



T.C.  
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BISFENOL A TOKSİKASYONUNA MARUZ KALAN ERKEK  
YENİ ZELANDA TAVŞANLARINDA PUNİKALAJİN  
UYGULAMALARININ SERUM ANTİOKSİDAN SEVİYELERİ  
VE ÜREME İLE İLGİLİ BAZI HORMONLAR ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

**GÜLŞAH CANDAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

VETERİNER FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Prof. Dr. MEHMET ŞÜKRÜ GÜLAY**

**BURDUR-2019**



T.C.  
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BISFENOL A TOKSİKASYONUNA MARUZ KALAN ERKEK  
YENİ ZELANDA TAVŞANLARINDA PUNİKALAJİN  
UYGULAMALARININ SERUM ANTİOKSİDAN SEVİYELERİ  
VE ÜREME İLE İLGİLİ BAZI HORMONLAR ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

**GÜLŞAH CANDAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**VETERİNER FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Danışman**

**Prof. Dr. MEHMET ŞÜKRÜ GÜLAY**

Bu Araştırma TUBİTAK (*proje no: 116O027*) ve Burdur Mehmet Akif Ersoy  
Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından *0474YL-17*  
proje numarası ile desteklenmiştir.

**BURDUR-2019**

**KABUL ve ONAY SAYFASI**

**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

*Gülşah CANDAN* tarafından *Prof. Dr. Mehmet Şükrü GÜLAY* yönetiminde hazırlanan "Bisfenol A toksikasyonuna maruz kalan erkek Yeni Zelanda tavşanlarında punikalajin uygulamalarının serum antioksidan seviyeleri ve üreme ile ilgili bazı hormonlar üzerine etkileri" başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Fizyoloji Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

**Tez Savunma Tarihi 11/04/2019**

Prof. Dr. Şule DEMİRCİ  
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi

**Başkan**

Prof. Dr. Mehmet Şükrü GÜLAY  
Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi

**Jüri**

Doç. Dr. Aziz BÜLBÜL  
Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi

**Jüri**

**ONAY**

Bu tez, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu **31/05/2019** Tarih ve **20**.. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. M. Doğa TEMİZSOYLU  
Müdür

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

## TEŞEKKÜR

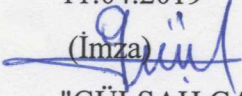
Lisansüstü eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen, bilgi birikimiyle bizleri aydınlatan başta sayın danışman hocam Prof. Dr. Mehmet Şükrü GÜLAY olmak üzere, Anabilim Dalımızın değerli hocaları Prof. Dr. Şule DEMİRCİ'ye, Dr. Öğretim Üyesi Özlem YILDIZ GÜLAY'a ve Dr. Öğretim Üyesi Ahu DEMİTAŐ'a teşekkürü bir borç bilirim. Hayatım boyunca beni her koşulda seven, büyüten, ve hayatımı anlamlı kılan, bu günlere gelmem de en büyük fedakarlığı yapan annem Ümmü CANDAN 'a, abim Fahreddin CANDAN'a, başımıza gelebilecek zorlu şartlarla başa çıkabilmeyi erken yaşta öğreten babam Abdurrahman CANDAN'a ve çok değerli diğer aile üyelerime müteőekkirim. Bu zorlu eğitim sürecimde yanımda olan sevgili arkadaşım Gamze GÖKER'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.



## ETİK BEYAN

*“Bisfenol A toksikasyonuna maruz kalan erkek Yeni Zelanda tavşanlarında punikalajin uygulamalarının serum antioksidan seviyeleri ve üreme ile ilgili bazı hormonlar üzerine etkileri”* başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

11.04.2019

(İmza) 

"GÜLŞAH CANDAN"

## İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bisfenol A	3
2.1.1. BPA'nın Genel Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	3
2.1.2. BPA'nın Başlıca Kaynakları	4
2.1.3. Gıda Yoluyla BPA Alımı	5
2.1.3.1. Epoksi Yapıştırıcılar yoluyla BPA Alımı	5
2.1.3.2. Polikarbon Kullanılan (PC) Ürünler	6
2.1.4. Gıda Dışı Yollarla BPA Alımı	7
2.1.5. Günlük Maruz Kalınan BPA Oranları	9
2.1.6. BPA Metabolizması	10
2.1.7. BPA'nın İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri	10
2.1.7.1. Metabolik Etkiler	11
2.1.7.2. Gelişim Üzerine Etkileri	11
2.1.7.3. Üreme Üzerine Etkileri	12
2.1.8. BPA Alternatifleri	12
2.2. Ellagitanninler	13
2.2.1. Punikalajin	15
2.2.1.1. Kaynakları	15
2.2.1.2. Punikalajinin Kimyasal Yapısı ve Genel Özellikleri	15
2.2.1.3. Ellagik asit ve Ellagitanninlerin Genel Metabolizması	17
2.3. Punikalajinin Sağlık Üzerine Etkileri	19
2.3.1. Antioksidan etkiler	19
2.3.2. Antibakteriyel etkiler	21
2.3.3. Antiviral etki	24
2.3.4. Antikarsinojenik etki	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Analizlerde Kullanılan Cihazlar	28
3.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	28
3.3. Deney Dizaynı	29
3.4. Kan Örneklerinin Alınması	30
3.5. Ötenazi ve Yaş Organ Eldesi	31
3.6. Hormon ve Enzim Analiz Metodları	31
3.7. İstatistiksel Değerlendirme	32

<b>4. BULGULAR</b>	<b>33</b>
<b>4.1. Serum Kolesterol Seviyeleri</b>	<b>33</b>
<b>4.2. Mineral Parametrelerinde Gözlenen Değişiklikler</b>	<b>33</b>
<b>4.3. Plazma Bilirubin, Albümin ve Toplam Protein Seviyeleri</b>	<b>34</b>
<b>4.4. Serum Amilaz, Lipaz, CRP ve GGT Seviyeleri</b>	<b>34</b>
<b>4.5. Serum Üreme Hormon Seviyeleri</b>	<b>34</b>
<b>4.6. Oksidan ve Antioksidan Parametreler</b>	<b>40</b>
<b>4.6.1. Süperoksit Dismütaz Enzimi Üzerindeki Değişikler</b>	<b>40</b>
<b>4.6.2. Katalaz Enzimi Üzerinde Değişiklikler</b>	<b>40</b>
<b>4.6.3. Malondialdehit Enzimi Üzerindeki Değişikler</b>	<b>40</b>
<b>4.6.4. Glutatyon Peroksidaz Enzimi Üzerindeki Değişiklikler</b>	<b>40</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>45</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>52</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>53</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>69</b>



## ŞEKİLLER

Şekil 2. 1. BPA'nın kimyasal yapısı	4
Şekil 2. 2. Punikalajin'in yapısı	16
Şekil 2. 3. Punikalajinin fiziksel görünümü	16
Şekil 2. 4. Ellagitanin alınımından sonra plazma ve idrarda rastlanan ellagik asit metabolitleri	18
Şekil 3. 1. Yeni Zelanda tavşanlarından kulak arteri yoluyla kan alınması	31



## TABLÖLAR

<b>Tablo 4.1.</b> Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının çeşitli biyokimyasal parametreler üzerine etkisi	35
<b>Tablo 4.2.</b> Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının çeşitli kan parametreleri üzerine etkisi	36
<b>Tablo 4.3.</b> Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının bazı hormonlar üzerine etkisi	37
<b>Tablo 4.4.</b> Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının kan ve çeşitli dokularda superoksit dismütaz enzimi (pg/ml) üzerine etkisi	38
<b>Tablo 4.5.</b> Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının kan ve çeşitli dokularda katalaz enzimi (pg/ml) üzerine etkisi	39
<b>Tablo 4.6.</b> Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının kan ve çeşitli dokularda superoksit dismütaz enzimi (pg/ml) üzerine etkisi	41
<b>Tablo 4.7.</b> Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının kan ve çeşitli dokularda katalaz enzimi (pg/ml) üzerine etkisi	42
<b>Tablo 4.8.</b> Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının kan ve çeşitli dokularda malonildialdehit enzimi (nmol/L) üzerine etkisi	43
<b>Tablo 4.9.</b> Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının kan ve çeşitli dokularda glutatyon peroksidaz enzimi (pg/ml) üzerine etkisi	44

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ALT</b>	Alanin Aminotransferaz
<b>AST</b>	Aspartat Aminotransferaz
<b>BAP</b>	Bilimsel Araştırma Projeleri
<b>BHT</b>	Bütil Hidroksi Toluen
<b>Bis-GMA</b>	Bisfenol A Glycidyl Methacrylate
<b>BPA</b>	Bisfenol A
<b>CAT</b>	Katalaz
<b>CDK</b>	Siklin Bağımlı Kinaz
<b>CRP</b>	C-reaktif Protein
<b>DHHP</b>	Dehidroheksahidroksidifenoil
<b>DMSO</b>	Dimetilsülfoksit
<b>DPPH</b>	Diphenil-1 - picrylhydrazyl
<b>EDC</b>	Endokrin Sistem Bozucu
<b>EFSA</b>	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
<b>FDA</b>	Gıda İlaç Dairesi
<b>FSH</b>	Folikül Stimüle Edici Hormon
<b>GGT</b>	Gama Glutemil-Transferaz
<b>GPx</b>	Glutasyon peroksidaz
<b>GR</b>	Glutasyon redüktaz
<b>GST</b>	Glutasyon-S-transferaz
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen Peroksit
<b>HCG</b>	Human Chorionic Gonadotropin
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>HHDP</b>	Heksahidroksidifenol
<b>HSP70-90</b>	HeatShock 70 ve 90
<b>iNOS</b>	Nitrik Oksit Sentaz
<b>IVF</b>	InVitro Fertilizasyon
<b>IP-10</b>	Induced Protein 10
<b>K</b>	Potasyum
<b>KONT</b>	Kontrol grubu
<b>LH</b>	Luteinleştirici Hormon
<b>LPO</b>	Lipit peroksidasyon
<b>MBC</b>	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
<b>MCP-1</b>	Monosit Kemoktan Protein-1
<b>MDA</b>	Malondialdehit
<b>Mg</b>	Magnezyum
<b>MIC</b>	Minimum Baskılayıcı Konsantrasyon
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Makrofaj İnflamatuvar Protein-1 $\alpha$
<b>Na</b>	Sodyum
<b>ng</b>	Nanogram
<b>NHTP</b>	Nonahidroksitrofenil
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nükleer Faktör Kappa Beta
<b>NO</b>	Nitrik oksit
<b>OH</b>	Hidroksil radikali
<b>P</b>	Fosfor

<b>PBS</b>	Fosfat tamponlu salin
<b>PC</b>	Polikarbon
<b>PDGFB</b>	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü Alt Ünite B
<b>PUN</b>	Punikalajin grubu
<b>PVC</b>	Polivinil Klorür
<b>RANTES</b>	Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted
<b>SAS</b>	İstatiksel Analiz Sistemi
<b>SOD</b>	SüperoksidDismütaz
<b>TGF- <math>\beta</math>/Smad</b>	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta/Smad
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tümör Nekrozis Faktör-a
<b>UBUC</b>	İdrar Kesesi Ürotelyal Karsinoma
<b>WHO</b>	Dünya Sağlık Örgütü



## ÖZET

### BİSFENOL A TOKSİKASYONUNA MARUZ KALAN ERKEK YENİ ZELANDA TAVŞANLARINDA PUNİKALAJİN UYGULAMALARININ SERUM ANTİOKSİDAN SEVİYELERİ VE ÜREME İLE İLGİLİ BAZI HORMONLAR ÜZERİNE ETKİLERİ

Bisfenol A'ya (BPA) maruz kalan erkek Yeni Zelanda tavşanlarında, güçlü antioksidan özellikleri ile bilinen punikalajinin (PUN), bazı dokulardaki oksidan-antioksidan enzimler, kandaki bazı biyokimyasal parametreler ve bazı hormonlar üzerine olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 24 erkek tavşan 2 hafta süresince laboratuvar koşullarına alıştırdı. Daha sonra, her grupta 6 tavşan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrılan tavşanlarda deneysel çalışmalara başlandı. Kontrol grubundaki (KONT) erkek tavşanlara mısır yağı ve musluk suyu verildi. BPA grubunda bulunan tavşanlara mısır yağı içerisinde 20 mg/kg BPA ve musluk suyu verildi. PUN grubundaki tavşanlara mısır yağı ve musluk suyu içerisinde 2 mg/kg PUN uygulandı. Son grupta bulunan tavşanlara ise sırasıyla mısır yağı içerisinde 20 mg/kg BPA ve musluk suyu içerisinde 2 mg/kg PUN verildi. Toplam 9 hafta boyunca günlük olarak oral gavaj yoluyla yapılan uygulamalar süresince tavşanlar haftada bir kez tartılarak uygulama dozları ayarlandı. Çalışmanın son gününde 12 saat aç bırakılan tavşanların kulak arterlerinden kan alınarak bazı hormon ve biyokimyasal parametrelerin analizi için kullanıldı. Daha sonra ötenazi yapılan tavşanların iç organları fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandıktan sonra oksidan-antioksidan parametreler ölçülünceye kadar -80 °C'de bekletildi. İstatistiksel analiz için PROC GLM prosedürü kullanıldı. Gruplararası farklılıklar için ise Dunnet testi yapıldı. Analizler neticesinde; kan serum inhibin, FSH, LH, FSH/LH oranı, FSH/inhibin oranı plazma, Mg, P, Ca, Na, K, bilirubin, albümin ve toplam plazma protein seviyelerinde gruplar arasında herhangi bir istatistiki farka rastlanmadı ( $P>0,1$ ). Benzer bir şekilde gruplar arasındaki plazma, karaciğer ve böbrek glutatyon peroksidaz değerleri de önemsiz bulundu ( $P>0,1$ ). Fakat, BPA uygulamaları serum kolesterol, LDL, HDL, amilaz, lipaz, CRP, GGT seviyelerini olumsuz etkiledi ( $P<0,05$ ). Ayrıca BPA'nın plazma, testis, karaciğer ve böbrek malonildialdehit seviyelerini yükseltirken, katalaz ve süperoksit dismutaz seviyelerini düşürdü ( $P<0,05$ ). BPA ile birlikte uygulanan PUN tedavisinin ise bu parametrelerde önemli ölçüde iyileşmeye sebep olduğu gözlemlendi. Elde edilen değerler, BPA'nın erkek tavşanlarda yol açtığı olumsuz etkilerin PUN tarafından önemli ölçüde düzeltilebileceğini gösterdi.

**Anahtar kelimeler:** Kolesterol, Oksidan-Antioksidan enzimler, Polifenoller, Toksikasyon, Üreme hormonları

(\* Bu çalışma TÜBİTAK (Proje No: 116O027) ve Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: BAP-0474YL-17).

## ABSTRACT

### THE EFFECTS OF PUNICALAGIN ON SERUM ANTIOXIDANT LEVELS AND SOME REPRODUCTIVE HORMONES IN MALE NEW ZEALAND RABBITS EXPOSED TO BISPHENOL A

The ameliorating effects of punicalagin (PUN) were evaluated against the changes in some oxidant-antioxidant, biochemical parameters and reproductive hormones of male New Zealand White rabbits treated with bisphenol A (BPA). A total of 24 male rabbits was housed individually and adapted to laboratory conditions for 2 weeks before the experiment. After adaptation, rabbits were randomly assigned into 4 groups. The control group received tap water and corn oil. Rabbits in BPA and PUN groups received 20 mg/kg BPA in corn oil + tap water, and 2 mg/kg PUN in tap water + corn oil, respectively. Rabbits in the last group received same amounts of BPA and PUN. All treatments were administered by daily oral gavages for 9 weeks. Body weights of the rabbits were evaluated once a week and the oral doses of the treatments were adjusted accordingly. On d 63 of the experiment, blood from the ear artery was collected and used for the evaluation of some hormones and biochemical parameters. After blood collection, rabbits were sacrificed, the internal organs were immediately removed, washed with PBS and stored at -80°C until analyzed. The PROC GLM procedure and Dunnett post hoc analysis were used for statistical evaluations. At the end of the experiment, serum inhibin, FSH, LH, FSH/LH ratio, FSH/inhibin ratio, plasma Mg, P, Ca, Na, K, bilirubin, albumin and total plasma protein levels were similar among the groups ( $P>0.1$ ). However, serum cholesterol, LDL, HDL, amylase, lipase, CRP, GGT levels were negatively affected by BPA ( $P<0.05$ ). In addition, BPA treatment significantly augmented malondialdehyde levels in plasma, testis, liver and kidney tissues ( $P<0.05$ ). However, PUN treatment significantly improved these parameters, up to control levels, when coupled with BPA. The results indicated that PUN has ameliorating effects in neutralizing the possible toxic effects of BPA in male rabbits.

**Key words:** Cholesterol, Oxidant-Antioxidant enzymes, Polyphenols, Reproductive hormones, Toxication

(\*)This study was supported by TUBITAK (Project Number: 116O027) and Burdur Mehmet Akif Ersoy University Scientific Research Projects Unit (Project Number: BAP-0474YL-17).

## 1. GİRİŞ

Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyip, bu maddelerin meydana getirdiği hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere vücutta görev yapan savunma sistemlerimizdir (Şener ve ark., 2009). Antioksidanlar canlının kendi ürettiği (endojen) veya dışarıdan aldığı (eksojen) maddelerdir. Glutasyon peroksidaz (GPx), glutasyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi maddeler vücudumuz tarafından üretilen endojen antioksidanlardır. Dışardan alınan, eksojen kaynaklı enzimatik olmayan antioksidanlar arasında ise  $\beta$ -karoten (Vitamin A), askorbik asit (Vitamin C),  $\alpha$ - tokoferol (Vitamin E) ve folik asit (Vitamin B9) gibi moleküller sayılabilir. Oksidatif stres, serbest radikallerin oluşturduğu ortamda eksik indirgenmiş oksijenlerin kendini stabil hale getirme çabasıdır. Bu yüzden ortamdan hidrojen iyonu çekerler. Serbest halde bulunan hidrojen atomu ise DNA'ya veya hücre zarına zarar verebilir. Benzer bir şekilde, serbest oksijen radikallerinden biri olan hidroksil radikali (OH), hem hücrelerin membranlarında lipid peroksidasyonuna hem de DNA zararlarına neden olmaktadır (Aydemir ve ark., 2009). Bu yüzden canlıların serbest radikallerin etkilerinden korunmak için belli seviyelerde antioksidanlara ihtiyacı vardır.

Hayatımızın devamı için ihtiyaç duyduğumuz gıdaların saklanması ve pişirilmesi de dahil, günlük yaşamda kullandığımız çoğu plastik üründe karşımıza çıkan bisfenol A'nın (BPA) toksik etkileri üzerine son yıllarda oldukça fazla araştırma yapılmaktadır. Endüstriyel bir kimyasal madde olan BPA'nın yoğun olarak kullanılmasının insan sağlığını olumsuz etkileyebileceği ve vücudumuzda oksidatif stresin artmasına yol açabileceği düşünülmektedir (Heba ve Abdel-Towab 2017; Ropero ve ark., 2008). Bu kimyasal madde üzerine yapılan farklı çalışmalarda, BPA'nın doku ve organlarda oksidatif strese yol açabileceği, endokrin sistemi olumsuz yönde etkileyebileceği ve dolayısı ile metabolik, hormonal ve reproduktif problemlere sebep olabileceği bildirilmiştir (Ogo ve ark., 2017). Günümüzde, artan oksidatif strese karşı endojen kaynaklı antioksidanların tek başına yeterli olamayabileceği tartışılmaktadır (Suhendi ve ark., 2018). Bu durum

araştırmacıları, tek başına oksidatif strese neden olduğu düşünölen BPA'ya ve dolayısı ile başka oksidatif stres kaynaklarına karşı, BPA kullanımında kısıtlamaya gidilmesinin yanında, stresi azaltmak için besinsel çözüm bulmaya itmektedir.

Coğrafyamızda sıklıkla tüketilen nar meyvesinde (*Punica granatum L.*) bolca bulunan bir ellagitanin olan punikalajinin, nar suyundaki antioksidan özelliklerin en önemli kısmından sorumlu olduğu düşünölmektedir (Gil ve ark., 2000). Yüksek antioksidan kapasitesi sebebiyle punikalajinin yangı önleyici (Jean Gilles ve ark., 2013; Lin ve ark., 1999), antimikrobiyel (Machado ve ark., 2002; Silva ark., 2015) ve karaciğer hasarından koruyucu (Lin ve ark., 2001) etkileri üzerine *in vivo* çalışmalara rastlamak mümkündür. Yapılan araştırmalar, eski çağlardan beri bilinen ve kullanılan nar meyvesindeki punikalajinin, BPA'nın olası toksik etkilerinin azaltılması veya engellenmesi için kullanılabileceğini düşöndürmektedir. Dolayısı ile tez çalışmamızda oral yolla BPA verilen erkek Yeni Zelanda tavşanlarında bu doğal antioksidanın olası koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

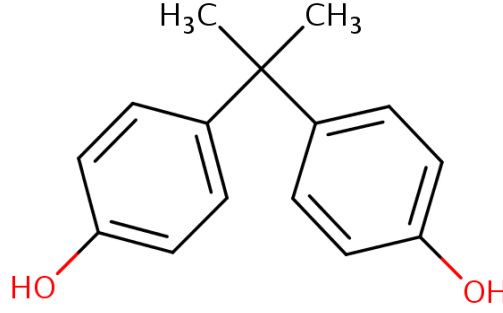
### 2.1. Bisfenol A

Endüstrinin son yıllardaki baş döndürücü ilerlemesi insanın ve doğadaki bütün canlıların endokrin sistem bozucularıyla (EDC) karşı karşıya kalma riskini artırmıştır (Sharpe, 2010). EDC'ler dış kaynaklı kimyasallar olmasına rağmen normal hormonal aktiviteyi bozucu etkiye sahiptirler (Zoeller ve ark., 2012). Ticari ürünlerde en yaygın olarak kullanılan EDC'ler arasında olan BPA dünyadaki en yüksek üretim hacmine sahip kimyasallarından biridir (Rochester, 2013; Vandenberg ve ark., 2007). Polikarbonat ve çeşitli plastik ürünlerinin üretiminde kullanılan BPA, yaygın olarak diş hekimliğinde tedavilerde kullanılan medikal ürünlerde, konserve kutularının iç yüzeylerinin kaplamalarında, biberonlarda, içecek kutularında, ve katkı maddelerinde kullanılmaktadır (Dekant ve Völkel, 2008; Vom Saal ve Hughes, 2005). BPA çevremizde çok yaygın olarak bulunmakta, bu yüzden hem besin hem de besin dışı kaynaklardan BPA'ya maruz kalınabilmektedir (Geens ve ark., 2012). BPA'nın insanda serum, idrar, plasental doku, göbek kordonu kanı ve anne sütünde tespit edilmesi bu kimyasalın ne kadar yaygın olduğunun bir kanıtıdır (Geens ve ark., 2012; Rochester, 2013). BPA'ya maruz kalma oranlarındaki artış ve buna bağlı olası sağlık etkileri konusundaki artan endişe, Kuzey Amerika ve Avrupa Birliği'nde BPA'nın üretimi ve kullanımı ile ilgili düzenlemelere gidilmesine yol açmıştır (Chen ve ark., 2016).

#### 2.1.1. BPA'nın Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

BPA (CAS 80-05-7; 4,40 -dihydroxy-2,2-diphenylpropane) iki mol fenolün bir mol aseton ile yüksek sıcaklıklarda birleşmesiyle oluşan endüstriyel bir kimyasal maddedir (Şekil 2.1). 1890'larda sentetik östrojen olarak geliştirilen BPA'nın, 1930'larda rat uterusunda östrojenik etkilere sahip olduğu ortaya kondu. Genelde üretilen BPA %99-99.8 saflıkta olmaktadır (Prokop ve ark.,2004). 25°C'deki yoğunluğu 1.1-1.2 g/L<sup>-1</sup> olan BPA katı, krem-beyaz renkte, fenolik kokulu ve kristal yapıdadır. Aseton, etanol, ve dimetilsülfoksit (DMSO) gibi çözücülerde iyi

çözünmektedir. Sudaki çözünürlüğü çok düşüktür ve 25°C’de 120 mgL<sup>-1</sup>’dir (Johnson ve Harvey, 2002; Kosky ve Guggenheim, 1991).



**Şekil 2.1.** BPA’nın kimyasal yapısı

### 2.1.2. BPA’nın Başlıca Kaynakları

1940’lı yıllardan bu yana üretimi yapılan BPA, özellikle polikarbonat gibi polimerlerin yapımında, epoksi yapıştırıcılarda, polivinil klorür (PVC) plastiklerde ve ateş söndürücülerde (tetrabromobisfenol A) kullanılmaktadır (Geens ve ark., 2011). Tüm dünyada 2002 yılında 2.8 milyon ton, 2011 yılında ise yaklaşık 5.5 milyon ton BPA üretildiği bildirilmiştir. Ancak üretilen polikarbonatların sadece %3’ü, epoksilerin ise %10’u yiyecek ve içeceklerle doğrudan temas etmektedir (Plastics Europe, 2008). Polikarbonatlar, özellikle yiyecek ve içeceklerle temas edebilen ve tekrar kullanılabilen plastik şişeler, biberonlar, tabaklar, mikrodalga fırınlarda kullanılan kaplar ve saklama kapları gibi ürünlerde bulunmaktadır. Epoksi yapıştırıcılar ise yiyecek ve içecekleri saklama için kullanılan konserve kutularının kaplanması için kullanılmaktadır (EFSA, 2006). Ayrıca güneş gözlüklerinde, yapı malzemelerinde, medikal aletlerde, dental malzemelerde, CD-ROM’larda ve termal kağıtlarda da BPA kullanılmaktadır (Geens ve ark., 2011). Günümüzde BPA’ya gıda, inhalasyon ve dermal yolla maruz kalmak mümkündür.

### **2.1.3. Gıda Yoluyla BPA Alımı**

Gıdalarımız BPA'nın ana geçiş yolu olarak kabul edilmektedir. Gıdalarımızın polikarbon veya epoksi yapıştırıcı bulunduran paketleme materyalleri ile teması kontaminasyona yol açabilmektedir. Epoksi yapıştırıcılar konserve kutuların iç kaplamasında yiyeceklerin metal ile doğrudan temasını ve kutu iç yüzeyinin paslanmasını önlemek için kullanılmaktadır (Cao ve ark., 2011; Goodson ve ark., 2002). Bu koruyucu tabaka cam şişe ve kavanozlarda kullanılan kapaklarının iç yüzeylerinde de bulunmaktadır (Cao ve ark., 2011). Polimerizasyonun tam yapılmadığı durumlarda, özellikle yüksek sıcaklıklarda ve depolama sırasında, BPA'nın yiyecek ve içeceklere geçtiği gözlenmiştir (Cao ve ark., 2011; Geens ve ark., 2010; Noonan ve ark., 2011).

#### **2.1.3.1. Epoksi Yapıştırıcılar Yoluyla BPA Alımı**

Sterilizasyon işlemi sırasında konserve kutuların kaplamalarında bulunan serbest BPA'nın en az % 80'inin kabın içerisinde bulunan ürünlere geçtiği gözlenmiştir (Goodson ve ark., 2002). Isıtma süresinden ziyade, işlem sırasında kullanılan sıcaklığın artışı BPA'nın geçişini hızlandırmaktadır (Kang ve Kondo, 2003). Beş gün boyunca konserve çorba içen 75 gönüllüdeki idrar BPA seviyeleri, aynı zaman diliminde taze yiyecek tüketenlere göre % 1200 artış göstermiştir (Carwile ve ark., 2011). Üç gün boyunca paketlenmemiş taze ürün tüketen bireylerin idrarlarında bulunan BPA seviyeleri ise % 66 oranında azalmıştır (Rudel ve ark., 2011).

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir araştırmada, rastgele olarak market raflarından alınan 78 konserve ürünün % 91'inin 7-730 ng/g düzeyinde BPA içerdiği açıklanmıştır (Noonan ve ark., 2011). Kanada'da 78 örnekle yapılan başka bir çalışmada bu oran % 99 olarak tespit edilirken, konserve içeriğindeki BPA oranı 0,6-534 ng/g düzeyleri arasında değişmiştir (Sajki ve ark., 2007). Japonya'da ise market raflarından rastgele seçilen 48 konserve ürünün yaklaşık % 92'sinin 1-842 ng/g seviyelerinde BPA içerdiği rapor edilmiştir (Sajki ve ark., 2007). En düşük BPA

sızıntısı ise Güney Kore’de yapılan bir çalışmada % 64 olarak belirtilmiştir (Lim ve ark., 2009). Gıda yoluyla alınan BPA’nın ülkelere göre farklı kutular ve kaplama malzemelerinin kullanılması, ürüne geçen BPA seviyesinde oynamalara sebep olabileceği düşünülmektedir (Geens ve ark., 2012).

### **2.1.3.2. Polikarbon Kullanılan Ürünler**

Halk arasında polikarbon ürünlerden BPA geçişi konusunda çok fazla kaygı bulunmaktadır. Buna rağmen, polikarbon malzemedeki BPA geçişi çok olağandışı koşullarda bile (100°C, 1 saat) düşük seviyelerde ve 0,1-1 µg/L düzeylerinde bulunmuştur (Biedermann-Brem ve Grob, 2009). Biberonlardan BPA geçişi sıcaklık ve bu sıcaklığa maruz kalma süresi uzadıkça artmıştır (Le ve ark., 2008). Mikrodalga fırınlarda ısıtmanın etkisine rastlanmazken, BPA geçişinin, sıcaklık artışı ile paralel bir şekilde artış gösterdiği bildirilmiştir (De Coensel ve ark., 2009; Ehlert ve ark., 2008). Buna rağmen, biberonlardan BPA geçişi, normal kullanım şartlarında, tolere edilebilen günlük alımın çok altında kalmıştır.

Normal şartlarda polikarbon şişelerinin tekrar tekrar kullanılmasıyla birlikte BPA’nın şişe içerisindeki sıvıya geçişinde bir azalma gözlenirse de, bir çalışmada, polikarbon materyallerin zaman içerisinde kullanıma bağlı aşınmasıyla birlikte BPA’nın şişe içeriğine göçünde bir artış olduğunu bildirmektedir (Brede ve ark., 2003). Biedermann-Brem ve Grob’un (2009) yılında yaptığı bir çalışmada BPA geçişindeki bu artışın polikarbon şişelerin sürekli kullanımına bağlı materyal eskimesine bağlı olabileceğini bildirmiştir. Bulaşık makinesinde PC materyallerin kurutulması, bu makinelerde kullanılan deterjanlardaki çözünmüş tuzların şişe duvarına yapışmasına sebep olmaktadır. Özellikle yıkamada kullanılan alkali kimyasalların şişe duvarında çökmesi, polimerin parçalanmasını ve BPA’nın serbest bırakılmasını teşvik edebilir (Biedermann-Brem ve Grob, 2009).

Polikarbon şişelerinden BPA salınımı, yüksek sıcaklık veya temas süresinin uzaması ile birlikte artmaktadır. BPA geçiş seviyelerindeki bu değişimleri göz önünde bulunduran Avrupa Komisyonu, 2011 yılında aldığı kararla şişe ve

biberonlardan BPA geçişine 600 µg/kg'a kadar izin vermiştir (EC, 2011). Bu bağlamda BPA geçişinin miktarını anlamak için yapılan araştırmalar incelendiğinde, rakamların Avrupa Komisyonu tarafından tanımlanan sınırların altında kaldığı görülmektedir. 2009 yılında yaptığı bir çalışmada 65 °C'de 60 saniye tutulan şişelerdeki BPA geçiş seviyeleri çok düşük bulunmuştur (0,30 µg /L) (De Coensel ve ark., 2009). Şişelerin 100 °C'de yaklaşık 3 dakikalık periyotlarla toplamda 3 kez mikrodalga fırında ısıtılması ile BPA geçişinin 0,73 µg /L'ye çıktığı gözlenmiştir (Ehlert ve ark.,2008). Toplam 24 saat boyunca 60 °C'de tutulan şişelerde ise BPA'nın suya geçişi 6,5 µg /L'de kalmıştır (Kubwabo ve ark., 2009). Yaklaşık 95 °C'deki buhar banyosunda 30 dakikalık sürelerle toplam 100 kere tutulan şişelerde ise BPA sızma oranı ancak 18,5 µg/L'ye yükselmiştir (Nam ve ark., 2010). Bununla birlikte 6 gün boyunca 70 °C'de tutulan şişelerde BPA geçişinin Avrupa Komisyonu tarafından belirtilen sınırlara yaklaştığı gözlenmektedir (521 µg/L) (Cao ve Corriveau, 2008).

Normal koşullarda tutulan su şişeleri içerisindeki BPA oranları da incelenmiştir. Kanada'da yapılan bir çalışmada PC malzemeyle üretilen su şişelerinde bulunan suların %80'inde, 0,5-1,4 ng/mL seviyelerinde BPA'ya rastlanmıştır (Cao ve Corriveau, 2008). Şişelerin uygun olmayan koşullarda tutulması BPA seviyelerini 8,8 ng/mL'ye kadar yükseltmiştir. Güneş ışığına maruz kalmanın BPA geçişini arttırdığı sonucuna varılmıştır. Yunanistan'da yapılan başka bir çalışmada su şişelerindeki sularda bulunan ortalama BPA seviyesi 4,4 ng/L iken 30 gün güneş ışığına maruz kalan sulardaki oran 170 ng/L'ye kadar yükselmiştir (Amiridou ve Voutsas, 2011). Ortalama 2 L su içen bir bireyde bile bu oranlar günde yaklaşık 0,006 µg/kg oranında BPA alımına eş olarak hesaplanmıştır.

#### **2.1.4. Gıda Dışı Yollarla BPA Alımı**

Buharlaştırma oranının düşük ve dolayısı ile havadaki yoğunluğunun az olması sebebiyle, BPA'nın solunum yoluyla vücuda girme ihtimali azaltılmaktadır (Dekant ve Vökel, 2008). Bununla birlikte ev tozlarının ağız yoluyla alınması önemli bir bulaştırma sebebidir. Özellikle küçük çocuklarda el-ağız temasının yüksek oluşu

kontaminasyon ihtimalini yetişkinlere oranla artırmaktadır (Calafat ve ark., 2008). Epoksi kullanılan yer döşemeleri, yapıştırıcılar, boyalar, elektronik eşyalar ve boyalı açma-kapama düğmelerinden buharlaşan ve sızan BPA'nın ev içi tozlara karışması problem yaratabilmektedir (Loganathan ve Kannan, 2011). Belçikada yapılan bir araştırmada ev içi tozlarında 10000 ng/g toz oranlarında BPA'ya rastlanmıştır. Ofislerde bu oranlar artarken, kreşlerde azalmıştır (Geens ve ark., 2009). Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan başka bir çalışmadaki ortalama değerler ise 422 ile 1460 ng/g arasında bulunmuştur (Loganathan ve Kannan, 2011). Bu tozlara ne kadar maruz kalındığı ve tozla ne kadar BPA alındığı bilinmese de bu oranların 0.006 µg/kg/gün dozundan daha az olduğu tahmin edilmektedir (Geens ve ark., 2009; Loganathan ve Kannan, 2011). Başka bir deyişle toz yoluyla vücuda giren BPA'nın toplam BPA'ya oranının %1-5'ten daha az olduğu düşünülmektedir.

Termal kağıtlarda rengin açığa çıkması için BPA kullanılmaktadır. Bu kağıtların bir yüzü BPA ile kaplanmıştır (Lassen ve ark., 2011). Sıcak etkisi ile BPA kağıtta bulunan mürekkep ile reaksiyona girerek rengin oluşmasını sağlamaktadır. Bu teknik özellikle yazar kasalarda bulunan yazıcılarda kullanılmaktadır. Avrupa ve ABD'de kullanılan termal kağıtların % 44 ile % 100'ünde BPA bulunmaktadır.

Diş hekimliğinde kullanılan kompozit reçinelerde BPA glycidyl methacrylate (bis-GMA) sıklıkla kullanılmaktadır. Bis-GMA'ya ilaveten bisfenol-A dimethacrylate (bis-DMA) monomerleri de ihtiva etmektedir. Dolayısı ile bis-DMA'dan tükürüğe BPA sızması olabilmekte ve hastaya geçebilmektedir (Van Landuyt ve ark., 2011). Yapılan çalışmalarda dolgu değişikliklerinden sonra hastalardaki BPA seviyelerinde artış gözlenmiş, bu artış akut olarak meydana gelmiş ve dolgudan 3 saat sonrasında kanda BPA'ya rastlanmamıştır (Fleisch ve ark., 2010). Molar bir dişte yapılan kaplama değişikliği sırasında, 24 saatlik periyotta, en kötü senaryoda 30 µg BPA (ortalama 13 µg BPA) salınmaktadır (Van Landuyt ve ark., 2011). Bununla birlikte, farklı markalardan salınan BPA miktarlarının da farklı olması muhtemeldir.

Kullanılan medikal aletler ve malzemeler yoluyla da BPA'nın oral yolla vücudumuza girişi mümkün olabilir. Lenslerde, tüp bağlantı aparatlarında, kan oksijenatörlerinde, yenidoğan inkübatörlerinde, nebulatörlerde ve nemlendiricilerde çok az miktarlarda olsa da BPA-bazlı polikarbon kullanılmaktadır (Geens ve ark., 2011). İntavenöz sıvıların bulunduğu torbalarda, bu sıvıların verilmesinde kullanılan hortumlarda ve kataterlerde de BPA bulunmaktadır. Ayrıca hemodiyaliz membranları da polysulfon'dan yapıldığı için, diyaliz hastalarında da BPA kontaminasyonu görülme riski bulunmaktadır (FDA, 2009).

### **2.1.5. Günlük Maruz Kalınan BPA Oranları**

Gıda yoluyla BPA'ya en çok maruz kalan yaş grubunu hem hazır bebek maması-sütü alıp hem de bu ürünleri PC biberonlardan içen 0-6 aylık bebekler oluşturmaktadır (WHO, 2010). Bebek mamalarının paketlenildiği metal kutulardan, biberonlardan BPA sızıntısının olması, bu oranları yükseltmektedir. Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Danışma Kurulu'nun 2006 yılında yayınladığı raporuna göre 3-12 aylık yaş grubunda bulunan çocuklarda diyet yoluyla ortalama BPA alımının 0,2-13 µg/kg/gün seviyelerinde olduğu bildirilmiştir (EFSA, 2006). Aynı çalışmada yetişkinlerde ise bu oran 1,5 µg/kg/gün düzeylerinde kalmıştır. Health Canada'nın 2008 yılında yayınladığı çalışmada 1-4 ve 5-11 yaş aralıklarındaki çocuklarda sırasıyla günlük 0,26-1,98 ve 0,15-1,28 µg/kg düzeyinde BPA'ya maruz kaldığı belirtilmektedir. 20 yaş üstü yetişkinlerde ise günlük BPA alımı 0,07-0,60 µg/kg bulunmuştur. FDA ise bu seviyeleri 0-12 ay yaş grubunda 0,3-0,6, 12-24 ay yaş grubunda 0,5-1,1 ve 2 yaş üstü çocuk grubunda 0,1-0,3 µg/kg/gün olarak açıklamaktadır (FDA, 2009). Dünya Sağlık Örgütü'nün 0-6 ay, 6-36 ay ve 36 ay üstü çocuklarda yaptığı çalışmalarda günlük BPA seviyeleri en yüksek 0-6 ay grubunda bulunmuş ve 4,5 µg/kg'ı aşmamıştır (WHO, 2009). Aynı çalışmada yetişkinlerin günlük 0,04-4,2 µg/kg seviyelerinde BPA'ya maruz kaldığı bildirilmiştir. Bütün bu çalışmalara göre en kötü senaryoda bile günlük alım, tolare edilebilen seviyelerin altında kalmaktadır (50 µg/kg/gün). Fakat, günlük olarak sofraya konan yiyeceklerde başka yollarla BPA geçişinin olma ihtimali göz ardı edilmemelidir. Pişirme esnasında kullanılan eşyalar, pişirme malzemeleri ve tek kullanımlık tabak ve diğer

malzemeler farklı yollardan sofraya konan son üründeki BPA seviyelerini değiştirebilir. Dolayısı ile sofraya gelen en son üründe BPA seviyelerinin daha yüksek olma ihtimali bulunmaktadır.

#### **2.1.6. BPA Metabolizması**

Oral yolla alımdan sonra BPA hızlı bir şekilde ve tamamen emilmektedir. Mide ve karaciğerde glukuronik asit ile konjuge edilmekte ve aktif olmayan BPA-glukuronit formuna dönüştürülmektedir. Az miktarda BPA ise sülfatlarla reaksiyona girerek BPA-sülfat'a dönüşebilir. BPA'nın konjüge formları vücudun bu ürünü detoksifike etme yöntemi olarak düşünülmektedir (Matthews ve ark., 2001). Sadece serbest BPA'nın östrojenik özellikleri bulunmaktadır. Konjuge BPA hızlı bir şekilde karaciğerden kana geçmekte ve idrar yoluyla atılmaktadır.

BPA'nın yarı ömrü 6 saatten azdır. İnsan ve maymunlarda oral yolla alınan BPA'nın hemen tamamı idrardan geri elde edilebilir. Böylece maruz kalınan BPA miktarını ölçmede idrar BPA seviyeleri iyi bir yöntemdir (Völkel ve ark., 2002). İnhalasyon veya dermal yolla alınan BPA'nın daha uzun süreli vücutta kalacağı düşünülmektedir. Kemirgenlerde BPA-glukuronit enterohepatik resirkülasyona tabii olduğundan, BPA'nın yarı ömrü uzamakta ve fekal yolla atılan miktarı arttırmaktadır (Pottenger ve ark., 2000). Ayrıca kemirgenlerde karaciğer ve böbrek gibi bazı dokularda bulunan  $\beta$ -glukuronidaz enzim aktivitesi BPA'nın doku seviyesinde tekrar aktif formu olan serbest forma dönmesine sebep olabilir ve zararlı etkisini artırabilir (Völkel ve ark., 2002).

#### **2.1.7. BPA'nın İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri**

BPA'nın insan sağlığı üzerine etkilerini incelerken metabolik, gelişim ve fertilité üzerine etkileri olmak üzere 3 temel başlıkta incelemek mümkündür.



### **2.1.7.1. Metabolik Etkiler**

İnsan çalışmalarında tip-2 diyabet ile BPA arasında bir ilişki olabileceği bildirilmiştir. 2003-2004 yılında ABD’de yapılan Ulusal Sağlık ve Beslenme İncelemesi çalışmasında idrarda BPA artışı ile tip 2 diyabet arasında pozitif bir korrelasyona rastlanmıştır (Shankar ve Teppala, 2011). Yüksek üriner BPA’nın kardiyovasküler hastalıklara (anjina, kalp krizi, koroner damar problemleri) yakalanma riskini arttırdığı bildirilmiştir (Lang ve ark., 2008). Melzer ve ark. (2010) 18-74 yaş aralığındaki bireylerde BPA’nın kalp problemleri oluşumunu yükselttiği sonucuna varmıştır. Ayrıca, üriner BPA seviyeleri yüksek hastalarda karaciğer fonksiyonlarında bozulmalar rapor edilmiştir (Lang ve ark., 2008).

BPA ile obezite arasında da bir ilişkiden bahsetmek mümkündür. Takeuchi ve ark. (2004) yılında serum BPA seviyesiyle vücut kitle indeksi arasındaki pozitif ilişkiyi rapor etmiştir. Obez gruptaki serum BPA, obez olmayanlara göre daha yüksek bulunmuştur. 20 yaş üzeri bireylerde üriner BPA artışının obesiteyi ve göğüs çevresi mesafesini yükselttiği belirtilmiştir (Shankar ve ark., 2012). Ayrıca, 6-19 yaş grubunda da BPA ile obezite arasındaki pozitif bağlantıdan bahsedilmektedir (Trasande ve ark., 2013).

### **2.1.7.2. Gelişim Üzerine Etkileri**

Miao ve ark. (2011) yılında ebeveynleri iş hayatlarında BPA’ya maruz kalan ve kalmayan bebeklerin doğum ağırlıklarında bir farkın olup olmadığını araştırmış, özellikle anneleri BPA’ya maruz kalan çocukların doğum ağırlıklarının daha düşük olduğu sonucuna ulaşmıştır.

BPA’nın gelişim çağındaki çocuklarda davranış üzerine etkilerinden de bahsetmek mümkündür. Braun ve ark. (2009) gebelerde yaptıkları araştırmalarda, gebeliğin 16 ve 24. haftaları ile doğum zamanı aldıkları idrar örneklerinden BPA seviyelerini incelemiş ve doğan bebekler 2 yaşlarına geldiklerinde, okul öncesi çocukların davranış özelliklerini test eden özel bir yöntem ile bu çocukları değerlendirmiştir. Özellikle kız çocuklarda sinirlilik ve hiperaktivitenin annedeki

BPA seviyelerinin artışı ile pozitif olarak etkilendiği sonucuna varılmıştır. Özellikle bu ilişki 16. haftadaki BPA ile daha doğru orantılı geliştiğinden, gebeliğin ilk dönemlerinin daha etkili olabileceği düşünülmüştür. (Braun ve ark., 2009).

### **2.1.7.3. Üreme Üzerine Etkileri**

Asya kökenli Amerikalı'larda yapılan bir çalışmada anne adaylarının serum BPA seviyelerindeki yükselmenin fertilizasyon ihtimalini % 55 oranında azalttığı sonucuna varılmıştır (Fujimoto ve ark., 2011). Başka bir çalışmada IVF başarısı da negatif olarak etkilenmiştir (Mok-Lin ve ark., 2010). Baba adaylarındaki serum BPA artışı embriyo kalitesinde düşüşe sebep olurken, BPA'nın sperm kalitesini olumsuz etkileyebileceği belirtilmiştir (Bloom ve ark., 2011). BPA üretimi yapılan fabrikalarda çalışan işçilerle yapılan çalışmalarda, üriner BPA'nın artışı ile sperm kalitesi arasında olumsuz ilişki olduğu belirtilmiştir (Li ve ark., 2010). BPA ile östrojenler, androjenler ve gonadotropinler arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmalar bulunmaktadır. Erkeklerde yüksek idrar BPA seviyeleri serum FSH ve testosteron seviyelerini artırırken, inhibin seviyesini düşürmüştür (Meeker ve ark., 2010). Kadınlarda yapılan başka bir çalışmada üriner BPA artışı ile serum testosteron seviyeleri arasında pozitif bir ilişki bulmuştur (Takeuchi ve ark., 2004). Yine erkeklerde yapılan bir çalışmada idrardaki BPA seviyesi artışının serum testosteron seviyelerini yükselttiği sonucuna varılmıştır (Galloway ve ark., 2010).

### **2.1.8. BPA Alternatifleri**

BPA ile ilgili son yıllarda oluşan kamuoyu ve ülke düzenlemeleri, BPA'nın yerini alacak alternatif maddelerin geliştirilmesini ve üretilmesini teşvik etmektedir. Bu sayede yapısal olarak BPA'ya benzeyen ve bisfenol analogları olarak isimlendirilen bir takım kimyasallar polikarbon plastik ve epoksi reçineleri imalatında kullanılmaya başlanmıştır. BPA-DGE (4,4'-izopropilidenedifenol diglisidil eter), BPAF (4,4'-hekzafloroizopropiliden difenol), BPAP (4,4'-1-feniletilden bisfenol), BPPH (2,2-bis 2-hidroksi-5-bifenilil propan), BPS (4-hidroksifenil sulfone), BPB (2,2-bis 4-hidroksifenil buta), BPBP (bis 4-hidroksifenil

difenilmetan), BPE (4,4'-etilidenbifenol), BPF (4,4'-metilenedifenol), BPG (2,2-bis(4-hidroksi-3-izopropilfenil propan), BPM (4,4'-1,3-fenilenediizopropiliden bisfenol), BPC (2,2-bis(4-hidroksi-3-metilfenil propan), BPC-diklorit (1,1-dikloro-2,2-bis(4-hidroksifenil etilen), BPP (4,4'-1,4-fenilenediizopropiliden bisfenol), BP-TMC (1,1-bis(4-hidroksifenil -3,3,5-trimetilsikloheksane) ve BPZ (4,4'-sikloheksilidenebisfenol) endüstriyel uygulamalar için bisfenol analogları olarak belgelenmiştir (Chen ve ark., 2016). Bunların arasında BPF, BPS ve BPAF en çok kullanım alanı bulanlardır. Sayısız BPA çalışmalarıyla kıyaslandığında, diğer bisfenol analogları üzerine yapılan araştırmalar halen sınırlı olmasına rağmen analoglarının da çeşitli toksik etkileri olabileceği bildirmiştir (Chen ve ark., 2016; Rochester ve ark. 2015). Bu durum BPA içermeyen malzemeleri kullanırken, en azından yeteri kadar bilimsel çalışma yapılmadan, hala şüpheli davranmamız gerektiğini göstermektedir.

## 2.2. Ellagitanninler

Tanenler, çok çeşitli biyolojik aktiviteye sahip polifenolik bileşiklerdir. Tanenlerin çoğu antioksidan etkilere sahiptir. Bu yüzden mantarlar, tümör hücreleri ve virüs gibi çeşitli organizmalar üzerine etkili olabilirler. Tanenler çeşitli gıda ve yem bitkilerinde bulunmaktadır. Bunlara sorgum, arpa, kuru fasulye, faba fasulyesi, bezelye, karob, kanatlı fasulye ve diğer baklagiller dahildir. Elma, muz, böğürtlen, kıvılcık, hurma, üzüm, alıç, şeftali, armut, trabzon hurması, erik, ahududu ve çilek gibi meyveler de kayda değer miktarda tanen içerir. Aynı şekilde, bu fenolik bileşikler çayda da bulunur (Akiyama ve ark. 2001).

Bate-Smith ve Swain, bitkisel taninleri 500-3000 D arasında moleküler ağırlığa sahip ve suda çözünür fenolik bileşikler olarak tanımlamıştır (Bate-Smith ve Swain, 1962). Bu polifenoller çok sayıda hidroksil veya diğer fonksiyonel grupları (100 D başına 1-2) içerir ve bu nedenle proteinler ve diğer makromoleküller ile çapraz bağlar oluşturabilir. Düşük molekül ağırlıklı fenolik bileşikler (moleküler ağırlık <500) ve yüksek molekül ağırlıklı olanlar (moleküler ağırlık >3000) biyolojik olarak aktif değildir.

Başlangıçta tanen terimi, deride renk değişimi için kullanılabilir doğal bir bileşik anlamına gelmekteydi. Tanen aslında hayvan postunu deri haline dönüştürmede kullanılan ve bitki özlerinde bulunan maddeleri tanımlamak için kullanılmıştı. Bugün ise tanenler, kaynaklarına ve kimyasal yapılarına göre birden fazla sınıfa ayrılmasına rağmen, kabaca iki ana kategoriye ayrılır: yoğunlaştırılmış ve hidrolize tanenler. Ellagitanninler ise hidrolize edilebilir tanenler kategorisinde yer alır (Okuda ve Ito, 2011).

Ellagitanninler oluşumu için biyosentetik yollar kullanılır ve bu sayede çok çeşitlili formalarda ellagitanninlerin oluşması mümkündür. Biyosentezin ilk aşamasında,  $\beta$ -pentagalloyl glikoz galloyl grupları, heksahidroksidifenol (HHDP) grubunu üretmek için oksidatif olarak birleşir (Niemetz ve Gross, 2003).  $\beta$ -pentagalloyl glikozun beş galloyl grubundan herhangi ikisi birleşebileceği gibi, HHDP grubunda R veya S aksiyal kiralitesinin oluşması mümkündür. Bu nedenle, kombinasyon sayısı 20'dir. İlk HHDP grubunun oluşumundan sonra, ikinci HHDP grubu cuspinin olarak üretilir. HHDP'nin ester bağlarının bölünmesi ile galloyl gruplarının geri kalanı corilagin'i oluşturur. Oksidatif bağlanmanın devamında, sırasıyla, nonahidroksitrofenil (NHDP; flavogalloni) ve gallagil grupları olarak adlandırılan galloyl grubunun trimer ve tetramerinin oluşmasına yol açar (Pouységu ve ark., 2011). Ek olarak, galloyl ve HHDP grupları "C-O" bağı yoluyla oksidatif olarak bağlanarak sanguisorboil, ergalloil, valoneoil ve diğer farklı grupları üretebilir (Li ve ark., 2007). C-O bağlantılı bileşenlerin üretimi, dimerik ve daha büyük ellagitanninlerin oluşumuna yol açarak çeşitliliği daha fazla artırır. HHDP grubu, dehidroheksahidroksidifenoil (DHHDP), chebuloil ve diğer grupları oluşturmak için oksitlenebilir. Ayrıca, ellagitanninler, acutissimin A ve hirsunun gibi ellagitanninlerin dışındaki bileşenlerle birleşebilir ve çok farklı yapılar oluşturabilir (Lee ve ark., 1992).

## 2.2.1. Punikalajin

### 2.2.1.1. Kaynakları

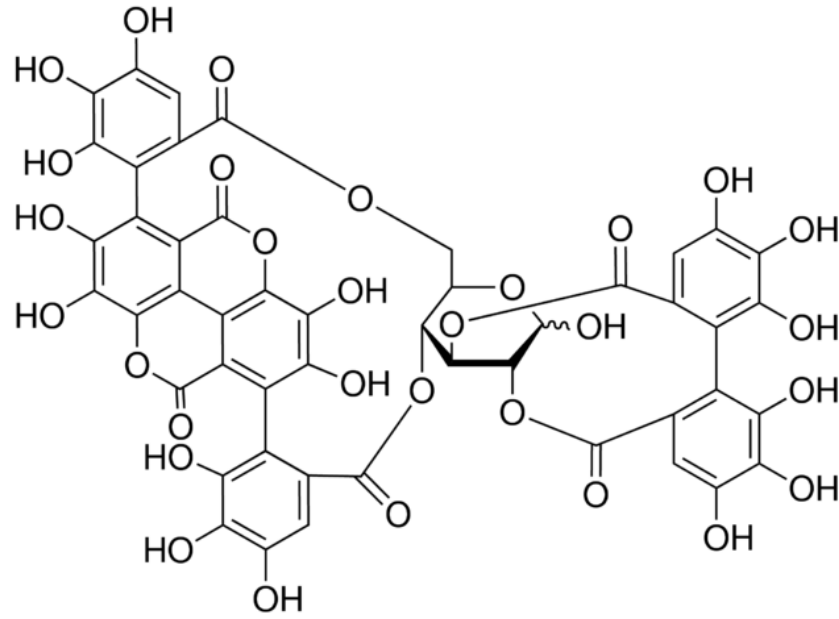
Punikalajinin en önemli kaynakları olarak nar (*Punica granatum*) ile beraber, *Combretaceae* ailesine ait *Terminalia catappa*, *Terminalia myriocarpa*, ve *Combretum molle* bitkileri gösterilebilir. Nar, boyu 5-10 m arasında değişen, *Lythraceae* ailesinde ait, meyveli ve yaprak döken küçük bir ağaçtır. Nar bitkisinde bulunan polifenoller arasında en fazla punikalajinin olduğu bildirilmiştir (Lu J ve ark., 2008). Nar meyvesinin kabuk kısımları da (perikarp) yüksek oranda fenolik punikalajin içerir. Ayrıca nar bitkisinin yaprakları, gövde kabukları, kökleri ve kabuğunda punikalajin bulunmaktadır (Martel ve ark., 2016). Meyve suyu işleme sırasında, nar meyvesi bütün olarak preslendiğinden, ellagitanninler önemli miktarlarda nar suyuna geçer (2 g/L) (Gil ve ark., 2000). Muz, mango ve hindistancevizi gibi diğer meyve kabukları arasında nar kabuğu, *in vitro* olarak en yüksek antioksidan kapasitesine sahiptir (Okonogi ve ark., 2007).

*Terminalia catappa*, başta Asya, Afrika ve Avustralya'nın tropikal bölgelerinde yetişen büyük bir tropikal ağaçtır. Yaygın olarak Hint bademi, deniz bademi veya tropikal badem olarak isimlendirilmektedir. *Terminalia myriocarpa*, Güneydoğu Asya'da bulunan, yaprak dökmeyen ve Doğu Hint bademi olarak isimlendirilen bir ağaç türüdür. *Combretum molle* ise batı, doğu ve Güney Afrika'da bulunan, 3-13 m yüksekliğinde küçük, ve yaprak döken *Combretum* cinsinde bir ağaçtır. Bu ağaçları yaprak ve gövdelerinde punikalajinin bulunduğu tespit edilmiştir (Asres ve ark., 2001; Marzouk ve ark., 2002).

### 2.2.1.2. Punikalajinin Kimyasal Yapısı ve Genel Özellikleri

Punikalajin; punikalın, ellagik asit ve gallagik asit adı verilen tanenleri içeren ellagitannin ailesinin bir parçasıdır. Bir polifenol olan punikalajin yapısında bir gallik asit ve glikoza bağlı bir ellagik asit bulundurulur. Dolayısı ile, punikalajin dahil olmak üzere, tüm bu ellagitanninler ellagik aside hidrolize olma yeteneğine sahiptir. Bu sayede ellagik asidin kana uzun süre salınmasına neden olur (Cerda ve ark.2003).

Punikalajin bilinen en büyük polifenollerden biridir. Moleküler ağırlığı 1084.722 g/mol olan punikalajinin moleküler formülü  $C_{48}H_{28}O_{30}$ 'dur. Toplamda 16 adet ayrışabilir  $-OH$  grubuna sahip olması sebebiyle güçlü bir antioksidan özelliğe sahiptir (Şekil 2.2). Doğada birbirlerine dönüşebilen  $\alpha$  ve  $\beta$  anomerleri şeklinde bulunur. Yağda kolay erimeyen punikalajin, mililitrede 5 mg dozunda metanolde eriyerek berrak bir çözelti oluşturur. Rengi soluk sarıdan koyu sarıya değişebilir ve suda kolayca erir (Sohrab ve ark., 2014). (Şekil 2.3)



**Şekil 2.2.** Punikalajinin kimyasal yapısı. kaynak: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/16129869>



**Şekil 2.3.** Punikalajinin fiziksel görünümü

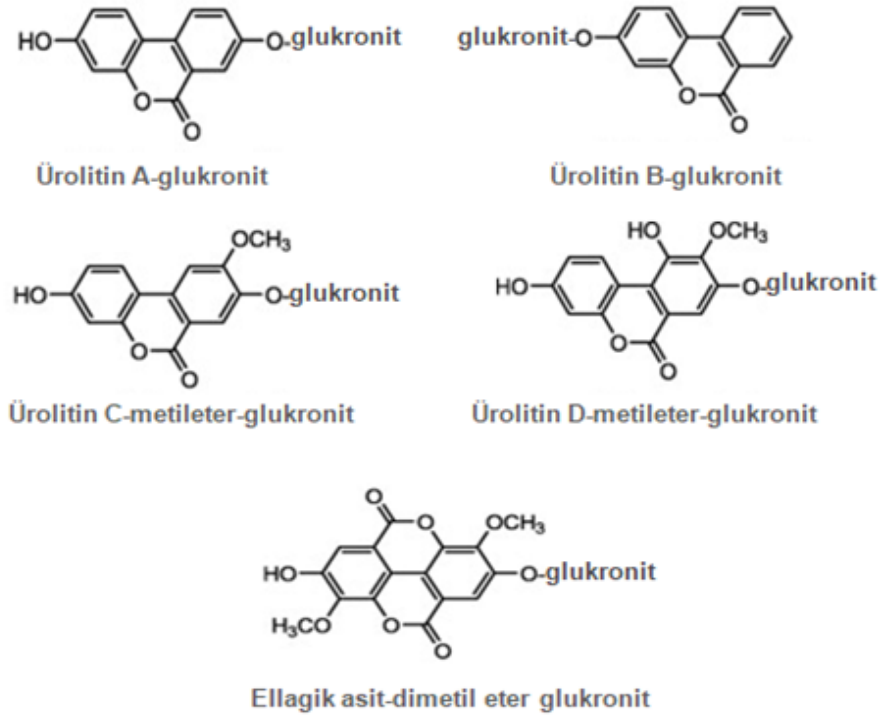
### 2.2.1.3. Ellagik asit ve Ellagitanninlerin Genel Metabolizması

Hidrolizi sonrası gallik ve ellagik asite ayrılan punikalajinin emilimini ve metabolizmasını anlamak, bu ellagitanenin sağlık üzerindeki potansiyel tıbbi etkilerini değerlendirmek için gereklidir. Ellagitanninlerin genel olarak tek midelilerin midesindeki fizyolojik koşullara dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Midede bulunan asidik koşullar (pH 1.8-2.0) ve mide enzimleri, ellagitanninleri parçalayamaz ve ellagik asit dönüşümüne izin vermez (Tomas-Barberan ve ark., 2014). Dolayısı ile mide ellagik asit için ilk emilim yeri olsa da, ellagitenler buradan emilemezler. Bununla birlikte, ince barsakta bulunan fizyolojik ortamlarda ellagitanninlerden serbest ellagik asit dönüşümünün olduğu anlaşılmaktadır. Bu hidroliz, pankreas enzimlerinin ve safra tuzlarının etkisinden ziyade, pH koşullarına (hafif alkalin pH, 7.0–7.3'e nötr) ve bakterilere bağlı gibi görünmektedir (Larrosa ve ark., 2006).

İnsan gastrointestinal ve kolon hücreleri kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmalarda ellagitanninlerin bu hücreler tarafından emilmediği gözlenirken, ellagik asitin hızlı bir şekilde bu hücrelerden emildiği ve katekol-O-metil transferaz enzimi ile hızlı bir şekilde metil konjigasyona uğradığı anlaşılmaktadır. Bu enzim ellagik asitte bulunan fenolik hidroksil gruplarına bir veya iki metil grubunu eklemekte ve ellagik asitin monometil ve dimetil eter'lerini oluşturmaktadır. Ayrıca, *in vitro* ortamda aynı hücrelerde glukuronik asit ile konjigasyon da gözlenmiştir. Punikalajinin kolon hücre kültürlerinde ellagik asite hidrolize olduğu ve ellagik asit formunda emildiği tespit edilmiştir (Larrosa ve ark., 2006). Bu hücrelerden ilk görülen ellagik asit metaboliti, katekol-O-metil transferaz enzimi tarafından dönüştürülen dimetil-ellagik asit olmuştur. Daha sonra kolon hücreleri tarafından glukuronik asitle konjigasyon sonucu en fazla bulunan metabolit olan dimetil-ellagik asit glukuronit oluşmaktadır. Küçük miktarlarda dimetil sülfatlar da üretilmektedir (Larrosa ve ark., 2006).

Hayvanlarda yapılan çalışmalar ellagik asitin sıçanlarda hızlı bir şekilde emilip metabolize olduğunu göstermiştir (Doyle ve Griffiths, 1980). Bu çalışmada

punikalajinin antioksidan etkisinden sorumlu oldukları düşünölen ürolitin A ve B metabolitleri hem gayta hem de idrarda bulunmuştur. İnce barsakta anaerobik bakteriler tarafından başlatılan mikrobiyal transformasyon, hidroksil grupların ürolitin A ve B'ye ayrılması ile devam etmektedir. Ürolitin A ve B'nin yanı sıra ürolitin C ve D formları da barsaklarda bulunabilir. Ürolitin A ve B metabolitleri bünyelerinde hiç bir mikroorganizma barındırmayan sıçanlarda oluşmadığından, bu metabolitlerin mikroflora tarafından oluşturulduğu anlaşılmaktadır. Ürolitinlerin büyük ölçüde barsaktan emildiği ve ince barsakta glukuronize edildiği gözlenmiştir (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Ellagitanin alınımından sonra plazma ve idrarda rastlanan ellagik asit metabolitleri (Larrosa M ve ark., 2006)

Farelerde yapılan başka bir çalışmada, hayvanların idrar, safra ve kanlarında ellagik asit ve bazı konjugatlarına (sülfat esterleri, glukronit ve glutasyon gibi) rastlanmıştır (Teel ve Martin, 1988). Ellagik asit emilimi oral yolla alımdan sonra 2 saat içerisinde oluşmuştur. Sıçanlarda nar kabuğuyla yapılan bir çalışmada bu hayvanlara diyetlerinin % 6'sı oranında ellagitanen verilmiştir (Cerde ve ark., 2003).



Oral yolla alınan punikalajinin % 3-6'sının metabolitler şeklinde idrar ve gayta yoluyla atıldığı belirtilmiştir. Bu kadar az miktarda punikalajinin atılıyor olması, ellagitaninlerin ya dönüştürüldüğü ya da dokularda biriktiği anlamına gelmektedir. Gaytada punikalajinin, kolonda bulunan mikroflora tarafından ellagik asit ve gallagik asit gibi hidroliz ürünlerine ve ürolitine dönüştürüldüğü anlaşılmıştır. Plazmada yaklaşık 30 µg/mL civarında punikalajine rastlanmıştır ve punikalajin gibi büyük bir molekülün emildiğini göstermesi açısından önemlidir. Bu çalışmada plazmada ellagik asitin glukuronit ve metil eter konjugatları da tespit edilmiştir.

### **2.3.Punikalajinin Sağlık Üzerine Etkileri**

#### **2.3.1. Antioksidan etkiler**

Oksidatif stres günümüzde ciddi bir sorundur. Oksidatif stres, kanser, inflamasyon, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma gibi faktörlerin gelişiminde kritik bir adımdır (Kehrer, 1993; Storz, 2005). Canlılar oksidatif stresle başa çıkabilmek için çeşitli stratejilere sahiptir. Bunlar içerisinde SOD, katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle glutatyon ve  $\alpha$ - tokoferol gibi endojen ve eksojen ajanlar sayılabilir. Bazı eksojen kaynaklı antioksidanlar diyet tarafından temin edilebileceğinden, beslenme ve antioksidan savunma sistemi arasındaki birbirlerini destekleyen bir ilişki bulunur. Bu iki sistemin koordinasyonu, birbirlerinin antioksidan seviyelerini ayarlayarak, oksidatif stres olaylarına karşı koruma sağlar (Masella ve ark., 2005). Bilimsel kanıtlar, antioksidanların kanser ve kalp hastalığı da dahil olmak üzere kronik hastalık riskini azaltmada rol oynayabileceğini göstermektedir. Bu sayede diyet ile alınacak eksojen antioksidanlar olası oksidatif hasarı önlemeye yardımcı olabilir. Bu gerçek, potansiyel doğal antioksidan kaynakların araştırılması için önemli bir sebep olmuştur (Benzie, 2003; Ross ve Kasum, 2002).

Polifenoller, metal şelatlama, serbest radikal süpürme, enzim modülasyonu, hücre sinyali ve moleküler transkripsiyonu gibi çok geniş bir alanda oksidatif stresten koruyucu eylemlerden sorumludur (Heim ve ark., 2002; Rice-Evans ve ark., 1996;

Tapiero ve ark., 2002; Williams ve ark. 2004). Yapısında bulundurduğu ayrışabilir hidroksil grupları, punikalajinin kuvvetli bir antioksidan kapasitesine sahip olmasını sağlamaktadır (Kulkarni ve ark., 2007). Punikalajin ayrıca singlet oksijeni ve lipid peroksidasyonunu baskılayıcı etkisinden dolayı kuvvetli bir serbest radikal süpürücüsüdür ve doku hasarlarına karşı koruyucu rol oynayabilir (Vora ve ark., 2015).

Bu bağlamda punikalajinin akciğer ve karaciğer dokusundaki etkilerini inceleyen çalışmalara rastlamak mümkündür. Dişi sıçanların akciğer dokusundaki endojen bir antioksidan olan glutatyon düzeyleri, 19 gün boyunca 1500 ppm dozunda yeme ilave edilen punikalajin grubunda, kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur (Aqil ve ark., 2012). Ayrıca punikalajinin koruyucu etkisine karaciğer dokusunda da rastlamak mümkündür. Lin ve arkadaşlarının (1998), yapmış olduğu bir çalışmada erkek sıçanlarda intraperitoneal yolla, 12,5 mg/kg dozda punikalajin uygulaması yapılmıştır. Bu çalışmada, *Terminalia catappa* L. yapraklarından izole edilen punikalajinin karbontetraklorid (CCl<sub>4</sub>) ile oluşturulan karaciğer hasarını önlemede etkili olduğu ortaya konmuştur (Lin ve ark., 1998). Erkek sıçanlarda yapılan farklı bir çalışmada, asetaminofen ile oluşturulan karaciğer harabiyeti neticesinde artan serum ALT ve AST seviyelerinin intraperitoneal olarak 5 mg/kg dozunda verilen punikalajin uygulamalarını takiben azaldığı gözlenmiştir. Punikalajinin antioksidan özelliği sayesinde histopatolojik olarak karaciğer dokusunda belirli oranda bir iyileşmeye yol açtığı da anlaşılmıştır. Bunlara ilaveten, punikalajin uygulamalarının karaciğer dokusundaki CAT ve GPx enzim aktivitesini de artırdığı görülmüştür (Lin ve ark., 2001).

Kimyasalların antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılan farklı yöntemler bulunmaktadır. Gıdalardaki antioksidan kapasiteyi ortaya koymak için kullanılan yöntemlerden bir tanesi, hızlı, basit ve ucuz bir yöntem olan, 2, 2-Diphenil-1 - picrylhydrazyl (DPPH) serbest radikali kullanımıdır. Bu yönteme bileşiklerin serbest radikal süpürücüler veya hidrojen bağışçuları olarak hareket etme yeteneğini test etmek ve antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için yaygın olarak başvurulur. DPPH yöntemi, kararlı bir serbest radikal olan DPPH'nin indirgenmesine

dayanır. Tek bir elektrona sahip serbest radikal DPPH, 517 nm'de maksimum absorpsiyon sağlar. Antioksidanlar, kararlı bir serbest radikal olan DPPH ile reaksiyona girdiğinde, bir hidrojen donörü varlığında eşlenir ve DPPH-H'ye düşürülür ve sonuç olarak absorbans azalır. Absorbans hangi derecede azalırsa, test edilen kimyasal için, o oranda bir antioksidan kapasiteden bahsedilir. Daha fazla renk giderme daha yüksek bir antioksidan kapasiteyi göstermektedir (Shekhar ve Anju, 2014).

Yine farklı kimyasalların antioksidan kapasitelerini analiz etmede kullanılan başka bir yöntem ise hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) süpürücü etkidir. Antioksidan moleküller,  $H_2O_2$ 'ye bir elektron vererek, bu radikali suya ( $H_2O$ ) dönüştürmektedir. Punikalajinin farklı dozları ile yapılan bir çalışmada (0,05, 0,1 ve 0,15 mg/mL) bu polifenolün DPPH ve  $H_2O_2$  üzerine etkisi incelenmiştir. Punikalajinin hem DPPH hem de  $H_2O_2$  üzerine doza bağlı artan oranlarda güçlü bir baskılayıcı etkisi olduğu gözlenmiştir (Li ve ark., 2007). Punikalajinin DPPH süpürücü etkisi sentetik bir antioksidan olan bütil hidroksi toluen'e (BHT;  $C_{15}H_{24}O$ ) eş değer olarak bulunmuş, doğal bir antioksidan olan troloks'tan ise az da olsa düşük bulunmuştur. Punikalajinin  $H_2O_2$  süpürücü etkisi DPPH'ye benzer şekilde BHT'ye oranla yüksek olarak bulunurken, troloks ile arasında bir fark gözlenmemiştir. (Aloqbi ve ark. 2016; Sun Yq ve ark 2017)

### 2.3.2. Antibakteriyel etki

Nar bitkisinin antibakteriyel etkisine dair kullanımına çok eski zamanlardan beri rastlanmaktadır. Eski Mısırlılar nar meyvesinden, meyve kabuklarından ve nar ağacının kabuklarından elde edilen sıvıları farklı hastalıkların tedavisi için kullanmışlardır. Özellikle meyve kabuğundan elde edilen ve punikalajinin gibi taninlerce zengin metanol ekstraktlarının *E. coli*, *Salmonella* türleri, *Staphylococcus* türleri, *Streptococcus* türleri ve *Listeria monocytogenes* gibi bir çok patojene karşı baskılayıcı özelliğinden bahsedilmektedir (Foss ve ark., 2014).

Bir maddenin bakteriler üzerine etkilerini incelemek için farklı farmakokinetik yöntemler bulunmaktadır. Bu *in vitro* yöntemler arasında, spesifik

inkübasyon koşullarında hedef bakterilerin çoğalmasını *in vitro* inhibe eden en düşük antibakteriyel konsantrasyon, minimum baskılayıcı konsantrasyon (MIC), başlangıçtaki bakteri popülasyonunu % 99.99 oranında azaltabilen en düşük antibakteriyel konsantrasyon ise minimum bakterisidal konsantrasyon (MBC) olarak tanımlanır.

Nar özütlerinin enterik bakteriler üzerine etkileri üzerine farklı çalışmalar yapılmıştır. Hemorajik ishale neden olan enterohemorajik *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli*) de dahil olmak üzere birçok gıda kaynaklı bakteri ciddi gastrointestinal enfeksiyonlara neden olabilir. Tayland'da yapılan iki farklı çalışmada, *E. coli* O157:H7 suşları da dahil olmak üzere farklı *E. coli* suşlarına karşı antibakteriyel aktivitesi için nar özütleri test edilmiştir (Voravuthikunchai, 2004; Voravuthikunchai ve Limsuwan, 2006). Bu çalışmalarda nardan elde etanol özütlerinin *E. coli* O157:H7'ye karşı MIC ve MBC değerleri üzerine son derece etkili olduğu gözlenmiştir. Bu ekstraktın, hem bakteriyostatik hem de bakterisidal faaliyetler sergilediği ve *E. coli* O157:H7 enfeksiyonu için etkili bir yardımcı tedavi olabileceği sonucuna varıldı.

Sanayileşmesi az olan ülkelerde daha yaygın olarak rastlanan ve hayatı tehdit eden enterik bir enfeksiyona sebep olan *Salmonella typhi* (*S. Typhi*), enfekte bir kişinin dışkısı ile kontamine olmuş yiyecek veya içme suyunun tüketilmesi ile bulaşabilir. Nar meyvesi özütleri ve metanol özütleri ile yapılan iki farklı çalışmada, *S. Typhi*'ye karşı güçlü bir antibakteriyel aktiviteye rastlanmıştır (Perez ve Anesini, 1994).

Et yüzeylerinin dekontaminasyonu ve gıda kalitesini korumak için yapılan çalışmalarda, 250 µg/mL dozundaki nar kabuğu özütünün, et yüzeylerinde bulunan antibiyotiğe dirençli *Salmonella tifimurium* (*S. Tifimurium*) ve *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) suşlarına karşı etkili olduğu anlaşılmıştır (Tayel ve ark., 2012). Çiğ tavuk göğüs etlerinin % 0,02'lik nar suyuna daldırılmasından sonra, uygulamanın depolanmayı takiben (12 gün boyunca 4 °C'de), protein oksidasyonunun azalttığı ve mikrobiyal büyümeyi baskıladığı gözlemlendi (Hayounive ark., 2011). Başka bir çalışmada, % 80'lik metanolik nar kabuğu özütü uygulaması,

4°C'de depolama sırasında balıklarda *Listeria. monositogenes* seviyelerinde azalmaya neden oldu (Al-Zoreky, 2009).

Narın yara iyileşmesi üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada nar kabuğunun özütleri (%5'lik metanolik ekstrakt) merhem şeklinde gine domuzlarında oluşturulan yaralara 12 gün boyunca uygulanmıştır (Hayouni ve ark., 2011). Bu tedavi, yara bölgesindeki kollajen, DNA ve protein sentezini artırmış ve *S. typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Salmonella anatum* gibi yara bakterilerine karşı antibakteriyel etki göstermiştir. Wistar sıçanlardaki farklı bir çalışmada da antibakteriyel bir pomadla kıyaslandığında, yara iyileşmesine karşı nardan elde edilen merhem daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Murthy ve ark., 2004).

Çalışmalar, patojen diş bakterilerinin azaltılması ve önlenmesinde, plak, diş eti iltihabı ve periodontal hastalık riskini azaltmada nar özütlerinin etkili bir rol alabileceğini önermektedir. Nar özütlerinin *Prevotella intermedia*, *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Bhadbhade ve ark., 2011), *Proteus* türleri, *E. coli*, ve *Klebsiella* gibi periodontal bakteriler üzerine etkili olduğu belirtilmiştir (Menezes ve ark., 2006). Karbopol, su ve trietanolamin ile birlikte kurutulmuş nar kabuk özünden yapılmış oral bir jelin *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* ve *S. mutans*'a karşı antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır (Vasconcelos ve ark., 2006). Bu çalışmanın sonuçları, kullanılan jelin ağız boşluğunda farklı bakterilerin kontrolünde yararlı olabileceğini göstermektedir. Benzer bir *in vitro* çalışmada, nar etanol ve su özlerinin *S. mutans* ve *Porfiromonas gingivalis*'e (*P. gingivalis*) karşı inhibitör etkilere sahip olduğu gözlenmiştir (Rosas-Pinon ve ark., 2012). Ayrıca, metanolik nar kabuğu özütlerinin 12 mg/mL'lık dozunun *S. epidermidis*, *S. aureus*, *L. acidophilus*, *S. salivarius* ve *S. mutans*'a karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Abdollahzadeh ve ark., 2011).

### **2.3.3. Antiviral etki**

Nar ve özlerinin antiviral etkileri üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. Nar özütlerinin influenza virüsü, herpes virüsü, poxvirüsü ve HIV-1 virüsü üzerine antiviral etkileri ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Haidari ve ark., 2009; Kotwal, 2008). Punikalajinin hepatit C virüsü, kızamık virüsü, dang virüsü, solunum sinsisyal virüsü ve sitolemegalovirüs gibi patojenler tarafından oluşturulan enfeksiyonlar üzerine olumlu etkilerinden bahsetmek de mümkündür (Lin ve ark., 2013). Ayrıca, punikalajin'in influenza virüsü üzerinde inhibitör etkileri olduğu gösterilmiştir (Kasimsetty ve Bialonska, 2009). Başka bir çalışmada, punikalajinin enterovirusa karşı antiviral etkisi ortaya konmuştur. Bu çalışmada kontrol grubu ile kıyaslandığında punikalajin grubundaki viral RNA replikasyonunun önemli ölçüde baskılandığı gözlenmiştir (Yang ve ark., 2012). Punikalajinin herpes simpleks-1 virüsünün hücre içine girişini durdurduğu rapor edilirken (Lin ve ark., 2011), çinko sülfat-nar kabuğu ekstraktı kombinasyonunun herpes simpleks-1 ve herpes simpleks-2 virüslerine karşı kuvvetli bir antiviral etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Houston 2017). Ayrıca, nar suyu ve özütlerinin enfekte gıda ürünleri ve vücut sıvıları yoluyla bulaşan virüsleri baskılamada yararlı olabileceği düşünülmektedir. Son zamanlarda, nar polifenollerinin gıda kaynaklı viral patojenlerden feline calicivirus, murine norovirus ve bakteriyofaj MS2'ye karşı önemli antiviral etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Su ve ark.,2010).

### **2.3.4. Antikarsinojenik etki**

Dünya çapında ikinci ölüm sebebi olarak gösterilen kanserin görülme sıklığı giderek artmaktadır (Turrini ve ark., 2015). Her yıl ortalama 14.1 milyon yeni kanser vakası teşhis edilmekte ve 8.2 milyon insan kanser yüzünden ölmektedir. Dünya üzerinde, yaklaşık 32.6 milyon insan kanserden etkilenmektedir (Ferlay ve ark., 2015). Bugüne kadar kanser tedavisinde kullanılan yaygın kemoterapötik ilaçların oluşturduğu tutarsız klinik yanıtlar, olumsuz yan etkiler ve direnç gelişimi, bu korkunç hastalıkla mücadele etmek için toksik olmayan, uygun fiyatlı, kolayca erişilebilen ve daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için yeni çalışmaların

yapılmasına sebep olmaktadır (Bordoloi ve ark., 2016). Son yıllarda yapılan kapsamlı araştırmalar, meyve ve sebzelerden zengin diyetlerin, içerdikleri fitokimyasal maddelerden dolayı, kanser riskinin azalmasıyla güçlü bir şekilde bağlantılı olabileceğini ortaya koymuştur (Karak 2019). Meyve-sebzelerde bulunan polifenoller ve flavonoid bileşiklerin tümör büyümesi ve ilerlemesinden sorumlu olan çeşitli genlerin, proteinlerin ve sinyal kaskadlarının ekspresyonunu azaltma yeteneği olduğuna dair alınan sonuçlar, bu polifenolleri kanser hastaları için potansiyel tedavi edici ajanlar arasına koymuştur (Ko, ve ark.,2017; Shams Ardekani ve ark., 2011; Turrini, ve ark., 2015). Bu bağlamda, nar meyvesi ve kabuğunda bulunan polifenoller potansiyel antikarsinojenik maddeler olarak ele alınabilir. Geleneksel olarak, çeşitli tıbbi uygulamalarda kullanılan nar meyvesinde bulunan punikalajin ve punikalajinden dönüşen ellagik asitin güçlü bir antikanserojenik ajan olma potansiyeli bulunmaktadır. Bu bitkiden elde edilen özütler, tümör hücresi proliferasyonunu baskılar ve çeşitli transkripsiyon faktörleri ile sinyal yollarını etkileyerek apoptozisi uyarabilir (Khwaitrakpama ve ark., 2018). Bu nedenle, bu bitkiden elde edilen özütlerin farklı kanser tipleri üzerine etkilerini araştıran çalışmalara rastlamak mümkündür.

Farklı çalışmalar, nar özütlerinin hücre döngüsünde önemli rol oynayan siklin bağımlı kinazı (cdk), WAF1/p21 ve KIP1/27 ekspresyonunu artırarak baskıladığını göstermiştir (Malik ve ark., 2005; Malik ve Mukhtar, 2006; Naiki-Itove ark., 2014). Ayrıca hücre döngüsünün önemli regülatörlerinden siklin D1, siklin D2, siklin D3, cdk2, cdk4, ve cdk6'nın da baskılanmasında rol oynadığına dair çalışmalar bulunmaktadır (Naiki-Ito ve ark., 2014; Sadik ve Shaker, 2013; N. Khan ve ark., 2007; X. Li ve ark., 2015). Meme kanserinde kullanılan nar ekstraktlarının pro-inflamatuvar interlökinlerden IL-1 $\beta$ , 2, 6, 8, 12, ve 17 ile makrofaj inflamatuvar protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), induced protein 10 (IP-10), tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1)'in önemli ölçüde baskılanmasına yol açtığı gözlenmiştir (Costantini ve ark., 2014; Wang ve ark., 2011). Ayrıca bitki ekstraktlarının heat shock protein-70 (HSP-70), heat shock protein-90 (HSP70-90), uyarılabilen nitrik oksit sentaz (iNOS), ve nükleer faktor kappa beta (NF- $\kappa$ B) gibi

inflamatuvar ajanların ekspresyonunu baskıladığı da tespit edilmiş ve farklı kanser türlerinde nar polifenollerinin etkileri araştırılmıştır (Bishayee ve ark., 2013).

Ölümcül bir kanser türü olan idrar kesesi kanseri üzerine nar polifenollerinin etkisini araştıran çalışmalara rastlamak mümkündür. Lee ve arkadaşlarının bir çalışmasında (2013) narın etanol ekstraktlarının UBUC (idrar kesesi urotelyal karsinoma) tümör hücrelerinin çoğalmasını durdurduğunu ortaya koymuştur. Narın etanol ekstraktı bu etkisini tümör hücresinde, hücre bölünme döngüsünün S fazında cdk-1'i baskılayarak yapmaktadır. Aynı çalışmada ekstraktın endoplazmik stres belirteçleri olan ve Bip ekspresyonunu da artırdığı gözlenmiştir (Lee ve ark., 2013). Ekstraktın PTEN/AKT/mTORC1 yolağını baskılayarak anti-proliferatif ve apoptotik aktivite gösterdiği de anlaşılmaktadır (Wu ve ark., 2016).

Nar polifenollerini kadınlarda ölümle sonuçlanan en önemli ikinci kanser türü olan meme kanserinde de olumlu sonuçlar vermiş, pro-inflamatuvar sitokinlerden IL-8, RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted), ve PDGFB (trombosit kökenli büyüme faktörü alt ünite B) ekspresyonunu baskılamıştır (Rocha ve ark., 2012). Ayrıca, hücre bölünme döngüsünü TGF- $\beta$ /Smad (transforme edici büyüme faktörü beta/Smad) yolağı üzerinden G0/G1 fazında durdurmuştur (Chen ve ark., 2015). Nar ellagitaninleri anti-aromataz aktivite göstermiş ve testosteron tarafından uyarılan MCF-/ hücre çoğalmasını da baskılamıştır. Meme kanserinde aromataz enzimi tümörögeneziste çok önemli bir rol oynamakta ve testosteronun östrojene dönüşümüne yardım etmektedir (Adams ve ark., 2010; Sturgeon ve Ronnenberg, 2010). Bunlara ilaveten nar ellagitaninlerinin östrojen reseptör-pozitif meme tümörlerinin büyümesini engellediği de bildirilmiştir (Sreejave ark., 2012).

Çok ölümcül bir kanser türü olan kolon kanseri ile nar tüketimi arasında zıt bir ilişki olduğunu belirten epidemiyolojik çalışmalara rastlamak mümkündür (Nunez-Sanchez ve ark., 2015). Ayrıca narın kolonda anti-tümörojenik etkisinden bahsetmek mümkündür (Khan ve ark., 2009). HT-29 insan kolon kanser hücre hattında yapılan çalışmada TNF- $\alpha$  tarafından uyarılan siklooksijenaz-2 (COX-2)



protein yapımının % 79'lara varan oranlarda baskılandığı görülmektedir (Adams ve ark., 2006). HT-29 ve HCT-116 kolon kanser hücre hatlarında yapılan *in vitro* çalışmada ise, nar tanenlerinin apoptozisi uyardığı ve hücre çoğalmasını azalttığı bildirilmiştir (Seeram ve ark., 2005).



### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Bu araştırmanın deneysel kısmı Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Deney Hayvanları Ünitesinde gerçekleştirilirken, analizler Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Fizyoloji ve Viroloji Ana Bilim Dalları ile Deneysel Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Etik Komitesi tarafından onaylanan bu araştırma TÜBİTAK (Proje No: 116O027) ve Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiş (Proje No: BAP-0474YL-17) ve Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Hayvan Etik Kurulu'nun 25.11.2015/159 tarih ve sayılı izni ile tavşan denemelerine başlanmıştır.

#### **3.1. Analizlerde Kullanılan Cihazlar**

Araştırmada Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde bulunan ELISA (Mindray MR-96A), Vorteks (IKA® MS1Minishaker), Hassas terazi (Shimadzu BL-220H), Buzdolabı (+4) (Vestel White FR 430 No Frost), Derin dondurucu (-20) (Bosch GSD30410NE), Dondurucu (-80) (Haier, Çin), Isıtıcı manyetik karıştırıcı (IKAMAG® RH), Dijital pH metre (Metrohm 744 ph meter), Distile su cihazı (Tuğrul Mühendislik), Homojenizatör (IKA® Yellow line DI 18 basic), Otoanalizör (Achitech C8000), Mikroskop (Nikon Eclipse E200), ve Etüv (Mommert BE 500) kullanıldı.

#### **3.2. Araştırmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler**

Araştırma sırasında kimyasal madde ve kit olarak Punikalajin (Lot:K2216, CAS 65995-63-3, ChemCruz Biomedicals, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), BPA (CAS 80-05-7, Lot:MKBQ5209V, Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO), Rabbit Folikül Stimüle Edici Hormon – FSH (Cat No: SG-0001Rb, SinoGeneClon Biotech Co.,Ltd., China), Rabbit Luteinleştirici Hormon – LH (Cat No: SG-0004Rb, SinoGeneClon Biotech Co.,Ltd., China), Rabbit İnhibin  $\alpha$  – INHA (Cat No: SG-0015Rb, SinoGeneClon Biotech Co.,Ltd., China), Katalaz – CAT (Cat

No: SG-50185, SinoGeneClon Biotech Co.,Ltd., China), Glutatyon Peroksidaz – GPx (Cat No: SG-0120Rb, SinoGeneClon Biotech Co.,Ltd., China), Süperoksid Dismütaz – SOD (Cat No: SG-0061Rb, SinoGeneClon Biotech Co.,Ltd., China), Malondialdehid – MDA (Cat No: SG-50252, SinoGeneClon Biotech Co.,Ltd., China), ve mısır yağı kullanılmıştır.

### 3.3. Deney Dizayını

Çalışmanın başlangıcında 8–10 aylık yaşta ve ağırlıkları 2,8–3,7 kg arasında değişen 24 adet erkek tavşan kullanıldı. Tavşanlar Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi'nde bulunan galvanize kafeste bireysel olarak tutuldular ve çalışmaya başlamadan önce 14 gün boyunca laboratuvar şartlarına (%50-55 nem,  $22 \pm 2$  °C sıcaklık, ve 14:10 saatlik aydınlık:karanlık döngüsünde) alıştırdılar.

Çalışmalar süresince tavşanların ağırlıkları ve yem tüketimleri haftalık olarak tartıldı ve ağırlıklarına göre doz ayarlaması yapıldı. Çalışma süresince su ve yem ad libitum olarak verildi. Tavşanlar standart ticari tavşan yemi (Korkuteli Yem Gıda San.-Antalya); %6,93 ham kül, %17,0 ham protein, %12,68 ham sellüloz, %3,67 ham yağ, %0,49 kalsiyum, %0,46 fosfor) ile beslendiler.

Toplam 14 günlük alışma periyodunu takiben, Yeni Zelanda tavşanları gruplarda 6 tavşan olacak şekilde toplam rastgele 4 gruba ayrıldılar. Kontrol grubuna 9 hafta boyunca ağız yolundan sonda ile mısır yağı ve distile su verildi (KONT). BPA grubuna (BPA) mısır yağı içerisinde 20 mg/kg canlı ağırlık dozunda BPA ve distile su uygulandı. Punikalajin grubuna (PUN) distile su içerisinde 2 mg/kg canlı ağırlık dozunda punikalajin ve mısır yağı verildi. BPA+PUN grubuna ise mısır yağı içerisinde 20 mg/kg canlı ağırlık dozunda BPA ve distile su içerisinde 2 mg/kg canlı ağırlık dozunda punikalajin ağız yoluyla günlük olarak verildi. Oral gavaj uygulamaları her gün sabah yemlemesinden önce saat 08:00 ile 09:30 arası yapıldı. Çalışmamız sırasında kullanılan gruplardaki çalışma protokolü aşağıdaki gibidir (n = 6):

KONT: (Kontrol grubu): Günlük mısır yağı oral (1 kg canlı ağırlık için 1 mL mısır yağı) + (günlük distile su oral 1 kg canlı ağırlık için 1 mL distile su);

BPA: (20 mg/kg BPA grubu): Günlük BPA (20 mg/kg canlı ağırlık) mısır yağı içerisinde (1 mL mısır yağı 20 mg BPA içeriyordu) + günlük distile su oral (1 kg canlı ağırlık için 1 mL distile su);

PUN: (2 mg/kg Punikalajin grubu): Günlük punikalajin (1 mg/kg canlı ağırlık) distile su içerisinde (1 mL distile su 2 mg punikalajin içeriyordu) + günlük mısır yağı oral (1 kg canlı ağırlık için 1 mL mısır yağı);

BPA+PUN: 20 mg/kg BPA ve 2 mg/kg Punikalajin grubu: Günlük BPA (20 mg/kg canlı ağırlık) mısır yağı içerisinde (1 mL mısır yağı 20 mg BPA içeriyordu) + günlük punikalajin (2 mg/kg canlı ağırlık) distile su içerisinde (1 mL distile su 2 mg punikalajin içeriyordu).

Tavşanlara yaklaşık 1 kg canlı ağırlık için 1 mL mısır yağı ve 1 mL distile su verildi. Punikalajin dozu haftalık canlı ağırlığa göre ayarlandı. Her tavşan için hesaplanan uygun doz, enjektöre tespit edilmiş olan plastik gavaj ile oral olarak mide içerisine uygulandı.

### **3.4. Kan Örneklerinin Alınması**

Oral gavaj uygulamalarının sonunda (63. gün), 12 saat öncesinden aç bırakılan tavşanların kulak tüyleri, kulak arterinin belirlenmesi amacıyla, traş edildikten sonra alkol ile temizlendi. Tavşanların kulak arterinden intravenöz kanül yardımıyla (24G I.V. Kanül – Wellmed) toplam 25 mL civarında kan toplandı (Şekil 3.4). Plazma için EDTA ve Na Heparinli, serum örnekleri için ise antikoagülsüz tüpler kullanıldı. Soğuk zincir içerisinde toplanan kanlar 30 dakika içerisinde, 2000 devirde 20 dk santirifüj edildikten sonra serum ve plazma örneklerinden bir kısmı inhibin, FSH ve LH hormon analizleri için -20 °C'de, oksidan-antioksidan enzim tayini için ise -80 °C'de saklandı.



**Şekil 3.1.** Yeni Zelanda tavşanlarından kulak arteri yoluyla kan alınması.

### **3.5. Ötenazi ve Yaş Organ Eldesi**

Erkek Yeni Zelanda tavşanlarına kan alınmasını takiben, İsoflurane ile genel anestezisi altında ötenazi yapıldı. Ötenazi işlemini takiben laparaskopi yapılan tavşanlarda ilk önce kavum abdominis açıldı. Daha sonra kostatom yardımıyla kosta'lar kesildikten sonra diyafram uzaklaştırıldı. Kullanılan kimyasalların oksidan-antioksidan parametreler üzerine etkilerinin incelenmesi için karaciğer, böbrekler, ve testis 5 °C'de soğutulmuş PBS ile yıkandı. Uygun nekropsi yöntemleriyle alınan karaciğer kaudal lobu, sağ böbrek ve sağ testis -80 °C'de analizler için kullanılabilecek kadar saklandı.

### **3.6. Hormon ve Enzim Analiz Metodları**

Hormon ve enzim analizleri, kullanılan kitlerdeki açıklama ve yöntemlere göre yapılmıştır. -80 °C saklanan doku örnekleri, analiz yapılmadan önce, homojenizasyon işlemine tabii tutuldu. Dokulardan ufak bir parça kesildikten sonra

hassas terazide tartılarak, ağırlıkları not edildi. Doku örnekleri, üzelerine 2 mL 5 °C'lik PBS (pH 7,4) eklendikten sonra, homojenitör yardımıyla parçalandı. Örnekler daha sonra 5 °C'de, 20 dakika ve 3000 devirde santirfuj edildikten sonra süpernatantlar toplandı ve 1 hafta içerisinde kitlerde kullanılmak üzere tekrar -80 °C'de muhafaza edildi. CAT, GPx, SOD ve MDA kitlerinde, -80 °C'de saklanan serum ve doku süpernatantları kullanıldı.

Biyokimyasal parametreler (Mg, P, Ca, Na, K, bilirubin, albümin, toplam plazma protein seviyeleri, serum kolesterol, LDL, HDL, Amilaz, Lipaz, CRP ve GGT) ise otoanalizör (Achitech C8000) tarafından analiz edildi. Tavşan LH, FSH, ve inhibin alfa analizleri SinoGeneClon Biotech Co., Ltd. tarafından tavşanlar için özel üretilen ELİSA kitleri kullanılarak yapıldı.

### **3.7. İstatistiksel Değerlendirme**

İstatistiksel değerlendirme için Statistical Analysis System (SAS) (PROC ANOVA prosedürü) istatistik programından faydalanıldı. İstatistiki fark bulunan sonuçlar Dunnet posthoc testi ile karşılaştırıldı. Tüm istatistik uygulamalarında gruplar arası farklılık  $P < 0,05$  olduğunda farklılık önemli kabul edildi.

## **4. BULGULAR**

### **4.1. Serum Kolesterol Seviyeleri**

Toplam 9 haftalık oral gavaj uygulamasını takiben, BPA ve PUN uygulamalarının serum kolesterol seviyeleri üzerine etkileri tablo 4.1’de verilmiştir. Serum toplam kolesterol seviyelerinin BPA uygulanan grupta, kontrol ve PUN grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi ( $P=0,002$ ). Bununla birlikte BPA+PUN grubunda toplam kolesterol seviyelerinin KONT grubu düzeylerine gerilediği anlaşılmaktadır. Benzer bir şekilde LDL seviyeleri de BPA grubunda, KONT ve PUN ve BPA+PUN grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Serum LDL seviyelerinin, KONT ve PUN gruplarıyla karşılaştırıldığında, BPA grubunda istatistiki olarak yükseldiği gözlenirken, BPA+PUN grubunda ise KONT ve PUN gruplarına göre istatistiki olarak bir değişikliğe rastlanmamıştır. Serum HDL seviyelerinin ise çalışma boyunca verilen BPA ve punikalajin uygulamalarından etkilenmediği görülmektedir. Öte yandan, BPA grubundaki serum LDL seviyelerindeki artışın HDL/LDL yüzde oranları üzerine de etkili olduğu ve tek başına yapılan BPA uygulamalarının serum HDL/LDL yüzde oranlarını istatistiki olarak düşmesine sebep olduğu görülmektedir. Serum HDL/LDL yüzde oranları üzerine BPA’nın olumsuz etkisinin punikalajin uygulamaları ile KONT grubu seviyelerine yükseldiği gözlenmiştir (Tablo 4.1).

### **4.2. Mineral Parametrelerinde Gözlenen Değişiklikler**

BPA ve punikalajin uygulamaları sonunda alınan serumlardan tayin edilen bazı mineral parametrelerine ait veriler Tablo 4.2’de verilmiştir. Magnezyum, fosfor, kalsiyum, sodyum ve potasyum seviyeleri göz önüne alındığında gruplar arasında istatistiki açıdan herhangi bir farklılık tespit edilmemiştir. KONT grubuyla karşılaştırıldığında BPA ve punikalajin uygulamalarının bu minerallerin serum seviyeleri üzerine negatif veya pozitif bir etkisine rastlanmamıştır ( $P>0,01$ ).

### **4.3. Plazma Bilirubin, Albümin ve Toplam Protein Seviyeleri**

Çalışma sonucu gruplarından elde edilen bilirubin, toplam bilirubin, albümin ve toplam protein değerleri Tablo 4.3’de verilmiştir. Oral yolla verilen punikalajin ve BPA uygulamalarının plazma bilirubin, toplam bilirubin, albümin ve toplam protein düzeylerine herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü ( $P>0,1$ ).

### **4.4. Serum Amilaz, Lipaz, CRP ve GGT Seviyeleri**

Çalışma sonunda gruplarda serum amilaz, lipaz, CRP ve GGT seviyelerine ait veriler Tablo 4.4’te sunulmuştur. Serum amilaz, lipaz, CRP ve GGT seviyelerine bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmiştir. Serum amilaz, lipaz, CRP ve GGT seviyeleri BPA verilen grupta yükselirken, BPA ile verilen punikalajin uygulamaları bu değerleri normal KONT grubu değerlerine yaklaştırmıştır. KONT ve PUN grupları arasında ise istatistiksel bir farklılığa rastlanmadı.

### **4.5. Serum Üreme Hormon Seviyeleri**

Çalışmasının son aşamasında BPA ve punikalajin’in 9 hafta boyunca oral yolla verilmesini takiben gruplardaki erkek Yeni Zelanda tavşanlarından elde edilen serumlardaki İnhibin, FSH ve LH değerlerine ait veriler Tablo 4.5’te verilmiştir. Grup ortalamaları değerlendirildiğinde, gruplar arasında serum inhibin değerlerinin istatistiki olarak etkilenmediği gözlenmiştir. Deney sonunda gruplar arasındaki serum FSH ve LH değerleri açısından anlamlı bir farka rastlanmamıştır ( $P>0,1$ ). Benzer olarak, FSH/LH ve FSH/İnhibin oranları da yapılan BPA ve PUN uygulamalarından etkilenmemiştir (Tablo 4.5.)



**Tablo 4.1.** Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının serum kolesterol seviyeleri üzerine etkisi.

	KONT	BPA	PUN	BPA+PUN	P=
Kolesterol (mg/L)	41,2 <sup>ab</sup> ± 1,30	46,8 <sup>c</sup> ± 1,92	39,8 <sup>a</sup> ± 3,11	43,6 <sup>bc</sup> ± 2,70	0,002
LDL (mg/dL)	16,22 ± 1,57	20,44 <sup>b</sup> ± 2,42	14,36 <sup>a</sup> ± 1,90	16,94 <sup>a</sup> ± 2,02	0,002
HDL (mg/dL)	10,56 ± 1,59	9,64 ± 1,62	10,46 ± 0,77	10,54 ± 0,89	0,627
HDLR *(%)	34,74 <sup>a</sup> ± 6,89	26,04 <sup>b</sup> ± 4,77	36,16 <sup>a</sup> ± 6,04	31,88 <sup>ab</sup> ± 2,99	0,036

KONT=kontrol; BPA= 20 mg/kg/gün BPA; PUN= 20 mg/kg/gün punikalajin; BPA+PUN= 20 mg/kg/gün BPA + 20 mg/kg/gün punikalajin.

\*HDLR=HDL/LDLx100. Değerler Ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir. LDL= Düşük Yoğunluklu Lipoprotein; HDL= Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein;

HDRL= Toplam Kolesterolde HDL'nin % oranı. Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur.

**Tablo 4.2.** Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının çeşitli kan serum parametreleri üzerine etkisi.

	KONT	BPA	PUN	BPA+PUN	P=
Magnezyum (mmol/l)	1,72 ± 0,33	1,35 ± 0,17	1,46 ± 0,21	1,52 ± 0,40	0,284
Fosfor (mmol/L)	5,48 ± 1,20	5,16 ± 1,56	4,65 ± 0,65	5,0 ± 0,91	0,770
Ca (mg/dL)	13,22 ± 0,68	12,06 ± 2,31	12,96 ± 1,69	12,92 ± 0,41	0,639
Na (mmol/L)	139,2 <sup>a</sup> ± 4,20	138,6 ± 2,50	140,4 ± 4,77	139 ± 2,23	0,873
K (mg/dL)	4,24 ± 0,26	4,15 ± 0,13	3,97 ± 0,28	4,13 ± 0,24	0,379

KONT=kontrol; BPA= 20 mg/kg/gün BPA; PUN= 20 mg/kg/gün punikalajin; BPA+PUN= 20 mg/kg/gün BPA + 20 mg/kg/gün punikalajin. Ca=Kalsiyum; Na=Sodyum; K=Potasyum.

**Tablo 4.3.** Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının çeşitli kan plazma parametreleri üzerine etkisi.

	KONT	BPA	PUN	BPA+PUN	P=
Bilirubin (µg/dL)	0,12 ± 0,04	0,18 ± 0,13	0,12 ± 0,04	0,14 ± 0,09	0,654
Toplam Bilirubin(µg/dL)	0,51 ± 0,38	1,04 ± 0,13	0,42 ± 0,24	0,69 ± 0,26	0,167
Albümin (g/dL)	3,16 ± 0,45	2,84 ± 0,70	3,10 ± 0,40	3,16 ± 0,26	0,608
TP (g/dL)	6,06 ± 0,32	5,38 ± 1,22	6,16 ± 0,43	5,76 ± 0,42	0,323

KONT=kontrol; BPA= 20 mg/kg/gün BPA; PUN= 20 mg/kg/gün punikalajin; BPA+PUN= 20 mg/kg/gün BPA + 20 mg/kg/gün punikalajin. TP = Total Protein. Değerler Ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir.

**Tablo 4.4.** Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının çeşitli serum enzimleri üzerine etkisi.

	KONT	BPA	PUN	BPA+PUN	P=
Amilaz (IU/L)	155,6 <sup>a</sup> ± 50,9	228,8 <sup>b</sup> ± 52,4	148,0 <sup>a</sup> ± 41,1	169,6 <sup>ab</sup> ± 29,1	0,043
Lipaz (IU/L)	119,6 <sup>a</sup> ± 47,5	173,2 <sup>b</sup> ± 22,9	112,8 <sup>a</sup> ± 21,3	136,8 <sup>ab</sup> ± 26,3	0,004
CRP (md/dL)	0,98 <sup>a</sup> ± 0,59	4,75 <sup>b</sup> ± 2,38	0,73 <sup>a</sup> ± 0,46	2,74 <sup>a</sup> ± 1,58	0,002
GGT (IU/L)	6,40 <sup>a</sup> ± 2,96	15,40 <sup>b</sup> ± 2,30	6,40 <sup>a</sup> ± 1,14	9,80 <sup>a</sup> ± 3,49	0,001

KONT=kontrol; BPA=20 mg/kg/gün BPA; PUN=20 mg/kg/gün punikalajin; BPA+PUN=20 mg/kg/gün BPA + 20 mg/kg/gün punikalajin. Değerler Ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir. CRP= C-Reaktif Protein; GGT= Gama Glutamil-Transferaz; Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler arasında istatistik olarak fark bulunmuştur.

**Tablo 4.5.** Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının bazı serum üreme hormonları üzerine etkisi.

	KONT	BPA	PUN	BPA+PUN	P=
İnhibin (pg/mL)	165,5 ± 16,3	157,3 ± 13,1	169,4 ± 10,5	167,4 ± 11,9	0,164
FSH (mIU/mL)	9,37 ± 1,76	8,88 ± 1,40	10,04 ± 1,21	10,26 ± 1,67	0,233
LH (mIU/mL)	9,62 ± 1,17	9,59 ± 1,08	9,66 ± 1,15	10,27 ± 1,37	0,392
FSH/İnhibin oranı	0,056 ± 0,003	0,056 ± 0,003	0,059 ± 0,003	0,060 ± 0,006	0,320
FSH/LH oranı	0,97 ± 0,16	0,92 ± 0,137	1,04 ± 0,13	1,00 ± 0,17	0,443

KONT=kontrol; BPA= 20 mg/kg/gün BPA; PUN= 20 mg/kg/gün punikalajin; BPA+PUN= 20 mg/kg/gün BPA + 20 mg/kg/gün punikalajin. Değerler Ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir. FSH= Folikül Stümlü Edici Hormon; LH= Lüteinleştirici Hormon.

## **4.6. Oksidan ve Antioksidan Parametreler**

### **4.6.1. Süperoksit Dismütaz Enzimi Üzerindeki Değişikler**

Çalışmamızda plazma, testis, böbrek, ve karaciğer üzerinde SOD enziminin etkisine bakıldı. SOD enziminin BPA kullanımına bağlı olarak azaldığı, punikalajin uygulamalarının ise bu düşüşü istatistiki olarak kontrol seviyelerine çektiği gözlendi (Tablo 4.6).

### **4.6.2. Katalaz Enzimi Üzerinde Değişiklikler**

Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve punikalajin uygulamalarının kan ve çeşitli dokularda CAT enzimi üzerine etkisi Tablo 4.7' te verilmiştir. Genel olarak, CAT enzim seviyeleri BPA grubunda önemli düzeyde düşmüş, ancak punikalajinin BPA ile birlikte uygulandığı BPA+PUN grubunda CAT seviyelerindeki düşüşünün istatistiki açıdan engellendiği gözlenmiştir (Tablo 4.7).

### **4.6.3. Malondialdehit Enzimi Üzerindeki Değişikler**

Kan ve çeşitli dokulardan elde edilen MDA enzim seviyeleri Tablo 4.7'de verilmiştir. Genel olarak, BPA kullanımının bakılan tüm dokularda ve kanda MDA seviyelerini kontrol grubuna göre yüksettiği anlaşılmaktadır. Bununla birlikte punikalajin uygulamaları, BPA'nın etkisini azaltarak, MDA seviyelerini KONT grubu düzeylerine düşürmede etkili olmuştur (Tablo 4.8).

### **4.6.4. Glutatyon Peroksidaz Enzimi Üzerindeki Değişiklikler**

Çalışma sonunda alınan kan ve çeşitli dokularda analizi yapılan glutatyon peroksidaz seviyelerine ait veriler Tablo 4.9'da özetlenmiştir. Plazma, böbrek ve karaciğer dokularındaki GPx seviyelerinin uygulanan tedavilerden istatistiki olarak etkilenmediği anlaşılmaktadır. Testis dokusuna bakıldığında ise GPx seviyelerinin sadece PUN grubu ile BPA ve BPA+PUN grupları arasında anlamlı bir farklılığa sebep olduğu gözlenmektedir ( $P < 0,05$ ; Tablo 4.9).

**Tablo 4.6.** Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının kan ve çeşitli dokularda süperoksit dismütaz enzimi (pg/mL) üzerine etkisi.

	KONT	BPA	PUN	BPA+PUN	P=
Plazma	501,2 <sup>ab</sup> ± 99,2	410,4 <sup>c</sup> ± 76,2	567,8 <sup>a</sup> ± 44,5	458,4 <sup>bc</sup> ± 45,1	0,012
Testis	363,0 <sup>a</sup> ± 58,2	241,4 <sup>b</sup> ± 62,3	391,6 <sup>a</sup> ± 73,9	304,0 <sup>ab</sup> ± 74,1	0,013
Böbrek	386,2 <sup>a</sup> ± 98,4	272,6 <sup>b</sup> ± 78,1	420,6 <sup>a</sup> ± 64,7	347,4 <sup>ab</sup> ± 63,8	0,045
Karaciğer	400,1 <sup>ab</sup> ± 52,4	280,8 <sup>c</sup> ± 64,8	437,2 <sup>a</sup> ± 66,0	335,2 <sup>bc</sup> ± 69,8	0,011

KONT=kontrol; BPA= 20 mg/kg/gün BPA; PUN= 20 mg/kg/gün punikalajin; BPA+PUN= 20 mg/kg/gün; BPA + 20 mg/kg/gün punikalajin. Değerler Ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir.

**Tablo 4.7.** Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının kan ve çeşitli dokularda katalaz enzimi (pg/mL) üzerine etkisi.

	KONT	BPA	PUN	BPA+PUN	P=
Plazma	4,81 <sup>ab</sup> ± 1,43	2,59 <sup>c</sup> ± 0,48	5,81 <sup>a</sup> ± 44,5	458,4 <sup>bc</sup> ± 1,45	0,013
Testis	11,78 <sup>ab</sup> ± 1,09	8,78 <sup>c</sup> ± 1,23	13,7 <sup>a</sup> ± 73,9	304,0 <sup>ab</sup> ± 2,85	0,010
Böbrek	17,32 <sup>a</sup> ± 4,82	11,97 <sup>b</sup> ± 1,73	19,21 <sup>a</sup> ± 64,7	347,4 <sup>ab</sup> ± 2,81	0,012
Karaciğer	16,80 <sup>a</sup> ± 4,74	11,71 <sup>b</sup> ± 2,05	19,1 <sup>a</sup> ± 66,0	335,2 <sup>bc</sup> ± 2,86	0,014

KONT=kontrol; BPA= 20 mg/kg/gün BPA; PUN= 20 mg/kg/gün punikalajin; BPA+PUN= 20 mg/kg/gün BPA + 20 mg/kg/gün punikalajin. Değerler Ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir.



**Tablo 4.8.** Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının kan ve çeşitli dokularda malonildialdehit enzimi (nmol/L) üzerine etkisi.

	KONT		BPA		PUN		BPA+PUN		P=
Plazma	3,37 <sup>ab</sup>	± 0,65	4,88 <sup>b</sup>	± 1,76	2,51 <sup>a</sup>	± 0,77	3,68 <sup>ab</sup>	± 0,87	0,028
Testis	1,69 <sup>a</sup>	± 0,70	2,70 <sup>b</sup>	± 0,80	1,14 <sup>a</sup>	± 0,45	1,84 <sup>ab</sup>	± 0,80	0,023
Böbrek	2,10 <sup>ab</sup>	± 0,80	3,24 <sup>b</sup>	± 1,37	1,16 <sup>a</sup>	± 0,44	2,36 <sup>ab</sup>	± 1,11	0,033
Karaciğer	2,72 <sup>ab</sup>	± 0,96	4,84 <sup>c</sup>	± 1,91	1,69 <sup>a</sup>	± 0,54	3,78 <sup>bc</sup>	± 0,82	0,004

KONT=kontrol; BPA= 20 mg/kg/gün BPA; PUN= 20 mg/kg/gün punikalajin; BPA+PUN= 20 mg/kg/gün BPA + 20 mg/kg/gün punikalajin. Değerler Ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir.

**Tablo 4.9.** Erkek Yeni Zelanda tavşanlarında ağız yolundan BPA ve Punikalajin uygulamalarının kan ve çeşitli dokularda glutatyon peroksidaz enzimi (pg/mL) üzerine etkisi.

	KONT	BPA	PUN	BPA+PUN	P=
Plazma	2742 ± 171	2784 ± 236	2764 ± 262	2879 ± 437	0,887
Testis	2013 <sup>ab</sup> ± 276	1543 <sup>b</sup> ± 276	2209 <sup>a</sup> ± 551	1638 <sup>b</sup> ± 245	0,031
Böbrek	2347 ± 687	1880 ± 618	2133 ± 268	22183 ± 404	0,573
Karaciğer	2144 ± 633	1779 ± 316	2176 ± 299	1988 ± 394	0,470

KONT=kontrol; BPA= 20 mg/kg/gün BPA; PUN= 20 mg/kg/gün punikalajin; BPA+PUN= 20 mg/kg/gün BPA + 20 mg/kg/gün punikalajin. Değerler Ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamız günlük hayatta kullandığımız birçok ürünün yapımında yaygın olarak kullanılan BPA'nın olası negatif etkilerine karşı özellikle nar meyvesi ve kabuklarında bol miktarda bulunan ve güçlü bir antioksidan olan punikalajinin olası koruyucu etkilerinin araştırılması üzerine odaklanmıştır. Ayrıca, bu antioksidan maddenin pozitif etkilerini ortaya koymaya çalışırken, herhangi bir olumsuz etkiye sahip olup olmadığının da araştırılması önemlidir. Daha önce laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan bir çalışmada, diyetlerinde ortalama % 6 punikalajin bulunacak şekilde 37 gün boyunca beslenen sıçanlarda herhangi bir olumsuzluğa rastlanmamış ve punikalajin ile 5 hafta süresince tekrarlanan oral uygulamaların sonucunda ratlar için toksik olmadığı kanaatine varılmıştır (Cerdá ve ark., 2003). Benzer bir şekilde, çalışmamızda kullanmış olduğumuz punikalajinin, 2 mg/kg'lık günlük oral dozunun, erkek Yeni Zelanda tavşanlarında incelenen parametrelerin hiçbirinde olumsuz bir etkiye yol açmadığı görüldü. Ayrıca yaptığımız çalışmada incelenen üreme ile ilgili hormonların seviyeleri üzerine de negatif bir etkisine rastlanmadı.

İnsan ve kemirgenlerde BPA ile gonadotropinler arasındaki ilişkiyi ortaya koymaya çalışan farklı araştırmalar bulunmaktadır. Bir çalışmada, erkeklerde yüksek idrar BPA seviyeleri ile serum FSH ve testesteron seviyeleri arasında pozitif bir ilişki tespit edilirken, inhibin seviyesi ile negatif bir korrelasyon gözlenmiştir (Meeker ve ark., 2010). Başka bir çalışmada BPA'nın LH seviyelerini artırdığına dair sonuçlar alınmıştır (Lassen ve ark., 2014). Öte yandan Wisniewski ve arkadaşlarının (2015) sıçanlarda yaptığı bir çalışmada ise BPA'nın serum LH seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir. Daha önce yapılan bu çalışmaların aksine, BPA ile FSH ve inhibin arasında herhangi bir ilişkiye rastlamayan çalışmalara rastlamak da mümkündür (Mendiola ve ark., 2010). Sıçanlarda yapılan farklı araştırmalarda, 10 µg/kg dan 20 mg/kg'a dozlarına kadar verilen BPA'nın plazma LH ve FSH seviyeleri üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir (Akingbemi ve ark, 2004; Nakamura ve ark 2010; Ogo ve ark., 2017). Benzer bir şekilde, yapılan bu çalışmada da BPA uygulamasının inhibin, FSH ve LH üzerinde anlamlı bir farklılık göstermediği gözlenmiştir. Bununla birlikte, erkeklerde üreme ile ilgili hormonlarda

gözlenebilecek değişiklikler üreme toksisitesi olabileceğine karşı bir uyarı olarak algılsa da, bu hormonların kan seviyelerinde bir değişiklik olmadan da testiküler dokuda hasarlar olabileceği ve bu durumun spermatogenezis üzerine olumsuz etkilere yol açabileceği unutulmamalıdır (Ogo ve ark., 2017).

Elde ettiğimiz toplam kolesterol, HDL, LDL ve HDL/LDL oranlarına baktığımızda, oral BPA'nın erkek tavşanlarda kolesterol seviyelerini olumsuz yönde etkilediği anlaşılmaktadır. BPA'nın kolesterol seviyeleri üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar sınırlıdır. Çalışmamıza paralel olarak, dişi farelerde 2,72 mg/kg vücut ağırlığı dozunda oral verilen BPA'nın kolesterol seviyesini yükselttiği görülmekle birlikte (Miyawaki ve ark 2007), Dodge ve ark. (1996) yapmış olduğu başka bir çalışmada ise 4 gün boyunca oral yolla verilen BPA'nın (0,1, 1 ve 10 mg/kg vücut ağırlığı) sıçanlarda toplam kolesterol düzeylerini etkilemediğini bildirmiştir. Benzer bir şekilde Seidlova-Wuttke ve ark. (2005) 3 ay boyunca 0,033 ve 0,333 mg/kg vücut ağırlığı dozlarında yemle verilen BPA'nın, toplam kolesterol seviyeleri üzerine etkisine rastlamamıştır. Bu son iki çalışmada ya BPA süresi (4 gün) ya da dozlar (0,033 ve 0,333 mg/kg vücut ağırlığı) sınırlı seviyelerde tutulmuş olduğundan BPA'nın serum kolesterolü üzerine herhangi bir etkisine rastlanmamış olabilir.

Punikalajinin kolesterol seviyeleri üzerine etkilerini inceleyen çalışmaların bir kısmında, punikalajinin makrofaj hücrelerini lipid birikiminden ve köpük hücre oluşumundan koruduğu bildirilmiştir (Aviram ve ark., 2002; Kaplan ve ark., 2001 ; Rosenvalt ve Aviram, 2011). Benzer bir şekilde, kolesterol sentezini baskılayan statinlerle birlikte verildiğinde, punikalajinin gerekli olan statin dozunu düşürdüğü, bu ilacın etkisini güçlendirdiği ve kolesterol biyosentezini engellediği gözlenmiştir (Reiner, 2014; Rosenbalt ve ark., 2013). İçme suyuna 6.25 mL/L nar suyu takviyesi yapılan aterosklerotik farelere, makrofaj lipid peroksidasyonunu, hücrel kolesterol birikimini ve aterosklerozun gelişimini düşürmektedir (Kaplan ve ark., 2001). Punikalajinin LDL ile etkileşimi, spesifik olarak köpük hücrelerine dönüşmeden makrofajlara LDL girişini hızlandırdığı ve aterosikleroza sebep olan köpük hücre oluşumunu azaalttığı bildirilmiştir (Atrahimovich ve ark., 2016). Punikalajinin LDL reseptör bağlama bölgesine yakın bir mesafede ApoB100'e bağlandığını

varsayılmaktadır. Bağlama üzerine, punikalajin proteinin konformasyonunu değiştirebilir ve LDL reseptörü için LDL'nin affinitesini artırabilir. Böylece, punikalajin muhtemelen LDL'nin lipid kısmı ve protein ile etkileşime girerek, ve makrofajlara LDL geçişini hızlandırarak serum LDL seviyelerini düşürebilir. Yaptığımız çalışmada uyguladığımız punikalajin dozu, kolesterol ve LDL seviyeleri üzerine istatistiki olarak etkisi olmasa da, BPA'nın olumsuz etkilerinin azaltarak, literatürdeki bilgilere paralel bir şekilde, olumlu katkıda bulunmuştur.

Uyguladığımız oral BPA serum Mg, P, Ca, Na, ve K seviyeleri üzerine etkili olmamıştır. BPA'nın plazmadaki Mg, P, Na, ve K seviyelerine ilişkin herhangi bir literatür çalışma bulunmamakla birlikte, potansiyel östrojenik yapısı sebebiyle plazma Ca seviyesini etkileyebileceği düşünülmüştür (Suzuki ve ark., 2003). Japon balıklarında yapılan ve 8 gün süren bir deneyde BPA'nın serum Ca seviyesini ilk 4 gün boyunca yükselttiği, sonraki dört gün boyunca ise düşürdüğü gözlenmiştir. Ayrıca bu balıklarda Ca seviyesinin düştüğü son 4 günlük dönemde serum kalsitonin seviyesi de etkilemiştir (Suzuki ve ark., 2003). Araştırmalar bu durumun BPA'nın etkisini dolaylı olarak östrojen üzerinden değil, doğrudan osteoblastik ve osteoklastik aktiviteyi değiştirerek gerçekleşmesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir (Suzuki ve Hattori, 2003).

Pankreas tarafından salgılanan amilaz uzun zincirli karbonhidratların maltoz ve glikoz gibi kısa zincirli karbonhidratlara parçalanmasından sorumludur. Yine pankreastan salgılanan pankreatik lipaz ise yağ moleküllerini hidrolize ederek parçalayan önemli bir enzimdir (Pieper-Bigelow ve ark., 1990). Bu enzimler pankreas hasarı ve yangısını belirlemede önemli birer gösterge olarak kabul edilirler ve bu nedenle pankreas hastalıkları klinik açıdan kandaki amilaz ve lipaz seviyelerine bakılarak değerlendirilmektedir (Lott, 1982). Böbrek, karaciğer, dalak, safra kesesi ve pankreasta bulunan bir enzim olan gama glutamil-transferaz (GGT) serumda ve birçok hücrenin dış yüzeyinde bulunan küçük peptidlerin veya amino asitlerin gama glutamil artıklarının transferinde katalizör görevi üstlenir (Goldberg, 1980). Özellikle karaciğer ve safra yolları ile ilgili hastalıkların tanısı ve takibinde kullanılan en önemli göstergelerden biridir. C-reaktif protein (CRP) ise

vücudumuzdaki enflamatuvar yanıt olarak salgılanan en önemli proteindir (Erlinger ve ark., 2004). CRP, hemen bütün sistemik hastalıklar sırasında artan maddedir ve genel yangının belirlenmesinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Bu bağlamda, kalp dokusu hasarlarında, kronik böbrek yetmezliklerinde ve ciddi periferik vasküler hastalığı olan hastalarda CRP seviyesinin yükseldiği gözlenmektedir (Naji, 2017).

Çalışmamızda BPA'nın erkek Yeni Zelanda tavşanlarında serum amilaz, lipaz, GGT, ve CRP seviyeleri üzerine olumsuz bir etki gösterdiği ve bu enzimlerin seviyelerini kontrol grubuna göre yükselttiği belirlendi. Punikalajin, KONT grubu ile karşılaştırıldığında tek başına verildiğinde bu enzimler ve CRP üzerine, olumlu veya olumsuz bir etkiye sebep olmazken, BPA ile birlikte verildiğinde, BPA'nın bu biyokimyasal parametreler üzerine etkilerini düzelttiği gözlendi. Ayrıca verilerimiz, BPA ve punikalajinin vermiş olduğumuz dozlarda erkek Yeni Zelanda tavşanlarındaki albümin, bilirubin ve toplam plazma proteinleri üzerine bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte sıçanlarda yapılan farklı çalışmalarda, BPA'ya bağlı karaciğer kaptisesindeki azalmaya dayalı plazma albümin seviyelerinde bir düşüş olduğu bildirilmiştir (Oguazu ve ark., 2015; Yamasaki ve ark., 2002). Ayrıca diğer çalışmalarda total bilirubin seviyelerinde de BPA'ya bağlı hemolitik aneminin artması sebebiyle bir yükselme olabileceği kanaatine varılmıştır (Hassan ve ark., 2012; Oguazu ve ark., 2015).

Endokrin sistem üzerine olumsuz etkili bir madde olan BPA'nın karaciğer, böbrek ve pankreas gibi organlarda önemli ölçüde hasara yol açabileceği düşünülmektedir. Östrojenik bir etkiye sahip olduğu belirtilen BPA'nın farelerde pankreas hasarına sebep olabileceği; langerhans hücre kültürlerinde glukagon ve insülin yapımından sorumlu  $\alpha$ - ve  $\beta$ -hücrelerini olumsuz etkilediği belirlenmiştir (Ropero ve ark., 2008). Hem yetişkin hem de çocuklarda yapılan çalışmalarda ise üriner BPA ile albüminüri arasında pozitif bir bağlantı olduğu sonucuna varılmıştır (Li, 2012; Trasande ve ark., 2013). Ayrıca, insanlarda yapılan epidemiyolojik bir çalışmada, 4.66-6.64 ng/mL seviyelerindeki üriner BPA'nın, renal paranşimada oksidatif stresi artırabileceği sonucuna varılmıştır. Üriner BPA ile karaciğer (ALP,

GGT, ve laktat dehidrojenaz) ve pankreas (amilaz) enzimleri arasında da pozitif bir ilişki bulunmuştur (Lang ve ark., 2008).

Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, sıçan karaciğerinde asetaminofen ile indüklenen toksisite üzerinde, punikalajinin antihepatotoksik aktivitesi değerlendirilmiştir (Lin ve ark. 2001). Asetaminofen uygulaması ile artan AST ve ALT seviyeleri punikalajin ile azaltılmıştır. Yine Tip II diyabetli hastalarda yapılan benzer bir çalışmada 1561 mg/L punikalajin içeren nar suyunun tüketimi sonrası diyabetik parametrelere bakılmıştır. Diyabetik hastalarda kan HbA1c düzeyinin kontrol gruplarına göre % 59 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Buna karşın insülin ve serum C-peptid düzeylerinin arasındaki farkın az olduğu bildirilmiştir. Hastalar tarafından tüketilen nar suyu, serum glikoz düzeylerinde anlamlı olarak (%8) bir düşüğe neden olmuştur. Serum insülin düzeylerinde ise % 9 oranında bir azalma kaydedilmiştir (Rosenblat Mve ark., 2006).

Çalışmamızda BPA uygulaması ile, amilaz, lipaz ve GGT gibi belirteçlerin seviyelerinin yükselmesi; BPA'nın karaciğer, böbrek ve pankreas gibi organlarda olası negatif etkilerini düşündürürken, punikalajin uygulamalarının bu etkiyi hafifletmede yararlı olabileceği ortaya çıkmıştır. Ayrıca, daha önce insanlarda yapılan çalışmalarda BPA seviyelerindeki artış ile yangı indikatörleri arasında pozitif bir ilişkiye rastlanmış, BPA seviyelerindeki artışın CRP seviyelerini yükselttiği gözlenmiştir (Tarantino ve ark., 2013). Çalışmamızda akut faz proteini olarak bilinen CRP'nin serum seviyelerinin BPA uygulamaları ile artış göstermesi, BPA'ya bağlı genel bir yangı olduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda punikalajinin bu olumsuz etkiyi azaltma potansiyeli olabileceği gözlenmiştir. BPA'nın bütün bu parametreleri yükseltmesi, bu sentetik östrojenin ana organlarda oksidatif stresi artırdığı ve buna bağlı doku hasarına sebep olduğunu düşündürmekte, punikalajinin incelenen parametreler üzerine olumlu etkisi ise kullanmış olduğumuz bu tanenin artmış oksidatif stresi yenmekte etkili olabileceğini göstermektedir.

SOD, CAT ve GPx, hidrojen peroksit ve süperoksit serbest radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin atılmasından sorumlu olan hücre içi enzimatik

antioksidanlardır. Ayrıca SOD, oksijen türlerine karşı ilk savunma hattını oluşturur (Sen ve ark., 2010). Çalışmamızda, oral BPA'ya maruz kalan tavşanların dokularında bu enzimlerin seviyelerinin KONT grubundaki tavşanlardan daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu durum tipik olarak, oksidatif stres neticesinde artmış lipid peroksidasyonun bir sonucu olabilir. Daha önce yapılan farklı araştırmalarda BPA'nın balık ve kemirgenlerde oksidatif strese yol açtığı bildirilmiştir (Andersen, 2004 ; Geetharathan, 2016 ; Heba ve Abdel-Tawwab, 2017; Kabuto ve ark., 2004 ; Qui ve ark., 2016 ; Tao ve ark., 2016). Sazan balıklarında 30 gün süre ile su tanklarına ilave edilen 10 – 1000 µg/ L dozunda BPA'nın lipid peroksidasyonunun arttığı, SOD, CAT ve GPx aktivitesinin baskılandığı gözlenmiştir (Qui ve ark., 2016). BPA ile tedavi edilen sıçan dokularında oksidatif stres artışının SOD ve CAT gibi bazı antioksidan enzimlerin aktivitesindeki azalmayla beraber olduğu gözlenmiştir (Geetharathan, 2016). Farklı bir çalışmada BPA maruziyeti, enzimatik antioksidan savunmayı negatif olarak etkileyerek nöronlarda lipid peroksidatif hasarı arttırmış ve böylece merkezi sinir sisteminin fonksiyonel ve yapısal gelişimini olumsuz etkilenmiştir (Andersen, 2004). BPA, membran lipidlerine, proteinlere ve antioksidan enzim savunma sistemine zarar verebilir. Bununla birlikte, dokularda biriken BPA serbest radikal oluşumunu uyararak antioksidanların ve metal iyonlarının tükenmesine yol açabilir. Böylece serbest radikal oluşumunu engellemede önemli görevleri bulunan SOD, CAT ve GPx gibi enzimlerin hızla azalmasına yol açarak doku harabiyetine sebep olabilir (Bindhmol ve ark., 2003 and Kabuto ve ark., 2004). BPA'ya bağlı doku MDA seviyelerindeki artış, bu dokularda BPA'ya bağlı normalden daha fazla ROS üretimi ve bu sebeple oksidatif strese olabilecek artışa paralel olarak oksidatif stres enzim seviyelerinin yükselmesine bağlı gözlenebilir (Yonar ve ark., 2014). Böylece BPA, erkek Yeni Zelanda tavşanlarında serbest radikal oluşumunu uyararak ROS yapımını artırabilir ve oksidatif strese yol açabilir (Chitra ve ark., 2003).

Yapmış olduğumuz çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler, incelenen çeşitli dokularda, BPA'ya bağlı olarak MDA aktivitesindeki artış ile SOD ve CAT seviyelerindeki düşüşün, punikalajin ilavesi ile KONT grubu seviyelerine yaklaştığını göstermektedir. Antioksidan parametreler üzerine punikalajin ile elde



edilen sonuçlarımız, daha önceki çalışmalarda farklı flavinoidler ve nar suyu ile elde edilen sonuçlarla benzemektedir. Keçi karaciğer dokularında yapılan *in vitro* bir çalışmada da, oksidatif strese maruz kalan dokularda punikalajinin önemli bir antioksidan aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur (Lavanya Yaidikar ve Santhrani Thakur, 2001). Benzer bir şekilde Sun ve ark. (2017) yaptığı çalışma punikalajin uygulamasının, SOD etkisini arttırdığını göstermiştir. Çeşitli bitki ve meyvelerden elde edilen bu antioksidanların güçlü  $O_2^{\cdot -}$  süpürücüsü olduklarını göstermektedir (Coballase-Urrutia ve ark., 2011). Çeşitli çalışmalar, tanen ve flavinoidlerin farmakolojik etkilerinin,  $OH^{\cdot}$  ve  $O_2^{\cdot -}$ 'yi temizleme, metal iyonları şelatlama ve diğer antioksidan metabolitlerle sinerjik etkiler uygulama kabiliyetlerinden kaynaklanabilecek antioksidan aktiviteleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Manna ve ark., 2006; Niki ve ark., 2005; Raja ve ark., 2007). Sonuçlarımız punikalajinin, BPA yüzünden meydana gelebilecek artmış serbest radikal oluşumunu önleyerek, oksidatif hasarı doğrudan veya dolaylı olarak azaltabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, BPA tarafından oluşturulan oksidatif strese karşı, karaciğer, böbrek ve testis dokusundaki oksidan-antioksidan aktivite üzerine de punikalajinin olumlu etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Yapmış olduğumuz çalışmadan elde ettiğimiz verilerin ışığında, BPA uygulamaları ile karaciğer, böbrek ve pankreas dokularına ait yangı belirteci olan enzimlerde bir artış olurken, punikalajin uygulamalarının BPA'nın olası olumsuz etkilerine karşı koruyucu olabileceği kanaatine varılmıştır. Sonuç olarak, punikalajin uygulamalarının, BPA'nın vücutta gösterdiği oksidatif strese karşı kan ve çeşitli dokularda koruyucu etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. Punikalajinin koruyucu etkisi hem antioksidan savunma sisteminin aktivitesinde bir artış hem de lipid peroksidasyonunun engellenmesi nedeniyle olabilir. Bu durum BPA'nın çeşitli doku ve üreme sistemi üzerindeki olası olumsuz etkilerinden korunmak için punikalajinin etkili olabileceğini düşündürmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmadan elde ettiğimiz veriler, erkek Yeni Zelanda tavşanlarında BPA uygulamalarının karaciğer, böbrek ve pankreas gibi önemli organlarda yangı belirteci olan bazı enzimlerin artışına sebep olması ve bu organların yapı ve işleyişine zarar verebileceğini ortaya koymuştur. Ayrıca, bu organlarla birlikte testis dokusunda da oksidatif strese yol açabileceği gözlenmiştir. Çalışmamızda BPA ile birlikte yapılan punikalajin uygulamalarının ise bu parametrelerde kayda değer bir oranda düzelmeye sebep olduğu anlaşılmaktadır. Verilerimiz, punikalajin uygulamalarının BPA'nın kolesterol, LDL, amilaz, lipaz, CRP, GGT, oksidan ve antioksidan değerler gibi bazı parametreler üzerine olası olumsuz etkilerini düzeltmede etkin bir rol oynayabileceği ve bu olumsuz etkilere karşı koruyucu olabileceğini desteklemektedir. Sonuç olarak, punikalajin uygulamalarının, BPA'nın vücutta gösterdiği oksidatif strese karşı kan ve çeşitli dokularda koruyucu etkiye sahip olduğu görülmekte ve bu bulgular ile BPA'nın çeşitli doku ve üreme sistemi üzerindeki olası olumsuz etkilerinden korunmak için punikalajinin etkili olabileceğini düşündürmektedir. Antioksidan savunma mekanizması üzerine olumlu etkileri göz önüne alındığında, punikalajinin serbest radikal aracılı hastalıklarda tedavi edici bir rolü olabileceğini de akla getirmektedir. Bununla birlikte, kullanılan BPA ve punikalajinin dokularda apoptozis üzerine olası olumlu/olumsuz etkisinin araştırılması bu çalışmadan elde edilen bulguların desteklenmesi açısından önemlidir. Ayrıca, BPA ve punikalajinin reproduktif aksta görev alan diğer hormonlarla olan ilişkisine bir bütün olarak bakılması ve spermatolojik parametreler üzerine etkisinin incelenmesi bu kimyasalların etki mekanizmasının ortaya çıkarılmasında yararlı olacaktır.

## KAYNAKLAR

**Abdollahzadeh SH, Mashouf RY, Mortazavi H, Moghaddam M, Roozbahani N, Vahedi M (2011).** Antibacterial and antifungal activities of Punica granatum peel extracts against oral pathogens. *J. Dentistry.*, **8(1)**, 1-6.

**Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB, Takada Y, Sand D, Heber D (2006).** Pomegranate Juice, Total Pomegranate Ellagitannins, and Punicalagin Suppress Inflammatory Cell Signaling in Colon Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.*, **54(3)**, 980–985.

**Adams LS, Zhang Y, Seeram NP, Heber D, Chen S (2010).** Pomegranate Ellagitannin-Derived Compounds Exhibit Antiproliferative and Antiaromatase Activity in Breast Cancer Cells In vitro. *Cancer Prevention Res.*, **3(1)**, 108-113.

**Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K (2001).** Antibacterial action of several tannins against Staphylococcus aureus. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, **(48)**, 487-491.

**Akingbemi BT, Sottas CM, Koulova AI, Klinefelter GR, Hardy MP (2004).** Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology*, **145(2)**, 592-603.

**Al-Zoreky NS (2009).** Antimicrobial activity of pomegranate (Punica granatum L.) fruit peels. *Int J. Food Microbiol.*, **134(3)**, 244-248.

**Aloqbi A, Omar U, Erguen B, Nitzsche B, Höpfner M, Jung K, Rabien A (2017).** Antioxidant activity of pomegranate juice and punicalagin. *Natural Sci.*, **8(6)**, 235-236.

**Amiridou D, Voutsas D (2011).** Alkylphenols and phthalates in bottled water. *J. Hazard. Mater.* **185(1)**, 281-286.

**Andersen JK (2004).** Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Rev. Neurosci.*, **10(7)**, S18-S25.

**Aqil F, Munagala R, Vadhanam MV, Kausar H, Jeyabalan J, Schultz DJ, Gupta RC (2012).** Anti-proliferative activity and protection against oxidative DNA damage by punicalagin isolated from pomegranate husk. *Food Res. Int.*, **49(1)**, 345-353.

**Atrahimovich D, Khatib S, Sela S, Vaya J, Samson AO (2016).** Punicalagin Induces Serum Low-Density Lipoprotein Influx to Macrophages. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 1-9.

**Asres K, Bucar F, Knauder E, Yardley V, Kendrick H, Croft SL (2001).** In vitro antiprotozoal activity of extract and compounds from the stem bark of *Combretum molle*. *Phytotherapy Res.*, **15 (7)**, 613-617.

**Aydemir B, Karadağ Sarı E (2009).** Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. *Kocatepe Vet. J.*, **2(2)**, 56-60.

**Aviram M, Dornfeld L, Kaplan M, Coleman R, Gaitini D, Nitecki S, Hofman A, Rosenblant M, Volkova N, Presser D, Attias J, Hayek T, Fuhrman B (2002).** Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs Exp. Clin. Res.*, **28( 2-3)**, 49-62.

**Bate-Smith EC, Swain T (1962).** *Comparative Biochemistry*, Vol. 3, Mason, H. S. and Florkin, M., Eds., Academic Press, New York, **764**.

**Benzie IFF (2003).** Evolution of dietary antioxidants. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, **136(1)**, 113-126.

**Bhadbhade SJ, Acharya AB, Rodrigues SV, Thakur SL (2011).** The antiplaque efficacy of pomegranate mouthrinse. *Quintessence Int.*, **42(1)**, 29-36.

**Bindhumol Y, Chitra KC, Mathur PP (2003).** Bisphenol A induced reactive oxygen species generation in the liver of male rats. *Toxicology*, **188(2-3)**, 117-124.

**Biedermann-Brem S, Grob K (2009).** Release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles: water hardness as the most relevant factor. *Eur. Food Res. Technol.* **228(5)**, 679-684.

**Bishayee A, Thoppil RJ, Darvesh AS, Ohanyan V, Meszaros JG, Bhatia D (2013).** Pomegranate phytoconstituents blunt the inflammatory cascade in a chemically induced rodent model of hepatocellular carcinogenesis. *J. Nutr. Biochem.*, **24(1)**, 178-187.

**Bloom MS, Vom Saal FS, Kim D, Taylor JA, Lamb JD, Fujimoto VY (2011).** Serum unconjugated bisphenol A concentrations in men may influence embryo quality indicators during in vitro fertilization. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **32(2)**, 319-323.

**Bordoloi DK, Roy N, Monisha J, Padmavathi GB, Kunnumakkara A (2016).** Multi-Targeted Agents in Cancer Cell Chemosensitization: What We Learnt from Curcumin Thus Far. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.*, **11(1)**, 67-97.

**Braun JM, Yolton K, Dietrich KN, Hornung R, Ye X, Calafat AM, Lanphear B P (2009).** Prenatal Bisphenol A Exposure and Early Childhood Behavior. *EHP*, **117(12)**, 1945-1952.

**Brede C, Fjeldal P, Skjevrak I, Herikstad H (2003).** Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit. Contam.*, **20(7)**, 684-689.

**Calafat AM, Ye XY, Wong, LY, Reidy JA, Needham LL (2008).** Exposure of the US population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environ. Health Perspect.*, **116(1)**, 39-44.

**Cao XL, Corriveau J (2008).** Survey of bisphenol A in bottled water products in Canada. *Food Addit. Contam. Part B.* **1(2)**, 161-164.

**Cao XL, Perez-Locas C, Dufresne G, Clement G, Popovic S, Beraldin F, Dabeka RW Feeley M (2011).** Concentrations of bisphenol A in the composite food samples from the 2008 Canadian total diet study in Quebec City and dietary intake estimates. *Food Addit. Contam. Part A*, **28(6)**, 791-798.

**Carwile JL, Ye X, Zhou X, Calafat AM, Michels KB (2011).** Canned food consumption and urinary bisphenol-A: a randomized cross-over trial. *JAMA.*, **306(20)**, 2218-2220.

**Cerdá B, Ceron JJ, Tomás-BarberánFA, Espín JC (2003).** Repeated Oral Administration of High Doses of the Pomegranate Ellagitannin Punicalagin to Rats for 37 Days Is Not Toxic. *J. Agric. Food Chem.*, **51(11)**, 3493-3501.

**Cerdá B, Llorach R, Cerón J, Espín JC (2003).** Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *Eur. J. Nutr.*, **42(1)**, 18-28.

**Chen HS, Bai MH, Zhang T, Li, GD, Liu M (2015).** Ellagic acid induces cell cycle arrest and apoptosis through TGF- $\beta$ /Smad3 signaling pathway in human breast cancer MCF-7 cells. *Int. J. Oncol.* **46(4)**, 1730-1738.

**Chen D, Kannan K, Tan H, Zheng Z, Feng YL, Wu Y, Widelka M (2016).** Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity—A Review. *Environ. Sci. Technol.*, **50(11)**, 5438-5453.

**Chidambara Murthy KN, Reddy VK, Veigas JM, Murthy UD (2004).** Study on Wound Healing Activity of Punica granatum Peel. *J. Med. Food*, **7(2)**, 256-259.

**Chitra K (2003).** Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology.*, **185(1-2)**, 119-127.

**Coballase-Urrutia E, Pedraza-Chaverri J, Cardenas-Rodriguez N, Huerta-Gertrudis B, Edna Garcia-Cruz M, Ramirez-Morales A, Javier Sanchez-Gonzalez D, Maria Martinez-Martinez C, Camacho-Carranza R, Javier Espinosa-Aguirre J (2011).** Hepatoprotective effect of acetonic and methanolic extracts of *Heterotheca inuloides* against CCl<sub>4</sub>-induced toxicity in rats. *Exp. Toxicol Pathol.*, **63(4)**, 363-370.

**Costantini S, Rusolo F, De Vito V, Moccia S, Picariello G, Capone F, Volpe M (2014).** Potential Anti-Inflammatory Effects of the Hydrophilic Fraction of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Seed Oil on Breast Cancer Cell Lines. *Molecules*, **19(6)**, 8644-8660.

**De Coensel N, David F, Sandra P (2009).** Study on the migration of bisphenol-A from baby bottles by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS. *J. Sep. Sci.*, **32(21)**, 3829–3836.

**Dekant W, Völkel W (2008).** Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, **228(1)**, 114-134.

**Dodge JA, Glasebrook AL, Magee DE, Phillips DL, Sato M, Short LL, Bryant HU (1996).** Environmental estrogens: Effects of cholesterol lowering and bone in the ovariectomized rat. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **59**, 155-161.

**Doyle B, Griffiths LA (1980).** The metabolism of ellagic acid in the rat. *Xenobiotica*, **10 (4)**, 247-256.

**EC(2011).** [http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/2\\_source\\_and\\_occurrence.pdf](http://www.who.int/foodsafety/chem/chemicals/2_source_and_occurrence.pdf), <http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC66077>

**EFSA (2006).** European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane.

**Ehlert KA, Beumer CWE, Groot MCE (2008).** Migration of bisphenol A into water from polycarbonate baby bottles during microwave heating. *Food Addit. Contam. Part A.*, **25(7)**, 904-910.

**Erlinger T, Platz E, Rifai N, Helzlsouer K (2004).** C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer. *JAMA.*, **291(5)**, 585-90.

**FDA (2009).** Food and Drug Administration. Safety assessment of BPA in medical products. August 7.

**Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Formaün D, Bray F (2015).** Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer.*, **136(5)**, E359-E386

**Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ (2010).** Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics*, **126**, 760-768.

**Foss SR, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T, Cortez DA, Endo EH, Dias Filho BP (2014).** Antifungal activity of pomegranate peel extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, **13(1)**, 32-37.

**Fujimoto VY, Kim D, vom Saal FS, Lamb JD, Taylor JA, Bloom MS (2011).** Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, **95(5)**, 1816-1819.

**Galloway T, Cipelli R, Guralnik J, Ferrucci L, Bandinelli S, Corsi AM, Money C, McCormack P (2010).** Daily Bisphenol A Excretion and Associations with Sex Hormone Concentrations: Results from the InCHIANTI Adult Population Study. *Environ. Health Perspect.*, **118(11)**, 1603-1608.

**Geens T, Roosens L, Neels H, Covaci A (2009).** Assessment of human exposure to Bisphenol-A, Triclosan and Tetrabromobisphenol-A through indoor dust intake in Belgium. *Chemosphere*, **76(6)**, 755-760.

**Geens T, Apelbaum TZ, Goeyens L, Neels H, Covaci A (2010).** Intake of bisphenol A from canned beverages and foods on the Belgian market. *Food Addit. Contam. Part A*, **27(11)**, 1627–1637.

**Geens T, Goeyens L, Covaci A (2011).** Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **214(5)**, 339–347.

**Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, Covaci A (2012).** A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem. Toxicol.*, **50(10)**, 3725-3740.

**Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA (2000).** Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.*, **48(10)**, 4581-4589.

**Goldberg DM (1980).** Structural, functional and clinical aspects of  $\gamma$ -glutamyltransferase. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.*, **12(1)**, 1-58.

**Goodson A, Summerfield W, Cooper I, (2002).** Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Addit. Contam.*, **19**, 796-802.

**Greetharathan T (2016).** Effect of Bisphenol-A on Brain Tissue in Pregnant Rat *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, **5(8)**, 677-689

**Haidari M, Ali M, Ward Casscells S, Madjid M (2009).** Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*, **16(12)**, 1127–1136.

**Hamed HS, Abdel-Tawwab M (2017).** Ameliorative effect of propolis supplementation on alleviating bisphenol-A toxicity: Growth performance, biochemical variables, and oxidative stress biomarkers of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fingerlings. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, **202**, 63-69.

**Harvey PW, Johnson I (2002).** Approaches to the assessment of toxicity data with endpoints related to endocrine disruption. *J. Appl. Toxicol.*, **22(4)**, 241-247

**Hassan, ZK, Elobeid MA, Virk P, Omer SA, ElAmin M, Daghestani MH, AlOlayan EM (2012).** Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2012**, 1-6.

**Hayouni EA, Miled K, Boubaker S, Bellasfar Z, Abedrabba M, Iwaski H, Hamdi M (2011).** Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum L.* peels with enhanced in vivo healing potential on dermal wounds. *Phytomedicine*, **18(11)**, 976–984.

**Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002).** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, **13(10)**, 572-584.

**Houston DMJ, Robins B, Bugert JJ, Denyer SP, Heard CM (2017).** In vitro permeation and biological activity of punicalagin and zinc (II) across skin and mucous membranes prone to Herpes simplex virus infection. *Europ. J. Pharma. Sci.*, **96**, 99-106.

**Jean-Gilles D, Li L, Vaidyanathan VG, King R, Cho B, Worthen DR, Seeram NP(2013).** Inhibitory effects of polyphenol punicalagin on type-II collagen degradation in vitro and inflammation in vivo. *Chem. Biol. Interact.*, **205(2)**, 90-99.

**Kang JH, Kondo F (2003).** Determination of bisphenol A in milk and dairy products by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Food Prot.*, **66(8)**, 1439–1443.

**Kabuto H, Amakawa, M, Shishibori, T (2004).** Exposure to bisphenol A during embryonic/fetal life and infancy increases oxidative injury and causes underdevelopment of the brain and testis in mice. *Life Sciences*, **74(24)**, 2931-2940.

**Kaplan M, Hayek T, Raz A, Coleman R, Dornfeld L, Vaya J, Aviram M (2001).** Pomegranate Juice Supplementation to Atherosclerotic Mice Reduces Macrophage Lipid Peroxidation, Cellular Cholesterol Accumulation and Development of Atherosclerosis. *J. Nutr.*, **131(8)**, 2082-2089.

**Karak K (2019).** Biological activities of flavinoids: An overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **10(4)**, 1567-1574.

**Kasimsetty SG, Bialonska D, Reddy MK, Thornton C, Willett KL, Ferreira D (2009).** Effects of Pomegranate Chemical Constituents/Intestinal Microbial Metabolites on CYP1B1 in 22Rv1 Prostate Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.*, **57(22)**, 10636-10644.

**Kehrer, J P (1993).** Free Radicals as Mediators of Tissue Injury and Disease. *Crit. Rev. Toxicol.*, **23(1)**, 21-48.

**Khan GN, Gorin MA, Rosenthal D, Pan Q, Bao LW, Wu ZF, Merajver SD (2009).** Pomegranate Fruit Extract Impairs Invasion and Motility in Human Breast Cancer. *Integr. Cancer Ther.*, **8(3)**, 242-253.



**Khan N, Hadi N, Afaq F, Syed DN, Kweon MH, Mukhtar H (2007).** Pomegranate fruit extract inhibits prosurvival pathways in human A549 lung carcinoma cells and tumor growth in athymic nude mice. *Carcinogenesis*, **28(1)**, 163-173.

**Khwairakpam AD, Bordoloi D, Thakur KK, Monisha J, Arfuso F, Sethi G, Kunnumakkara AB (2018).** Possible use of Punica granatum (Pomegranate) in cancer therapy. *Pharmacological Research*, **133**, 53-64.

**Ko JH, Sethi G, Um JY, Shanmugam MK, Arfuso F, Kumar AP, Bishayee A, Ahn KS (2017).** The role of resveratrol in cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, **18(12)**, 2589-2625.

**Kosky PG, Guggenheim EA (1985).** Solid-state polymerization in poly(butylene terephthalate): The Equilibrium constant. *Polymer Engineering and Science*, **25(18)**, 1145-1147.

**Kotwal GJ (2008).** Genetic diversity-independent neutralization of pandemic viruses (e.g. HIV), potentially pandemic (e.g. H5N1 strain of influenza) and carcinogenic (e.g. HBV and HCV) viruses and possible agents of bioterrorism (variola) by enveloped virus neutralizing compounds (EVNCs). *Vaccine.*, **26(24)**, 3055-3058.

**Kubwabo C, Kosarac I, Stewart B, Gauthier BR, Lalonde K, Lalonde PJ (2009).** Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Addit. Contam. Part A.*, **26(6)**, 928-937.

**Kulkarni AP, Mahal HS, Kapoor S, Aradhya SM (2007).** In Vitro Studies on the Binding, Antioxidant, and Cytotoxic Actions of Punicalagin. *J. Agric. Food Chem.*, **55(4)**, 1491-1500.

**Lang LA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D (2008).** Association of Urinary Bisphenol A Concentration With Medical Disorders and Laboratory Abnormalities in Adults". *JAMA.*, **300 (11)**, 1303-1310.

**Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Espín JC (2006).** The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J. Nutr. Biochem.*, **17(9)**, 611-625.

**Lassen C, Mikkelsen SH, Brandt UK (2011).** *Migration of bisphenol A from cash register receipts and baby dummies.* In: Survey of Chemical Substances in Consumer Products. Danish Ministry of the Environment., Survey of Chemical Substances in Consumer Products, No. 110. 1-67.

**Lassen TH, Frederiksen H, Jensen TK, Petersen JH, Joensen UN, Main KM (2014).** Urinary bisphenol A levels in young men: Association with reproductive hormones and semen quality. *Environ Health Perspect.*, **122(5)**, 478-484.

**Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM (2008).** Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology Letters.*, **176(2)**, 149-156.

**Lee MW, Tanaka T, Nonaka GI, Nishioka I (1992).** Dimeric ellagitannins from *Alnus japonica*. *Phytochemistry*, **31(8)**, 2835-2839.

**Lee ST, Lu MH, Chien LH, Wu TF, Huang LC, Liao GI (2013).** Suppression of urinary bladder urothelial carcinoma cell by the ethanol extract of pomegranate fruit through cell cycle arrest and apoptosis. *BMC Complement Altern Med.*, **13(1)**, 364-375.

**Li DK, Zhou Z, Miao M, He Y, Qing D, Wu T, Wang J, Weng X, Ferber J, Herrinton LJ, Zhu Q, Gao E, Yuan, W (2010).** Relationship Between Urine Bisphenol-A Level and Declining Male Sexual Function. *J. Andrology.*, **31(5)**, 500-506.

**Li Y, Burns KA, Arao Y, Luh CJ, Korach KS (2012).** Differential Estrogenic Actions of Endocrine-Disrupting Chemicals Bisphenol A, Bisphenol AF, and Zearalenone through Estrogen Receptor alpha and beta in Vitro. *EHP.*, **120 (7)**, 1029-1035.

**Li X, Gong X, Chen J, Zhang J, Sun J, Guo M (2015).** miR-340 inhibits glioblastoma cell proliferation by suppressing CDK6, cyclin-D1 and cyclin-D2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **460(3)**, 670-677.

**Li, H, Tanaka T, Zhang YJ, Yang CR, Kouno I (2007).** Rubusaviins A-F, Monomeric and Oligomeric Ellagitannins from Chinese Sweet Tea and Their  $\alpha$ -Amylase Inhibitory Activity. *Chem. Pharm. Bull.*, **55 (9)**, 1325-1331.

**Lim DS, Kwack SJ, Kim KB, Kim HS, Lee BM (2009).** Risk assessment of bisphenol A migrated from canned foods in Korea. *J. Toxicol. Environ. Health A.* **72**, 1327-1335.

**Lin LT, Chen TY, Chung CY, Noyce RS, Grindley TB, McCormick C, Lin TC, Wang GH, Lin CC, Richardson C D (2011).** Hydrolyzable Tannins (Chebulagic Acid and Punicalagin) Target Viral Glycoprotein-Glycosaminoglycan Interactions To Inhibit Herpes Simplex Virus 1 Entry and Cell-to-Cell Spread. *J. Virology*, **85(9)**, 4386-4398.

**Lin LT, Chen TY, Lin SC, Chung CY, Lin TC, Wang GH, Anderson R, Lin CC, Richardson CD (2013).** Broad-spectrum antiviral activity of chebulagic acid and punicalagin against viruses that use glycosaminoglycans for entry. *BMC Microbiology*, **13(1)**, 187-202.

**Lin CC, Hsu YF, Lin TC, Hsu HY (2001).** Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminophen-induced liver damage in rats. *Phytotherapy Research*, **15(3)**, 206-212.

**Lin CC, Hsu YF, Lin TC, Hsu FL, Hsu HY (1998).** Antioxidant and Hepatoprotective Activity of Punicalagin and Punicalin on Carbon Tetrachloride-induced Liver Damage in Rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, **50(7)**, 789-794.

**Lin CC, Hsu YF, Lin TC (1999).** Effects of punicalagin and punicalin on carrageenan-induced inflammation in rats. *J. Chin. Med.*, **27(3-4)**, 371-376.

**Loganathan SN, Kannan K (2011).** Occurrence of Bisphenol A in Indoor Dust from Two Locations in the Eastern United States and Implications for Human Exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **61(1)**, 68-73.

**Lott JA (1982).** Inflammatory diseases of the pancreas. *Crit Rev. Clin. Lab. Sci.*, **17(3)**, 201-228

**Lu J, Ding K, Yuan Q (2008).** Determination of punicalagin isomers in pomegranate husk. *Chromatographia*, **68(3-4)**, 303-306.

**Machado TD, Leal ICR, Amaral ACF, dos Santos KRN, da Silva MG, Kuster RM (2002).** Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *J. Mex. Chem. Soc.*, **13(5)**, 606-610.

**Malik A, Mukhtar H (2006).** Prostate Cancer Prevention Through Pomegranate Fruit. *Cell Cycle.*, **5(4)**, 371-373.

**Malik A, Afaq F, Sarfaraz S, Adhami VM, Syed DN, Mukhtar H (2005).** Pomegranate Fruit Juice for Chemoprevention and Chemotherapy of Prostate Cancer. *PNAS.*, **102(41)**, 14813-14818.

**Manna P, Sinha M, Sil PC (2006).** Aqueous extract of *Terminalia arjuna* prevents carbon tetrachloride induced hepatic and renal disorders. *BMC Complement. Altern. Med.*, **6(1)**, 33-43.

**Martel F, Guedes M, Keating E (2016).** Effect of polyphenols on glucose and lactate transport by breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, **157(1)**, 1-11.

**Marzouk MSA, El-Toumy SAA, Moharram FA, Shalaby NM, Ahmed AA (2002).** Pharmacologically Active Ellagitannins from *Terminalia myriocarpa*. *Planta Medica.*, **68 (6)**, 523-527.

**Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C (2005).** Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*, **16(10)**, 577-586.

**Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR (2001).** In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 149-157.

**Meeker JD (2010).** Exposure to environmental endocrine disrupting compounds and men's health. *Maturitas*, **66 (3)**, 236-241.

**Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS (2010).** Association of Urinary Bisphenol A Concentration with Heart Disease: Evidence from NHANES 2003/06. *Plos one*, **5(1)**, e8673.

**Menezes SMS, Cordeiro LN, Cordeiro GSB (2006).** Punica granatum(pomegranate) extract is active against dental plaque. *J. Herb. Pharmacother.*, **6(2)**, 79-92

**Mendiola J, Jørgensen N, Andersson AM, Calafat AM, Ye X, Redmon JB, Drobnis EZ, Wang C, Sparks A, Thurston SW, Swan SH (2010).** Are Environmental Levels of Bisphenol A Associated with Reproductive Function in Fertile Men? *Environ Health Perspect.*, **118(9)**, 1286-1291.

**Miao M, Yuan W, Zhu G, He X, Li DK (2011).** In utero exposure to bisphenol-A and its effect on birth weight of offspring. *Reprod. Toxicol.*, **32(1)**, 64-68.

**Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, Masuno H (2007).** Perinatal and postnatal exposure to bisphenol A increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J. Atheroscler. Thromb.*, **14(5)**, 245-252.

**Mok-Lin E, Ehrlich S, Williams P, Petrozza J, Wright D, Hauser R (2009).** Urinary bisphenol a concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *Fertility and Sterility*, **92(3)**, S43-S44.

**Naiki-Ito A, Chewonarin T, Tang M, Pitchakarn P, Kuno T, Ogawa K, Takahashi S (2014).** Ellagic acid, a component of pomegranate fruit juice, suppresses androgen-dependent prostate carcinogenesis via induction of apoptosis. *The Prostate*, **75(2)**, 151-160.

**Naji H (2017).** The Interaction of C - Reactive Protein, Bisphenol A, & Cardiovascular Disease: A Demographical Analysis. *Glob. J. Health Sci.*, **9(3)**, 63-72.

**Nakamura D, Yanagiba Y, Duana Z, Itoa Y, Okamura A, Asaeda N, Tagawa Y, Lic CM, Taya K, Zhanga SY, Naitoa H, Ramghana DH, Kamijima M, Nakajima T (2010).** Bisphenol A may cause testosterone reduction by adversely affecting both testis and pituitary systems similar to estradiol. *Toxicol. Lett.*, **194**, 16-25.

**Nam SH, Seo YM, Kim MG (2010).** Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*, **79(9)**, 949-952.

**Niemetz R, Gross GG (2003).** Oxidation of pentagalloylglucose to the ellagitannin, tellimagrandin II, by a phenol oxidase from *Tellima grandiflora* leaves. *Phytochemistry*, **62 (3)**, 301-306.

**Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N (2005).** Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338 (1)**, 668-676.

Noonan GO, Ackerman LK, Begley TH (2011). Concentration of bisphenol A in highly consumed canned foods on the U. S. Market. *J. Agric Food Chem.*, **59** (13), 7178-7185.

Núñez-Sánchez MA, González-Sarrías A, Romo-Vaquero M, García-Villalba R, Selma MV, Tomás-Barberán FA, Espín JC (2015). Dietary phenolics against colorectal cancer-From promising preclinical results to poor translation into clinical trials: Pitfalls and future needs. *Mol. Nutr. Food Res.*, **59**(7), 1274-1291.

Ogo FM, Siervo GE ML, Gonçalves GD, Cecchini R, Guarnier FA, Anselmo-Franci JA, Fernandes GSA (2017). Low doses of bisphenol A can impair postnatal testicular development directly, without affecting hormonal or oxidative stress levels. *Reprod., Fertil. Dev.*, **29**(11), 2245-2254.

Oguazu CE, Ezeonu FC, Ubaoji KI, Anajekwu B (2015). Bisphenol A Exerts A Transient Perturbation of Liver Function in Wistar Albino Rats at Acute and Sub-Chronic Exposure Doses. *JPSBR.*, **5**(3), 274-278.

Okonogi S, Duangrat C, Anuchpreeda S, Tachakittirungrod S, Chowwanapoonpohn S (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *J. Food Chem.*, **103**(3), 839-846.

Okuda T, Ito H (2011). Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, **16**(3), 2191-2217.

Pérez C, Anesini C (1994). In vitro antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against Salmonella typhi. *J. Ethnopharmacol.*, **44**(1), 41-46.

Pieper-Bigelow C, Strocchi A, Levitt MD (1990). Where does serum amylase come from and where does it go? *Gastroentero. Clin. North. Am.*, **19**, 793-810.8

Plastics Europes (2008). [https://www.plasticseurope.org/application/files/1515/1689/9283/2007\\_CompellingFacts\\_PubOct2008.pdf](https://www.plasticseurope.org/application/files/1515/1689/9283/2007_CompellingFacts_PubOct2008.pdf)

Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, Waechter JM (2000). The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci.*, **54**, 3-18.

Pouységu L, Deffieux, D, Malik G, Natangelo A, Quideau S (2011). Synthesis of ellagitannin natural products. *Nat.Prod. Rep.*, **28**(5), 853-874.

Prokop Z, Hanková L, Jeřábek K (2004). Bisphenol A synthesis – modeling of industrial reactor and catalyst deactivation. *React. Func. Polym.*, **60**, 77-83.

Qiu W, Chen J, Li Y, Chen Z, Jiang L, Yang M, Wu M (2016). Oxidative stress and immune disturbance after long-term exposure to bisphenol A in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol Environ Saf.*, **16**(130), 93-102.

**Raja S, Ahamed KF, Kumar V, Mukherjee K, Bandyopadhyay A, Mukherjee PK(2007).** Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *J. Ethnopharmacol.*, **109(1)**, 41-47.

**Reiner Ž (2014).** Resistance and intolerance to statins. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **24(10)**, 1057-1066.

**Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996).** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free. Radic. Biol. Med.*, **20(7)**, 933-956.

**Rocha A, Wang L, Penichet M, Martins-Green M (2012).** Pomegranate juice and specific components inhibit cell and molecular processes critical for metastasis of breast cancer. *Breast. Cancer Res. Treat.*, **136(3)**, 647-658.

**Rochester JR (2013).** Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod. Toxicol.*, **42**, 132-155.

**Rochester JR, Bolden AL (2015).** Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ Health Perspect*, **123(7)**, 643-650.

**Ropero AB, Alonso-Magdalena P, García-García E, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A (2008).** Bisphenol-A disruption of the endocrine pancreas and blood glucose homeostasis. *J. Androl.*, **31(2)**, 194-200.

**Rosas-Piñón Y, Mejía A, Díaz-Ruiz G, Aguilar MI, Sánchez-Nieto S, Rivero-Cruz J F (2012).** Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *J. Ethnopharmacol.*, **141(3)**, 860–865.

**Rosenblat M, Volkova N, Aviram M(2013).** Pomegranate phytosterol ( $\beta$ -sitosterol) and polyphenolic antioxidant (punicalagin) addition to statin, significantly protected against macrophage foam cells formation, *Atherosclerosis*, **226(1)**, 110-117.

**Rosenblat M, Aviram M (2011).** Pomegranate Juice Protects Macrophages from Triglyceride Accumulation: Inhibitory Effect on DGAT1 Activity and on Triglyceride Biosynthesis. *Ann. Nutr. Metab.*, **58(1)**, 1-9.

**Rosenblat M, Hayek T, Aviram M (2006).** Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. *Atherosclerosis*, **187(2)**, 363-371.

**Ross J A, Kasum C M (2002).** Dietary Flavinoids: Bioavailability, Metabolic Effects, and Safety. *Annu. Rev. Nutr.*, **22(1)**, 19-34.

**Rudel RA, Gray JM, Engel CL, Rawsthorne TW, Dodson RE, Ackerman JM Rizzo J, Nudelman JL, Brody JG (2011).** Food packaging and bisphenol A and

bis(2-ethylhexyl) phthalate exposure: findings from a dietary intervention. *Environ Health Perspect*, **119(7)**, 914-920.

**Sadik NAH, Shaker OG (2013)**. Inhibitory Effect of a Standardized Pomegranate Fruit Extract on Wnt Signalling in 1, 2-Dimethylhydrazine Induced Rat Colon Carcinogenesis. *Dig. Dis. Sci.*, **58(9)**, 2507-2517.

**Sajiki J, Miyamoto F, Fukata H, Mori C, Yonekuno J, Hayakawa K (2007)**. Bisphenol A (BPA) and its source in foods in Japanese markets. *Food Addit. Contam.*, **24(1)**, 103-112.

**Seeram N, Adams L, Henning S, Niu Y, Zhang Y, Nair M, Heber D (2005)**. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *J. Nutr. Biochem.*, **16(6)**, 360-367.

**Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W (2005)**. Effects of bisphenol-A (BPA), dibutylphthalate (DBP), benzophenone-2 (BP2), procymidone (Proc), and linurone (Lin) on fat tissue, a variety of hormones and metabolic parameters: A 3 months comparison with effects of estradiol (E2) in ovariectomized (ovx) rats. *Toxicology*, **213(1-2)**, 13-24.

**Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B (2010)**. Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: Current status and future prospect. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **3(1)**: 91-100.

**Shams Ardekani MR, Hajimahmoodi M, Oveisi MR, Sadeghi N, Jannat B, Ranjbar AM, Gholam N, Moridi T (2011)**. Comparative antioxidant activity and total flavonoid content of persian pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars. *Iran J. Pharm. Res.*, **10 (3)**, 519-524.

**Shankar A ve Teppala S (2011)**. Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, **96(12)**, 3822-3826.

**Shankar A, Teppala S, Sabanayagam C. (2012)**. Urinary bisphenol a levels and measures of obesity: results from the national health and nutrition examination survey 2003-2008. *ISRN Endocrinology*, **2012**, 1-6.

**Sharpe RM (2010)**. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.*, **365(1546)**, 1697-1712.

**Shekhar TC, Anju G (2014)**. Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *Am. J. Ethno.*, **1 (4)**, 244-249.

**Silva LP, Angelis CD, Bonamin F, Kushima H, Mininel FJ, Dos Santos LC, Delella FK, Felisbino SL, Vilegas W, Da Rocha LRM, Ramos MADS, Bauab TM, Toma W, Lima CAH (2015)**. Terminalia catappa L.: A medicinal plant from the Caribbean pharmacopeia with anti-Helicobacter pylori and antiulcer action in experimental rodent models. *J. Ethnopharmacol.*, **159**, 285-295.

- Sohrab G, Narollahzadeh J, Zand H, Amiri Z, Tohidi M, Kimiagar M (2014).** Effects of pomegranate juice consumption on inflammatory markers in patients with type 2 diabetes: A randomized, placebo-controlled trial. *J Res Med Sci.* **19(3)**, 215-220.
- Sreeja S, Santhosh Kumar TR, Lakshmi BS, Sreeja S (2012).** Pomegranate extract demonstrate a selective estrogen receptor modulator profile in human tumor cell lines and in vivo models of estrogen deprivation. . *J. Nutr. Biochem.*, **23(7)**, 725-732.
- Storz P (2005).** Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci.*,**10(1-3)**, 1881-1896.
- Sturgeon SR, Ronnenberg AG (2010).** Pomegranate and breast cancer: possible mechanisms of prevention. *Nutr.Rev.*, **68(2)**, 122-128.
- Su X, Sangster MY, D'Souza DH (2010).** In Vitro Effects of Pomegranate Juice and Pomegranate Polyphenols on Foodborne Viral Surrogates. *Foodborne Pathol. Dis.*, **7(12)**, 1473-1479.
- Suhendi A, Hanwar D, Santoso B, Wicaksono AN, Widiana L (2018).** Antioxidant Activity of Non polar and Semipolar Fractions of Ethanol Extract of Zingiber zerumbet Smith Leaves by Spectrophotometer and ELISA Reader. *J. Pharm. Sci. Res.*, **10(3)**, 439-441.
- Sun Y, Xin T, Men X, Xu Z, Tian W (2017).** In vitro and in vivo antioxidant activities of three major polyphenolic compounds in pomegranate peel: Ellagic acid, punicalin, and punicalagin. *J. Integr. Agric.*,**16(8)**, 1808-1818.
- Suzuki N, Hattori, A (2003).** Bisphenol A suppress osteoclastic and osteoblastic activities in the cultured scales of goldfish. *Life Sci.*,**73(17)**, 2237-2247.
- Suzuki N, Kambegewa A, Hattori, A (2003).** Bisphenol A Influences the plasma calcium level and inhibits calcitonin secretion in Goldfish. *Zool. Sci.*, **20(6)**, 745-748.
- Şener G, Yeğen BÇ (2009).** İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi*, **22(3)**, 5-73.
- Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Takai Y, Taketani Y (2004).** Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocrine J.*, **51(2)**, 165-169.
- Tapiero H, Tew K, Nguyen Ba G, Mathé G (2002).** Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomed. Pharmacother.*, **56(4)**, 200-207.
- Tarantino G, Valentino R, Di Somma C, D'Esposito V, Passaretti F, Pizza G, Brancato V, Orio F, Formisano P, Colao A, Savastano C (2013).** Bisphenol A in



polycystic ovary syndrome and its association with liver–spleen axis. *Clin. Endocrinol.*, **78** (3), 447-453.

**Tayel AA, El-Tras WF, Moussa SH, El-Sabbagh SM (2012).** Surface Decontamination and Quality Enhancement in Meat Steaks Using Plant Extracts as Natural Biopreservatives. *Foodborne Patholog. Dis.*, **9**(8), 755-761.

**Teel RW, Martin RM (1988).** Disposition of the plant phenol ellagic acid in the mouse following oral administration by gavage. *Xenobiotica.*, **18**(4), 397-405.

**Tomás-Barberan FA, Villalba RG, Sarrias AG, Selma MV, Espin JC (2014).** Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: consistent observation of three urolitin phenotypes in intervention trials, Independent of Food Source, Age and Health Status. *J. Agric. Food Chem.*, **62**(28), 6535-6538.

**Trasande L, Attina T, Trachtman H (2013).** Bisphenol A exposure is associated with low-grade urinary albumin excretion in children of the United States. *Kidney Int.*, **83** (4), 741-748.

**Turrini E, Ferruzzi L, Fimognari C (2015).** Potential Effects of Pomegranate Polyphenols in Cancer Prevention and Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 1-19.

**Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, Scheers H, Godderis L, Hoet P, Van Meerbeek B (2011).** How much do resinbased dental materials release? A meta-analytical approach. *Dent. Mater.*, **27**(8), 723-747.

**Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV (2007).** Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.*, **24**(2), 139-177.

**Vasconcelos LCS, Sampaio FC, Sampaio MCC, Pereira MSV, Higino JS, Peixoto M HP (2006).** Minimum inhibitory concentration of adherence of *Punica granatum* Linn (pomegranate) gel against *S. mutans*, *S. mitis* and *C. albicans*. *Braz. Dent. J.*, **17**(3), 223-227.

**Vom Saal FS, Hughes C (2005).** An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol A Shows the Need for a New Risk Assessment. *Environ Health Perspect*, **113**(8), 926–933.

**Vora A, Londhe V, Pandita N (2015).** Herbosomes enhance the in vivo antioxidant activity and bioavailability of punicalagins from standardized pomegranate extract. *J. Funct. Foods*, **12**, 540-548.

**Voravuthikunchai S, Lortheeranuwat A, Jeeju W, Sririrak T, Phongpaichit S, Supawita T (2004).** Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Ethnopharmacol.*, **94**(1), 49-54.

**Voravuthikunchai SP, Limsuwan S (2006).** Medicinal Plant Extracts as Anti-Escherichia coli O157:H7 Agents and Their Effects on Bacterial Cell Aggregation. *J. Food Prot.*, **69(10)**, 2336-2341.

**Völkel W, Colnot T, Csanady GA, Filser JG, Dekant W (2002).** Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.*, **15(10)**, 1281-1287.

**Wang L, Alcon A, Yuan H, Ho J, Li QJ, Martins-Green M (2011).** Cellular and molecular mechanisms of pomegranate juice-induced anti-metastatic effect on prostate cancer cells. *Integr. Biol.*, **3(7)**, 742-754.

**WHO (2010).** Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A. Summary report. Available from: <<http://www.who.int/>

**Williams RJ, Spencer J P, Rice-Evans C (2004).** Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free. Radic. Biol. Med.*, **36(7)**, 838-849.

**Wisniewski P, Romano RM, Kizys MML, Oliveira KC, Kasamatsu T, Giannocco G Chiamaelore MI, Silva MRD, Romano MA (2015).** Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Toxicology*, **329**, 1-9.

**Wu TF, Hsu LT, Tsang BX, Huang LC, ih WY, Chen LY (2016).** Clarification of the molecular pathway of Taiwan local pomegranate fruit juice underlying the inhibition of urinary bladder urothelial carcinoma cell by proteomics strategy. *BMC Complement. Altern. Med.*, **16(1)**, 1-10.

**Yaidikar L, Thakur S (2014).** Antioxidant potential of punicalagin in an in-vitro system of precision cut goat liver slices subjected to oxidative stress. *IJP.*, **1(10)**, 646-649.

**Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Imatanaka N, Takatsuki M (2002).** Subacute oral toxicity study of ethynylestradiol and bisphenol A, based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline no. 407". *Arch. Toxicology.*, **76 (2)**, 65-74.

**Yang Y, Xiu J, Zhang L, Qin C, Liu J (2012).** Antiviral activity of punicalagin toward human enterovirus 71 in vitro and in vivo. *Phytomedicine*, **20(1)**, 67-70.

**Yonar MS, Ural M Ş, Silici S, Yonar ME (2014).** Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of propolis. *Ecotoxicol Environ Saf.*, **102**, 202-209.

**Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, Woodruff TJ, Vom Saal FS (2012).** Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from the Endocrine Society. *Endocrinology*, **153(9)**, 4097-4110.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Gülşah CANDAN  
Doğum Yeri ve Yılı : Bucak-1994  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
Uyruğu : Türk  
Telefon No : 0546 455 31 76  
Elektronik Posta : [candanglsh@yahoo.com.tr](mailto:candanglsh@yahoo.com.tr)  
İletişim Adresi : Fatih Mahallesi 1646 Sokak No:6  
Daire:2 Bucak/BURDUR



### Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lisans: Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik Bölümü (2012-2016)

Yüksek Lisans: Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı

### Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl (Mesleki Deneyim):

1. Zonguldak Çaycuma Devlet Hastanesi (2013)
2. Burdur Bucak Devlet Hastanesi (2013)
3. Burdur Devlet Hastanesi (2014)
4. Burdur Bucak Devlet Hastanesi (2016- görev yapmaktayım)

