimyasallar ve bazı sarf malzemeler	22
Tablo 3.2. (Devam)	Kullanılan kimyasallar ve bazı sarf malzemeler	23
Tablo 3.3.	Çalışmada kullanılan primer ve sekonder antikorlar	34

RATLARDA BİSFENOL A İLE OLUŞTURULAN KARDİYOTOKSİSİTE ÜZERİNE 18β -GLİSİRETİNİK ASİD'İN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Ülkemizde ve dünyada en önemli ölüm sebeplerinden biri kardiyovasküler hastalıklardır. Kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde çevresel faktörler çok önemlidir. Hava, su, toprak ve gıda insanı etkileyen en önemli çevresel faktörlerin başında gelir. Bu farklı ortamların çevresel bir kirleticisi ile kontaminasyonu doğrudan yada dolaylı olarak insanları da etkilemektedir. BPA endüstride yoğun kullanım alanına sahip sentetik bir çevresel kirleticidir. Sentetik bir kimyasal olan BPA, epoksi reçinelerin üretiminde ve polimer olmayan plastiklerin katkı maddesi olarak kullanılır. BPA'ya en fazla oral yol ile maruz kalınmaktadır. BPA protein ekspresiyonu, DNA metilasyonu ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu etkileyerek çeşitli kardiyovasküler hastalıklara sebep olmaktadır.

Bu çalışmada BPA'nın sebep olduğu kardiyotoksisite üzerine 18β glisiretinik asid'in antioksidan ve antiapoptotik etkilerinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Deneyde 40 adet Wistar Albino cinsi erkek rat (250 – 300 gr ağırlığında) kullanıldı. Her grupta 8 adet rat olacak şekilde 5 farklı deney grubu oluşturuldu. 1. Grup (Kontrol): 0,2 mL zeytinyağı, 2. Grup (GA 100): 100 mg/kg GA, 3. Grup (BPA): 250 mg/kg BPA, 4. Grup (BPA + GA 50): 250 mg/kg BPA ve 50 mg/kg GA, 5. Grup (BPA + GA 100): 250 mg/kg BPA ve 100 mg/kg GA olacak şekilde 14 gün boyunca gavaj ile oral yoldan uygulandı. Deney sonunda ratlardan LDH ve CK-MB seviyelerini belirleyebilmek için kan örnekleri, antioksidan parametreler (SOD, KAT, GSH, GPx ve MDA) ve apoptotik proteinlerin (Bax, Bcl-2, Prokaspaz 3, Prokaspaz 9, Sitokrom C ve p53) belirlenmesi için ise kalp dokuları alındı. Elde edilen verilerde kontrol grubuna kıyasla, BPA'nın serum LDH ve CK-MB seviyelerini önemli düzeyde arttırdığı ve SOD, KAT, GSH ve GPx antioksidanları inhibe ettiği belirlendi. Ayrıca MDA seviyesinde de önemli düzeyde artışa sebep olduğu tespit edildi. Ek olarak BPA grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli apoptotik markırlardan olan Bax ve sitokrom C'nin ekspresiyon seviyelerinde artış olduğu tespit edilirken Bcl-2, prokaspaz 3 ve prokaspaz 9 ekspresiyon seviyelerinde ise önemli düzeyde azalma gözlemlendi. Ek olarak BPA'nın p53 ekspresiyon seviyesinde anlamlı bir değişime sebep olmadığı tespit edildi. Tedavi edici olarak uygulanan GA'nın 50 ve 100 mg/kg dozları BPA ile uygulandığında apoptotik parametreler üzerinde önemli düzeyde iyileştirmeler gerçekleştirdiği saptandı.

Deney sonucunda BPA'nın oksidatif stresi ve apoptozu arttırdığı belirlendi. Tedavi edici olarak uygulanan GA'nın ise BPA kaynaklı oluşan kardiyotoksistide hem oksidatif stresi hem de apoptoz mekanizması üzerinde etkili olduğu belirlenerek kardiyoprotektif etkiye sahip olduğu bulundu.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, bisfenol A, kardiyotoksisite, oksidatif stres, 18β glisiretinik asit.

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF 18 β -GLYCYRRHETINIC ACID ON BISPHENOL A-INDUCED CARDIOTOXICITY IN RATS

ABSTRACT

One of the most important causes of death in our country and in the world is cardiovascular diseases. Environmental factors play an important role in the development of cardiovascular diseases. Air, water, soil and food are among the most important environmental factors affecting people. Contamination of these different environments with an environmental pollutant directly or indirectly affects humans. BPA is a synthetic environmental pollutant with extensive use in industry. A synthetic chemical, BPA is used in the manufacture of epoxy resins and as an additive to non-polymer plastics. Humans are most exposed to BPA by the oral route. BPA causes various cardiovascular diseases by affecting protein expression, DNA methylation and formation of reactive oxygen species.

In this study, it was aimed to elucidate the antioxidant and antiapoptotic effects of 18 β -glycyrrhethinic acid on cardiotoxicity caused by BPA. In the experiment, 40 Wistar Albino male rats (250-300 gr. weight) were used. 5 different experimental groups were formed with 8 rats in each group. It was administered orally to the groups by gavage for 14 days as 1. Group (Control): 0,2 mL olive oil, 2. Group (GA 100): 100mg/kg GA, 3. Group (BPA): 250mg/kg BPA, 4. Group (BPA + GA 50): 250mg/kg BPA ve 50mg/kg GA, 5. Group (BPA + GA 100): 250mg/kg BPA ve 100mg/kg GA. At the end of the experiment, blood samples were taken from the rats to determine LDH and CK-MB levels, and heart tissues were taken to determine antioxidant parameters (SOD, KAT, GSH, GPx and MDA) and apoptotic proteins (Bax, Bcl-2, Procaspase 3, Procaspase 9, Cytochrome C ve p53). In addition, it was determined that the MDA level caused a significant increase. In addition, when the BPA group was compared with the control group, an increase in the expression levels of Bax and cytochrome C, which are important apoptotic markers, was observed, while a significant decrease was observed in the expression levels of Bcl-2, procaspase 3 and procaspase 9. In addition, it was determined that BPA did not cause a significant change in p53 expression level. It was determined that the therapeutically applied GA achieved significant improvements on apoptotic parameters when 50 and 100 mg/kg doses were administered with BPA.

As a result of the experiment, it was determined that BPA increased oxidative stress and apoptosis. It was determined that GA, applied as a preventative, was effective on both oxidative stress and apoptosis mechanism in BPA-induced cardiotoxicity, and it was found to have a cardioprotective effect.

Keywords: Apoptosis, bisphenol A, cardiotoxicity, oxidative stress, 18 β glycyrrhethinic acid.

1. GİRİŞ

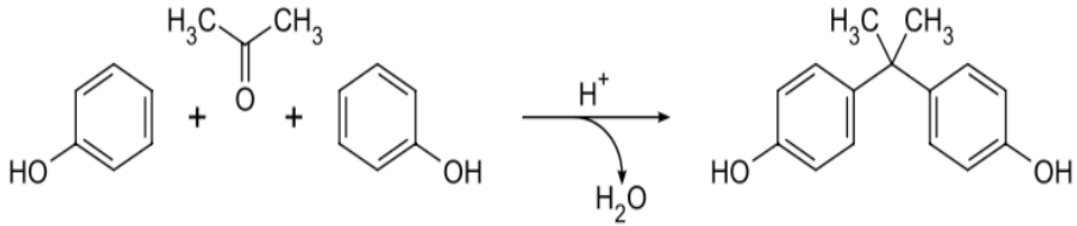
Gelişen teknoloji çevreyi ve insan sağlığını olumlu veya olumsuz etkileyebilmektedir. Aynı zamanda insanlar ve diğer canlılar (hayvanlar ve bitkiler vb.) olumsuz çevre şartlarından etkilenerek çeşitli rahatsızlıklar geçirebilmektedir. İnsanların yaşamını olumlu ya da olumsuz etkileyebilen en önemli parametreler çevre, su, toprak ve gıda şeklinde sıralanabilir. Son yıllarda endüstrileşmenin de artmasıyla çevre sağlığı açısından özellikle ağır metaller, plastikler, ilaç kalıntıları, pestisitler ve çeşitli tarım ilaçları önemli çevresel kirletici maddeler olarak dikkat çekmektedir (Güler ve Can, 2017).

1.1. Çevresel Kirletici Maddeler

İnsan ve çevre sağlığını olumsuz yönde etkileyen birçok kimyasal bileşik üretim zincirinin birçok basamağında ürünlere geçebilmektedir. Doğrudan ya da dolaylı olarak çevreye salınımı da gerçekleşebilen bu kimyasal bileşiklerin bir kısmı doğal olarak bulunurken bir kısmı da insanlar tarafından oluşturulabilmektedir (Güler ve Can, 2017). Bu durumun kontrol altına alınamaması çevreyi ve insan sağlığını tehdit edebilecek ve tehlike oluşturabilecek boyutlara ulaşabilmektedir. Endüstrileşmedeki hızlanmaya paralel olarak üretim sektöründe kullanılan kimyasalların oranı da hızla artmaktadır. Endüstri ve sanayi atıklarının barındırdığı kimyasal atıklar, çevre için önemli kirletici maddeler olarak karşımıza çıkarken aynı zamanda tehlikeli bir gıda kontaminantı olabilmektedirler (Güler ve Can, 2017). Genellikle stabil olmayan kimyasal maddeler; hava, su, toprak ve gıdalar gibi çeşitli ortamlarda kontaminasyona sebep olabilirler. Bu kimyasal kontamine edici maddelerden biri de Bisfenol A (BPA) olarak literatürde yer almaktadır (Huang et al., 2012).

1.2. Bisfenol A (BPA)

BPA, [2,2-bis (4-hidroksifenil) propan] endüstride epoksi reçinelerin üretiminde ve polimer olmayan plastikler için katkı maddesi olarak kullanılan bir kimyasal bileşiktir (Ayazgök ve Küçükkilinç, 2017; Gündoğdu ve Akdevelioğlu, 2019). Dünyada çok yaygın kullanım alanlarına sahip olan BPA ilk olarak 1891’de Dianin tarafından daha sonra 1905’te Zincke tarafından rapor edilmiştir (Huang et al., 2012; Jalal et al., 2018). 20. yüzyılın başlarından beri sentetik estradiol bir bileşik olarak BPA büyük bir ticari hacme sahiptir. BPA üretiminde artan talepten dolayı Asya ülkelerinde yıllık %13, Hindistan’da ise %19’luk bir artış gerçekleşmektedir (Gündoğdu ve Akdevelioğlu, 2019). Öyle ki 2002 yılında yıllık BPA üretimi 2,8 milyon ton iken bu rakam 2011’de yaklaşık 5,5 milyon tona çıkmıştır (Rochester, 2013). Şekil 1.1’de görüldüğü gibi BPA, 2 fenol bileşiğinin asidik veya bazik bir ortamda aseton ile tepkimeye sokularak elde edilmektedir (Bernardo et al., 2015).



Şekil 1.1. BPA’nın sentetik olarak elde edilme reaksiyonu (Bernardo et al., 2015)

Endüstride maliyeti düşük ve sürdürülebilir materyallerden biri olarak karşımıza çıkan BPA, polikarbonat plastiklerin üretiminde kullanılan ve plastikleri şeffaf, hafif, güçlü ve kırılmalara karşı daha dayanıklı hale getiren bir bileşiktir. Hayatımızın her alanında karşılaştığımız bu madde gıda, tarım, ilaç ve sanayi gibi birçok farklı alanda sıklıkla kullanılmaktadır (Bao et al., 2020; Simões, 2016). BPA’nın üretim ve imalatla bu denli sık kullanılması; oda sıcaklığında katı halde bulunabilmesi, düşük buhar basıncı, orta derecede suda çözünürlük ve düşük uçuculuk gibi farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Huang et al., 2012). Düşük konsantrasyonlarda suda yaşayan bazı organizmalar için akut toksik etki gösterebilen BPA’nın endokrin sisteme karşı da hasar verici bir ajan olduğu bilinmektedir (Santoro et al., 2019).

İnsanlarda erkek üreme fonksiyonu üzerindeki olumsuz etkileri ile bazı metabolik faaliyetlerde bozulma (hipertansiyon, şeker hastalığı, insülin direnci ve obezite) gibi hastalıkların BPA maruziyeti sonucunda gerçekleşebildiği birçok kez rapor edilmiştir (Rezg et al., 2014; Galloway et al., 2010). BPA'nın kullanım alanlarının genişlemesi aynı zamanda canlı sistemler üzerindeki BPA maruziyetini de arttırmıştır.

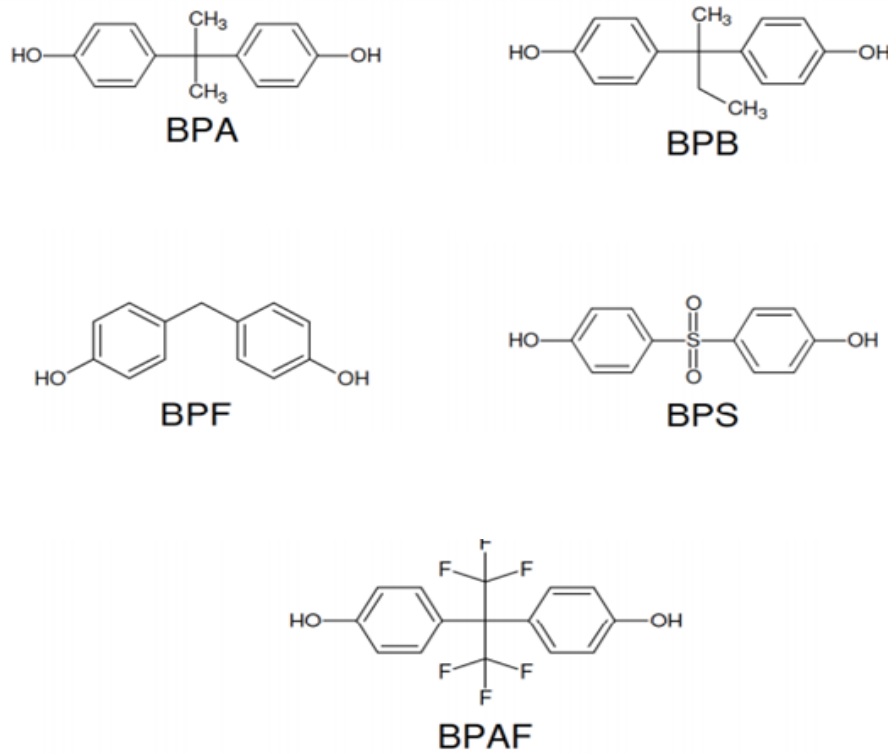
İnsan kaynaklı oluşan çevresel sorunlar antropojenik faaliyetler olarak değerlendirilir. Bu nedenle çeşitli çevrelerde (toprak, çökelti, yeraltı suyu, yüzey suyu ve hava) BPA varlığının tespit edilmesi antropojenik faaliyetlerin sonucudur. BPA, polikarbonat/epoksi reçine içeren birçok ürünün kullanımdan sonra çöpe atılmasının ardından çevreye salınır (Huang et al., 2012). Aynı zamanda BPA, üretim tesislerinde yapılan deşarjlar yoluyla doğrudan yüzey ve yeraltı su kütlelerine ve atmosfere salınmaktadır. Küçük miktarlarda reaksiyona girmemiş veya kürlenmemiş BPA içeren farklı ticari ürünlerin (örneğin polikarbonatlar ve epoksi reçineler) fabrikalarda imalat için BPA'nın işlenmesi ve depolanması sırasında istenmeyen durumlardan dolayı çevreye ve havaya salınabilmektedir (Führacker et al., 2000; Huang et al., 2012). Buna bağlı olarak, BPA çeşitli çevresel ortamlarda ve yiyeceklerde tespit edilmiş olması BPA maruziyetinin, insanlarda gıda ve içme suyu tüketimi yolu ile de gerçekleşebildiğini ortaya çıkarmıştır (Santoro et al., 2019). BPA maruziyeti sonucunda gelişebilen sağlık problemleri de göz önünde bulundurularak, bazı ülkeler bir takım tüketici ürünlerinde BPA kullanımını yasaklama ihtiyacı duymuştur. Kanada hükümeti, BPA içeren bebek şişelerinin satışını, ithalatını ve reklamını yasaklamış ve BPA'yı "tehlikeli bir madde" olarak ilan eden ilk ülke olmuştur. 2011 yılında ise Avrupa Komisyonu, BPA'yı polikarbonat bebek biberonlarında yasaklamaya karar vermiştir. 2012'de Amerika bebek şişeleri ile yudum kaplarında BPA'yı, 2013 yılında ise Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) bebek maması ambalajlarının kaplamalarında kullanılan BPA bazlı reçinelerin kullanımını kısıtlamıştır. Ülkemizde ise Avrupa Komisyonu kararları baz alınmış ve bu kararlara katılarak bebek biberonları ve beslenme kaplarında BPA kullanılmasında bazı sınırlandırmalar Tarım ve Köy işleri Bakanlığınca uygulanmıştır (Türk Gıda Kodeksi, 2011). 2011 Haziran ayında BPA içeren biberonlar ve diğer beslenme kapları gibi ürünler bakanlık tarafından toplatılmıştır (Durmaz ve Giray, 2013).

1.3. BPA'nın Kullanım Alanları

Özellikle, hızlı gelişen ekonomilere sahip ülkelerde (Örn: Çin, ABD vb.) BPA'nın çok fazla kullanım alanı bulunmaktadır. Günümüzde üretilen BPA'nın yaklaşık olarak %95'i polikarbonat ve epoksi reçinelerin üretiminde kullanılırken, %5'lik kısmı ise çok geniş bir ürün yelpazesinde kullanılmaktadır (Huang et al., 2012). Bunlara fenolik reçineler, fenoplast reçineleri, kutu astarları, PVC üretimi, etoksillenmiş BPA, termal kağıt üretimi için katkı maddeleri, polioller, modifiye poliamid, araba lastik üretiminde kullanılan bazı bileşikler, alev geciktiriciler (Örn: tetrabromobisfenol A), otomotiv ve diğer ulaşım ekipmanları, elektrikli/elektronik ekipman, inşaat, içme suyu borularının içindeki kaplamalar, termal ve karbonsuz kağıt kaplamalar örnek verilebilir (Huang et al., 2012; Ma et al., 2019). Ülkemizde ise benzer kullanım alanlarına sahip olan BPA'nın özellikle ithal edilen ucuz plastik ve polikarbonatların yapısında oldukça yüksek olduğu belirtilmektedir (Amini, 2017).

1.4. BPA'nın Alternatif Formları

Ülkemiz de dahil olmakla birlikte diğer bazı ülkelerin BPA kullanımındaki kısıtlamaları, üreticileri BPA'nın yerine alternatif maddeler kullanmaya teşvik etti (Dualde et al., 2019). Şekil 1.2'de açık kimyasal yapıları gösterilmekte olan Bisfenol B (BPB), Bisfenol F (BPF), Bisfenol S (BPS) ve Bisfenol AF (BPAF) bunlara örnektir. Bunlar arasında bisfenol analogları olan BPF ve BPS en çok kullanılanlardır (Liao et al., 2012; Chen et al., 2016; İyigündoğdu et al., 2020). Bununla birlikte, son çalışmalar BPF ve BPS'in BPA'ya benzer endokrin bozucu etkiler gösterdiğini belirtmektedir (Rochester and Bolden, 2015; İyigündoğdu et al., 2020). Sonuç olarak, BPA'nın yerini alması için üretilmiş olan BPB, BPF, BPS ve BPAF'in güvenli olup olmadığı hala tartışma konusudur (Andra et al., 2015; Rochester and Bolden, 2015; Ullah et al., 2018; İyigündoğdu et al., 2020).



Şekil 1.2. BPA ve alternatiflerinin (BPAF, BPB, BPF ve BPS) kimyasal yapısı (Santoro et al., 2019)

1.5. BPA'nın Toksik Etkileri

Avrupa birliğinin 2002 yılında yayınlamış olduğu raporda BPA'nın, çevre ve insan sağlığı üzerinde özellikle de endokrin sisteme hasar veren toksik ajanlar içerisinde yer aldığı belirtilmiştir. Kişisel bakım ürünleri, oyuncaklar ve plastik şişeler gibi hayatımızın birçok alanında sıklıkla kullandığımız ürünlerin BPA içermesi, günlük yaşantımızda BPA'ya olan maruziyetimizi gözler önüne sermektedir. İnsanların BPA'ya maruziyeti intrauterin dönemi dahil yaşamları boyunca devam edebilmektedir. İnsanların BPA ile olan teması kişinin kullandığı ürünler ya da yaşadığı çevrenin içerdiği BPA miktarı ile paralel olarak artıp azalmaktadır. BPA'dan etkilenmenin çocukluk ve süt döneminde daha fazla olduğu söylenmektedir (Durmaz ve Giray, 2013). İdrar ve kan başta olmak üzere tükürük, amniyotik sıvı, anne sütü, plasenta ve fetüs, kolostrum ve yağ dokusunda BPA'ya rastlanabilmektedir (Willhite et al., 2008; Shelby, 2010; Fernandez et al., 2010). BPA'nın büyük bir kısmı oral yoldan alınırken belirli bir miktarı deri emilimi ile de gerçekleşebilmektedir (Shelby, 2010; Cai et al., 2020). Farklı dozlarda ki BPA; endokrin sisteme hasar verme, üreme sistemi üzerine olumsuz etkiler, farklı nörolojik etkiler,

immün sistem toksisitesi, obezite ve diabetes mellitus, nefrotoksosite, hepatotoksosite ve çeşitli kardiyovasküler rahatsızlıklara sebep olduğu bildirilmiştir (Masuno et al., 2005; Hugo et al., 2008; Ginsberg and Rice, 2009; Alonso-Magdalena et al., 2010).

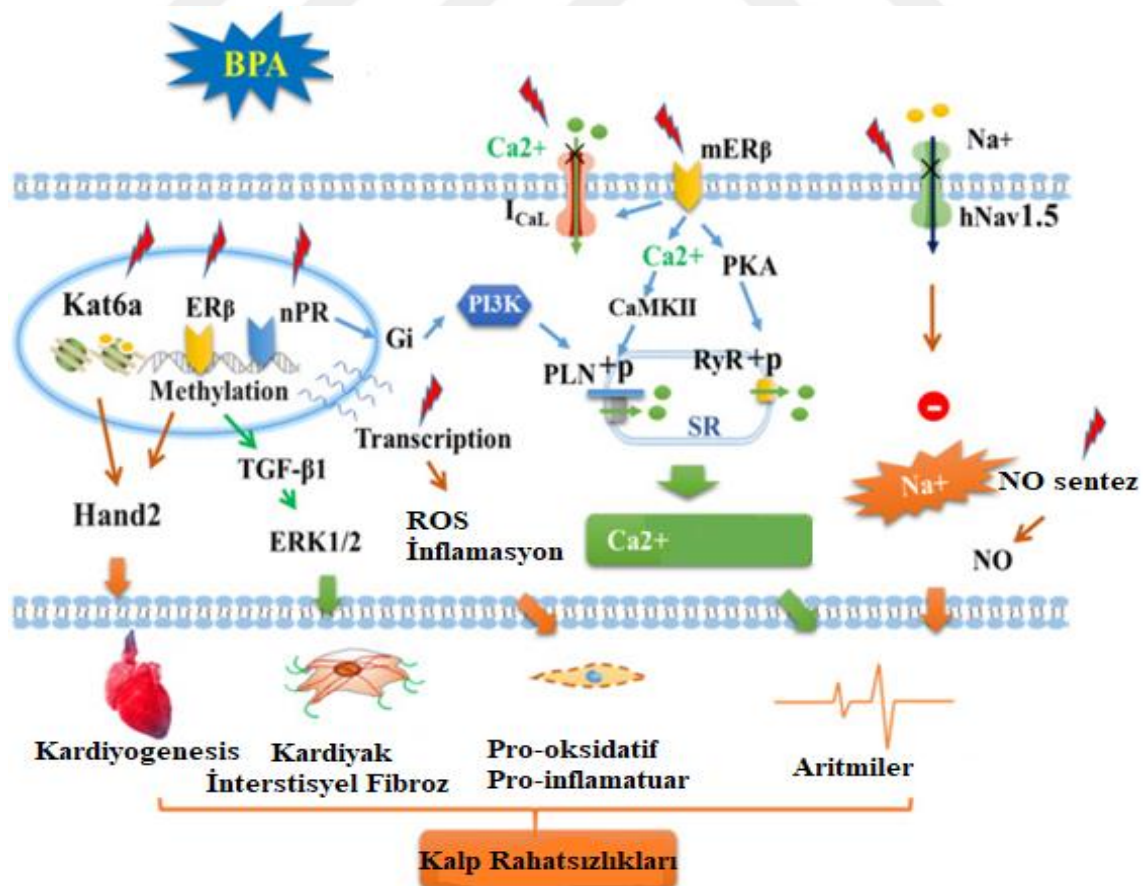
1.5.1. BPA'nın Karaciğer ve Böbrek Dokuları Üzerindeki Etkileri

Oral yoldan alınan BPA'nın eliminasyonun da görev alan karaciğer ve böbrek BPA'ya en çok maruz kalan organlardır. BPA'nın vücuda girmesi ile başlayan metabolik yolda ilk olarak karaciğer görev alır. BPA karaciğerde BPA glukronit ve BPA sülfat'a dönüştürülür ve az miktarda dönüşüme uğramadan serbest BPA olarak çıkar. Serbest haldeki BPA endokrin bozucu BPA olarak karşımıza çıkmaktadır (Durmaz ve Giray, 2013). Serbest BPA'nın yıkıcı hepatotoksik etkilerinin olduğu ve karaciğerde proinflatuar sitokinler olan IL-1 β ve IL-6'yı doza bağlı olarak arttırdığı ve katalaz enzim aktivitesinde düşüş olduğu belirtilmektedir (Hussein and Eid, 2013). Ayrıca oksidatif stres, inflamatuvar yanıt ve histopatolojik hasara sebep olduğu bildirilmiştir (Hussein and Eid, 2013; Wang et al., 2019; Sun et al., 2021). BPA'nın eliminasyonunda görev alan böbreklerde ise doza bağımlı olarak proteinüri ve glomerüler yaralanmalar gözlenmiştir ve bunun sonucunda serumda üre ve kreatinin seviyelerinde önemli derecede artış, kreatinin klirensinde ise azalma gerçekleşerek böbrek hasarının olduğu kanısına varılmaktadır (Kobroopet al., 2018).

1.5.2. BPA'nın Kardiyovasküler Etkileri

Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) verilerine göre kardiyovasküler hastalıklar (KH) günümüzdeki başlıca ölüm sebeplerindendir. Miyokard enfarktüsü, dilate kardiyomiyopati, koroner arter hastalığı, ateroskleroz ve hipertansiyon, kalp ve kan damarlarını içeren bazı rahatsızlıklar yaygın olarak görülen KH'dır (Lombo et al., 2019; Zhang et al., 2020). Günümüzde KH'nın erken yaşlarda artmasında çevresel faktörlerin (BPA dâhil) önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (Momtazan et al., 2018; Dastoopoor et al., 2019; Argacha et al., 2019). Çevresel bir kontaminasyon kaynağı olan BPA, kardiyotoksositeye sebep olmaktadır. BPA, transkriptom, protein ekspresyonu ve DNA metilasyonu gibi önemli mekanizmaları etkileyerek farklı KH'nın oluşmasını tetikleyebilir (Patel et al., 2013; Chapalamadugu et al., 2014; Moreno Gomez Toledano et al., 2021).

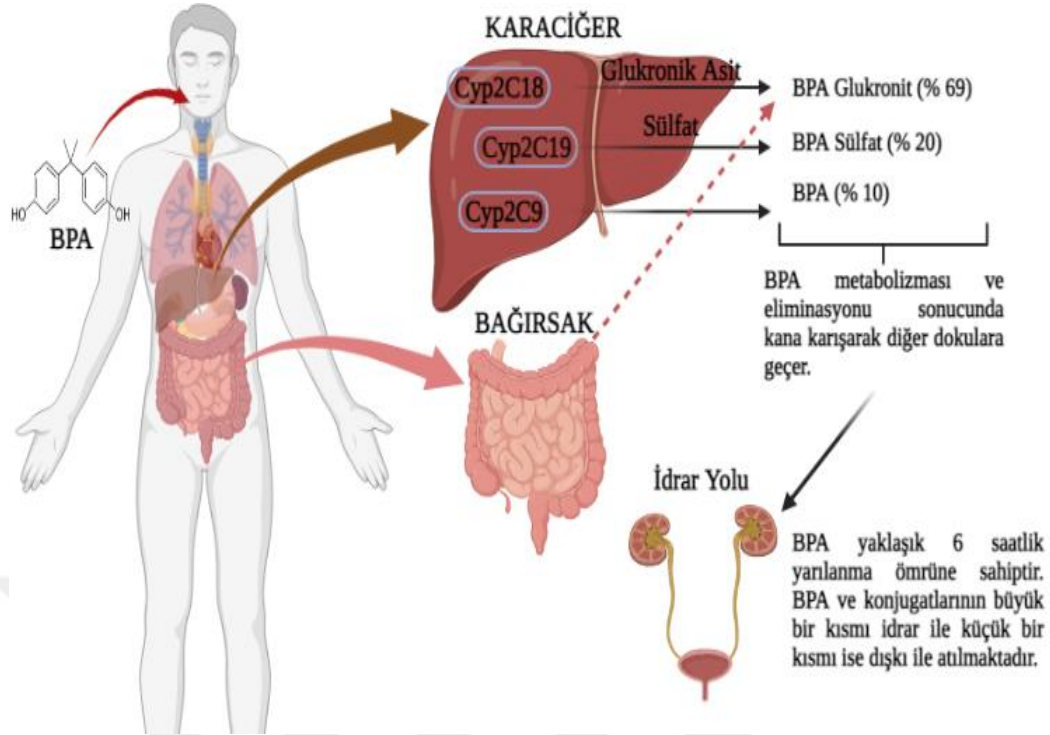
Ayrıca sistolik kan basıncını arttırma, interventriküler septal kalınlığı oluşturma, zebra balığı, kemirgen, koyun ve maymun yavrularında kardiyak yapı ve işlev değişikliğini de tetikleyebilmektedir (Cagampang et al., 2012; Koneva et al., 2017). BPA maruziyetinin ventriküler iletim hızı ve kardiyak yapı/fonksiyonu ile ilgili etkileşimleri cinsiyete göre farklılıklar gösterebilmektedir (Posnack et al., 2014; Zhang et al., 2020). BPA'nın iskemi ve reperfüzyondan zarar görmüş kobay kalplerinde 17β ösradol'e benzer şekilde hareket ederek koruyucu etkilerini bastırarak hasarı arttırabildiği vurgulanmıştır (Mao et al., 2019). Ayrıca bazı fare modellerinde BPA'nın neden olduğu aritmik etkiler östrojen reseptörü β 'nin inhibisyonunu etkilemiştir (Yan et al., 2011). Östrojenler, kardiyovasküler sistemin oluşumu ve işlevi için gerekli moleküllerdir. Bu moleküllerdeki değişimler ya da dengesizlikler KH riskini arttırabilmektedir (Naftolin et al., 2019). BPA şekil 1.3'de görüldüğü gibi; nükleer reseptörler ve kalsiyum sinyalleri, lipid metabolizması, kardiyak gelişimi ve fonksiyonu için önemli hücre dışı matriks etkileşimleri gibi bir çok moleküler yolu hedefleyebilmektedir (Brown et al., 2018; Zhang et al., 2020).



Şekil 1.3. BPA'nın kardiyotoksik etkisinin olası metabolik hedefleri (Zhang et al., 2020)

1.5.3. BPA'nın Metabolizması

Etik olarak insanlar üzerinde araştırılması mümkün olmayan BPA çalışmalarının çoğu deney hayvanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ancak bazı istenmeyen durumlardan ötürü BPA'ya maruz kalmış insanlar veya bazı gönüllüler üzerinde çalışmalar yapılabilmektedir. Bu gibi durumlardan ötürü BPA'nın metabolizması hala yeterince aydınlatılamamıştır. İnsanlarda BPA maruziyetinin büyük bir kısmı oral yol ile gerçekleşirken yaklaşık %10'luk bir kısmı deri emilimi ile gerçekleşebilmektedir. İdrar ve kan başta olmak üzere tükürük, amniyotik sıvı, anne sütü, plasenta ve fetüs, kolostrum ve yağ dokusunda BPA'ya rastlanabilmektedir (Willhite et al., 2008; Shelby, 2010; Fernandez et al., 2010). Oral yol ile alınan BPA'nın büyük bir kısmı karaciğerde bulunan CYP2C18 ile küçük bir kısmı da CYP2C19 ve CYP2C9 enzimleri ile metabolize edilmektedir. Yaklaşık 6 saatlik yarılanma ömrüne sahip BPA'nın tamamına yakını 42 saatte idrar yolu ile vücuttan atılabildiği bilinmektedir (Melzer et al., 2010; Durmaz ve Giray, 2013; Michalowicz, 2014; Quesnot et al., 2014). BPA'nın karaciğer eliminasyonu sırasında yaklaşık %69'u glukuronik asit ile konjugasyonu sonucunda majör metaboliti olarak BPA glukuronit'e, yaklaşık %20'si ise sülfat konjugasyonu ile minör metaboliti olan BPA sülfata dönüştürülür. Geriye kalan (yaklaşık %11) BPA da hiç değişime uğramadan metabolitler ile birlikte kana karışarak diğer dokulara taşınmaktadır (Durmaz ve Giray, 2013; Quesnot et al., 2014; Almeida et al., 2018; Santoro et al., 2019). BPA metabolitlerinin herhangi bir toksik etki sergilemediği belirtilmekle beraber, asıl toksikasyonun kana salınan serbest BPA'dan kaynaklandığı belirtilmiştir. Ek olarak bazı kimyasalların (salisilik asit ve naproksen vb.) karaciğerdeki BPA glukronidasyonunu baskılayarak kana salınan serbest BPA miktarını arttırabileceğini rapor etmiştir (Verner et al., 2010). Ayrıca plasenta ve diğer dokularda bulunan β -glukronidaz enzimi BPA majör metabolitini dekonjuge edebilir ve arilsülfataz-C enzimi ise minör metabolitteki sülfatın inaktivasyonunu gerçekleştirerek kana salınan serbest BPA'nın oranının artmasına sebep olabilmektedir (Durmaz ve Giray, 2013; Almeida et al., 2018; Santoro et al., 2019). Ayrıca şekil 1.4 gösterildiği gibi BPA'nın glukuronidasyonunun küçük bir kısmı bağırsaklarda da gerçekleşebilmektedir (WHO, 2010; Mazur et al., 2010; Wang et al., 2018).



Şekil 1.4. BPA'nın metabolizması (Mazur et al., 2010; Durmaz ve Giray, 2013; Wang et al., 2018)

1.6. Apoptoz

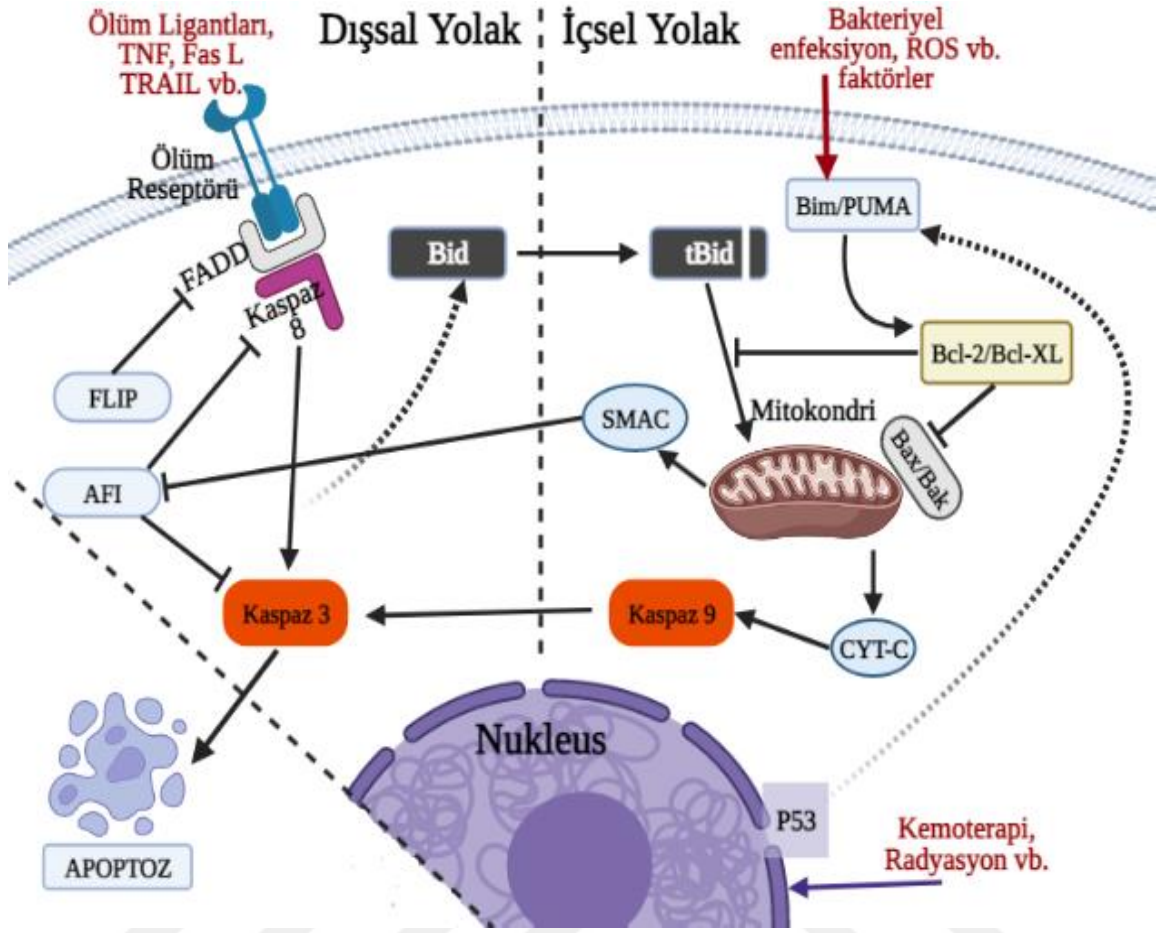
Apoptoz veya programlanmış hücre ölüm mekanizması, çok hücreli organizmaların normal gelişimi ve homeostazı korumak için gerekli olan ve doğal olarak meydana gelen bir hücre ölümü sürecidir (Jan, 2019). Bu işlem ayrıca hasarlı, enfekte veya potansiyel olarak neoplastik hücrelerin çıkarılması için de önemlidir. Ancak apoptotik hücre ölümünün hem çok az hem de çok fazla gerçekleşmesi biyolojik olarak olumsuz sonuçlara yol açabilir (D'Arcy, 2019). Örneğin romatoid artrit ve kanser gelişiminde apoptozun çok az gerçekleştiği görülürken, iskemik kalp hastalığı, kazanılmış bağışıklık yetersizliği sendromu (AIDS)'nin yanı sıra alzheimer ve parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda apoptozun çok fazla gerçekleştiği bilinmektedir (D'Arcy, 2019; Jan, 2019; Darendelioglu, 2020). Organizmaların yaşamlarını ve homeostazı koruması için gerekli olan apoptoz, genetik materyal tarafından kontrol edilen bir mekanizmadır. Apoptoz mekanizmasında görev alan genler proapoptotik (apoptozu tetikleyen) ve antiapoptotik (apoptozu baskılayan) olmak üzere iki farklı şekilde gruplandırılmaktadır (Chipuk et al., 2008; Coşkun ve Özgür, 2011). Bu her iki grup kendi aralarında bir denge içerisinde bulunurlar. Bu dengenin bozulması durumunda yani hücre içerisinde proapoptotiklerin artması hücreyi apoptoza sürüklerken antiapoptotiklerin artması durumunda ise hücrenin

apoptoza gitmemesi yani hücrenin yaşamına devam etmesi sağlanır (Chipuk et al., 2008; Darendelioglu, 2020). Apoptozda görev alan birçok gen olmasına karşın (Tablo 1.1’de gösterilmektedir) apoptoz sonucu gerçekleşen bazı morfolojik değişiklikler görülmektedir. Apoptoz’da genel olarak; kromatin kondenzasyonu, hücrenin küçülmesi, DNA fragmentasyonları (180-200 bp), organeller ve membran bütünlüğünün korunması gibi morfolojik değişimler diğer ölüm mekanizmalarından (otofaji gibi) farklı olarak apoptozun belirgin özelliklerindendir (Coşkun ve Özgür, 2011; D’Arcy, 2019).

Tablo 1.1. Bazı antiapoptotik ve proapoptotik proteinler (Abotaleb et al., 2018; Uzdensky, 2019; Carneiro and El-Deiry, 2020)

Proapoptotik	Bax Bak Bcl-10 Bid p53 Puma Sitokrom-C Kaspaz-3 Kaspaz-9
Antiapoptotik	Bcl-2 Bcl-X _L Mcl-1 MDM2 p21 p63

Apoptoz, intrinsik (içsel) ve ekstrinsik (dışsal) olarak bilinen iki farklı yolak kullanarak gerçekleşebilmektedir. İntrinsik yolağın uyarılmasında DNA hasarı, hücre döngüsündeki bazı problemler, hücre içi kalsiyum seviyesindeki artış ve hipoksi gibi çeşitli durumlar rol alırken ekstrinsik yolakta UV ışınları, toksinler, radyasyon, iskemi, sitotoksik T lenfositler, kemoterapötik ajanlar, ölüm reseptörleri aktivasyonu (Fas/Fas Ligant ve TNF) ve büyüme faktörü eksikliği gibi etmenler sayılabilir (Coşkun ve Özgür, 2011; Darendelioglu, 2017; Ashkenazi et al., 2017). Her ne kadar farklı uyaranlara sahip olan iki yolak olarak görünseler de her iki yolakta apoptozu gerçekleştirmek için şekil 1.5’te görüldüğü gibi benzer sistein proteazları olan kaspazları kullanırlar.



Şekil 1.5. Apoptozun içsel ve dışsal yolağında görev alan bazı apoptotik elemanlar (Parrino et al., 2007)

1.6.1. Apoptoz İçsel Yolak

Hücrede her hangi bir iç uyaranın olması durumunda apoptotik mekanizmanın başlaması, proapoptotik ajan olan Bid proteininin bir antiapoptotik olan Bcl-2 proteinini baskılayarak Bax ve Bak olarak bilinen diğer proapoptotik ajanları aktifleşmesi ile bazı metabolik aktiviteleri meydana getirmesi ile gerçekleşmektedir. Bax ve Bak proteinleri aktifleştikten hemen sonra mitokondri organelinin hücre duvarına saldırarak por oluşumunu sağlar ve mitokondri içerisinde bulunan SMAC (İkincil mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü), AIF (Apoptoz indükleyici faktör), kalsiyum iyonları ve oksidatif fosforilasyon da elektron taşıyıcı olarak görev alan sitokrom C'nin (CYT-C) sitoplazmaya salınmasını tetikler. Prokaspaz 3 ve Prokaspaz 8'in aktifleşmesini baskılayan AFI (Apoptotik faktör inhibitörü), SMAC proteinleri tarafından baskılanarak apoptozun hızlanması sağlanır. Sitoplazmaya salınan CYT-C ise APAF-1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1) ile ATP varlığında apoptozom olarak bilinen yapıyı

oluşturarak prokaspaz 9'u keser ve aktif kaspaz 9 haline dönüştürür. Kaspaz 9 da prokaspaz 3'leri aktif kaspaz 3'e dönüştürür. Kaspaz 3'ler de Kaspaz 9 gibi diğer prokaspaz 3'leri aktif kaspaz 3'e dönüştürerek kaspaz kaskadını başlatmasıyla apoptozun hızlı bir şekilde gerçekleşmesi sağlanır (Coşkun ve Özgür, 2011; Darendelioğlu, 2017; Ashkenazi et al., 2017).

1.6.2. Apoptoz Dışsal Yolak

Hücre yüzeyinde bulunan ve ölüm reseptörü olarak adlandırılan Fas, TNFR ve DR5 reseptörleri farklı ölüm sinyalleri (Fas-L, TNF- α ve TRAIL gibi) ile uyarılması sonucunda trimerik bir yapı şeklini almaktadırlar. Bu yapı adaptör protein ve prokaspazla DISC (Ölüme neden olan sinyal kompleksi) olarak bilinen kompleksi oluşturur. DISC oluşumu sitoplazmada bulunan prokaspaz 8'i aktif kaspaz 8'e dönüşmesini sağlamaktadır. Kaspaz 8 ise ya direk olarak prokaspaz 3'ü aktif kaspaz 3 ya da dolaylı olarak yani içsel yolakta görevli olan Bid proteinini aktifleştirerek içsel yolağında başlaması ile prokaspaz 3'leri aktifleştirmiş olur. Böylece apoptozun hem iç hem de dış yolağının aktifleşmesi ile apoptotik hücre ölümünün hızlı bir şekilde gerçekleşmesi sağlanır (Coşkun ve Özgür, 2011; D'Arcy, 2019; Carneiro and El-Deiry, 2020).

1.7. Serbest Radikaller

Dış orbitallerinde bir ya da birden fazla eşlenmemiş elektron bulunduran atom, molekül veya iyonlar serbest radikaller olarak adlandırılmaktadır (Wang et al., 2021). Serbest radikallerde bulunan eşlenmemiş elektron çiftleri genellikle diğer kararlı bileşiklerdeki (protein, karbonhidrat, nükleik asit ve lipidler vb.) elektronlara saldırarak onlara yüksek reaktivite kazandırır (Yan et al., 2016; Wang et al., 2021). Oldukça reaktif karakterlerinden dolayı serbest radikaller, genellikle kısa ömürlü oldukları söylenebilir ve çevrelerindeki moleküllerle seçici olmayan bir şekilde reaksiyona girerler. Böylece reaksiyona girdiği molekül, elektronunu kaybeder ve sonunda biyolojik sisteme zarar veren bir zincirleme reaksiyon kaskadı başlatarak kendisi gibi serbest radikaller meydana getirir (Yan et al., 2016). Biyolojik sistemlere zarar veren serbest radikallerin çoğu oksijensiz radikallerdir ve bunlar genel olarak reaktif oksijen türleri (ROS) olarak adlandırılırlar (Rahman, 2007). Hem ROS hem de reaktif nitrojen türleri (RNS) toplu

olarak serbest radikalleri ve diğer radikal olmayan reaktif türleri oluşturur (Yan et al., 2016). Tablo 1.2’de görülmekte olan bazı ROS/RNS, canlı sistem için hem faydalı hem de toksik bileşikler olarak iki yönlü bir iş görür (Yan et al., 2016; Çağlayan, 2018). Orta veya düşük seviyelerde ROS/RNS faydalı etkilere sahiptir ve bağışıklık fonksiyonu (patojenlere karşı savunma), bir dizi hücrel sinyal, mitojenik tepki ve redoks düzenlemesi gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda görev alabilmektedirler. Ancak daha yüksek konsantrasyonlarda, hem ROS hem de RNS, sırasıyla oksidatif stres ve nitroztatif stres oluşturarak biyomoleküllerde potansiyel hasara neden olur (Yan et al., 2016; Wang et al., 2021).

Serbest radikallerin oluşumuna hem endojen (mitokondriyal ETS, redoks ve oksidatif reaksiyonlar ve bazı enzimler) hem de eksojen (çevre kirlenici maddeler, bazı kimyasallar, pestisitler, sigara dumanı, diyet vb.) kaynaklar katkı sağlayabilmektedir (Çağlayan, 2018; Kia et al., 2020). Bunun sonucu olarak oksidatif stres ve nitroztatif stresin oluşması kaçınılmazdır. Ayrıca oksidatif ve nitroztatif stresin artması aşırı ROS/RNS üretimi ve enzimatik/enzimatik olmayan antioksidanların eksikliği ile bağlantılıdır (Yan et al., 2016; Çağlayan, 2018).

Tablo 1.2. Bazı ROS ve RNS Türleri

	RADİKALLER	SEMBOL	RADİKAL OLMAYANLAR	SEMBOL
ROS	Süperoksit	$\cdot^-$	Singlet Oksijen	$^1O_2$
	Hidroksil	$OH\cdot$	Ozon	O_3
	Alkoksil Radikali	$RO\cdot$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
	Peroksil Radikali	$\cdot$	Hipoklorit	$HOCl$
		ROO	Lipit hidroperoksit	$LOOH$
RNS	Nitrik Oksit	$NO\cdot$	Peroksi Nitrit	$ONOO^-$
	Nitrojen Oksit	$\cdot$	Nitroksil Katyon	NO^+
		NO_2	Nitroksil Anyon	NO^-

Vücudumuzda antioksidan savunma sisteminde görev alan önemli bazı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar bulunmaktadır (Çağlayan, 2018). Bu antioksidanların yokluğunda ya da yeterince bulunmaması durumunda, hücre içerisindeki ROS miktarı

artarak oksidatif strese yol açacaktır. Bunun sonucunda ROS lipidler, proteinler ve DNA dâhil olmak üzere çeşitli biyomoleküllerin bütünlüğüne zarar verebilir (Çağlayan, 2018; Kia et al., 2020). Böylece diyabetes mellitus, nörodejeneratif hastalıklar, romatoid artrit, katarakt, KH ve solunum hastalıkları gibi birçok insan hastalıklarına sebep olabilmektedir (Saleh et al., 2019; Kia et al., 2020).

1.7.1. Enzimatik Antioksidanlar

1.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Sıklıkla oksidatif stres belirteci olarak kullanılan SOD, süperoksit radikalini oksijene ve hidrojen peroksite dönüştürür (Kandemir et al., 2017).

1.7.1.2. Katalaz (KAT)

ROS'un olumsuz etkilerine karşı hemen hemen tüm hücre tiplerinde bulunan indüklenabilir bir enzimdir. Hidrojen peroksiti suya ve oksijene dönüştürmektedir (Anitha and Rajadurai, 2014; Ramos et al., 2014).

1.7.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Hücrelerin sitozolünde lokalize olan GPx, hücrelerdeki hidrojen peroksitin detoksifikasyonunu gerçekleştirmektedir. Ayrıca lipid peroksidasyonunu baskılayarak hücrenin fonksiyonunu ve yapısının korunmasında görev alır (Margis et al., 2008).

1.7.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

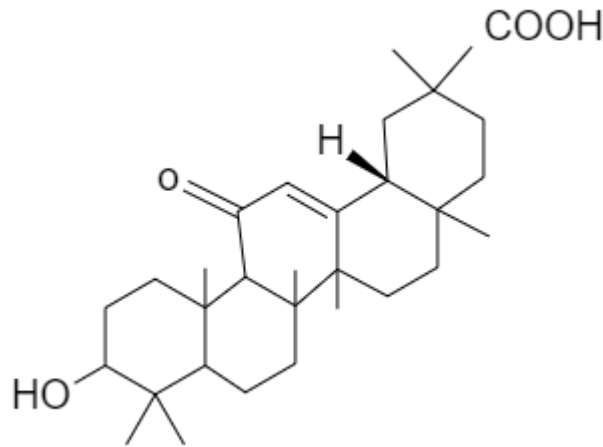
1.7.2.1. Glutatyon (GSH)

Glutamin, sistein ve glisin olarak bilinen üç farklı aminoasit içeren bir tripeptittir. ROS'un olumsuz etkilerine karşı hücreleri korur (Townsend et al., 2003; Bursal et al., 2013).

Yukarıda belirtilenin dışında bazı enzimatik olmayan antioksidanlara ek olarak benzer görevleri yerine getirebilen eksojen kaynaklı olarak adlandırabileceğimiz E vitamini (α - tokoferol), C vitamini (askorbik asit), melatonin, β karoten ve 18β glisiretinik asit (GA) gibi antioksidanlarda bulunmaktadır (Çağlayan, 2018; Wu et al., 2018).

1.7.3. 18β -Glisiretinik Asit

Bitkilerin sahip oldukları fenolik ve flavonoid maddeler biyolojik olarak aktif maddelerdir. Bitkiler bu biyolojik aktif maddeler sayesinde geçmişten günümüze birçok tedavide kullanılmış ve hala sıklıkla kullanılmaktadır (Shah et al., 2019). Yüzyıllardır alternatif tıp adı altında sıklıkla kullanılan meyan bitkisi kökü (*Glycyrrhiza glabra* L.) de zengin fenolik ve flavonoid içeriğe sahip bitkilerdendir. Meyan kökü solunum yolu hastalıkları ve gastrointestinal semptomlar gibi birçok rahatsızlığı tedavi etmek için kullanılmaktadır. Meyan kökü sahip olduğu biyoaktif bileşikler sayesinde günümüzde, antikanserojen, antimikrobiyal, antiviral, anti-ülser, hepatoprotektif, immün sistemi uyarıcı, sinir, endokrin, solunum ve kardiyovasküler sistemin korunmasına katkıda bulunan bazı etkileri olduğu belirtilmiştir (Pastorino et al., 2018). Meyan bitkisi kökü 18β glisiretinik asid (GA) gibi önemli bileşikler bünyesinde bulundurmaktadır. Dolayısıyla GA'nın BPA maruziyeti sonucunda oluşabilecek oksidatif stres ve diğer metabolik bozuklukları engelleyebileceği ya da azaltabileceği düşünülmektedir. GA meyan kökünün en önemli biyoaktif bileşenlerinden olup pentasiklik bir triterpenoid'tir (Şekil 1.6) (Kao et al., 2014).



Şekil 1.6. GA'nın kimyasal yapısı

GA antialerjik, antitümör, antienflamatuar, antioksidan, antibakteriyel ve antiapoptotik gibi özelliklerinin yanında otofajinin indüklemesi, immünosupresyonun azaltılması ve kardiyoprotektif etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Kao et al., 2014; Kowalska and Kalinowska-Lis, 2019; Hong, 2020).

Yapılan literatür taramalarından elde edilen verilere göre BPA'nın birçok kardiyovasküler hastalığı direk yada dolaylı olarak tetiklediği bilinmektedir. Fakat bu etkinin GA'nın kardiyoprotektif etkileri aracılığı ile engellenebileceği ya da azaltılabileceği düşünülmektedir. Bu alanda yeterli düzeyde çalışma olmadığından yapılacak olan tez çalışması, daha sonra yapılacak benzer çalışmalara sıklıkla referans olabileme potansiyeline sahiptir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Asetonun iki eşdeğer monofenol bileşik ile asidik bir ortamda tepkimeye sokulması ile elde edilen BPA insanlar tarafından en fazla üretilmiş sentetik bileşiklerden biridir (Beserra et al., 2012; Metz, 2016). BPA'nın üretim hacmi her yıl yaklaşık 8 milyar paund'ın üzerinde gerçekleşerek dünyada oldukça yaygın bir kullanım alanına sahiptir (Beserra et al., 2012). BPA genel olarak polikarbonat plastiklerin üretimi, kredi kartları, oyuncaklar, şişe üretimi ve termal kâğıtlar gibi günlük hayatta sık kullandığımız ürünlerde kullanılmaktadır (Beserra et al., 2012; Metz, 2016; Geens et al., 2012). Bu ürünlerin çöpe atılması BPA'nın çevreye salınmasında önemli bir etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Çöpe atılan BPA bazlı materyaller, sızıntılara sebep olarak BPA bileşiklerinin öncelikle yüzey sularına buradan da denizlere karışmasına sebep olmaktadır (Mazzotta et al., 2013; Jenkins et al., 2012).

ABD'de yetişkin bireyler üzerinde yapılmış bir araştırmada, bireylerin % 90'ının idrarlarında saptanabilir BPA düzeyi tespit edilmiştir. (Melzer et al., 2012; Mazzotta et al., 2013). Ayrıca idrardaki BPA seviyesine paralel olarak periferik arter hastalığı arasında pozitif bir korelasyon olduğu da vurgulanmıştır (Mazzotta et al., 2013).

Araştırmacılar BPA'nın sıklıkla östrojeni taklit etme yeteneğine sahip olduğunu ve böylece östrojen reseptörlerine bağlanma ve endojen östrojenlere müdahale ettiklerini dile getirerek endokrin bozucu kimyasallar arasında yer aldığını vurgulamaktadır (Beserra et al., 2012; Jenkins et al., 2012).

Hyun ve ark. (2021) pluripotent kök hücre kaynaklı kardiyomiyositlerde 1 ile 100 μM arasındaki farklı BPA dozlarını 24 saat boyunca uygulamış ancak herhangi bir sitotoksik etki göstermediklerini rapor etmişlerdir. Ancak çeşitli BPA dozlarının alan potansiyelini azaltarak kalp fonksiyonunu değiştirdiklerini belirtmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda BPA'nın kalsiyum (Ca^{2+}) iyon kanallarını ve kasılmaları inhibe ettiğini böylelikle BPA'nın kardiyak fonksiyon bozukluğu ve aritmi gibi kardiyak risk faktörlerine yol açtığını göstermişlerdir (Hyun et al., 2021).

Benzer şekilde Posnack ve ark. (2014) dişi rat kalplerinde BPA'nın 01-100 µM konsantrasyonlarında elektrik iletim hızını yavaşlattığını belirterek önceden kalp rahatsızlığı olan ya da popölasyondaki yüksek riskli bireyler için risk oluşturabileceğini vurgulamışlardır (Posnack et al., 2014).

Valokola ve ark. (2019) bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda ki BPA dozlarını ratlara uygulayarak subkronik kardiyotoksisiteyi indüklediklerini rapor etmişlerdir. Ayrıca BPA konsantrasyonuna paralel olarak ratlarda kilo artışının da önemli düzeyde gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Elde ettikleri verilere göre BPA sitoplazmik vakuolasyon, fokal lenfatik inflamasyon, sistolik ve diyastolik kan basınçları ve nükleer dejeneratif değışiklikler histopatolojik hasarları indüklemiştir. Ayrıca malondialdehit (MDA) ve kreatin kinaz MB (CK-MB) düzeyi kontrol grubuna kıyasla arttığını glutatyon (GSH) içeriğini azalttığını belirtmişlerdir. Koruyucu olarak uyguladıkları kurkumin kapsüllemesi olarak bilinen nanomikel kurkuminin kardiyotoksisiteyi engelleyebileceğini göstermişlerdir. (Volakola et al., 2019).

Benzer bir durum Ezz ve ark. (2015) yaptığı çalışmada, farklı doz ve sürelerde BPA'ya maruz bıraktıkları ratların kalpteki antioksidan parametreleri (MDA, GSH, GST, KAT, NO) ve asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesinin önemli ölçüde değıştirdiğini ve BPA'ya maruz kalma süresine bağılı olarak ratlar da aşırı şekilde kilo artışının gözleendiğini rapor etmişlerdir. Sonuç olarak BPA, ROS oluşumu ve oksidatif stres durumunu şiddetlendirmiş ve kalbin antioksidan savunmalarının azalmasına neden olarak, ratların kalbi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğunu vurgulamışlardır. NO seviyeleri ve AChE aktivitesindeki eşzamanlı azalma ve vücut ağırlığındaki artış, BPA'dan kaynaklanan kardiyovasküler rahatsızlıklara neden olabileceğini belirtmişlerdir (Ezz et al., 2015).

Frigues ve ark. (2020) da kardiyovasküler fonksiyon üzerindeki çalışmalarında ratların aortundan izole edilen vasküler hücrelerinde BPA'nın süperoksit ve hidrojen peroksit seviyelerini arttırıp NO seviyesini azaltarak ROS/NO arasındaki dengenin bozulup hipertansiyon ve endotel disfonksiyonuna sebep olduğunu vurgulamıştır. Ancak uyguladıkları kefirin antioksidan etkileri sayesinde ROS/NO dengesini koruyarak BPA'nın etkilerini hafiflettiklerini bildirmişlerdir (Friques et al., 2020).

Apaydın ve ark. (2019) erkek ratlara 28 gün boyunca 130 mg/kg dozunda BPA uygulamıştır. BPA'nın kalp dokusu üzerindeki olumsuz etkilerini azaltılabileceğini düşündükleri önemli antioksidanlardan olan taurin ve kurkumin ile tedavi ettiklerini belirtmişlerdir. Deney sonucunda bazı antioksidan parametrelere (SOD, GSH, GPx, KAT) ve lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan MDA seviyelerine bakarak önemli veriler kaydettiklerini belirtmektedirler. Ayrıca histopatolojik sonuçlarda BPA ile tedavi edilen grupta konjesyon, infiltrasyon, vakuolizasyon, dejenerasyon ve bağ dokuda ödem tespit edilmiştir. Bu histopatolojik sonuçlarında destekleyecek şekilde MDA seviyesinde önemli derece artış gözlemlediklerini belirtmişlerdir. Ek olarak BPA uygulanan grupta diğer gruplara kıyasla antioksidan parametrelerden olan SOD, GSH, GPx ve KAT aktivitelerinde düşüş olduğu vurgulanmıştır (Apaydın et al., 2019).

Ojha ve ark. (2015) ise ratlarda izopreterenol (ISP) ile miyokardiyal hasarı indüklemiş ve bu hasarı farklı konsantrasyonlarda ki meyan kökü ekstraktı ile azaltılabileceğini belirtmişlerdir. Sundukları çalışmada ratlarda ISP ile miyokard da histopatolojik değişimlerle birlikte lipid peroksidasyonunun olduğunu ve antioksidan enzimlerin tükendiğini vurgulamışlardır. Ancak meyan kökü uygulanan gruplarda histopatolojik değişimlerin gözlemlenmediği ve diğer parametrelerinde korunduğunu söyleyerek, meyan kökünün oksidatif stresi azaltarak endojen antioksidan enzimleri arttırdığını ve yapısal bütünlüğün korunması ile kardiyoprotektif etkiler sergilediğini söylemişlerdir (Ojha et al., 2015).

Chu ve ark. (2021) benzer şekilde ratlarda ve farelerde ISP ile akut miyokard enfarktüsü (AME) indüklemişlerdir. Daha sonra oluşturdukları bu hasarı GA'yı kullanarak fare kalplerindeki patolojik değişiklikleri, oksidatif stresi, inflamatuvar yanıtı ve apoptotik ekspresyonları değerlendirmişlerdir. Yaptıkları değerlendirmelerde kalp hızı, kreatin kinaz, Laktat Dehidrojenaz (LDH), SOD, KAT, MDA ve GSH gibi önemli parametrelerle birlikte apoptoz yolağında önemli markırlarından olan Bax, Bcl-2 ve Kas-3 seviyelerindeki değişimlerle birlikte fosfoinositol-3-kinaz (PI3K), protein kinaz B (Akt) ifadeleri ve ayrıca PI3K ve Akt'nin (p-PI3K ve p-Akt) fosforilasyon seviyeleri de incelenmiştir. ISP kaynaklı AME, GA tedavisinden sonra farelerde, kalp hızında önemli değişimlerle birlikte, SOD, KAT, ve GSH gibi parametrelerde artış olduğu ve ROS ile birlikte MDA, kreatin kinaz ve LDH seviyelerinde önemli derecede azalma olduğu rapor

edilmiştir. Ayrıca GA, ISP kaynaklı morfolojik patolojiyi iyileştirmiş, inflamatuvar yol yanıtını ve kardiyomiyosit apoptozunu PI3K/Akt sinyal yolu ile inhibe ettiğini belirtmişlerdir (Chu et al., 2021).

Bir grup bilim insanı GA'nın miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarında oksidatif stresi azaltarak kardiyoprotektif etki sergilemesi, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde kullanılma potansiyelinin olduğunu rapor etmiştir (Ojha et al., 2013).

Son olarak meyan kökünün en önemli aktif bileşenlerinden olan GA'nın antitümör, antienflamatuvar, antioksidan, antiviral, antimikrobiyal, antiülser, antidiyabetik, hepatoprotektif, nöroprotektif ve kardiyoprotektif etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Kowalska and Kalinowska-Lis, 2019).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada Bingöl Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde (BÜDAM) yetiştirilmiş 250-300 g ağırlığındaki 40 adet Wistar Albino cinsi erkek rat kullanıldı. Deneyde kullanılacak olan ratlar uygulamaya başlamadan yaklaşık bir hafta önce tartılarak gruplar arasında istatistiksel fark olmayacak şekilde seçildi ve ortama adaptasyonları sağlandı. Hayvanlar deney sürecine kadar standart bakım odasında 24-25 °C’de, 12 saat ışıklı ortamda (07:00-19:00), 12 saat karanlık ortamda (19:00-07:00) bakım uygulanarak standart rat yemi ve su *ad libitum* olarak verildi. Bu çalışma, Bingöl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığının 13.01.2021 tarihli ve 1518 sayılı izni ile belgelendirildi.

3.2. Deneyde Kullanılan Cihazlar ve Ekipmanlar

Tablo 3.1’de belirtilmiş olan cihaz ve ekipmanların tümü deneysel süreçte kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar ve ekipmanlar

Ekipman ve Cihazlar	Marka	Menşei
Otoklav	Hirayama	JAPONYA
Buzdolabı	Arçelik	TÜRKİYE
Derin dondurucu (-80)	Nuaire	İNGİLTERE
Buz Makinası	Hoshizaki	EU
Mikropipetler	Eppendorf	ABD
Manyetik Karıştırıcı	İka	ALMANYA
Çalkalayıcı	Gerhardt	ALMANYA
Hassas Terazı	Denver instrument	ALMANYA

Tablo 3.1. (Devamı) Kullanılan cihazlar ve ekipmanlar

pH Metre	Thermo Scientific	ABD
UV-vis Spektrofotometre	Shimadzu	JAPONYA
Vortex	Genie II	ABD
Plate Okuyucu	Molecular Devices	ALMANYA
Western Blot Tank Sistemleri	Bio-Rad	ABD
Güç kaynağı	Bio-Rad	ABD
Trans-Blot Sistemi	Bio-Rad	ABD
X-Ray Film Sabitleme Sistemi	Carestream	ABD
Homojenizatör (Tissue Lyser II)	Qiagen	ALMANYA
Santrifüj	Hettich Universal 320R	ALMANYA
Sonikatör	Bandelin	ALMANYA
Saf Su Cihazı	Human Power I	KORE

3.3. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar ve Bazı Sarf Malzemeler

Tablo 3.2’de belirtilen kimyasal ve sarf malzemeler steril olarak çeşitli firma ve ülkelerden temin edilmiştir.

Tablo 3.2. Kullanılan kimyasallar ve bazı sarf malzemeler

Kimyasallar ve Sarf Malzeme	ŞİRKET	MENŞEİ
BPA	Sigma-Aldrich	ABD
18β -Glisiretinik Asit	Sigma-Aldrich	ABD
HCl (Hidroklorik asit)	Sigma-Aldrich	ABD
NaOH (Sodyum hidroksit)	Sigma-Aldrich	ABD
TBA (Tiyobarbütirik asit)	Acros Organics	ABD
TCA (Trikloroasetik asit)	Merck	Almanya
Dinitrobenzoik asit	Sigma-Aldrich	ABD
Hidroksimetil aminometan	Merck	Almanya
Metanol	Sigma-Aldrich	ABD

Tablo 3.2. (Devam) Kullanılan kimyasallar ve bazı sarf malzemeler

Etanol	Sigma-Aldrich	ABD
PBS (Fosfat tuzu tamponu)	Sigma-Aldrich	ABD
EDTA (Etilendiamintetraasetik asit)	Sigma-Aldrich	ABD
Akrilamid	Fisher	Belçika
Metilenbis Akrilamid	Acros Organics	ABD
Trizma Base	Sigma-Aldrich	ABD
Glisin	Fisher	Belçika
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Amonyum Sülfat)	Sigma-Aldrich	ABD
CuCl ₂ (Bakır klorür)	Sigma-Aldrich	ABD
Na ₂ HPO ₄ (Disodyum fosfat)	Sigma-Aldrich	ABD
H ₂ O ₂ (Hidrojen peroksit)	Sigma-Aldrich	ABD
CHPO (Kumen hidroperosit)	Sigma-Aldrich	ABD
Ksantin	Sigma-Aldrich	ABD
ECL protein görüntüleme	Abcam	İngiltere
Primer Antiadiler (β-aktin, Bax, Bcl-2, sitokrom-C, cas-3, p53)	Santa-Cruz	ABD
Sekonder Antiadı (HRP)	Abcam	İngiltere
Tween 20	Sigma-Aldrich	ABD
0,5 ml ependorf tüpleri	IsoLab	Almanya
1,5 ml ependorf tüpleri	IsoLab	Almanya
50 ml santrifüj tüpleri	LabSolute	Almanya
96 kuyucuklu Plate	LabSolute	Almanya

3.4. Deneylerde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

3.4.1. pH Ayarlama İçin Kullanılan Çözeltiler

pH ayarlamak için 1M NaOH ve 1M HCl çözeltileri aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

1. 1M 100 mL'lik NaOH için; yaklaşık 4 gr NaOH 100 mL saf su içerisine eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımı ile iyice çözünmesi sağlandı.
2. 1M 100 mL'lik HCl için; % 36'lık stok HCl'den 8,5 mL alındı ve üzeri 100 mL'ye (91,5 mL eklendi) tamamlandı. Homojen bir şekilde karışması sağlandı.

3.4.2. PBS ve TBS Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Deneyler esnasında kullanılmak üzere 1L PBS (pH:7.4) ve 10 kat konsantrasyonda (10X) 1L TBS (pH:7.4) stok çözeltileri hazırlanmıştır.

1. 1 litre PBS çözeltisi için; Ticari olarak satılan 5 adet tablet PBS 1 litre saf su içerisinde çözdürüldü ve pH: 7.4 olarak ayarlandı.
2. 1 litre 10X TBS çözeltisi için; 80 gr NaCl, 2 gr KCl ve 30 gr Trizma base ($C_4H_{11}NO_3$) tartıldı ve ilk olarak 800 mL saf su içerisinde çözdürüldü. Daha sonra pH ölçülerek pH: 7,4'e ayarlandı. Son olarak üzerine saf su ilave edilerek 1 litreye tamamladı. Bu stok çözelti deneylerde 1 kat konsantrasyona (1X) seyreltilerek kullanıldı.

3.4.3. TBA ve TCA Solüsyonlarının Hazırlanması

1. TBA (Tiyobarbitürik Asit) Solüsyonu: 0,67 gr TBA 80 ml %10'luk perklorik asit içerisinde çözdürüldü. Ardından son hacim 100 mL' ye (20mL) saf suyla tamamlandı.
2. %10'luk TCA (Trikloroasetik asit) Solüsyonu: 10 gr TCA 100 ml saf su içerisinde iyice çözdürüldü. Daha sonra kullanılmak üzere hazırlanan çözelti kahverengi cam şişelerde ışık almayacak şekilde +4 santigrad derecede muhafaza edildi.

3.4.4. Protein Yükleme (Sample Buffer) ve Yürütme (Running Buffer) Tamponlarının Hazırlanması

Western blot deneyler için 20 mL 5 kat konsantrasyonda (5X) yükleme tamponu ve 1 litre 10 kat konsantrasyonda (10X) yürütme tamponu (pH: 8,3) stok çözeltileri hazırlandı.

1. 20 mL 5X yükleme tamponu için; %10 SDS, %5 Gliserol, 0,5 M Tris-Cl (pH: 6,8), %0,05 Bromofenol Mavisi ve %25 2-merkaptoetanol kullanıldı ve üzeri saf su ile 20 mL'ye tamamlandı.
2. 1 Litre 10X yürütme tamponu için; 30 gr Trizma base ($C_4H_{11}NO_3$), 144 gr Glisin ve 10 gr SDS tartıldı ve ilk olarak 800 mL saf su ilave edilerek manyetik karıştırıcı yardımı ile çözdürüldü. Daha sonra pH ölçülerek pH: 8,3'e ayarlandı. Son olarak üzerine saf su ilave edilerek 1 litreye tamamladı. Bu stok çözelti deneylerde 1X konsantrasyona seyreltilerek kullanıldı.

3.4.5. BPA ve GA'nın Hazırlanması

Ratlara gavaj ile oral olarak uygulanan BPA ve GA her uygulamadan önce taze olarak hazırlanmıştır.

1. BPA'nın hazırlanışı; %99'luk saflık derecesine sahip olan BPA hayvan başına günlük 250 mg/kg/gün dozunda zeytinyağında hafif ısı uygulanarak çözdürülmüştür.
2. GA hazırlanışı: %97'lik saflığa sahip GA günlük 50 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün dozlarında zeytin yağında süspanse hale getirilerek oral yoldan uygulandı.

3.5. Yöntem

3.5.1. Deneysel Uygulamalar

40 adet Wistar albino cinsi erkek ratlar her grupta 8 adet olacak şekilde rastgele seçilerek 5 grup oluşturuldu.

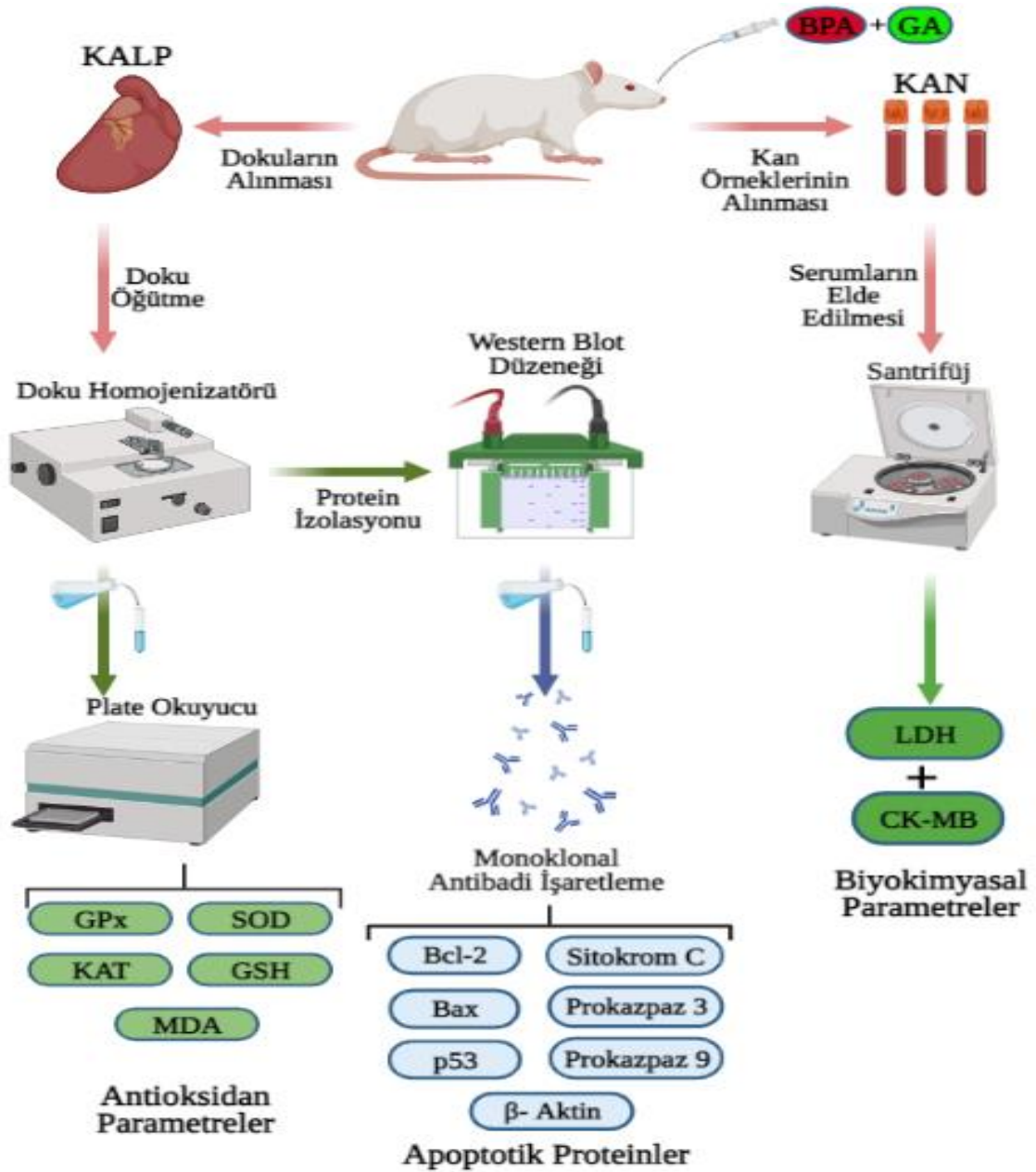
- 1. Grup (Kontrol grubu):** 14 gün boyunca 0,2 ml zeytinyağı gavaj ile oral yoldan uygulandı.
- 2. Grup (GA 100 grubu):** 14 gün boyunca gavaj ile oral yoldan 100 mg/kg GA uygulandı. (Rashid et. al., 2017).
- 3. Grup (BPA grubu):** 14 gün boyunca gavaj ile oral yoldan 250 mg/kg BPA uygulandı. (Shirani et al., 2019).
- 4. Grup (BPA + GA 50 grubu):** 14 gün boyunca gavaj ile oral yoldan 250 mg/kg BPA ve 50 mg/kg GA uygulandı.
- 5. Grup (BPA + GA 100 grubu):** 14 gün boyunca gavaj ile oral yoldan 250 mg/kg BPA ve 100 mg/kg GA uygulandı.

3.5.1.1. Deneysel Tasarım ve Numunelerin Alınması

Şekil 3.1’de gösterildiği gibi tasarlanan deney süreci son BPA ve GA (14. Gün) uygulamasından sonraki 24 saat sonunda (15. gün) doku ve kan örneklerinin alınması ile başlanmıştır.

Tüm ratlar hafif sevofloran anestezi uygulanarak ötenazileri gerçekleştirildi. Bu sırada doku ve kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri LDH ve CK-MB gibi parametrelerin analizi için antikoagülansız tüplere aktararak +4 °C’de 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri elde edildi. Serum örnekleri daha sonra yapılacak olan analizler için alınan diğer dokular ile birlikte -20 °C’de muhafaza edildi.

Deneylere başlamadan önce tüm kalp dokularının sıvı azot içerisinde TissueLyser II (Qiagen) cihazı kullanılarak 5 mikron çapa kadar öğütme işlemleri gerçekleştirildi. Daha sonra bazı antioksidan parametrelerin analizi için öğütülmüş dokudan gerektiği kadar tartılıp uygun tamponla seyrelme işlemi gerçekleştirilerek yine TissueLyser II (Qiagen) cihazı kullanılarak homojenizasyonları yapıldı.



Şekil 3.1. Deneysel tasarım

3.5.2. Biyokimyasal Parametrelerin Analizi

3.5.2.1. LDH ve CK-MB Parametrelerinin Ölçülmesi

Ratlardan alınan kanlar sarı kapaklı serum tüplerine aktarıldı ve 4000 rpm'de +4 °C 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Mindray Perfect Plus 400 cihazı vasıtasıyla serum LDH ve CK-MB aktiviteleri ölçüldü.

3.5.2.2. Kalp Dokularının Analiz İçin Hazırlanması (MDA, KAT, GSH, GPx, SOD ve Protein Miktar Analizi)

TissueLyser II cihazı ile öğütülmüş olan kalp dokuları GSH, GPx, MDA ve protein analizleri için %1,15' lik KCl çözeltisi ile sulandırılarak homojenize edildi.

Bu homojenatlardan;

- MDA ve protein miktar için 3500 rpm'de 15 dk.,
- GSH ve GPx için 11000 rpm'de 20 dk.

santrifüj edildi ve süpernatant kısımları analiz işlemlerinde kullanıldı.

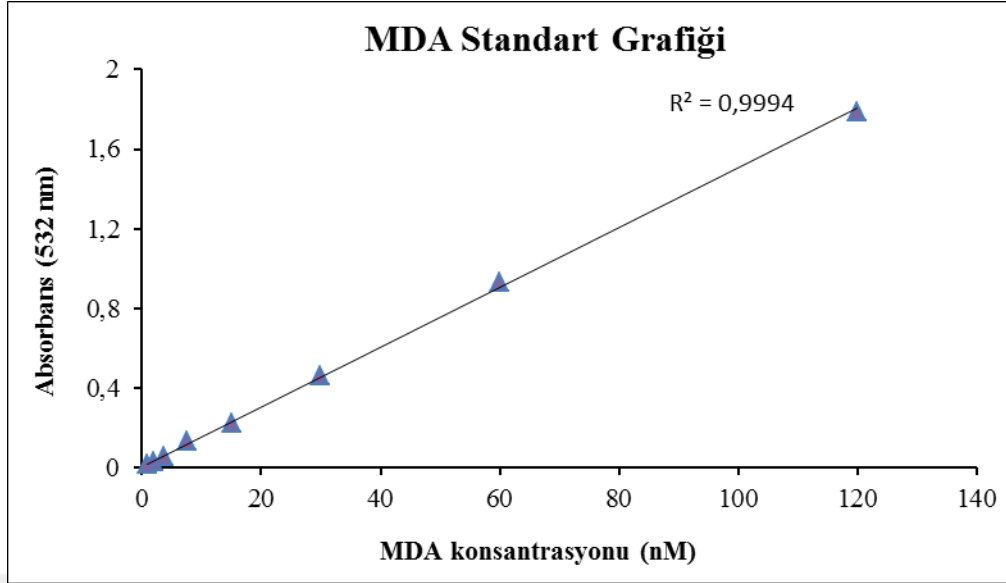
SOD aktivite analizi için kalp dokuları Tris-HCl Tamponu (pH 7,4) kullanılarak seyreltildi ve homojenize edildi.

- 7000 rpm'de 60 dk. santrifüj edildi ve süpernatant kısım analiz işlemlerinde kullanıldı.

KAT aktivite analizi için ise dokular Triton-x-100 kullanılarak homojenize edildi. 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant kısım analiz için pellet kısmından ayrıldı.

3.5.2.3. MDA Ölçümü

Homojenize edilmiş kalp dokuları Placer ve ark. (1966)'nın yapmış oldukları yöntemle göre MDA analizi gerçekleştirildi. Lipit peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan MDA, TBA ile muamele edildikten sonra pembe renkli bir karışım oluşturmaktadır. MDA seviyesi, TBA muamelesinden sonra bir plate okuyucuda (ELISA Reader) 532 nm dalga boyundaki absorbanları alınarak standart grafik (Şekil 3,2) üzerinden hesaplandı.



Şekil 3.2. MDA Standart grafiği (Standart grafik, 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) kullanılarak oluşturulmuştur. Sonuçlar nmol/g doku cinsinden verildi.)

3.5.2.4. KAT Ölçümü

Kalp dokularındaki KAT aktivitesi 50 mM'lık fosfat tamponu (pH:7) ve 30 mM'lık H₂O₂ çözeltileri kullanılarak Aebi'nin (1983) belirttiği gibi ölçüldü. KAT, dokuda ki H₂O₂ yıkımını katalize edebilen bir enzimdir. H₂O₂ ise 240 nm dalga boyundaki ışığı absorbe edebilmektedir. Kalp dokularındaki KAT enziminin H₂O₂ yıkım hızı, spektrofotometrik olarak ölçümü gerçekleştirildi.

KAT analizi kör ile örneklerin 240 nm'de kinetik ölçümü 0. (Absorbans 1) ve 30. (Absorbans 2) saniyelerdeki absorbans farkı kullanılarak gerçekleştirildi. Hesaplama aşağıdaki formül kullanıldı.

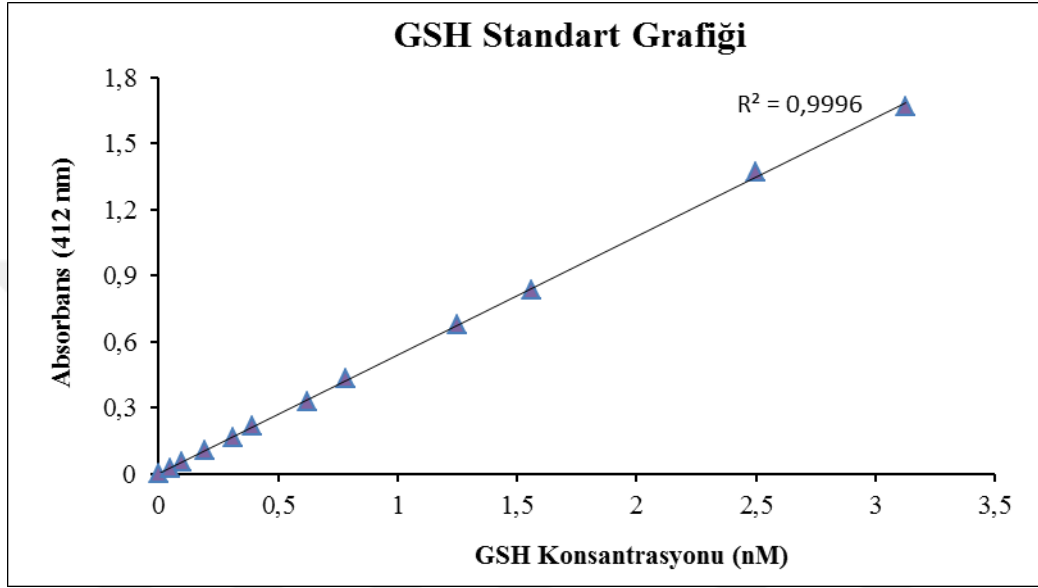
$$k = (2.3/30) \times (\log A_1/A_2) \times \text{Dilüsyon} \quad (3.1)$$

Kalp dokuları için aktivite: k/gr protein cinsinden yazıldı.

3.5.2.5. GSH Ölçümü

Kalp dokularındaki GSH düzeyi Tris (hidroksimetil) aminometan (pH: 8,9), %10'luk TCA ve DTNB [5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik) asit] solüsyonları kullanılarak Sedlak ve

Lindsay'ın (1968) belirttiği gibi yapıldı. Bu metoda göre, sülfidril grubuna sahip bileşikler DTNB tarafından indirgenerek karışımda sarı renk meydana getirmektedir. Daha sonra karışım 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbansları ölçülür. Kalp dokularının anlatıldığı gibi absorbansları ölçüldü ve oluşturulan standart grafik (Şekil 3.3) üzerinden GSH düzeyi hesaplandı.



Şekil 3.3. GSH standart grafiği

3.5.2.6. GPx Ölçümü

Kalp dokularının GPx analizi homojenizasyondan sonra Matkovichs ve ark.'nın (1988) belirttiği yöntem ile gerçekleştirildi.

GPx analizinde kullanılan çözeltiler;

- 50 mM'lık Tris-HCl tamponu (pH: 7,6)
- 0.4 M Tris Tamponu (pH: 8,9)
- %10'luk TCA
- %0,6'lık Red GSH çözeltisi
- CHPO (Cumen Hidrojen Peroksit) çözeltisi
- %0,4'lük DTNP çözeltisi

Matkovics ve ark.'nın (1988) belirttiği gibi tüm numuneler saf suya karşı 412 nm'de absorbansları ölçüldü.

GPx aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir.

$$\frac{[\text{Abs(kontrol)} - \text{Abs(örnek)}] \times 0.76989}{\text{g protein}} \quad (3.2)$$

3.5.2.7. SOD Ölçümü

Kalp dokularının SOD enzim analizi homejenizasyondan sonra Sun ve ark.'nın (1988) belirttiği yöntem ile gerçekleştirildi.

SOD enziminin aktivitesinin analizi, ksantin-ksantin oksidaz yoluyla üretilen süperoksit radikalının Nitroblue tetrazolyum (NBT)'a indirgemesiyle gerçekleşen renk oluşumu esasına dayanmaktadır. NBT'nin indirgenmesi ile elde edilen bu renkli çözeltide formazon oluşumuyla mavi renkli çözelti elde edilerek 560 nm'de maksimum absorbans verdiği gözlemlenir. Formazonun oluşumu ile SOD enzim konsantrasyonu ters orantılıdır.

SOD analizinde kullanılan çözeltiler;

- 0.6 mmol/L Na₂EDTA
- 400 mmol/L Na₂CO₃
- 0.3 mmol/L Ksantin
- 150 µmol/L NBT
- 1 g/L BSA (Bovine Serum Albumin)
- 2M (NH₄)SO₄ (Amonyum Sülfat)
- 0.8 mmol/L CuCl₂
- 167 U/L Ksantin oksidaz

Reaksiyon çözeltisi hazırlandıktan sonra tüm örnekler eklendi. Ardından oda sıcaklığında 20 dk. inkübe edildi. Son olarak tüm tüplere CuCl₂ çözeltisi eklendi ve 560 nm'de absorbansları ölçüldü.

SOD enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Sonuçlar U/g protein cinsinden hesaplanır.

$$\text{EU/g protein} = \frac{\Delta A_{\text{kör}} - \Delta A_{\text{numune}}}{\Delta A_{\text{kör}}} \quad (3.3)$$

3.5.2.8. Protein Miktar Ölçümü

Kalp dokularında protein miktarları Lowry ve ark. (1951)'nin metodu modifiye edilerek belirlendi.

Kullanılan çözeltiler;

- Protein Standartı olarak 50 µg/ ml BSA kullanıldı.
- Fenol Ayırıcı: 2 N Folin Ciocalteu-Fenol ayırıcından 7,5 mL alındı. Üzeri saf su (127,5 mL) ile 135 mL'ye tamamlandı. Fenol ayırıcı günlük taze olarak örnek miktarına göre hazırlanır.
- Alkali Bakır Ayırıcı: 0,1 gr Potasyum tartarat, 0,05 gr bakır sülfat, 10 gr Na₂CO₃ tartılır ve 0,5 N NaOH çözeltisi içinde çözdürüldü ve üzeri saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Alkali bakır ayırıcı aminoasitlerde bulunan peptit bağları ile kompleks oluşturabilmektedir. Oluşan bu kompleks üzerine fenol ayırıcı eklendiğinde mavi/mor bir renk oluşumu elde edilmektedir. Bu renk oluşumundan sonra 650 nm' dalga boyunda köre karşı örneklerin absorbansı ölçülmektedir. Protein miktar hesaplamasında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\mu\text{g protein / ml} = (\text{Örnek Abs. / Std. Abs.}) \times \text{Std. Konsantrasyonu} \quad (3.4)$$

3.5.3. Hedef Proteinlerin Analizi

3.5.3.1. Dokulardan Protein İzolasyonu

Önceden öğütülmüş olan doku örneklerinden 3'er mg tartıldıktan sonra her grup PBS ile bir kez yıkandı. PBS ortamdan santrifüj edilerek uzaklaştırıldı. Böylece dokular protein izolasyonu için hazır hale getirildi.

İzolasyon işlemi;

- Protein izolasyon kiti (Abcam, UK) kullanılarak buz içerisinde gerçekleştirildi. Kite belirtildiği miktar kadar PMSF (fenil metan sülfonil florit) ve PIC (proteaz inhibitör kokteyli) eklendi.
- İzolasyon kiti ile 1 saat boyunca buz içerisinde inkübe edilen dokular 14000 rpm'de 15 dk boyunca +4 °C'de sanrifüj edildi ve süpernatant kısım alındı.
- Süpernatant kısımdan Bradford yöntemi kullanılarak total protein miktarları hesaplandı.

Protein örnekleri daha sonra western blot tekniğinde kullanılmak üzere – 80 °C'de muhafaza edildi.

3.5.3.2. Western Blot Tekniği

- Dokulara ait protein örnekleri yükleme tamponu ile muamele edilerek denaturasyon işlemi gerçekleştirildi.
- Denatüre edilen proteinler yürütme tamponu varlığında SDS-PAGE (Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi) tekniği kullanılarak %12'lik konsantrasyona sahip jelde yürütüldü.
- Daha sonra jelde bulunan proteinler Trans-Blot Turbo (Bio Rad, ABD) cihazı kullanılarak PVDF (Polivinilidenflorit) membrana transfer edildi.
- Membranlar, oda sıcaklığında bir saat boyunca %5'lik BSA (sığır serum albümin) içerisinde inkübe edilerek blotlama işlemi gerçekleştirildi.
- Daha sonra membranlara BAX, Bcl-2, Cas-3, Cas-9, CYT-C, p53 ve β Aktin genleri için uygun primer antikorlar (Tablo 3.3) ile 3 saat boyunca muamele edildi. Ardından membranların,
- 2 X 5 dk TBS-T (Tris Tampon Tuzu-Tween20 %0,1) ile yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- Daha sonra primer antikorlara uygun sekonderler kullanılarak (Tablo 3.3) membranların oda sıcaklığında 2 saat inkübasyonu sağlandı.
- Membranlar son olarak 5 X 5 dk TBS-T ile yıkandı.
- Ardından membranlar ECL (Enhanced Chemiluminescence) ile karanlık ortamda 1 dk. inkübe edilerek membrandaki protein bantlarında ışıma oluşturuldu ve X-Ray filmlere medikal X-Ray görüntü sabitleme cihazı kullanılarak sabitlendi.

- X-Ray filmlerinde görünen bantlar Image Lab (Bio Rad, ABD) bilgisayar yazılımı kullanılarak proteinlerin sentezlenme miktarları hesaplandı.

Sentezlenme miktarları hesaplanırken hedef genler (BAX, Bcl-2, Cas-3, Cas-9, CYT-C ve p53) housekeeping gen (β Aktin) ile normalize edildi ve kontrole göre yüzde değişimleri göz önüne alınarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan Primer ve Sekonder antikorlar

Antikorların Adı	Antikorların Marka / Özellikleri
β-aktin	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:500, sc-47778; Mouse monoclonal
Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:500, sc-7382;Mouse monoclonal
BAX	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:500, sc-20067; Mouse monoclonal
p-53	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:500, sc-71820; Mouse monoclonal
Cas-3	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:500, sc-65496; Mouse monoclonal
Cas-9	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:500, sc-70505; Mouse monoclonal
Sitokrom-C	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:500, sc-13156; Mouse monoclonal
Sekonder	Santa Cruz Biotechnology,Inc. , Dilüsyon: 1:1000, sc-2005; Anti-Mouse HRP

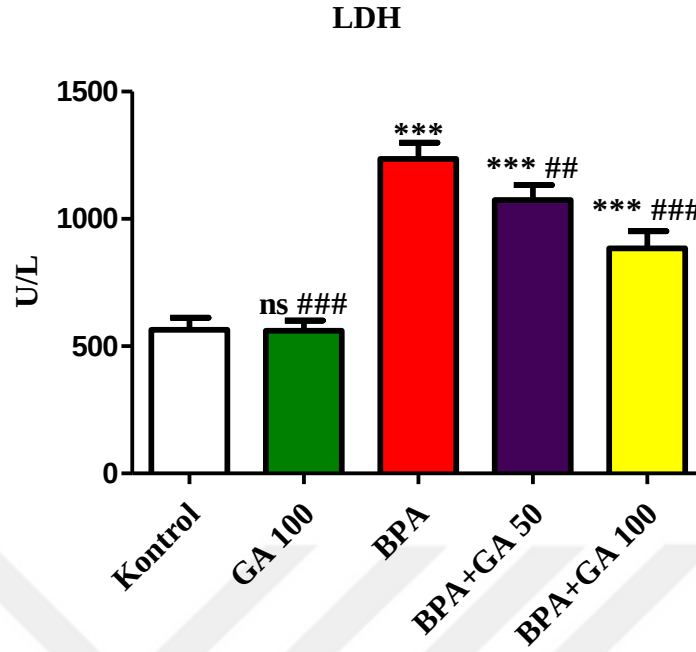
3.5.4. İstatiksel Analiz

Tüm sonuçlar en az üçer kere tekrarlandı. İstatistiksel analiz GraphPad Prism 5.01 yazılımı ile gerçekleştirildi. Tüm deneylerde karşılaştırılabilir veri gruplarının istatistiksel farkları ve önem seviyeleri “ANOVA (One-way Analysis of Variance)” Newman-Keuls Post-Hoc Testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ seviyesindeki veriler anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

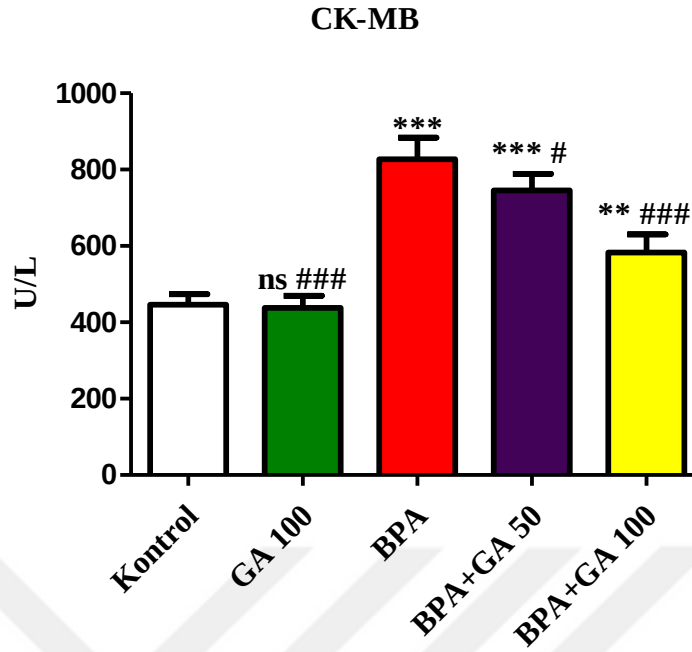
4.1. Kalp Dokusu Serum Biyokimyasal Parametreleri (LDH, CK-MB)

Biyolojik organizmalarda çeşitli doku hasarlarının meydana geldiği durumlarda serumda ki bazı enzim ve protein seviyelerinde değişiklikler gözlemlenmektedir. Bu enzimler dokudaki hasara özgü olarak artıp veya azalabilir. Kalp dokusu için önemli biyobelirteçlerden olan LDH ve CK-MB hücrelerin sitoplazmasında konumlanmıştır. Bu iki önemli enzim kasılma elemanlarının parçalanması durumunda ya da oksidatif stres nedeniyle gerçekleşen miyokart hasarı sırasında kana salınır. Her iki enzimin kanda yüksek seviyelerde ölçülmesi kardiyak disfonksiyonunun belirteci olarak kabul edilir (Kasap et al., 2007; Paul et al., 2012; Hazzaa et al., 2020; Khodayar et al., 2020; Vanani et al., 2020). Bu çalışmada kalp hasarı belirteçleri olarak serumdaki LDH ve CK-MB aktiviteleri incelenmiştir (Şekil 4.1 ve 4.2). Serum LDH aktiviteleri incelendiğinde, BPA uygulanan tüm gruplarda LDH aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede ($p<0,001$) artış olduğu saptanmıştır. Ancak tedavi edici olarak verilen GA'nın doza bağlı olarak bu etkiyi azalttığı ve GA uygulanan grupların BPA grubu ile karşılaştırıldığında LDH aktivitelerinde önemli derecede iyileşmeler gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. GA'nın BPA kaynaklı kalp hasarındaki koruyucu etkileri. Grafik serumdaki LDH aktivitelerini belirtmektedir. BPA grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlemlendi (** $p < 0,001$). BPA+GA 100 grubunda ise BPA grubuna karşı LDH seviyesinde anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir(### $p < 0,001$). Veriler ortalama $\pm$ SEM ile hesaplandı. *** $p < 0,001$ Kontrol vs. diğer gruplar, ## $p < 0,01$ BPA vs. diğer gruplar, ### $p < 0,001$ BPA vs. diğer gruplar

CK-MB aktiviteleri incelendiğinde ise BPA uygulanan tüm gruplarda CK-MB aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli derecede ($p < 0,01$ ve $p < 0,001$) artış olduğu saptanmıştır. Ancak tedavi edici olarak verilen GA'nın doza bağlı olarak bu etkiyi azalttığını ve GA'nın 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozlarının uygulandığı grupların BPA grubu ile karşılaştırıldığında CK-MB aktivitelerinde önemli derecede (sırasıyla $p < 0,05$ ve $p < 0,001$) iyileşmeler gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. GA'nın BPA kaynaklı kalp hasarındaki koruyucu etkileri. Grafik serumdaki CK-MB aktivitelerini belirtmektedir. BPA grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlemlendi (** $p < 0,001$). BPA+GA 100 grubunda ise BPA grubuna karşı CK-MB seviyesinde anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir (### $p < 0,001$). Veriler ortalama $\pm$ SEM ile hesaplandı. * $p < 0,01$ Kontrol vs. diğer gruplar, *** $p < 0,001$ Kontrol vs. diğer gruplar, # $p < 0,05$ BPA vs. diğer gruplar, ### $p < 0,001$ BPA vs. diğer gruplar

Literatürdeki benzer çalışmalara bakıldığında BPA'nın çeşitli rat çalışmalarında serumdaki LDH ve CK-MB seviyelerinde önemli derecede artışa neden olduğu rapor edilmiştir (Khodayar et al., 2020; Pant et al., 2020; Vanani et al., 2020). Bununla birlikte serumda gözlemlenebilen kalp hasarı biyobelirteçlerinden olan LDH ve CK-MB seviyelerini, çeşitli bitkisel kaynaklı antioksidanlar (naringin ve quersetin) vasıtasıyla önemli ölçüde azaltabildiklerini belirtmişlerdir (Khodayar et al., 2020; Vanani et al., 2020). Ayrıca bir grup araştırmacı H9c2 hücrelerini oksijen ve glikoz yoksunluğuna tabi tutarak oluşturdukları deneysel gruplarda LDH ve CK-MB seviyelerini incelediklerinde ortamda her iki enzimin artışını tetiklemiş ve tedavi edici olarak uyguladıkları farklı dozlardaki GA'nın doza bağlı olarak LDH ve CK-MB seviyelerini önemli düzeyde azaltabildiklerini ve GA'nın H9c2 hücrelerini koruyabildiğini rapor etmişlerdir (Wang et al., 2017a, 2017b).

Benzer şekilde Chu ve arkadaşları isoproterenol ile oluşturdukları akut miyokart enfarktüsünün fare ve rat modellerinde LDH ve CK-MB seviyelerini incelediklerinde fare modellerindeki LDH ve CK-MB seviyelerinin GA dozuna bağlı olarak önemli ölçüde

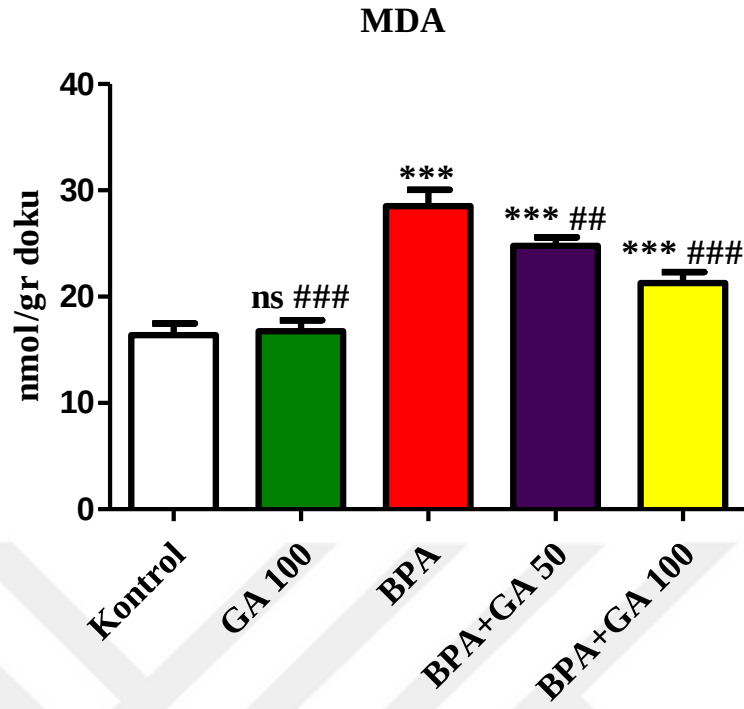
azaltabildiklerini ve GA'nın akut miyokart enfarktüsünde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Chu et al., 2021). Yapmış olduğumuz bu çalışmada elde edilen veriler literatür ile uyum göstermektedir.

4.2. BPA İle İndüklenmiş Lipit Peroksidasyonu Üzerine GA'nın Etkileri

Biyolojik materyallerde lipit peroksidasyonunu değerlendirmenin en kolay yollarından biri MDA seviyesinin belirlenmesidir (Toto et al., 2022). Doymamış yağ asitlerinin ROS ile peroksidasyonu sonucunda son ürün olarak ortaya çıkan MDA, lipit peroksidasyon düzeyini belirtirken aynı zamanda dolaylı olarak hücre veya doku hasarının düzeyini de belirtmektedir (Su et al., 2008; Grotto et al., 2009; Chen et al., 2011).

Çevresel kirleticilerin neden olduğu aşırı ROS üretimi organellerde ve makromoleküller de ciddi hasarlara neden olabilir (Oluranti et al., 2021). Yapılan çeşitli araştırmalarda çevresel bir kirleticisi olan BPA, kalp dokusunda aşırı ROS oluşumunu tetikleyerek lipit peroksidasyonu belirteçlerinden biri olan MDA'nın artışına neden olduğunu böylelikle çeşitli kardiyovasküler rahatsızlıkları tetikleyebileceği rapor edilmiştir (Grotto et al., 2009; Huang et al., 2012; Ezz et al., 2015; Eweda et al., 2020; Khodayar et al., 2020; Oluranti et al., 2021).

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen MDA sonuçlarına bakıldığında BPA'nın uygulandığı gruplarda MDA seviyesinin kontrol grubuna kıyasla önemli derecede arttığı görülürken ($^{***}p < 0,001$) BPA ile birlikte uygulanan GA 50 ve GA 100 gruplarında MDA seviyesinde BPA grubuna kıyasla önemli düzeyde düşüş gözlemlendi. Özellikle BPA+GA 100 grubundaki MDA seviyesindeki düşüş ($^{###}p < 0,001$) diğer tedavi grubu olan BPA+GA 50 grubuna ($^{##}p < 0,01$) göre daha fazla gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. GA'nın BPA kaynaklı lipid peroksidasyonundaki koruyucu etkileri. Grafik kalp dokusundaki MDA seviyelerini belirtmektedir. BPA grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış gözlemlendi (** $p < 0,001$). BPA+GA 100 grubunda ise BPA grubuna karşı MDA seviyesinde anlamlı bir düşüş gözlemlenmiştir (### $p < 0,001$). Veriler ortalama $\pm$ SEM ile hesaplandı. *** $p < 0,001$ Kontrol vs. diğer gruplar, ## $p < 0,01$ BPA vs. diğer gruplar, ### $p < 0,001$ BPA vs. diğer gruplar

Bu durumda elde edilen verilere bakılarak bunun GA'nın sahip olduğu antioksidan özelliğinden kaynaklandığı söylenebilir. Yapılan birçok araştırma deneysel olarak indüklenmiş bazı kardiyovasküler hastalıklarda GA'nın sahip olduğu antioksidan özellik sayesinde lipid peroksidasyonunu baskılayarak MDA oluşumunu azalttığını bildirmiştir (Zhang et al., 2019; Chu et al., 2021; Yang et al., 2021).

4.3. BPA ve GA'nın Antioksidan Parametreler (GSH, GPx, SOD ve KAT) Üzerine Etkileri

BPA endüstride çok yaygın kullanım alanına sahip fenolik bir bileşiktir. Ayrıca BPA östrojenik aktivite gösterdiğinden endokrin bozucu kimyasallar arasında yer almaktadır (Michalowicz, 2014; Bernardo et al., 2015). BPA, oksidatif stres mediatörlerin artması ve antioksidan enzimlerin azalması, mitokondriyal disfonksiyonun belirlenmesi, hücre sinyal yollarında değişiklik ve apoptozun indüklenmesi dâhil olmak üzere doğrudan yada

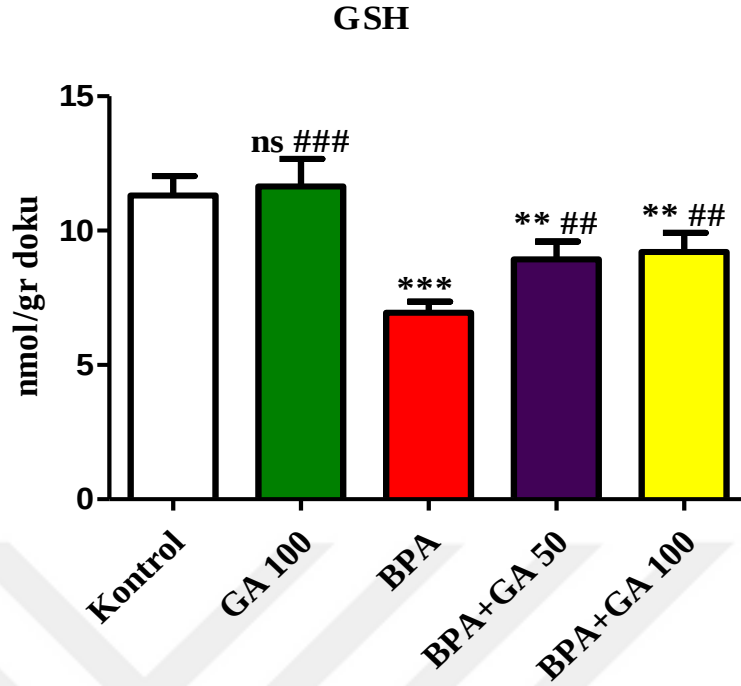
dolaylı olarak oksidan-antioksidan dengeyi bozarak serbest radikal oluşumunu tetikleyebilmektedir. (Jayakanthan et al., 2015; Wang et al., 2019; Tavakkoli et al., 2020).

Serbest radikaller olarak bilinen NO, OH[•] radikali, O₂⁻ anyonu ve lipid radikaller normal metabolik süreç içerisinde oluşan ROS ve RNS'lerden bazılarıdır. Bu radikal elemanlar sahip oldukları eşlenmemiş elektron çiftleri ile genellikle protein, karbonhidrat, nükleik asit ve lipitler gibi kararlı bileşiklere saldırarak onlara yüksek reaktivite kazandırıp radikal grupların artması ile oksidatif stresinde artmasına neden olurlar. (Yan et al., 2016; Wang et al., 2021). Biyolojik sistemlerde bu radikal grupların sebep olduğu oksidatif stresin azaltılmasında SOD, GSH, GPx ve KAT gibi bazı enzim ve enzim olmayan antioksidanlar görev almaktadır (Çağlayan, 2018).

SOD ve KAT enzimleri ROS'u temizlemek için birlikte çalışarak oksidatif strese karşı ilk savunma mekanizmasını oluşturur. SOD hücre içerisindeki süperoksit radikallerini hidrojen peroksit'e dönüşümünü sağlarken KAT enzimi ise bu hidrojen peroksitleri suya ve oksijene dönüştürerek hücre için zararsız hale dönüşümünü gerçekleştirmektedir (Boujbiha et al., 2009; Maonsur and Mossa, 2009; Çağlayan, 2018). GPx ise hücrelerin sitoplazmasında yer alır ve GSH varlığında hidrojen peroksit'in detoksifikasyonunu gerçekleştirir (Towsend et al., 2003; Margis et al., 2008; Bursal et al., 2013; Çağlayan, 2018; Kuzu et al., 2019).

BPA'nın yapılan birçok çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak çeşitli organizmalarda SOD, GSH, GPx ve KAT gibi antioksidan parametreleri baskıladığını ve böylelikle oksidatif strese neden olarak biyolojik organizmalarda homeostazı bozduğu bildirilmiştir (Zhang et al., 2016; Ahammed et al., 2020; Olujimi et al., 2020; Akram et al., 2021).

BPA'nın farklı rat dokularında SOD, KAT ve GPx enzim aktivitelerini önemli düzeyde azaltarak oksidatif stresi arttırdığını böylelikle lipit peroksidasyonunu tetikleyebileceğinin ve karaciğer, böbrek, beyin ve kalp gibi dokularda toksikasyona sebep olup çeşitli rahatsızlıkları meydana getirebileceği belirtmiştir (Kovacıç, 2010; Mourad and Khadrawy, 2012; Hassan et al., 2012; Ezz et al., 2015; Acaroz et al., 2019; Sahoo et al., 2020).



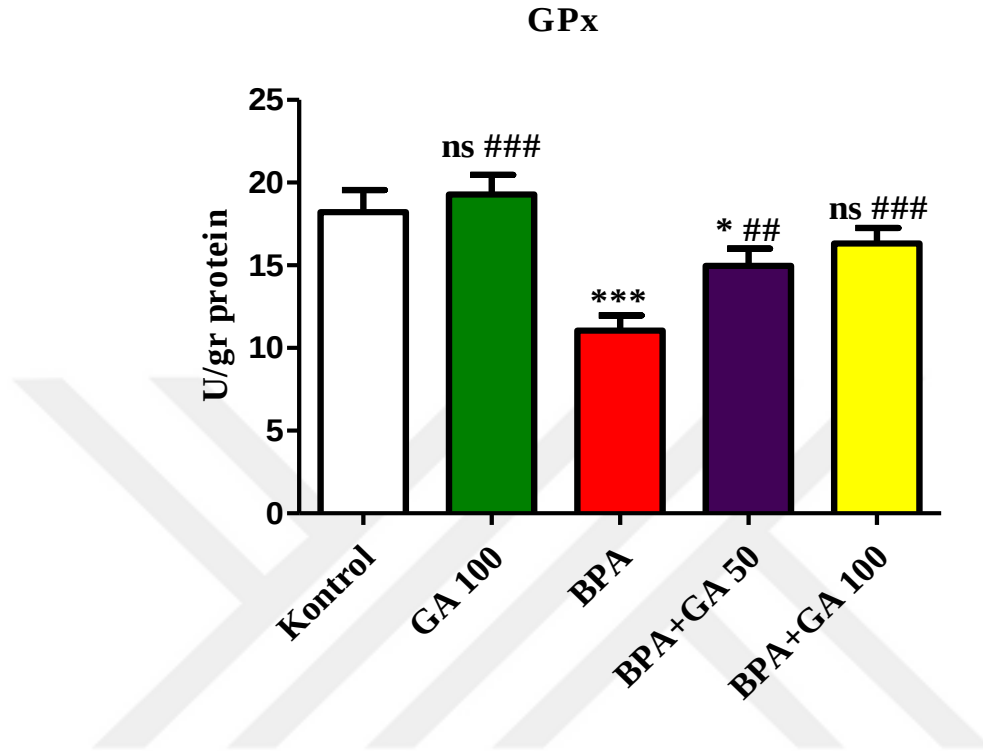
Şekil 4.4. GA'nın GSH üzerine etkileri. Grafik kalp dokusundaki GSH seviyelerini belirtmektedir. BPA grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlendi ($***p < 0,001$). BPA+GA 50 ve BPA+GA 100 grubunda ise BPA grubuna karşı GSH seviyesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($**p < 0,01$ ve $##p < 0,01$). Veriler ortalama $\pm$ SEM ile hesaplandı. $**p < 0,01$ Kontrol vs. diğer gruplar, $***p < 0,001$ Kontrol vs. diğer gruplar, $##p < 0,01$ BPA vs. diğer gruplar, $###p < 0,001$ BPA vs. diğer gruplar

Yapılan bu çalışmada kalp dokusu GSH ve GPx düzeyine bakıldığında, sadece BPA uygulanan grupta kontrol grubuna göre GSH ve GPx seviyelerinde önemli bir azalma gözlemlenmektedir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5).

Ola-Davies ve arkadaşının (2018) yaptığı çalışmada BPA ile kalp ve renal toksisiteyi tetikleyerek antioksidan parametrelerden olan GSH ve GPx aktivitesini incelemiştir. Yayınladıkları raporda BPA'nın mevcut antioksidanları tüketerek oksidatif stresi tetiklediğini böylelikle kalpte toksik etki sergilediğini belirtmişlerdir (Ola-Davies and Olukole, 2018). Ayrıca Thabet ve arkadaşları (2020) da benzer bir çalışma gerçekleştirmiş ve benzer sonuç aldıklarını bildirmişlerdir (Thabet et al., 2020).

Ojha ve ark. (2015) ratlarda izoproterenol (ISP) ile indükledikleri kalp hasarını meyan kökü ekstresi kullanarak tedavi ettiklerini ve meyan kökünün endojen antioksidanların tükenmesini engellediğini belirtmişlerdir (Ojha et al., 2015). Ayrıca meyan kökü bileşenlerinden olan GA'nın antioksidan özellik göstererek kardiyoprotektif etkiye sahip

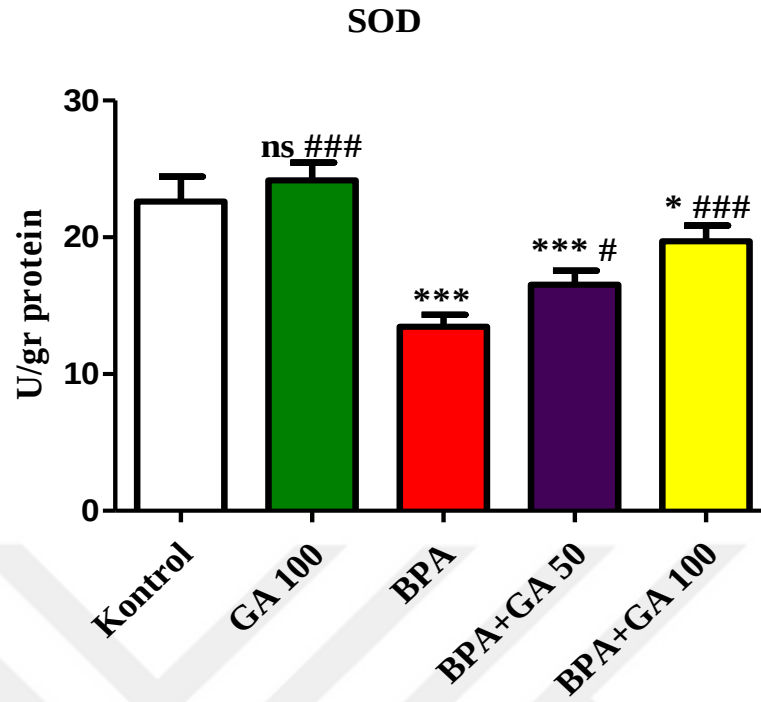
olduğu bilinmektedir (Haleagrahara et al., 2011). Bunlara ek olarak birçok araştırmada GA'nın oksidatif stres durumunu iyileştirebildiği belirtilmektedir (Zhang et al., 2019; Chu et al., 2021; Yang et al., 2021).



Şekil 4.5. GA'nın GPx enzim aktivitesi üzerine etkileri. Grafik kalp dokusundaki GPx enzim aktivitesini belirtmektedir. BPA grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlendi (**p < 0,001). BPA+GA 50 ve BPA+GA 100 grubunda ise BPA grubuna karşı GPx enzim aktivitesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (##p < 0,01 ve ###p < 0,001). Veriler ortalama $\pm$ SEM ile hesaplandı. *p < 0,05 Kontrol vs. diğer gruplar, **p < 0,001 Kontrol vs. diğer gruplar, ##p < 0,01 BPA vs. diğer gruplar, ###p < 0,001 BPA vs. diğer gruplar

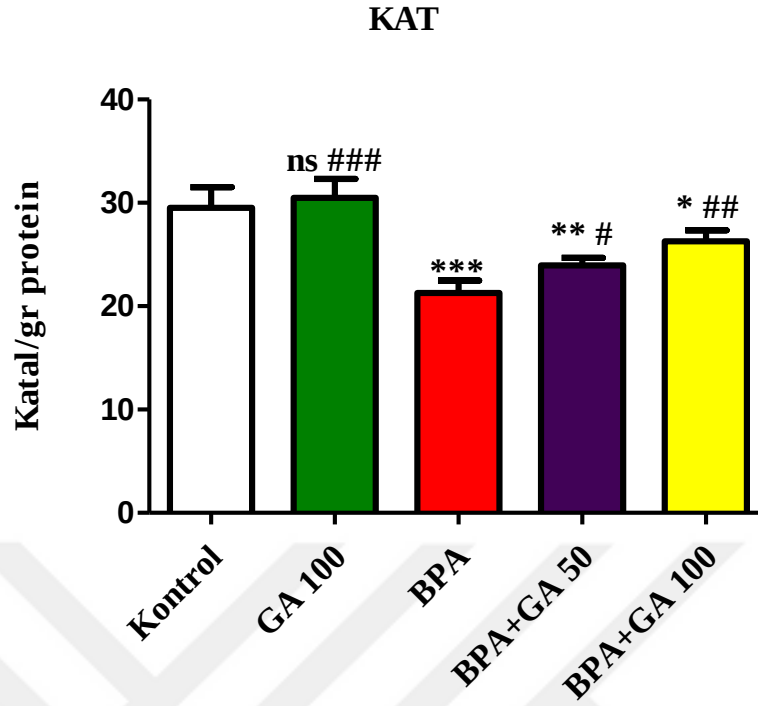
Yapılan bu çalışma verileri ele alındığında tedavi edici olarak verilen GA'nın GSH ve GPx düzeylerinin korunmasında yardımcı olduğu böylelikle antioksidan özellik göstererek kardiyoprotektif etki sergilediği kanısına varılmıştır. Tedavi edici olarak verilen iki farklı GA dozundan 100 mg/kg GA dozunun daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Ayrıca önemli diğer endojen antioksidanlardan olan SOD ve KAT enzim aktiviteleri de mevcut çalışmamızda incelenmiş GA'nın SOD ve KAT aktiviteleri üzerinde de etkili olduğu bulunmuştur (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).



Şekil 4.6. GA'nın SOD enzim aktivitesi üzerine etkileri. Grafik kalp dokusundaki SOD enzim aktivitesini belirtmektedir. BPA grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlendi (** $p < 0,001$). BPA+GA 50 ve BPA+GA 100 grubunda ise BPA grubuna karşı SOD enzim aktivitesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($\#p < 0,05$ ve $###p < 0,001$). Veriler ortalama $\pm$ SEM ile hesaplandı. * $p < 0,05$ Kontrol vs. diğer gruplar, *** $p < 0,001$ Kontrol vs. diğer gruplar, $\#p < 0,05$ BPA vs. diğer gruplar, $###p < 0,001$ BPA vs. diğer gruplar

Wu ve arkadaşları (2015) GA'nın ratlarda reperfüzyon sırasında ölümcül ventriküler aritmiye hem yatkınlığı hem de insidansını azalttığını göstererek GA'nın antiaritmik ajan olarak kullanılabileceğini böylelikle iskemi/reperfüzyon ortamında umut vaat ederek kardiyoprotektif etkiler sergilediğini bildirmiştir (Wu et al., 2015). Chu ve ark. (2021) ise GA'nın farelerde miyokart enfarktüsüne karşı etkili olduğunu buldu. Yapmış oldukları çalışmada GA'nın fare miyokartlarında önemli antioksidan enzimlerden olan SOD ve KAT enzimlerinin aktivitelerindeki artışı desteklediğini belirtmişlerdir. Böylelikle oksidatif stresi azaltarak miyokart enfarktüsüne karşı bir tutum sergilediğini belirtilmiştir (Chu et al., 2021).



Şekil 4.7. GA'nın KAT enzim aktivitesi üzerine etkileri. Grafik kalp dokusundaki KAT enzim aktivitesini belirtmektedir. BPA grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlemlendi (** $p < 0,001$). BPA+GA 50 ve BPA+GA 100 grubunda ise BPA grubuna karşı KAT enzim aktivitesinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir ($^{\#}p < 0,05$ ve $^{\#\#}p < 0,01$). Veriler ortalama $\pm$ SEM ile hesaplandı. * $p < 0,05$ Kontrol vs. diğer gruplar, ** $p < 0,01$ Kontrol vs. diğer gruplar, *** $p < 0,001$ Kontrol vs. diğer gruplar, $^{\#}p < 0,05$ BPA vs. diğer gruplar, $^{\#\#}p < 0,01$ BPA vs. diğer gruplar, $^{\#\#\#}p < 0,001$ BPA vs. diğer gruplar

Sunulan mevcut çalışmada BPA'nın SOD ve KAT enzim aktivitelerini kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalttığı belirlendi. Tedavi edici olarak verilen GA'nın ise SOD ve KAT aktivitelerinin korunmasında yardımcı olduğu görüldü. Özellikle GA 100 gruplarında enzim aktiviteleri diğer gruplara göre belirgin bir şekilde artış gösterdi. Böylelikle GA 100 dozunun BPA kaynaklı oluşan oksidatif stresi baskılabildiği düşünülmektedir (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Elde edilen sonuçlar yukarıda belirtildiği gibi literatür ile uyum göstermektedir.

4.4. BPA ve GA'nın Bazı Apoptozla İlişkili Proteinlerin Ekspresiyon Seviyeleri Üzerine Etkileri

Doğal fizyolojik bir süreç olan apoptoz, vücudumuzda, gereksinim duyulmayan ya da onarılamayacak şekilde hasar almış hücreleri ortadan kaldırarak homeostazın korunmasında görev alan programlı bir hücre ölüm mekanizmasıdır (Ashkenazi, 2008).

Apoptoz temel biyolojik süreçlerden olan büyüme, çoğalma, farklılaşma, ölüm, iltihaplanma ve bağışıklık gibi sistemlerin merkezinde yer alır. Bu nedenle, apoptoz yaşamın devamlılığı için önemli bir süreçtir. Ancak apoptozun çok az veya çok fazla gerçekleşmesi hücre ölümüyle sonuçlanan düzensizliği meydana getirerek çeşitli hastalıklara aracılık edebilmektedir (D'Arcy, 2019; Jan, 2019; Darendelioğlu, 2020). Örneğin, aşırı apoptoz gerçekleşmesi inme ve miyokard enfarktüsün patogeneğinde ve kalp yetmezliğinde bir bileşen olabilirken, yetersiz apoptoz ise karsinogeneze katkıda bulunabilir (Crow et al., 2004).

Apoptoz, kemoterapötik ajanlar, UV, radyasyon, çevresel kirlleticiler ve oksidatif stres gibi birçok etken tarafından tetiklenebilir (Darendelioğlu, 2018; Xu et al., 2019). Apoptozun gerçekleşmesinde iç yolak ve dış yolak olmak üzere iki farklı yol vardır. Ancak her iki yol da, apoptozun proteolitik olayları gerçekleştiren enzimatik kaspazları kullanır (Ashkenazi, 2008; Coşkun ve Özgür, 2011; Darendelioğlu, 2017; Xu et al., 2019). Sunulan bu çalışmada apoptozun iç yolağı üzerinde yoğunlaşıldı. İç yolak ya da diğer adıyla mitokondriyal yolak genel olarak Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilmektedir. Bu protein ailesi kendi içinde proapoptotikler (Bax ve Bak vb.) ve antiapoptotikler (Bcl-2 ve Bcl-XL vb.) olarak iki farklı grup barındırır (Ahagh et al., 2019; Singh et al., 2019). Bu proapoptotik ve antiapoptotik gruplar kendi aralarında bir denge içerisinde bulunurlar. Bu dengede ki değişim hücrenin yaşamının devam etmesine veya ölmesine (apoptozu gitmesi) sebep olmaktadır (Ahagh et al., 2019; Singh et al., 2019). Dengenin antiapoptotiklere kayması durumunda hücre yaşamaya devam ederken, proapoptotiklere doğru kayması durumunda ise hücrenin ölümü yani apoptozu gerçekleşir (Akifusa et al., 2009; Singh et al., 2019). Nitekim bu durum göz önünde bulundurulduğunda apoptoz sürecinde en önemli markırlar olarak bilinen antiapoptotik Bcl-2 ve proapoptotik Bax proteinlerinin birlikte değerlendirilmesinin gerektiğinin daha doğru olacağı belirtilmiştir (Akifusa et al., 2009; Ola et al., 2011; Darendelioğlu, 2017; Sarvestani et al., 2018; Ahagh et al., 2019; Singh et al., 2019).

BPA makrofajlarda ve vasküler sistemde Bax ekspresyonunu ve Bax/Bcl-2 oranını artırır (Mohsenzadeh et al., 2020; Wu et al., 2022). Aynı zamanda iç yolakta görev alan Kaspaz 9'u aktive ettiğini ve daha sonra kaspaz 3 ve 7 gibi önemli apoptotik proteinlerin aktivasyonu ile apoptozu tetiklemektedir. Ayrıca BPA'nın kaspaz 8 aktivitesi üzerinde

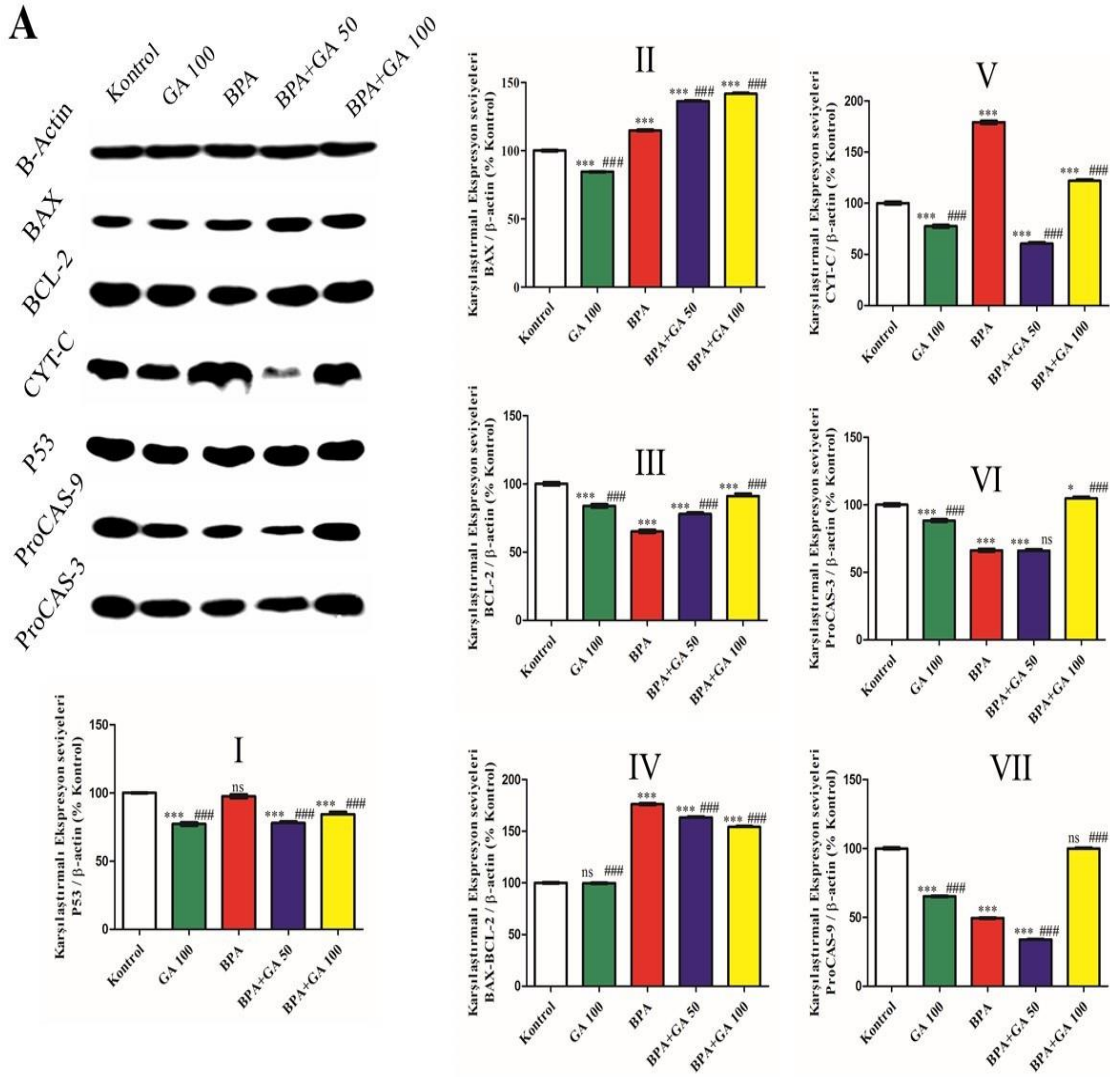
önemli bir etkisi olmadığından apoptozun özellikle iç yolak üzerinden devam ettiği belirtilmiştir (Wu et al., 2022).

BPA'nın farklı doku ve hücre hatlarında Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde değişikliklere sebep olarak apoptozu tetikleyebildiğini belirtilmektedir (Hwang et al., 2013; Zhu et al., 2019; Wang et al., 2020).

Sunulan çalışmada elde ettiğimiz verilere bakıldığında Bax/Bcl-2 oranı, BPA uygulanan grubun kontrol grubuna göre kıyasla (Şekil 4.8 A IV) anlamlı şekilde arttığı görülmektedir. Buna karşın tedavi edici olarak uygulanan 2 farklı GA dozunun ise BPA grubuna kıyasla Bax/Bcl-2 oranını anlamlı şekilde düşürdüğü görülmüştür. Ayrıca GA 100 dozunun düşük doza göre daha etkili olduğu bulundu.

Bax ve Bcl-2 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde değişiklikler mitokondri membran potansiyelinde değişikliklere sebep olarak CYT-C'nin sitoplazmaya salınmasına sebep olmaktadır (Akşit ve Bildik, 2008). CYT-C sitoplazmada APAF-1 ile kompleks oluşturarak apoptozom yapısını kazanıp prokaspaz 9'un aktifleşmesini sağlar. Ardından aktif kaspaz 9 ise prokaspaz 3'leri aktifleştirerek apoptozu tetikleyip bir kaspaz kaskadını başlatır ve böylelikle iç yolak üzerinden hücrenin ölümü gerçekleşmiş olur (Coşkun ve Özgür, 2011; Darendelioğlu, 2017; Ashkenazi et al., 2017).

BPA'nın akvaryum balığı ve rat kalplerinde önemli proapoptotiklerden olan Bax ve CYT-C seviyelerinde önemli ölçüde artışa neden olarak apoptozu tetiklediği belirtilmiştir (Ishtiaq et al., 2020; Filice et al., 2021). Daha önceki çalışmalar da BPA'nın kardiyovasküler sistemde apoptozu tetiklediğini ve böylelikle kardiyotoksik etkiler sergilediğini bildirmektedir (Gu et al., 2020; Ishtiaq et al., 2020; Thabet et al., 2020; Chu et al., 2021).



Şekil 4.8. BPA ve GA'nın apoptoz ile ilişkili bazı protein ekspresyon seviyeleri üzerine etkileri. Grafik kalp dokusundaki bazı antiapoptotik ve proapoptotik protein ekspresyon seviyelerini belirtmektedir. (A) Bax (23 kDa), Bcl-2 (26 kDa), sitokrom-c (15 kDa), p53 (53 kDa) prokaspaz-3 (32 kDa) ve prokaspaz-9 (46 kDa) protein ekspresyon seviyelerinin Western blot analiz sonuçları. Yükleme kontrolü olarak β -Aktin (43 kDa) protein ekspresyon seviyesi bakıldı. Protein gruplarının karşılaştırmalı ekspresyon seviyeleri. (A I) P53, (A II) BAX, (A III) BCL-2, (A IV) BAX-BCL-2 oranı, (A V) CYT-C, (A VI) ProCASP-3 ve (A VII) ProCASP-9 protein ekspresyon oranları Graphpad programı kullanılarak belirlenmiştir. Veriler ortalama $\pm$ SEM (n:3) ile hesaplandı. * $p < 0,05$ Kontrol vs. diğer gruplar, *** $p < 0,001$ Kontrol vs. diğer gruplar, ### $p < 0,001$ BPA vs. diğer gruplar

BPA'nın kaspaz 3 ve 9 aktivasyonu üzerine önemli etkileri vardır (Liu et al., 2020; Chiang et al., 2022). Ayrıca BPA'nın kaspaz 3, 8, 9 ve 10 gen ekspresyon seviyelerini artırarak apoptozun iç yolağı üzerinde daha etkili olduğu belirtilmiştir (Wang et al., 2019).

Yapmış olduğumuz çalışmada sadece BPA uygulanan grupta CYT-C seviyesinde önemli derecede artış olduğu gözlemlenirken proCAS-3 ve proCAS-9 seviyelerinde önemli derecede azalma olduğu görüldü ($p<0,001$). Ayrıca tedavi edici olarak uygulanan GA gruplarına bakıldığında özellikle GA 100 dozunun bu apoptotik parametreleri önemli derecede iyileştirdiği saptandı ($p<0,001$).

Ek olarak apoptozda önemli proteinlerden olan p53 protein ekspresiyon seviyesi incelenmiştir. BPA'nın p53 seviyesi üzerine farklı etkiler sergilediğini belirten çalışmalar rapor edilmiştir (Dairkee et al., 2013; Elshafiey et al., 2020; Kose et al., 2020; Ishtiaq et al., 2020). Elde ettiğimiz verilerde BPA'nın p53 üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı belirlendi. Bu veriler Kose ve arkadaşlarının verileri ile uyum göstermektedir (Kose et al., 2020).

Birçok araştırmacı ise yapmış olduğu çeşitli hücre grupları ve çeşitli dokular üzerinde GA'nın farklı dozlarının bazı proapoptotik proteinleri baskılayabilirken bazı antiapoptotik proteinlerin ise desteklenebileceğini göstermişlerdir. (Wang et al., 2016; Yang et al., 2017; Yu and He 2017; Zhang et al., 2021).

GA, Bcl-2 aktivitesini desteklerken aynı zamanda Bax ve kaspaz 3 gibi proapoptotik proteinlerin aktivitelerini ise baskıladığı belirtilmiştir (Zhang et al., 2019; Zhang et al., 2021). Ayrıca GA'nın kaspaz 9 ve CYT-C ekspresiyon düzeylerini de azaltarak apoptozu engelleyebildiği rapor edilmiştir (Yang et al., 2012; Yan et al., 2021).

Yapılan çalışmada elde edilen bulgular GA'nın Bax/Bcl-2 oranını ve CYT-C ekspresiyon düzeyini önemli ölçüde baskıladığı prokaspaz 3 ve 9 düzeylerini ise önemli ölçüde koruduğu, ayrıca p53 ekspresiyon düzeyinin azaltılmasında etkili olduğunu göstermektedir. Elde edilen veriler yukarıda da bahsedilen literatür ile uyum sağlamaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ratlarda BPA kaynaklı kardiyotoksisite üzerine GA'nın antioksidan ve anti apoptotik işlevleri ortaya konmuştur. Yapmış olduğumuz çalışmada, ratlarda BPA ile indüklenmiş kardiyotoksisite modeli oluşturularak BPA'nın sebep olduğu yüksek serum LDH ve CK-MB seviyeleri tespit edilmiştir. Ayrıca BPA, antioksidan savunmasında önemli görevlere sahip olan antioksidanlardan GSH, GPx, SOD ve KAT gibi parametreleri baskılayabildiği böylelikle oksidatif stresin artmasına aracılık ettiğini ve bunun sonucunda lipid peroksidasyonuna neden olarak kalp dokusunda çeşitli işlev bozuklarının gelişmesini desteklemiştir. Bununla birlikte BPA'nın önemli proapoptotik proteinler üzerine etkileri de araştırılmıştır. Elde edilen verilerde BPA'nın apoptotik iç yolak üzerinde önemli etkiler sergilediği ve apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir.

Tedavi edici olarak uygulanan GA'nın ise BPA'nın sebep olduğu yüksek LDH ve CK-MB seviyelerini önemli düzeyde iyileştirdiği ve antioksidan savunmada görevli olan GSH, GPx, SOD ve KAT enzim aktivitelerini artırarak oksidatif stresin azaltılması yoluyla lipid peroksidasyonunu önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca GA'nın BPA kaynaklı kardiyotoksisitede önemli antiapoptotik özellikler sergilediği bulunmuştur.

Elde edilen verilere dayanarak GA'nın BPA kaynaklı kardiyotoksisite üzerinde antioksidan ve antiapoptotik etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte GA'nın BPA kaynaklı kardiyotoksik etkilerinin azaltılması için destekleyici bir tedavi unsuru olarak kullanılabilmek potansiyeline sahip olduğu ortaya çıkarılmıştır. Ancak GA üzerine yeterli literatür verisi olmadığından daha ileri çalışmalar gerekmektedir. Örneğin GA'nın apoptozun dış yolağında ve diğer programlı hücre ölüm mekanizmaları (Otofaji vb.) üzerinde ki etkileri de incelenip bunlar arasındaki ilişki ortaya çıkarılmalıdır. Ayrıca benzer çalışmaların farklı model organizmalarda ve farklı dokularda yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Abotaleb, M., Samuel, S. M., Varghese, E., Varghese, S., Kubatka, P., Liskova, A., Büsselberg, D. (2018). Flavonoids in cancer and apoptosis. *Cancers*, 11(1), 28.

Acaroz, U., Ince, S., Arslan-Acaroz, D., Gurler, Z., Demirel, H. H., Kucukkurt, I., ... and Zhu, K. (2019). Bisphenol-A induced oxidative stress, inflammatory gene expression, and metabolic and histopathological changes in male Wistar albino rats: protective role of boron. *Toxicology research*, 8(2), 262-269.

Aebi, H. (1983). Catalase. *Methods of enzymatic analysis*, 3: 273

Ahagh, M. H., Dehghan, G., Mehdipour, M., Teimuri-Mofrad, R., Payami, E., Sheibani, N., ... and Asadi, M. (2019). Synthesis, characterization, anti-proliferative properties and DNA binding of benzochromene derivatives: increased Bax/Bcl-2 ratio and caspase-dependent apoptosis in colorectal cancer cell line. *Bioorganic chemistry*, 93, 103329.

Ahammed, G. J., Wang, Y., Mao, Q., Wu, M., Yan, Y., Ren, J., ... and Chen, S. (2020). Dopamine alleviates bisphenol A-induced phytotoxicity by enhancing antioxidant and detoxification potential in cucumber. *Environmental Pollution*, 259, 113957.

Akifusa, S., Kamio, N., Shimazaki, Y., Yamaguchi, N., Nishihara, T., Yamashita, Y. (2009). Globular adiponectin-induced RAW 264 apoptosis is regulated by a reactive oxygen species-dependent pathway involving Bcl-2. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(9), 1308-1316.

Akram, R., Iqbal, R., Hussain, R., Jabeen, F., Ali, M. (2021). Evaluation of oxidative stress, antioxidant enzymes and genotoxic potential of bisphenol A in fresh water bighead carp (*Aristichthys nobilis*) fish at low concentrations. *Environmental pollution*, 268, 115896.

Akşit, H., Bildik, A., (2008). Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1): 55-63.

Al-Olayan, E. M., El-Khadragy, M. F., Abdel Moneim, A. E. (2015). The protective properties of melatonin against aluminium-induced neuronal injury. *International journal of experimental pathology*, 96(3), 196-202.

Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., Nadal, A. (2010). Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environmental health perspectives*, 118(9), 1243-1250.

Amini, A. M. (2017). Bisfenol-A'nın Kontaminasyonu ve Risk Etmenleri. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilimdalı, Sakarya Üniversitesi, Sakarya, 39-40.

Andra, S. S., Charisiadis, P., Arora, M., van Vliet-Ostaptchouk, J. V., Makris, K. C. (2015). Biomonitoring of human exposures to chlorinated derivatives and structural analogs of bisphenol A. *Environment international*, 85, 352-379.

Anitha, T. A., Rajadurai, M. (2014). Antioxidative potential of chrysin, a flavone in streptozotocin–nicotinamide-induced diabetic rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(4), 511-517.

Antonsson, B., Martinou, J. C. (2000). The Bcl-2 protein family. *Experimental cell research*, 256(1), 50-57.

Apaydin, F. G., Aslanturk, A., Uzunhisarcikli, M., Bas, H., Kalender, S., Kalender, Y. (2019). Histopathological and biochemical studies on the effect of curcumin and taurine against bisphenol A toxicity in male rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(12), 12302-12310.

Argacha, J. F., Mizukami, T., Bourdrel, T., & Bind, M. A. (2019). Ecology of the cardiovascular system: Part II–A focus on non-air related pollutants. *Trends in cardiovascular medicine*, 29(5), 274-282.

Ashkenazi, A., (2008). Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*, 19(3-4), 325-331.

Ashkenazi, A., Fairbrother, W. J., Levenson, J. D., Souers, A. J. (2017). From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nature reviews drug discovery*, 16(4), 273-284.

Ayazgök, B., Küçükkilinç, T. T. (2017). Düşük Doz Bisfenol A'nın Büyük Etkileri. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(2), 139.

Bao, W., Liu, B., Rong, S., Dai, S. Y., Trasande, L., Lehmler, H. J. (2020). Association between bisphenol A exposure and risk of all-cause and cause-specific mortality in US adults. *JAMA network open*, 3(8), e2011620-e2011620.

Bernardo, P. E. M., Navas, S. A., Murata, L. T. F., de ALCÂNTARA, M. R. D. S. (2015). Bisfenol A: o uso em embalagens para alimentos, exposição e toxicidade–Uma Revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 74(1), 1-11.

Beserra, M. R., de Araújo Schiavini, J., Rodrigues, W. C., Pereira, C. D. S. S. (2012). O Bisfenol A: sua utilização e a atual polêmica em relação aos possíveis danos à saúde humana. *Revista eletrônica Teccen*, 5(1), 37-46.

Boujbiha, M. A., Hamden, K., Guermazi, F., Bouslama, A., Omezzine, A., Kammoun, A., El Feki, A. (2009). Testicular toxicity in mercuric chloride treated rats: association with oxidative stress. *Reproductive toxicology*, 28(1), 81-89.

- Brown, A. R., Green, J. M., Moreman, J., Gunnarsson, L. M., Mourabit, S., Ball, J., ... and Tyler, C. R. (2018). Cardiovascular effects and molecular mechanisms of bisphenol a and its metabolite MBP in zebrafish. *Environmental science & technology*, 53(1), 463-474.
- Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G., Gören, A. C. (2013). Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC–MS/MS. *Food research international*, 51(1), 66-74.
- Cagampang, F. R., Torrens, C., Anthony, F. W., Hanson, M. A. (2012). Developmental exposure to bisphenol A leads to cardiometabolic dysfunction in adult mouse offspring. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 3(4), 287-292.
- Cai, S., Rao, X., Ye, J., Ling, Y., Mi, S., Chen, H., ... and Li, Y. (2020). Relationship between urinary bisphenol a levels and cardiovascular diseases in the US adult population, 2003–2014. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 192, 110300.
- Carneiro, B. A., El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 17(7), 395-417.
- Chapalamadugu, K. C., VandeVoort, C. A., Settles, M. L., Robison, B. D., Murdoch, G. K. (2014). Maternal bisphenol a exposure impacts the fetal heart transcriptome. *PLoS One*, 9(2), e89096.
- Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y. L., Wu, Y., Widelka, M. (2016). Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity a review. *Environmental science & technology*, 50(11), 5438-5453.
- Chen, H., Yoshioka, H., Kim, G. S., Jung, J. E., Okami, N., Sakata, H., ... and Chan, P. H. (2011). Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxidants & redox signaling*, 14(8), 1505-1517.
- Chiang, Y. W., Su, C. H., Sun, H. Y., Chen, S. P., Chen, C. J., Chen, W. Y., ... & Kuan, Y. H. (2022). Bisphenol A induced apoptosis via oxidative stress generation involved Nrf2/HO-1 pathway and mitochondrial dependent pathways in human retinal pigment epithelium (ARPE-19) cells. *Environmental Toxicology*, 37(1), 131-141.
- Chipuk, J. E., Fisher, J. C., Dillon, C. P., Kriwacki, R. W., Kuwana, T., Green, D. R. (2008). Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), 20327-20332.
- Chu, S., Wang, W., Zhang, N., Liu, T., Li, J., Chu, X., ... and Chu, L. (2021). Protective effects of 18 β -Glycyrrhetic acid against myocardial infarction: Involvement of PI3K/Akt pathway activation and inhibiting Ca²⁺ influx via L-type Ca²⁺ channels. *Food Science & Nutrition*, 9(12), 6831-6843.

Chu, P. L., Lin, C. Y., Sung, F. C., Su, T. C. (2021). Apoptotic microparticles mediate the association between bisphenol A and subclinical atherosclerosis in a young population: A population-based study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 224, 112663.

Crow, M. T., Mani, K., Nam, Y. J., Kitsis, R. N. (2004). The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circulation research*, 95(10), 957-970.

Coşkun, G., Özgür, H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3), 145-158.

Çağlayan, C. (2018). Ratlarda civa (II) klorür kaynaklı karaciğer ve böbrek hasarı üzerine rutin'in etkilerinin araştırılması. *Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Biyokimyası Anabilimdalı, Atatürk Üniversitesi, Erzurum*, 17-80.

Dairkee, S. H., Luciani-Torres, M. G., Moore, D. H., Goodson III, W. H. (2013). Bisphenol-A-induced inactivation of the p53 axis underlying deregulation of proliferation kinetics, and cell death in non-malignant human breast epithelial cells. *Carcinogenesis*, 34(3), 703-712.

D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43(6), 582-592.

Darendelioğlu, E., (2017). İnsan kolon kanseri hücrelerinde (ht-29) lactobacillus reuteri türünden elde edilen bazı kısa zincirli yağ asitlerinin apoptotik etkilerinin araştırılması. *Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalı, Bingöl Üniversitesi, Bingöl*, 8-52.

Darendelioglu, E. (2020). Neuroprotective effects of chrysin on diclofenac-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Neurochemical research*, 45(5), 1064-1071.

Dastoorpoor, M., Sekhavatpour, Z., Masoumi, K., Mohammadi, M. J., Aghababaeian, H., Khanjani, N., ... and Vahedian, M. (2019). Air pollution and hospital admissions for cardiovascular diseases in Ahvaz, Iran. *Science of the total environment*, 652, 1318-1330.

Dualde, P., Pardo, O., Corpas-Burgos, F., Kuligowski, J., Gormaz, M., Vento, M., ... and Yusà, V. (2019). Biomonitoring of bisphenols A, F, S in human milk and probabilistic risk assessment for breastfed infants. *Science of the total environment*, 668, 797-805.

Durmaz, E., BK, G. (2013). Çevresel bir endokrin bozucu: Bisfenol A ve toksik etkilerinin değerlendirilmesi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 56(4), 192-199.

Elshafiey, S. H. M. F., ElGendy, M. M. L., Rashed, M. A., Ali, R. A. M., Kamel, A. H. (2020). Reproductive Toxicity Induced by Low Dose Bisphenol A (BPA) in Male Rats. *Journal of Scientific Research in Science*, 37(Part 2 (Biological Sciences)), 73-98.

Ezz, H. S. A., Khadrawy, Y. A., Mourad, I. M. (2015). The effect of bisphenol A on some oxidative stress parameters and acetylcholinesterase activity in the heart of male albino rats. *Cytotechnology*, 67(1), 145-155.

- Eweda, S. M., Newairy, A. S. A., Abdou, H. M., Gaber, A. S. (2020). Bisphenol A-induced oxidative damage in the hepatic and cardiac tissues of rats: The modulatory role of sesame lignans. *Experimental and therapeutic medicine*, 19(1), 33-44.
- Fernandez, M. F., Arrebola, J. P., Taoufik, J., Navalón, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., ... and Olea, N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reproductive toxicology*, 24(2), 259-264.
- Filice, M., Leo, S., Mazza, R., Amelio, D., Garofalo, F., Imbrogno, S., ... and Gattuso, A. (2021). The heart of the adult goldfish *Carassius auratus* as a target of Bisphenol A: a multifaceted analysis. *Environmental Pollution*, 269, 116177.
- Friques, A. G., Santos, F. D., Angeli, D. B., Silva, F. A. C., Dias, A. T., Aires, R., ... and Vasquez, E. C. (2020). Bisphenol A contamination in infant rats: Molecular, structural, and physiological cardiovascular changes and the protective role of kefir. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 75, 108254.
- Fürhacker, M., Scharf, S., Weber, H. (2000). Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere*, 41(5), 751-756.
- Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J. P., Goeyens, L., Lecomte, P., ... and Covaci, A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and chemical toxicology*, 50(10), 3725-3740.
- Ginsberg, G., Rice, D. C. (2009). Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A?. *Environmental health perspectives*, 117(11), 1639-1643.
- Grotto, D., Maria, L. S., Valentini, J., Paniz, C., Schmitt, G., Garcia, S. C., ... and Farina, M. (2009). Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova*, 32(1), 169-174.
- Gu, J., Wang, H., Zhou, L., Fan, D., Shi, L., Ji, G., Gu, A. (2020). Oxidative stress in bisphenol AF-induced cardiotoxicity in zebrafish and the protective role of N-acetyl N-cysteine. *Science of the Total Environment*, 731, 139190.
- Güler, Ü. A., Can, Ö. P. (2017). Kimyasal Kontaminantların Çevre Sağlığı ve Gıdalar Üzerine Etkileri. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(1), 170-195.
- Gündoğdu, T., Akdevelioğlu, Y. (2019). Bisfenol A ve erkek üreme sağlığı. *Androl Bül*, 21, 32-40.
- Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and tissue research*, 301(1), 5-17.
- Haleagrahara, N., Varkkey, J., Chakravarthi, S. (2011). Cardioprotective effects of glycyrrhizic acid against isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats. *International journal of molecular sciences*, 12(10), 7100-7113.

Hassan, Z. K., Elobeid, M. A., Virk, P., Omer, S. A., ElAmin, M., Daghestani, M. H., AlOlayan, E. M. (2012). Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2012.

Hazzaa, S. M., El-Roghy, E. S., Abd Eldaim, M. A., Elgarawany, G. E. (2020). Monosodium glutamate induces cardiac toxicity via oxidative stress, fibrosis, and P53 proapoptotic protein expression in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(16), 20014-20024.

Hong, G. (2020). Enoxolone suppresses apoptosis in chondrocytes and progression of osteoarthritis via modulating the ERK1/2 signaling pathway. *Archives of Medical Science*, 16(1).

Huang, Y. Q., Wong, C. K. C., Zheng, J. S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., ... and Wong, M. H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment international*, 42, 91-99.

Hugo, E. R., Brandebourg, T. D., Woo, J. G., Loftus, J., Alexander, J. W., Ben-Jonathan, N. (2008). Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environmental health perspectives*, 116(12), 1642-1647.

Hussein, R. M., Eid, J. I. (2013). Pathological mechanisms of liver injury caused by oral administration of bisphenol A. *Life Science Journal*, 10(1), 663.

Hyun, S. A., Lee, C. Y., Ko, M. Y., Chon, S. H., Kim, Y. J., Seo, J. W., ... and Ka, M. (2021). Cardiac toxicity from bisphenol A exposure in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 428, 115696.

Hwang, J. K., Min, K. H., Choi, K. H., Hwang, Y. C., Jeong, I. K., Ahn, K. J., ... and Chang, J. S. (2013). Bisphenol A reduces differentiation and stimulates apoptosis of osteoclasts and osteoblasts. *Life Sciences*, 93(9-11), 367-372.

İyigündoğdu, İ., Üstündağ, A., Duydu, Y. (2020). Toxicological evaluation of bisphenol A and its analogues. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(4), 457.

Ishtiaq, A., Bakhtiar, A., Silas, E., Saeed, J., Ajmal, S., Mushtaq, I., ... and Murtaza, I. (2020). Pistacia integerrima alleviated Bisphenol A induced toxicity through Ubc13/p53 signalling. *Molecular Biology Reports*, 47(9), 6545-6559.

Jalal, N., Surendranath, A. R., Pathak, J. L., Yu, S., Chung, C. Y. (2018). Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicology reports*, 5, 76-84.

Jamshidi-Kia, F., Wibowo, J. P., Elachouri, M., Masumi, R., Salehifard-Jouneghani, A., Abolhasanzadeh, Z., Lorigooini, Z. (2020). Battle between plants as antioxidants with free radicals in human body. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 9(3), 191-199.

Jan, R. (2019). Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 9(2), 205.

Jayakanthan, M., Jubendradass, R., D'Cruz, S. C., Mathur, P. P. (2015). A use of homology modeling and molecular docking methods: to explore binding mechanisms of nonylphenol and bisphenol A with antioxidant enzymes. In *Computational Peptidology*, 1268, 273-289). Humana Press, New York, NY.

Jenkins, S., Betancourt, A. M., Wang, J., Lamartiniere, C. A. (2012). Endocrine-active chemicals in mammary cancer causation and prevention. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 129(3-5), 191-200.

Kandemir, F. M., Kucukler, S., Eldutar, E., Caglayan, C., Gülçin, İ. (2017). Chrysin protects rat kidney from paracetamol-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy: a multi-biomarker approach. *Scientia pharmaceutica*, 85(1), 4.

Kao, T. C., Wu, C. H., Yen, G. C. (2014). Bioactivity and potential health benefits of licorice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(3), 542-553.

Kasap, S., Gönenç, A., Şener, D. E., Hisar, İ. (2007). Serum cardiac markers in patients with acute myocardial infarction: oxidative stress, C-reactive protein and N-terminal probrain natriuretic peptide. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 41(1), 50-57.

Khodayar, M. J., Kalantari, H., Mahdavinia, M., Khorsandi, L., Alboghobeish, S., Samimi, A., ... and Zeidooni, L. (2020). Protective effect of naringin against BPA-induced cardiotoxicity through prevention of oxidative stress in male Wistar rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(1), 85-95.

Kobroob, A., Peerapanyasut, W., Chattipakorn, N., Wongmekiat, O. (2018). Damaging effects of bisphenol A on the kidney and the protection by melatonin: emerging evidences from in vivo and in vitro studies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.

Koneva, L. A., Vyas, A. K., McEachin, R. C., Puttabyatappa, M., Wang, H. S., Sartor, M. A., Padmanabhan, V. (2017). Developmental programming: Interaction between prenatal BPA and postnatal overfeeding on cardiac tissue gene expression in female sheep. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(1), 4-18.

Kose, O., Rachidi, W., Beal, D., Erkekoglu, P., Fayyad-Kazan, H., Kocer Gumusel, B. (2020). The effects of different bisphenol derivatives on oxidative stress, DNA damage and DNA repair in RWPE-1 cells: A comparative study. *Journal of applied toxicology*, 40(5), 643-654.

Kovacic, P. (2010). How safe is bisphenol A? Fundamentals of toxicity: metabolism, electron transfer and oxidative stress. *Medical hypotheses*, 75(1), 1-4.

Kowalska, A., Kalinowska-Lis, U. (2019). 18 β -Glycyrrhetic acid: its core biological properties and dermatological applications. *International journal of cosmetic science*, 41(4), 325-331.

Kuzu, M., Yıldırım, S., Kandemir, F. M., Küçükler, S., Çağlayan, C., Türk, E., Dörtbudak, M. B. (2019). Protective effect of morin on doxorubicin-induced hepatorenal toxicity in rats. *Chemico-biological interactions*, 308, 89-100.

Liao, C., Liu, F., Kannan, K. (2012). Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environmental science & technology*, 46(12), 6515-6522.

Liu, Q., Wang, W., Zhang, Y., Cui, Y., Xu, S., Li, S. (2020). Bisphenol A regulates cytochrome P450 1B1 through miR-27b-3p and induces carp lymphocyte oxidative stress leading to apoptosis. *Fish & shellfish immunology*, 102, 489-498.

Lombó, M., González-Rojo, S., Fernández-Díez, C., Herráez, M. P. (2019). Cardiogenesis impairment promoted by bisphenol A exposure is successfully counteracted by epigallocatechin gallate. *Environmental pollution*, 246, 1008-1019.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. (1951). Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem*, 193(1), 265-275.

Ma, Y., Liu, H., Wu, J., Yuan, L., Wang, Y., Du, X., ... and Zhang, H. (2019). The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environmental research*, 176, 108575.

Mansour, S. A., Mossa, A. T. H. (2009). Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 93(1), 34-39.

Mao, N., Gao, Q., Hu, H., Zhu, T., Hao, L. (2019). BPA disrupts the cardioprotection by 17 β -oestradiol against ischemia/reperfusion injury in isolated guinea pig hearts. *Steroids*, 146, 50-56.

Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family—an evolutionary overview. *The FEBS journal*, 275(15), 3959-3970.

Matkovics, B. (1988). Determination of enzyme activity in lipid peroxidation and glutathione pathways. *Laboratoriumi Diagnosztika*, 15, 248-250.

Mazur, C. S., Kenneke, J. F., Hess-Wilson, J. K., Lipscomb, J. C. (2010). Differences between human and rat intestinal and hepatic bisphenol A glucuronidation and the influence of alamethicin on in vitro kinetic measurements. *Drug Metabolism and Disposition*, 38(12), 2232-2238.

Mazzotta, E., Malitesta, C., Margapoti, E. (2013). Direct electrochemical detection of bisphenol A at PEDOT-modified glassy carbon electrodes. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(11), 3587-3592.

Melzer, D., Gates, P., Osborn, N. J., Henley, W. E., Cipelli, R., Young, A., ... and Galloway, T. S. (2012). Urinary bisphenol a concentration and angiography-defined coronary artery stenosis. *PloS one* 7(8).

Melzer, D., Rice, N. E., Lewis, C., Henley, W. E., Galloway, T. S. (2010). Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PloS one*, 5(1), e8673.

Metz, C. M. (2016). Bisphenol A: understanding the controversy. *Workplace health & safety*, 64(1), 28-36.

Michałowicz, J. (2014). Bisphenol A—sources, toxicity and biotransformation. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(2), 738-758.

Mohsenzadeh, M. S., Razavi, B. M., Imenshahidi, M., Mohajeri, S. A., Rameshrad, M., Hosseinzadeh, H. (2021). Evaluation of green tea extract and epigallocatechin gallate effects on bisphenol A-induced vascular toxicity in isolated rat aorta and cytotoxicity in human umbilical vein endothelial cells. *Phytotherapy research*, 35(2), 996-1009.

Momtazan, M., Geravandi, S., Rastegarimehr, B., Valipour, A., Ranjbarzadeh, A., Yari, A. R., ... and Mohammadi, M. J. (2018). An investigation of particulate matter and relevant cardiovascular risks in Abadan and Khorramshahr in 2014–2016. *Toxin reviews*, 290-297.

Moreno-Gómez-Toledano, R., Arenas, M. I., Sánchez-Esteban, S., Cook, A., Saura, M., Bosch, R. J. (2021). Critical analysis of human exposure to bisphenol a and its novel implications on renal, cardiovascular and hypertensive diseases.

Mourad, I. M., Khadrawy, Y. A. (2012). The sensitivity of liver, kidney and testis of rats to oxidative stress induced by different doses of bisphenol A. *Int J Life Sci Pharma Res*, 2(2), 19-28.

Naftolin, F., Friedenthal, J., Nachtigall, R., Nachtigall, L. (2019). Cardiovascular health and the menopausal woman: the role of estrogen and when to begin and end hormone treatment. *F1000Research*, 8. F1000 Faculty Rev-1576.

Ojha, S., Golechha, M., Kumari, S., Bhatia, J., Arya, D. S. (2013). Glycyrrhiza glabra protects from myocardial ischemia–reperfusion injury by improving hemodynamic, biochemical, histopathological and ventricular function. *Experimental and toxicologic pathology*, 65(1-2), 219-227.

Ojha, S. K., Sharma, C., Golechha, M. J., Bhatia, J., Kumari, S., Arya, D. S. (2015). Licorice treatment prevents oxidative stress, restores cardiac function, and salvages myocardium in rat model of myocardial injury. *Toxicology and Industrial Health*, 31(2), 140-152.

Ola-Davies, O. E., Olukole, S. G. (2018). Gallic acid protects against bisphenol A-induced alterations in the cardio-renal system of Wistar rats through the antioxidant defense mechanism. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107, 1786-1794.

Ola, M. S., Nawaz, M., Ahsan, H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry*, 351(1), 41-58.

Olujimi, O., Ayoola, R., Olayinka, O., Dosumu, O., Rotimi, S., Aladesida, A. (2020). Evaluation of antioxidant enzymes performances and DNA damage induced by bisphenol A and diisobutylphthalate in *Hyperiodrilus africanus*-earthworms. *Emerging Contaminants*, 6, 1-9.

Oluranti, O. I., Alabi, B. A., Michael, O. S., Ojo, A. O., Fatokun, B. P. (2021). Rutin prevents cardiac oxidative stress and inflammation induced by bisphenol A and dibutyl phthalate exposure via NRF-2/NF- κ B pathway. *Life Sciences*, 284, 119878.

Pant, M. K., Ahmad, A. H., Naithani, M., Pandey, H. S., Pandey, M., Pant, J. (2020). Effect of Exposure of Plastic Infant Feeding Bottle Leached Water on Biochemical, Morphological and Oxidative Stress Parameters in Rats. *Toxics*, 8(2), 34.

Parrino, J., Hotchkiss, R. S., Bray, M. (2007) Immune Cell Apoptosis Prevention as Potential Therapy for Severe Infections. *Emerging Infectious Diseases*, 13(2).

Pastorino, G., Cornara, L., Soares, S., Rodrigues, F., Oliveira, M. B. P. (2018). Liquorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review. *Phytotherapy research*, 32(12), 2323-2339.

Patel, B. B., Raad, M., Sebag, I. A., Chalifour, L. E. (2013). Lifelong exposure to bisphenol a alters cardiac structure/function, protein expression, and DNA methylation in adult mice. *toxicological sciences*, 133(1), 174-185.

Paul, S., Mohanan, A., Varghese, M. V., Alex, M., Nair, H. (2012). Ameliorative effect of α -tocopherol on monosodium glutamate-induced cardiac histological alterations and oxidative stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(15), 3002-3006.

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.

Posnack, N. G., Jaimes III, R., Asfour, H., Swift, L. M., Wengrowski, A. M., Sarvazyan, N., Kay, M. W. (2014). Bisphenol A exposure and cardiac electrical conduction in excised rat hearts. *Environmental Health Perspectives*, 122(4), 384-390.

Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*, 2(2), 219.

Ramos, A. S., Correia, A. T., Antunes, S. C., Gonçalves, F., Nunes, B. (2014). Effect of acetaminophen exposure in *Oncorhynchus mykiss* gills and liver: detoxification mechanisms, oxidative defence system and peroxidative damage. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(3), 1221-1228.

Rashid, S., Nafees, S., Siddiqi, A., Vafa, A., Afzal, S. M., Parveen, R., ... and Sultana, S. (2017). Partial protection by 18 β Glycrrhetic acid against Cisplatin induced oxidative intestinal damage in wistar rats: Possible role of NFkB and caspases. *Pharmacological Reports*, 69(5), 1007-1013.

Rezg, R., El-Fazaa, S., Gharbi, N., Mornagui, B. (2014). Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment international*, 64, 83-90.

Rochester, J. R., Bolden, A. L. (2015). Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes. *Environmental health perspectives*, 123(7), 643-650.

Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive toxicology*, 42, 132-155.

Sahoo, P. K., Pradhan, L. K., Aparna, S., Agarwal, K., Banerjee, A., Das, S. K. (2020). Quercetin abrogates bisphenol A induced altered neurobehavioral response and oxidative stress in zebrafish by modulating brain antioxidant defence system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80, 103483.

Saleh, J., Edeas, M., Van Goor, H. (2019). Antioxidant Supplements and Oxidative Stress: The debate extends to the Middle East. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 19(3), e177.

Santoro, A., Chianese, R., Troisi, J., Richards, S., Nori, S. L., Fasano, S., ... and Meccariello, R. (2019). Neuro-toxic and reproductive effects of BPA. *Current neuropharmacology*, 17(12), 1109-1132.

Sarvestani, N. N., Sepehri, H., Delphi, L., Farimani, M. M. (2018). Eupatorin and salvigenin potentiate doxorubicin-induced apoptosis and cell cycle arrest in ht-29 and sw948 human colon cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 19(1), 131.

Sedlak, J., Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25, 192-205.
Shah, S. M. A., Akram, M., Riaz, M., Munir, N., Rasool, G. (2019). Cardioprotective potential of plant-derived molecules: a scientific and medicinal approach. *Dose-response*, 17(2), 1559325819852243.

Shelby, M. (2010). Potential Human Reproductive and Development Effects of Bisphenol A. NIH Publication No. 08-5994, CERHR, USA

Shirani, M., Alizadeh, S., Mahdavinia, M., Dehghani, M. A. (2019). The ameliorative effect of quercetin on bisphenol A-induced toxicity in mitochondria isolated from rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(8), 7688-7696.

Simões, C. P. P. (2016). Avaliação operacional e remoção de bisfenol-A no tratamento de água por diferentes tipos de membranas: avaliação em escala piloto. Postgraduation Thesis, Environmental Technology and Water Resources Post-Graduation Program, Brasil Universty, Brasil

Singh, R., Letai, A., Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*, 20(3), 175-193.

Su, L., Wang, M., Yin, S. T., Wang, H. L., Chen, L., Sun, L. G., Ruan, D. Y. (2008). The interaction of selenium and mercury in the accumulations and oxidative stress of rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(3), 483-489.

Sun, Y. I., Oberley, L. W., Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3), 497-500.

Sun, Y., Wang, X., Zhou, Y., Zhang, J., Cui, W., Wang, E., ... and Xu, X. (2021). Protective effect of metformin on BPA-induced liver toxicity in rats through upregulation of cystathionine β synthase and cystathionine γ lyase expression. *Science of The Total Environment*, 750, 141685.

Tavakkoli, A., Abnous, K., Hassani, F. V., Hosseinzadeh, H., Birner-Gruenberger, R., Mehri, S. (2020). Alteration of protein profile in cerebral cortex of rats exposed to bisphenol a: a proteomics study. *NeuroToxicology*, 78, 1-10.

Thabet, N. M., Abdel-Rafei, M. K., Moustafa, E. M. (2020). Boswellic acid protects against Bisphenol-A and gamma radiation induced hepatic steatosis and cardiac remodelling in rats: Role of hepatic PPAR- α /P38 and cardiac Calcineurin-A/NFATc1/P38 pathways. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1-19.

Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267(5203), 1456-1462.

Toto, A., Wild, P., Graille, M., Turcu, V., Cr    , C., Hemmendinger, M., ... AND Hopf, N. B. (2022). Urinary Malondialdehyde (MDA) Concentrations in the General Population—A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Toxics*, 10(4), 160.

Townsend, D. M., Tew, K. D., Tapiero, H. (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 57(3-4), 145-155.

Türk Gıda Kodeksi. (2011). Gıda Maddeleri İle Temasta Bulunan Plastik Madde Ve Malzemeler Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ (Tebliğ No: 2011/29), Ankara.

Uzdensky, A. B. (2019). Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro-and antiapoptotic proteins. *Apoptosis*, 24(9), 687-702.

Valokola, M. G., Karimi, G., Razavi, B. M., Kianfar, M., Jafarian, A. H., Jaafari, M. R., Imenshahidi, M. (2019). The protective activity of nanomicelle curcumin in bisphenol A-induced cardiotoxicity following subacute exposure in rats. *Environmental toxicology*, 34(3), 319-329.

Vanani, A. R., Mahdavinia, M., Shirani, M., Alizadeh, S., Dehghani, M. A. (2020). Protective effects of quercetin against oxidative stress induced by bisphenol-A in rat cardiac mitochondria. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(13), 15093-15102.

Verner, M. A., Magher, T., Haddad, S. (2010). High concentrations of commonly used drugs can inhibit the in vitro glucuronidation of bisphenol A and nonylphenol in rats. *Xenobiotica*, 40(2), 83-92.

Yang, G., Wang, L., Yu, X., Huang, Y., Qu, C., Zhang, Z., ... and Chen, H. (2017). Protective effect of 18 β -glycyrrhetic acid against triptolide-induced hepatotoxicity in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.

Yang, J. C., Myung, S. C., Kim, W., Lee, C. S. (2012). 18 β -Glycyrrhetic acid potentiates Hsp90 inhibition-induced apoptosis in human epithelial ovarian carcinoma cells via activation of death receptor and mitochondrial pathway. *Molecular and cellular biochemistry*, 370(1), 209-219.

Yang, T., Zhou, J., Fang, L., Wang, M., Dilinuer, M., Ainiwaer, A. (2021). Protection function of 18 β -glycyrrhetic acid on rats with high-altitude pulmonary hypertension based on 1H NMR metabonomics technology. *Analytical Biochemistry*, 631, 114342.

Yan, M., Guo, L., Yang, Y., Zhang, B., Hou, Z., Gao, Y., ... and Gong, H. (2021). Glycyrrhetic Acid Protects α -Naphthylisothiocyanate-Induced Cholestasis Through Regulating Transporters, Inflammation and Apoptosis. *Frontiers in Pharmacology*, 2487.

Yan, M., Lo, J. C., Edwards, J. T., Baran, P. S. (2016). Radicals: reactive intermediates with translational potential. *Journal of the American Chemical Society*, 138(39), 12692-12714.

Yan, S., Chen, Y., Dong, M., Song, W., Belcher, S. M., Wang, H. S. (2011). Bisphenol A and 17 β -estradiol promote arrhythmia in the female heart via alteration of calcium handling. *PloS one*, 6(9), e25455.

Yu, L., He, Y. (2017). Influence of compatibility of glycyrrhetic acid, liquiritin and hypaconitine on apoptosis pathway in rats with chronic heart failure. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2018-2023.

Zhang, D., Sun, J., Chang, S., Li, X., Shi, H., Jing, B., ... and Zhao, G. (2021). Protective effect of 18 β -glycyrrhetic acid against H₂O₂-induced injury in Schwann cells based on network pharmacology and experimental validation. *Experimental and therapeutic medicine*, 22(5), 1-9.

Zhang, J., Li, X., Zhou, L., Wang, L., Zhou, Q., Huang, X. (2016). Analysis of effects of a new environmental pollutant, bisphenol A, on antioxidant systems in soybean roots at different growth stages. *Scientific Reports*, 6(1), 1-10.

Zhang, M., Chang, Z., Zhao, F., Zhang, P., Hao, Y. J., Yan, L., ... and Zhou, R. (2019). Protective effects of 18 β -glycyrrhetic acid on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Frontiers in Pharmacology*, 13.

Zhang, Y. F., Shan, C., Wang, Y., Qian, L. L., Jia, D. D., Zhang, Y. F., ... and Xu, H. M. (2020). Cardiovascular toxicity and mechanism of bisphenol A and emerging risk of bisphenol S. *Science of The Total Environment*, 723, 137952.

Wang, K., Zhao, Z., Ji, W. (2019). Bisphenol A induces apoptosis, oxidative stress and inflammatory response in colon and liver of mice in a mitochondria-dependent manner. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 117, 109182.

Wang, L., He, Y., Zhang, Y., Zhou, H., Yu, L., Yang, J., Wan, H. (2016). Effects of active components of Fuzi and Gancao compatibility on Bax, Bcl-2, and Caspase-3 in chronic heart failure rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016.

Wang, L., Zhang, Y., Wan, H., Jin, W., Yu, L., Zhou, H., Yang, J. (2017a). Glycyrrhetic acid protects H9c2 cells from oxygen glucose deprivation-induced injury through the PI3K/Akt signaling pathway. *Journal of natural medicines*, 71(1), 27-35.

Wang, L. Q., He, Y., Wan, H. F., Zhou, H. F., Yang, J. H., Wan, H. T. (2017b). Protective mechanisms of hyaconitine and glycyrrhetic acid compatibility in oxygen and glucose deprivation injury. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 18(7), 586-596.

Wang, Y., Du, X., Wang, D., Wang, J., Du, J. (2020). Effects of bisphenol A exposure during pregnancy and lactation on hippocampal function in newborn rats. *International Journal of Medical Sciences*, 17(12), 1751.

Wang, Y., Rui, M., Nie, Y., Lu, G. (2018). Influence of gastrointestinal tract on metabolism of bisphenol A as determined by in vitro simulated system. *Journal of hazardous materials*, 355, 111-118.

Wang, X. Q., Wang, W., Peng, M., Zhang, X. Z. (2021). Free radicals for cancer theranostics. *Biomaterials*, 266, 120474.

WHO (2010) Toxicological and Health Aspects of Bisphenol. Ottawa, Canada, 7-45.

Willhite, C. C., Ball, G. L., McLellan, C. J. (2008). Derivation of a bisphenol A oral reference dose (RfD) and drinking-water equivalent concentration. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 11(2), 69-146.

Wu, H. J., Yang, J. Y., Jin, M., Wang, S. Q., Wu, D. L., Liu, Y. N., ... and He, J. (2015). Glycyrrhetic acid protects the heart from ischemia/reperfusion injury by attenuating the susceptibility and incidence of fatal ventricular arrhythmia during the reperfusion period in the rat hearts. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(2), 741-752.

Wu, F., Li, X., Jiang, B., Yan, J., Zhang, Z., Qin, J., ... and Gao, Z. (2018). Glycyrrhetic acid functionalized nanoparticles for drug delivery to liver cancer. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 14(11), 1837-1852.

Wu, M., Cong, Y., Wang, K., Yu, H., Zhang, X., Ma, M., ... and Pei, X. (2022). Bisphenol A impairs macrophages through inhibiting autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway and inducing apoptosis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 234, 113395.

Xu, X., Lai, Y., Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, 39(1).