

T.C.  
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

BİSFENOL A'YA MARUZ KALAN SIÇAN KARACİĞER  
DOKULARINDA HESPERETİN'İN ANTİOKSİDAN ENZİMLER,  
MİNERALLER VE YAĞ ASİTLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AYNI ZELİHA TÜRKAN

DANIŞMAN

DOÇ. DR. AHMET ÖZKAYA

ADİYAMAN, 2025

*Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen FEFYL/2024-0002 no.lu  
proje kapsamında desteklenmiştir.*

## ÖZET

### BİSFENOL A'YA MARUZ KALAN SIÇAN KARACİĞER DOKULARINDA HESPERETİN'İN ANTİOKSİDAN ENZİMLER, MİNERALLER VE YAĞ ASİTLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Aynı Zeliha TÜRKAN

Kimya Anabilim Dalı

Adıyaman Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ağustos/2025, Sayfa: 53

Danışman: Doç. Dr. Ahmet ÖZKAYA

Bu tez çalışmasında, sıçanlarda Bisfenol A toksisitesine karşı Hesperetin'in koruyucu etkileri araştırıldı. Çalışmada dört grup oluşturuldu. Bu gruplar; Kontrol grubu (K), Hesperetin grubu (H), Bisfenol A grubu (B) ve Hesperetin+Bisfenol A (HB) grubudur. Hesperetin 75 mg/kg ve Bisfenol A 25 mg/kg gūnaşırı olarak uygulandı. Sıçanların karaciğer dokularında MDA, GSH, AChE, GST, CaE, bazı mineraller ve yağ asit düzeyleri belirlendi. B grubu MDA düzeyi K grubuna göre arttı. HB grubu MDA düzeyi B grubuna göre azaldı. B grubu GSH düzeyi K grubuna göre azaldı. B grubu GR enzim aktivitesi K grubuna göre azaldı. B grubu CaE ve GST enzim aktivite düzeyleri K grubuna göre arttı. HB grubu CaE ve GST enzim aktivite düzeyleri B grubuna göre azaldı. B grubu AChE enzim aktivite düzeyi K grubuna göre arttı. HB grubu AChE enzim aktivite düzeyi B grubuna göre arttı. B grubu Fe düzeyi K grubuna göre azaldı. B grubu 16:0, 18:0 ve  $\Sigma$ SFA düzeyi K grubuna göre arttı. B grubu 18:2n6c ve 20:4n6 düzeyleri K grubuna göre azaldı. HB grubu 18:2n6c düzeyi B grubuna göre arttı. B grubu  $\Sigma$ PUFA ve  $\Sigma$ SFA düzeyleri K grubuna göre azaldı. Sonuç olarak Bisfenol A'nın oluşturduğu toksisite ve oksidatif strese karşı Hesperetin'in sıçan karaciğer dokularında koruyucu etkileri olduğunu düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Bisfenol A; Enzim aktivitesi; MDA; Mineral; Yağ asitleri.

## ABSTRACT

### EFFECTS OF HESPERETIN ON ANTIOXIDANT ENZYMES, MINERALS, AND FATTY ACIDS IN RAT LIVER TISSUES EXPOSED TO BISPHENOL A

Aynı Zeliha TÜRKAN

Department of Chemistry

Adıyaman University, Graduate Education Institute, August/2025, Page: 53

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet ÖZKAYA

In this thesis, the protective effects of hesperetin against bisphenol A toxicity in rats were investigated. Four groups were formed in the study. These groups are the Control group (C), Hesperetin group (H), Bisphenol A group (B), and Hesperetin+Bisphenol A (HB) group. Hesperetin 75 mg/kg and Bisphenol A 25 mg/kg were administered every other day. MDA, GSH, AChE, GST, CaE, some minerals, and fatty acid levels were determined in the liver tissues of rats. MDA level in group B increased compared to group K. MDA level in group HB decreased compared to group B. GSH level in group B decreased compared to group K. GR enzyme activity in group B decreased compared to group K. CaE and GST enzyme activity levels in group B increased compared to group K. CaE and GST enzyme activity levels in group HB decreased compared to group B. AChE enzyme activity level in group B increased compared to group K. AChE enzyme activity level in group HB increased compared to group B. Fe levels in group B decreased compared to group K. 16:0, 18:0, and  $\Sigma$ SFA levels in group B increased compared to group K. 18:2n6c and 20:4n6 levels in group B decreased compared to group K. 18:2n6c levels in group HB increased compared to group B.  $\Sigma$ PUFA and  $\Sigma$ SFA levels in group B decreased compared to group K. In conclusion, we believe that hesperetin has protective effects on rat liver tissues against the toxicity and oxidative stress caused by bisphenol A.

**Keywords:** Bisphenol A; Enzyme activity; Fatty acids; MDA; Mineral.

## TEŞEKKÜR

Öncelikle, bu tez çalışmam boyunca bana yol gösteren, destek veren ve bilgi birikimini cömertçe paylaşan danışman hocam Doç. Dr. Ahmet ÖZKAYA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bilgi ve tecrübesiyle her aşamada bana rehberlik etmiştir. Deneylerdeki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Miraç UÇKUN hocama teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca beni her daim destekleyen, emekleri ve sevgileriyle bugünlere gelmemi sağlayan sevgili annem Müjgan ASLAN ve babam Hasan ASLAN'a şükranlarımı sunarım. Hayat yolculuğumda en büyük destekçim olan, bana inanan, beni destekleyen kıymetli eşim Kenan TÜRKAN'a sabrı ve sevgisi için teşekkür ederim. Hayatıma anlam katan, gülüşüyle tüm yorgunluğumu unutturan, evimizin neşesi canım oğlum Selçuk TÜRKAN'a da teşekkür eder, bu çalışmayı ileride annesi ile gurur duyabilmesi için ona ithaf ederim.

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ**

Bu tez çalışması kapsamında; bilimsel araştırma ve yayın etiği kurallarına, yürürlükteki yasal düzenlemelere, ilgili üniversite ve enstitülerin etik ilkelerine tam olarak uyulduğunu; araştırma sürecinde herhangi bir biçimde intihal, veri tahrifatı, uydurma veri veya etik dışı davranışta bulunulmadığını beyan ederim. Tez çalışmasında kullanılan tüm kaynaklar doğru ve eksiksiz şekilde belirtilmiş; başkalarının çalışmalarından yapılan alıntılar uygun şekilde referanslandırılmıştır. Gerek insan gerekse hayvan denekler üzerinde gerçekleştirilen araştırmalarda ilgili etik kurul onaylarının alındığını ve bu onayların gerekli belgelerle kanıtlandığını bildiririm. Bilimsel dürüstlük ve etik kurallara bağlı kalarak hazırladığım bu tez çalışmasının, bilim dünyasına katkı sağlamasını temenni ederim.

**Aynı Zeliha TÜRKAN**

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

|                                                   |     |
|---------------------------------------------------|-----|
| BAŞLIK SAYFASI.....                               | i   |
| JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI .....                       | ii  |
| ÖZET .....                                        | iii |
| ABSTRACT .....                                    | iv  |
| TEŞEKKÜR.....                                     | v   |
| ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ ..... | vi  |
| İÇİNDEKİLER.....                                  | vii |
| TABLolar DİZİNİ.....                              | ix  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                              | x   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....               | xi  |
| 1. GİRİŞ.....                                     | 1   |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                           | 2   |
| 2.1. Hesperetin .....                             | 2   |
| 2.2. Serbest Radikaller .....                     | 4   |
| 2.3. Flavonoidler .....                           | 5   |
| 2.3.1. Flavonoller .....                          | 5   |
| 2.3.2. Flavonlar .....                            | 5   |
| 2.3.3. Flavanonlar.....                           | 5   |
| 2.3.4. Flavonoidler (Flavan-3-oller).....         | 5   |
| 2.3.5. İzoflavonlar.....                          | 6   |
| 2.3.6. Antosiyanidinler .....                     | 6   |
| 2.4. Bisfenol A .....                             | 6   |
| 2.5. Mineraller .....                             | 10  |
| 2.6. Asetilkolinesteraz Enzimi .....              | 12  |
| 2.7. Malondialdehit .....                         | 13  |
| 2.8. Redükte Glutasyon.....                       | 14  |
| 2.9. Glutasyon-S-Transferaz.....                  | 15  |
| 2.10. Glutasyon Redüktaz.....                     | 16  |
| 2.11.Karboksilesteraz Enzimi .....                | 16  |
| 2.12. Yağ Asitleri.....                           | 17  |

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.13. Karaciğerin Fizyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkenlere Karşı Savunma Mekanizmaları ..... | 18 |
| 2.14. Çalışmanın Amacı.....                                                                      | 19 |
| 3. MATERYAL ve METOD .....                                                                       | 20 |
| 3.1. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler.....                                                 | 20 |
| 3.2. İnceleme Materyali .....                                                                    | 20 |
| 3.3. Kullanılan Yardımcı Aletler ve Cihazlar.....                                                | 20 |
| 3.4. Deney Hayvanları.....                                                                       | 21 |
| 3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....                                                     | 21 |
| 3.6. Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri.....                                                  | 21 |
| 3.7. Redükte Glutatyon Analizi .....                                                             | 22 |
| 3.8. Glutatyon-S-Transferaz Aktivitesi Analizi .....                                             | 22 |
| 3.9. Malondialdehit Analizi.....                                                                 | 23 |
| 3.10. Karboksilesteraz Aktivitesi Analizi .....                                                  | 23 |
| 3.11. Asetilkolinesteraz Aktivitesi Analizi.....                                                 | 23 |
| 3.12. Total Protein Analizi .....                                                                | 24 |
| 3.13. Dokuların Lipit Ekstraksiyonu.....                                                         | 24 |
| 3.14. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması.....                                             | 24 |
| 3.15. Element Analizi.....                                                                       | 25 |
| 3.16. İstatistiksel Analiz .....                                                                 | 25 |
| 4. BULGULAR .....                                                                                | 26 |
| 5. TARTIŞMA.....                                                                                 | 35 |
| KAYNAKÇA.....                                                                                    | 39 |
| ÖZ GEÇMİŞ                                                                                        |    |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 2.1.</b> BFA'nın bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....                          | 2  |
| <b>Çizelge 2.2.</b> Farklı Bisfenol türevlerinin kimyasal özellikleri ve kullanım alanları..... | 8  |
| <b>Çizelge 3.1.</b> TR-CN100 kolonu sıcaklık programı.....                                      | 25 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> Mikrodalga yakma cihazı çalışma şartları.....                               | 25 |
| <b>Çizelge 4.1.</b> Karaciğer dokusu yağ asit düzeyi (%).....                                   | 33 |
| <b>Çizelge 4.2.</b> Sıçan ağırlıklarının değişim miktarları.....                                | 34 |



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Flavanon ve hesperetinin kimyasal yapıları..... | 2  |
| Şekil 4.1. Karaciğer dokusu AChE aktivitesi düzeyleri..... | 26 |
| Şekil 4.2. Karaciğer dokusu CaE aktivitesi düzeyleri.....  | 27 |
| Şekil 4.3. Karaciğer dokusu GR aktivitesidüzeyleri.....    | 27 |
| Şekil 4.4. Karaciğer dokusu GST aktivitesi düzeyleri.....  | 28 |
| Şekil 4.5. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri.....             | 28 |
| Şekil 4.6. Karaciğer dokusu GSH düzeyleri.....             | 29 |
| Şekil 4.7. Karaciğer dokusu Cu düzeyleri.....              | 30 |
| Şekil 4.8. Karaciğer dokusu Fe düzeyleri.....              | 30 |
| Şekil 4.9. Karaciğer dokusu Mg düzeyleri.....              | 31 |
| Şekil 4.10. Karaciğer dokusu Mn düzeyleri.....             | 31 |
| Şekil 4.11. Karaciğer dokusu Zn düzeyleri.....             | 32 |
| Şekil 4.12. Karaciğer dokusu Se düzeyleri.....             | 32 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                               |                                       |
|-------------------------------|---------------------------------------|
| AChE                          | : Asetilkolinesteraz                  |
| ATCI                          | : Asetiltiyokolin İodat               |
| BFA                           | : Bisphenol A                         |
| CaE                           | : Karboksilesteraz                    |
| CAT                           | : Katalaz                             |
| CDNB                          | : 1-Kloro-2,4-Dinitrobenzen           |
| Cu                            | : Bakır                               |
| DTNB                          | : 5,5'-Ditiyo-Bis-2-Nitrobenzoik Asit |
| DTT                           | : Dithiothreitol                      |
| EDTA                          | : Etilendiamin Tetra Asetik Asit      |
| FAD                           | : Flavın Adenin Dinükleotit           |
| Fe                            | : Demir                               |
| GSH                           | : Redükte Glutasyon                   |
| GP <sub>x</sub>               | : Glutasyon Peroksidaz                |
| GR                            | : Glutasyon Redüktaz                  |
| GSSG                          | : Glutasyon Disülfür                  |
| GST                           | : Glutasyon S-Transferaz              |
| HCl                           | : Hidroklorik Asit                    |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | : Hidrojen Peroksit                   |

|                                |                                         |
|--------------------------------|-----------------------------------------|
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | : Slfirik Asit                         |
| HNO <sub>3</sub>               | : Nitrik Asit                           |
| KCl                            | : Potasyum Klorr                       |
| KHCO <sub>3</sub>              | : Potasyum Bikarbonat                   |
| MDA                            | : Malondialdehit                        |
| MUFA                           | : Tekli Doymamış Yağ Asitleri           |
| NaCl                           | : Sodyum Klorür                         |
| NADPH                          | : Nikotinamid Adenin Dinükleotit        |
| PNPA                           | : p-Nitrofenil Asetat                   |
| PUFA                           | : Çoklu Doymamış Yağ Asitleri           |
| Se                             | : Selenyum                              |
| SFA                            | : Doymuş Yağ Asitleri                   |
| TBA                            | : Tiyobarbitürik Asit                   |
| TBARS                          | : Tiyobarbitürik Asit Reaktif Maddeleri |
| TCA                            | : Trikloroasetik Asit                   |
| USFA                           | : Doymamış Yağ Asitleri                 |

## 1. GİRİŞ

Bisfenol A (BFA), plastik ürünlerin birincil bileşenlerinden biri olup, toksik bir molekül olarak sınıflandırılmaktadır. Bu bileşik, çevresel kontaminasyona yol açmasının yanı sıra, hayvan metabolizması üzerinde de ciddi zararlı etkilere neden olmaktadır. Özellikle, dokulardaki antioksidan savunma sistemini zayıflattığı gözlemlenmiştir [1]. Günümüzde, BFA'nın toksik etkilerini hafifletmeye yönelik gereksinimler giderek artmaktadır. Bu bağlamda, araştırmalar doğal antioksidan bileşiklerin potansiyel terapötik rollerine odaklanmıştır. Hücresel antioksidan sistemin güçlendirilmesinin, BFA'nın neden olduğu hücresel hasarları önlemede etkili bir strateji sunduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır [2]. Hesperetin, narenciye ve diğer çeşitli bitkisel kaynaklarda bol miktarda bulunan, doğal antioksidan özelliklere sahip bir flavonoid moleküldür. Bu biyoaktif bileşiğin, literatürde belirtildiği üzere, çeşitli pozitif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Bu etkiler arasında, hücre içi serbest radikal seviyesinin azaltılması [3] ve karaciğer hasarlarının engellenmesi öne çıkmaktadır [4]. Bu tez çalışmasında, BFA'nın neden olduğu karaciğer hasarı modelinde, Hesperetin'in biyokimyasal parametreler üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmıştır.

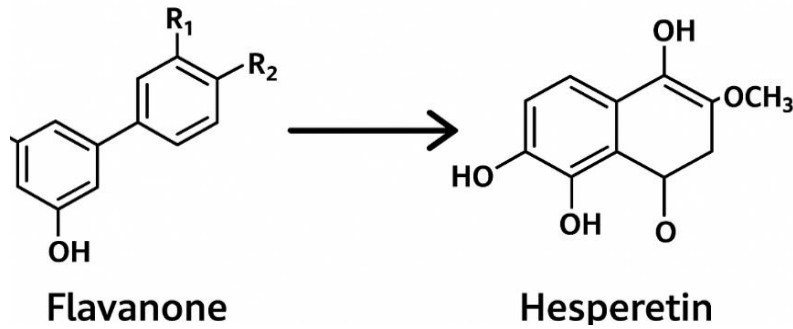
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hesperetin

Flavonoidler, çeşitli meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan polifenolik bileşiklerin geniş bir alt sınıfını oluşturmaktadır [5]. Bu flavonoidlerden biri olan Hesperetin, kimyasal olarak 3',5,7-trihidroksi-4'-metoksiflavanon formülüyle tanımlanan bir molekül olup, özellikle turunçgil meyvelerinde bol miktarda bulunmaktadır. Hesperetinin kimyasal yapısında bir dihidro-2H-piran-3-on halkasıyla bağlanan iki aromatik halkanın oluşturduğu bir flavanon çekirdeğinden oluşmaktadır. Ayrıca moleküler formunda R<sub>1</sub> ve R<sub>3</sub> pozisyonlarında bir hidroksil grubu (OH), R<sub>2</sub> pozisyonunda ise bir metoksi grubu (OCH<sub>3</sub>) vardır [6].

**Çizelge 2.1.** BFA'nın bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri [6]

| Fiziksel ve kimyasal özellikler | Veri                                           |
|---------------------------------|------------------------------------------------|
| Moleküler formül                | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> |
| Molekül kütlesi                 | 304,2713                                       |
| Erime noktası                   | 230-232 °C                                     |
| Kaynama noktası                 | 586,2 °C (760 mm)Hg                            |
| Yoğunluk                        | 1,458 g/cm <sup>3</sup>                        |
| Alevlenme noktası               | 223 °C                                         |
| Kırılma indeksi                 | -4° (C = 1,8, EtOH)                            |



**Şekil 2.1.** Flavanon ve hesperetinin kimyasal yapıları [6]

Oksidatif stres, metabolik süreçler sırasında serbest radikal üretiminin artışına neden olan bir durumdur. Bu durum, doku ve hücrelerdeki antioksidan savunma sistemlerinin işlevini zayıflatarak, hücresel bütünlüğü tehlikeye atar [7]. Oksidatif stresin tetiklediği metabolik süreçler, Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üretimini artırarak önemli hücresel hasarlara yol açmaktadır [8]. Hesperetin, doğrudan ROS'u nötralize ederek ve vücudun doğal antioksidan enzimlerinin aktivitesini artırarak öne çıkan antioksidan özelliklere sahiptir. Özellikle, Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi reaktif moleküllerin yol açtığı serbest radikal üretimine karşı hücresel düzeyde koruma sağladığı bilinmektedir [9]. Hesperetin'in antioksidan özelliklerine ve biyolojik sistemler üzerindeki faydalı etkilerine dair geniş bir literatür mevcuttur. Yapılan çalışmalar, bu bileşiğin ROS seviyelerini düşürdüğünü [3], miyokardiyal iskemiye önlediğini [10], diyabetik sıçanlarda antioksidan kapasiteyi artırdığını [11] ve farelerde karaciğer hasarını hafiflettiğini [4] ortaya koymaktadır. Bu molekülün anti-inflamatuar aktivitesine dair yapılan çalışmalar, çeşitli mekanizmalarla inflamatuvar süreçleri düzenleyerek etki ettiğini göstermektedir. Bildirilen etkiler arasında; nöroinflamasyonun baskılanması [12], karaciğer inflamasyonunun hafifletilmesi [13] ve kalp iltihabının önlenmesi [14] yer almaktadır. Ayrıca, moleküler düzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve pro-inflamatuar faktörlerin salınımını azalttığı da belirtilmiştir [15]. Sisplatin, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajandır. Ancak, bu ilacın en önemli yan etkilerinden biri, oksidatif strese ve buna bağlı akut böbrek hasarına (nefrotoksisiteye) yol açmasıdır. Bu bağlamda, Sisplatin ile muamele edilmiş HK2 hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, Hesperetin'in ROS seviyelerini düşürerek oksidatif stres kaynaklı apoptozu etkili bir şekilde baskıladığı rapor edilmiştir [10]. Ek olarak, çeşitli çalışmalar Hesperetin'in antitümör etkilerini de ortaya koymuştur. Bu çalışmalar, söz konusu bileşiğin tümör inflamasyonunu azalttığını ve tümör metastazını engellediğini bildirmektedir [16]. Yapılan araştırmalar, Hesperetin'in çeşitli kanser hücreleri üzerindeki antitümör aktivitesini ortaya koymaktadır. Bu çalışmalar, molekülün akciğer adenokarsinom hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü inhibe ettiğini [17] ve mide kanseri hücrelerinde göç ve invazyonu baskıladığını [18] göstermektedir. Ayrıca, apoptozu indüklediği, hücre döngüsünün durdurulmasını tetiklediği [19] ve akciğer kanseri H522 hücrelerinde mitokondriyal membran potansiyelinin kaybını önlediği de bildirilmiştir [20]. Yapılan çalışmalar, bu molekülün nöroprotektif özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Bu etkiler arasında, hafıza bozukluklarının iyileştirilmesi [21] ile Alzheimer [22] ve Parkinson [23] gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu bir etki gösterdiği yer almaktadır. Genel

nöroprotektif etkileri de yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur [24]. Yapılan çalışmalar, Hesperetin'in anti-diyabetik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalar, molekülün Tip 2 diyabeti azalttığı [25], diyabetin başlangıcını önlediği [26] ve diyabetik sıçanlarda yara iyileşmesini desteklediği [27] gibi önemli bulguları ortaya koymaktadır.

## 2.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, hücrede hem ekzojen hem de endojen kaynaklar aracılığıyla üretilmektedir. Ekzojen kaynaklar, yüksek enerjili radyasyon, kemoterapi ilaçları, sigara kullanımı ve alkol tüketimi gibi çeşitli çevresel faktörleri içermektedir [28]. Endojen radikaller, canlı organizmaların normal metabolik süreçlerinin doğal birer yan ürünü olarak meydana gelmektedir. Bu radikallerin en önemli endojen kaynağı, özellikle mitokondriyal solunum zincirinde gerçekleşen reaksiyonlar sırasında üretilen ROS'dur [29]. Ek olarak, ksantin oksidaz, NADPH (Nikotinamid Adenin Dinükleotit) oksidaz, nitrik oksit sentaz gibi bazı enzimler de serbest radikal üretimine önemli katkılar sunar. Bu radikallerin, özellikle nitrogen türlerinin, aşırı üretimi; hücre zarları, DNA, lipitler ve proteinler gibi temel hücre bileşenlerine hasar vererek hücresel bütünlüğü bozabilir. Biyolojik sistemlerde, radikal oluşumu ile antioksidan sistemler tarafından bu radikallerin temizlenmesi arasındaki dengesizlik, oksidatif stres olarak tanımlanır. Oksidatif stresin aşırı seviyelere ulaşması, metabolizmayı bozarak çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasına neden olabilir [30]. Serbest radikallerin zararlı etkileri, antioksidan enzimler ve diğer antioksidan moleküller tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Bu enzimatik savunma sisteminin temel bileşenleri arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) yer alır. Bu enzimler, ilk olarak SOD aracılığıyla süperoksit radikallerini ( $O_2^-$ ) hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüştürmekte, ardından CAT ve GPx enzimleri bu  $H_2O_2$ 'yi su ve oksijen gibi zararsız moleküllere indirgemektedir. Ayrıca, polifenolik bileşikler, vitaminler ve redükte glutatyon (GSH) gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da bu savunma hattına önemli katkılar sağlamaktadır [31]. Hücre zarları, yapılarında bol miktarda çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) barındırmaktadır. Serbest radikaller, bu PUFA'lar ile reaksiyona girerek, lipit peroksidasyonu olarak bilinen zincirleme reaksiyonlarını başlatır [32]. Bu sürecin başlıca ürünleri arasında 4-hidroksinonenal (4-HNE) ve malondialdehit (MDA)'ın yanı sıra propionaldehit ve hekzanal gibi aldehitler yer almaktadır [33]. MDA, lipit peroksidasyonu sürecinin birincil ürünlerinden olup, bu alanda en çok incelenen bileşiklerden biridir. Mutajenik ve toksik özelliklere sahip olan MDA, lipit peroksidasyonunun bir son ürünü

olarak, kronik hastalıklarında yaygın olarak ölçülen önemli bir biyobelirteç olarak kabul edilmektedir [34].

### **2.3. Flavonoidler**

Polifenolik bileşikler, meyveler, sebzeler ve tahıllar başta olmak üzere çeşitli bitkisel kaynaklarda yaygın olarak bulunmaktadır [35]. Polifenoller, kimyasal yapılarına göre flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Flavonoidler, iki benzen halkasının üç karbonlu bir heterosiklik piran halkasıyla birbirine bağlandığı, on beş karbonlu bir flavon iskeletine sahiptir. Flavonoidlerin temel yapısı, bir difenilpropan (C6–C3–C6) iskeleti tarafından oluşturulur. Yapısal farklılıklarına göre altı ana gruba ayrılan bu bileşikler; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavonoidler (flavan-3-oller), izoflavonlar ve antosiyanidinler olarak sınıflandırılır [36].

#### **2.3.1. Flavonoller**

En yaygın flavonoidler arasında yer alan kuersetin, kaempferol ve mirisetin, bu grubun en önemli moleküllerindendir. Kuersetin, soğan, elma, brokoli ve çayda; kaempferol, ıspanak ve brokolide; mirisetin ise çeşitli meyve ve sebzelerde bulunur [37].

#### **2.3.2. Flavonlar**

Flavonlar beyaz veya mavi çiçeklerin pigmentlerinde bulunurlar. En sık incelenen flavonlar luteolin ve apigenindir. Luteolin havuç, lahana ve brokoli gibi birçok sebze ve meyvede bulunur ve apigenin kereviz, maydanoz ve enginar da bulunur [38].

#### **2.3.3. Flavanonlar**

En sık incelenen flavonlar arasında naringenin (greyfurt), eriodictyol (limon) ve hesperetin (portakal) gibi aglikonlar bulunur [39].

#### **2.3.4. Flavonoidler (Flavan-3-oller)**

En sık incelenen kateşinler kateşin-3-gallat, epigallokateşin 3-gallat (EGCG) ve epikateşindir. EGCG, yeşil çaydaki en bol bulunan polifenoldür [40].



### **2.3.5. İzoflavonlar**

İzoflavonlar, fitoöstrojenler arasında en yaygın grubu oluşturmaktadır [41]. Başlıca izoflavonlardan biri olan genistein, bir fitoöstrojen olarak hem steroid hormon reseptörlerini hem de çeşitli metabolik yolları düzenleyebilme yeteneğine sahiptir. İzoflavonlar için en zengin kaynak, soya fasulyesi ve bu ürünlerden elde edilen gıdalardır. Bu gıdalarda bulunan başlıca izoflavonlardan biri olan daidzein, östrojen reseptörleri ile etkileşerek anti-neoplastik (kanser karşıtı) etkilere sahip olabileceğini göstermektedir [42].

### **2.3.6. Antosiyanidinler**

Antosiyanidinler, çeşitli meyveler ve diğer bitkisel kaynaklarda bol miktarda bulunan polifenolik bileşiklerdir. Siyanidin, delfinidin, pelargonidin ve malvidin, doğada en yaygın olarak bulunan antosiyanidinler arasında yer almaktadır [43].

## **2.4. Bisfenol A**

Hızlı sanayileşme ve değişen tüketim alışkanlıkları, gıda ürünlerinin raf ömrünü artırma ihtiyacını beraberinde getirmiştir. Bu durum, gıda ambalajlamasında plastik materyallerin kullanımını yaygınlaştıran önemli bir faktör olmuştur. Bu ambalajlar, gıdaların bozulmasını geciktirerek mikrobiyal kontaminasyonu ve oksidatif reaksiyonları azaltır. Böylece, hem gıda güvenliği hem de lojistik süreçlerdeki verimlilik artışı sağlanır [44]. Bu süreç, küresel plastik üretiminin 1950 ile 2018 yılları arasında yaklaşık 240 katlık bir artış gösterdiğini ortaya koymaktadır [45]. Bu artışa paralel olarak, endüstriyel bir kimyasal olan BFA, özellikle gıda ambalajları, tüketim ürünleri ve oyuncak sanayisi gibi alanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. BFA'nın çevresel ortamlara salınımı; hava, su ve toprakta kontaminasyona yol açarken, aynı zamanda insan vücudunun çeşitli doku ve biyolojik sıvılarında da saptanabilmektedir [46]. Bu nedenle, BFA çevresel kirletici ve endokrin bozucu bir kimyasal olarak sınıflandırılmaktadır [47]. BFA, ilk kez 1905 yılında fenol ve asetonadan sentezlenmiştir. Bu bileşiğin biyolojik aktivitesi ise 1938'de Dodds ve Lawson tarafından rapor edilmiştir [48]. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalar, BFA, BPB, BPC ve BPF gibi bileşiklerin östrojenik etkilerinin, moleküler yapıdaki para pozisyonunda bulunan hidroksil grupları ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu gruplar, doğal bir östrojen olan 17 $\beta$ -estradiol ile yapısal benzerlik sergilemektedir [49]. BFA'nın, plastik endüstrisinde polikarbonat üretiminde bir çapraz bağlayıcı olarak işlev gördüğü 1953 yılında belirlenmiştir. Bu bulguyu takiben, bileşiğin ticari üretimine 1957 yılında başlanmıştır [50].

1960'lı yıllar itibarıyla, BFA bazlı polikarbonat ve epoksi reçinelerinin gıda ile temas eden malzemeler olarak kullanımı geniş bir şekilde yaygınlaşmıştır [51]. Bugün, BFA bisfenol ailesinin en yaygın üretilen üyesi konumundadır. Bu bileşiğin yıllık üretim miktarının yaklaşık 8 milyon ton olduğu rapor edilmektedir [52]. Hamile kadınlar, bebekler ve çocuklar, BFA'nın potansiyel zararlı etkilerine karşı en hassas ve yüksek riskli gruplar arasında yer almaktadır [53]. Gıda ambalajlarından kaynaklanan BFA maruziyeti, bileşiğin insan biyolojik sıvılarında, özellikle serumda ve idrarda, ölçülebilmesine olanak tanımaktadır. Yapılan analizler, serum BFA seviyelerini 0,3-4,4 µg/L, idrar BFA seviyelerini ise 0,001-0,863 µg/kg/gün aralığında göstermektedir [54]. Literatürdeki pek çok çalışma, BFA'nın konserve gıdalarda yaygın olarak saptandığını teyit etmektedir [55]. Yapısal olarak östrojeni taklit eden BFA, endokrin sistemi bozarak çeşitli sağlık sorunlarına yol açabilmektedir. BFA'nın bu etkisi, kanser, diyabet, dislipidemi, kardiyovasküler bozukluklar ve karaciğer hastalıkları gibi metabolik rahatsızlıkların gelişimine neden olabilmektedir [56]. BFA, vücuda alındıktan sonra iki aşamalı bir metabolik süreçten geçer. Bu sürecin ilk aşamasında, bağırsak lipaz ve esterazları tarafından hidrolize edilerek monoester formunda emilimi gerçekleşir. İkinci aşamada ise, karaciğerde sülfat ve glukuronid konjugasyonu reaksiyonlarıyla metabolize edilerek idrar, dışkı veya ter yoluyla vücuttan atılır [57]. Bununla birlikte, BFA'nın bazı biyolojik sistemler üzerindeki etkileri geri döndürülemez olabilmektedir. Örneğin, DNA metilasyonunun inhibisyonu ve östrojen reseptörleri ile etkileşimler gibi mekanizmalar aracılığıyla mutajenik ve kanserojen etkilere zemin hazırlamaktadır [58]. Güncel bilimsel çalışmalar, BFA için belirlenmiş olan 5 mg/kg/gün'lük güvenlik sınırının, bileşiğin düşük dozlardaki potansiyel tehlikelerini tam olarak yansıtmadığını ortaya koymaktadır. Nitekim fareler üzerinde yapılan bir deneyde, 10 hafta boyunca sadece 50 µg/kg/gün dozunda BFA'ya maruz bırakılan deneklerde; bağırsak geçirgenliğinde bozulma, artan inflamasyon ve oksidatif stres, ayrıca apoptozda artış gözlenmiştir [59,60].

Sıcaklık artışı ve pH değişimleri gibi çevresel faktörlerin etkisiyle BFA, ambalaj materyallerinden kolayca sızarak su, toprak ve hava gibi çevresel ortamlara geçiş yapabilmektedir [61]. Yapılan araştırmalar, küresel atmosferdeki BFA konsantrasyonlarının 170–880 pg/m<sup>3</sup> aralığında olduğunu belirtirken, kutup bölgelerinde bu konsantrasyonların 1–17 pg/m<sup>3</sup> gibi kayda değer ölçüde daha düşük seviyelerde saptandığını bildirmektedir [62]. Gıda zincirindeki BFA konsantrasyonlarına ilişkin yapılan araştırmalar, besinlerin insanlar için başlıca maruziyet kaynağı olduğunu doğrulamaktadır. Ölçümlere göre, et

ürünlerinde ortalama 21,3 µg/kg, balıkta 26,3 µg/kg ve sebzelerde 5,66 µg/kg BFA seviyeleri tespit edilmiştir [63].

**Çizelge 2.2.** Farklı Bisfenol türevlerinin kimyasal özellikleri ve kullanım alanları [64]

| Bileşik (Kısaltma) | Kimyasal Adı                            | Kullanım Alanları                                                                                                                             |
|--------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BFA                | 2,2-bis(4 hidroksifenil) propan         | Polikarbonat plastikler, epoksi reçineler, oyuncaklar, diş dolguları, medikal cihazlar, gıda saklama kapları, hijyen ürünleri, gözlük camları |
| BPAF               | 4,4'-(hekzafloro-izopropiliden) difenol | Elektronik malzemeler, kozmetik, floroelastomer üretimi, kimya sanayi, çapraz bağlayıcılar                                                    |
| BPB                | 2,2-bis(4 hidroksifenil) butan          | Konserve gıdalar, meyve suları, marul türleri                                                                                                 |
| BPC                | 4,4'-(2,2-dikloroeten-1,1 diil) difenol | Polikarbonatlar, polyester, epoksi reçineler                                                                                                  |
| BPF                | 4,4'-dihidroksidifenil metan            | Boru kaplamaları, yapıştırıcılar, elektrik yalıtkanları, döşemeler                                                                            |
| BPS                | 4,4'-sülfonildifenol                    | Gıda ambalajları, termal kağıtlar, temizlik ürünleri, fenolik reçineler                                                                       |

Canlı organizmalar, çevresel bir toksin olan BFA'ya maruz kaldıklarında oksidatif stres artabilir. Bu durum, BFA'nın hücresel düzeydeki antioksidan savunma sistemlerini zayıflatmasıyla ilişkilendirilir. Yapılan araştırmalar, BFA maruziyetinin SOD, GPx ve CAT gibi önemli antioksidan enzimlerin aktivitesini düşürdüğünü göstermektedir. Bu mekanizma, hücrelerde serbest radikal hasarının artmasına ve dolayısıyla oksidatif stresin yükselmesine yol açar [65]. BFA'ya maruz kalma, hücre zarlarında lipid peroksidasyonu seviyelerinin artmasına neden olarak hücresel yapıların zarar görmesine yol açabilir. Yapılan çalışmalar, BFA'nın özellikle sıçanların karaciğer ve sperm hücrelerinde oksidatif stresi önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. Bu artan oksidatif stres, apoptoz (programlanmış hücre ölümü) sürecini tetikleyerek serum, kolon ve karaciğer dokularında hücre ölümü oranlarını yükseltir [1]. BFA'nın canlı organizmalara olan zararlı etkileri, yalnızca oksidatif stres ile sınırlı değildir. Aynı zamanda otofaji ve ferroptoz gibi farklı hücresel ölüm mekanizmalarını da tetiklediği gözlemlenmiştir. Bu durum, insan yumurtalık granüloza hücrelerinde [66] ve farelerin böbrek tübüler epitel hücrelerinde [67] yapılan çalışmalarda da doğrulanmıştır. BFA'nın özellikle plastik ürünler aracılığıyla yaygın bir şekilde çevrede bulunması ve endokrin bozucu özellikleri, bu toksinin zararlı etkilerini azaltacak stratejilere olan ihtiyacı artırmaktadır. Bu bağlamda, birçok doğal ürünün antioksidan özelliklerinin, BFA'nın neden olduğu hücresel hasara karşı koruyucu bir etki gösterdiği belirlenmiştir. Antioksidan kapasitenin artırılması, BFA'nın yol açtığı hücresel hasarı önleyebilir veya hafifletebilir [2]. Doğal ürünlerin koruyucu etkileri, genellikle antiinflamatuvar,

hepatoprotektif, antikarsinojenik ve metabolik düzenleyici aktivitelerle açıklanır. Yapılan bilimsel çalışmalar, bu tür biyoaktif bileşiklerin; iltihaplanma [68], karaciğer hasarı [69], prediyabet [70], kemik oluşumu [71] ve kanser [72] gibi çeşitli sağlık sorunlarına karşı koruyucu etkiler sağladığını göstermektedir. BFA'nın neden olduğu toksisiteye karşı etkili olduğu rapor edilen başlıca doğal bileşikler şunlardır:

- Biyokanin A
- Sineol
- Kurkumin
- Ergosterol
- Gallik asit
- Geraniol
- Lignin
- $\alpha$ -lipoik asit
- Luteolin
- Likopen
- Melatonin
- Naringenin
- Naringin
- Oroksilin A
- Proantosiyanidinler
- Kersetin
- Resveratrol
- Rutin
- Silibinin
- Taurin
- Timokinon
- E vitamini

Bu biyoaktif bileşiklerin sağladığı farmakolojik etkilerin, esas olarak BFA'nın neden olduğu oksidatif stresi baskılamasıyla ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu nedenle, söz konusu doğal ürünler, BFA maruziyetinin yol açabileceği karaciğer hasarı başta olmak üzere, çeşitli organ

ve sistemlerdeki toksik etkileri azaltmak için potansiyel koruyucu ajanlar olarak değerlendirilmektedir [73].

## 2.5. Mineraller

Organik bileşiklerin tam oksidasyonu sonrasında geriye kalan inorganik kalıntı kül olarak adlandırılmakta olup, bu kısım mineral içeriği temsil etmektedir. Hayvansal organizmalarda külün büyük çoğunluğu iskelet sisteminde yer alan minerallerden oluşurken, daha küçük bir bölümü ise hayati moleküllerin yapısında bulunan elzem minerallerden meydana gelmektedir. Bu minerallerin büyük bir kısmı iyonik bağlarla karakterize edilmektedir. Erişkin bir bireyin vücudunda mineraller, toplam vücut ağırlığının yaklaşık %4-5'ini oluşturmaktadır. Minerallerin metabolik işlevleri türlerine göre farklılık göstermektedir. Bazı mineraller, organik maddelerle bileşik oluşturarak yapısal bütünlüğe katkı sağlarken; bazıları enzim aktivasyonu, biyolojik düzenleme ve transmitter görevleriyle işlev görmektedir. Aynı zamanda mineraller; asit-baz dengesinin korunması, osmotik basıncın düzenlenmesi ve hücre zarından madde geçişi gibi fizyolojik süreçlerde önemli roller üstlenmektedir. Ayrıca sinir iletimi ve kas kasılması gibi sistemlerin sağlıklı işleyişi için gereklidirler. Organizma tarafından daha yüksek miktarda ihtiyaç duyulan mineraller arasında kalsiyum (Ca), fosfor (P), kükürt (S), sodyum (Na), potasyum (K), magnezyum (Mg) ve klor (Cl) yer almakta olup, bu elementler literatürde asal mineraller olarak tanımlanmaktadır. Bu minerallerden S ve P, aynı zamanda organik bileşiklerin yapısında bulunurlar. Ca, Mg ve P'nin büyük bir kısmı ise kemik dokusunda yer almakta ve bu dokuların yapısal bütünlüğünü ve mineral yoğunluğunu sağlamaktadır. Kemikler, sinir, endokrin ve kan dokuları gibi çeşitli biyolojik sistemlerin işlevleri için gerekli olan temel minerallerin depolanmasında kritik bir rol oynar. Asal minerallerin yanı sıra organizmada daha düşük miktarlarda ihtiyaç duyulan ancak yaşamsal açıdan son derece önemli olan eser mineraller de bulunmaktadır. Bu grupta öncelikli olarak demir (Fe) ve bakır (Cu) yer almakta; ayrıca çinko (Zn), manganez (Mn), iyot (I), flor (F), selenyum (Se) ve kobalt (Co) da eser mineraller arasında sayılmaktadır. Vücutta eser minerallerin düzeyleri, asal minerallere göre oldukça düşük olmasına karşın, her biri canlılık için zorunlu elementlerdir [74].

Mg, hücre metabolizmasında birçok biyokimyasal tepkimede rol alan temel minerallerden biridir. Özellikle Mg'nin adenozin trifosfat (ATP) ile oluşturduğu kompleks, çoğu enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi için gereklidir. Hücre içinde gerçekleşen

karbonhidrat ve protein metabolizmaları başta olmak üzere, çeşitli biyosentetik süreçlerde magnezyuma ihtiyaç duyulmaktadır. Tüm protein, nükleik asit, nükleotit ve karbonhidrat sentez süreçlerinde iyonize Mg ( $Mg^{+2}$ ) varlığı zorunludur. Karbonhidrat metabolizmasında  $Mg^{+2}$ , çok sayıda enzimin aktivasyonunda aktivatör olarak görev yaparken, protein metabolizmasında ise ribozom düzeyinde işlev göstererek protein sentezi için ko-faktör rolü üstlenmektedir [74].

Fe, metabolik faaliyetler açısından özellikle kan ve doku sağlığı için hayati öneme sahip temel eser elementlerden biridir. Fe, yalnızca hemoglobin ve miyoglobinin yapısında yer almakla kalmaz, aynı zamanda oksijen metabolizmasında görevli çeşitli enzimlerin yapısında da bulunur. Bu enzimler arasında yer alan hidrojen peroksidaz içerenler, hücre içinde oluşan  $H_2O_2$  birikimini engelleyerek ROS'un zararlı etkilerini sınırlar.  $H_2O_2$ 'nin biyolojik olarak birikmesi durumunda, proteinler, nükleik asitler ve hücre zarları gibi önemli yapılar zarar görebilir. Bu nedenle, Fe içeren CAT ve peroksidaz enzimleri,  $H_2O_2$ 'yi su ve moleküler oksijene ( $O_2$ ) dönüştürerek oksidatif stresin azaltılmasında önemli rol oynar [74].

Cu, birçok hayati enzimin aktivasyonu için gerekli olan temel eser elementlerden biridir. Bu mineraller arasında yer alan ve yapısında Cu bulunan SOD, güçlü bir antioksidan savunma enzimi olarak görev yapmaktadır. SOD enzimleri tüm hücrelerde yaygın olarak bulunmakla birlikte, hücre içi ve dışı formları farklı protein kompleksleriyle ilişkilidir. Ekstrasellüler SOD formu seruloplazmin aracılığıyla taşınırken, intrasellüler formu ise bakır tionein ile ilişkilidir. Bu kompleksler hem Zn hem de Cu elementlerini taşıma görevini üstlenir ve ilgili enzimler literatürde Cu/SOD (bakır süperoksit dismutaz) ve Zn/SOD (çinko süperoksit dismutaz) olarak tanımlanır. Tüm SOD enzimleri, hücre metabolizması sırasında oluşan  $O_2^-$ 'leri daha az zararlı olan peroksitlere dönüşümünü katalize eder. Ardından, bu peroksitler Se'ye bağlı GPx enzimi yardımıyla suya indirgenerek zararsız hale getirilir [74].

Zn, hücre içi enzimatik sistemlerde görev alan temel eser elementlerden biridir. Zn, canlı organizmalarda 70 ila 90 arasında enzimin yapısında bulunur. Bu enzimler, karbonhidrat ve enerji metabolizması, protein yıkımı ve sentezi, nükleik asit sentezi, karbondioksit taşınımı ve çeşitli biyokimyasal tepkimeler gibi önemli biyolojik süreçlerde rol oynar. Zn içeren en önemli enzimler arasında karbonik anhidraz, laktat dehidrojenaz, glutamat dehidrojenaz, alkalın fosfataz ve timidin kinaz yer almaktadır [74].

Mn, hücre içinde özellikle mitokondri düzeyinde bulunan ve metabolik işlevler açısından önemli rol oynayan eser bir mineraldir. Mn, metal-enzim kompleksleri oluşturarak birçok besin öğesinin metabolizmasında katalizör görevi üstlenir. Ayrıca, çeşitli amino

asitlerin birbirine dönüşümünü sağlayan enzimlerin aktivasyonunda görev yapmaktadır. Mn tarafından aktive edilen başlıca enzimler arasında arginaz, sistein desülfidaz, prolinaz, dipeptidaz ve lösin aminopeptidaz yer almaktadır [74].

Se, insan sağlığı açısından elzem bir eser element olup, bu özelliği ilk kez deneysel olarak sıçanlarda E vitamini eksikliği ile birlikte görülen karaciğer nekrozu sonucu belirlenmiştir. Se eksikliğine çeşitli canlı türlerinde rastlanmakla birlikte, belirgin semptomlar genellikle E vitamini ve diğer antioksidan maddelerin eksikliği ile birlikte ortaya çıkar. Vücutta Se en yüksek oranda karaciğer, böbrek, kalp ve dalakta bulunur. Bunun dışında, yağ dokusu hariç hemen tüm dokularda daha düşük düzeylerde de olsa yer alır. Se, antioksidan savunma sisteminde yer alan GPx enziminin yapısal bir bileşeni olup, bu yolla GSH aracılığıyla  $H_2O_2$ , lipid peroksitleri ve oksidatif hasarlara karşı hücre ve hücre zarını korur. Bu antioksidan rolüyle Se, E vitamini ile sinerjik bir denge içerisinde çalışır; her iki madde birbirinin koruyucu etkisini desteklemektedir. Se'nin bu koruyucu işlevleri, vücut genelinde pek çok dokudaki enzim sistemlerinde yaygın biçimde gözlemlenir. Bununla birlikte, toprakta ve bitkilerde yüksek miktarda bulunan Se'nin aşırı alımı toksik etkilere yol açabilir. En sık karşılaşılan Se toksisitesi ise, özellikle madencilik gibi sektörlerde çalışan bireylerin korunmasız şekilde Se içeren minerallere maruz kalması sonucu gelişmektedir [74].

## 2.6. Asetilkolinesteraz Enzimi

Asetilkolinesteraz (AChE; EC 3.1.1.7), asetilkolin adlı nörotransmitteri kolin ve asetik aside hidrolizleyen bir enzimdir. Bu enzim, dokularda serbest halde ya da fosfolipidlerle birleşmiş olarak bulunur. Özellikle karaciğerde sentezlenen AChE, beyinde, sinir uçlarında, eritrositlerde, dalakta ve kas dokularında yüksek konsantrasyonlarda yer alırken; karaciğer, pankreas ve kan serumunda daha düşük düzeylerde bulunur [75,76]. Asetilkolin, sinir hücreleri arasında nörotransmitter olarak görev yapar. Ayrıca kas kasılmalarının başlatılmasında ve kas lifi boyunca elektriksel iletimin sağlanmasında önemli rol oynar. Görevi sona eren asetilkolin, sinaps adı verilen nöronlar arası boşlukta bulunan AChE enzimi tarafından hızla kolin ve asetata parçalanarak etkisiz hale getirilir. Bu yıkım süreci, sinir iletilisinin doğru zamanda sonlanmasını ve sinyalin sürekli devam etmesini engeller [75,77]. AChE, oldukça yüksek bir aktiviteye sahip olup, her bir enzim molekülü saniyede yaklaşık 25.000 asetilkolin molekülünü parçalayabilmektedir [78]. AChE sadece sinaptik iletimde değil, aynı zamanda hücre yenilenmesi, hücresel farklılaşma ve stres yanıtı gibi çeşitli

fizyolojik süreçlerde de görev almaktadır [79]. Enzim aktivitesindeki azalma, sinir sistemi hastalıklarıyla ilişkilendirilmekte ve ciddi durumlarda ölümle sonuçlanabilmektedir [80]. Özellikle Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların tanı ve tedavisinde AChE önemli bir biyobelirteç olarak değerlendirilmektedir [81]. AChE enzimi ilk olarak 1938 yılında, elektrik balığının (*Electrophorus electricus*) elektrik organından ekstraksiyon yöntemiyle saflaştırılmıştır. Bu organ, günümüzde de en zengin AChE kaynaklarından biri olarak kabul edilmektedir [75,82].

## 2.7. Malondialdehit

Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı sonucu MDA oluşur. Memelilerde bu yağ asitleri arasında en çok araşidonik asit (20:4n6) ve dokosahekzaenoik asit (22:6n3) yer alırken, oleik asit (18:1n9c) ve linoleik asit (18:2n6c) oksidasyonu daha az miktarda MDA meydana gelir. Bazı dokularda MDA, yalnızca oksidatif süreçlerle değil, aynı zamanda enzimatik reaksiyonlar sonucu da oluşabilmektedir [83]. MDA, lipid peroksidasyonunun ve dolayısıyla oksidatif stresin önemli bir biyobelirteci olarak kabul edilmektedir [84]. MDA düzeylerinin ölçülmesi, hücrelerdeki lipid peroksidasyonu düzeyinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu molekülün hücre zarlarının geçirgenliğini artırdığı, iyon dengesini bozduğu, enzim aktivitelerinde azalmaya ve DNA hasarına yol açtığı gösterilmiştir [85]. PUFA'ların peroksidasyonu sonucu oluşan MDA, hücre zarının iyon geçirgenliğini ve enzim fonksiyonlarını olumsuz etkiler [86]. Aynı zamanda biyolojik sistemlerde kolayca tespit edilebilir olması, onu etkili bir belirteç haline getirmektedir [87]. Serbest oksijen radikallerinin etkisiyle lipid peroksidasyonunun artması, MDA seviyelerinde yükselmeye neden olur. Bu süreç hücre zarlarını ve organik yapıların işlevselliğini bozarak hücre ölümüne yol açabilir [88]. Hücre zarlarında bulunan doymamış yağ asitleri, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek lipid oksidasyonunu başlatır [89]. MDA enzimatik olarak metabolize edilebilir ve elektrofilik yapısından dolayı arginin, histidin ve lizin gibi amino asitlerle reaksiyona girme eğilimindedir [90]. MDA oluşumu, özellikle karaciğer, beyin, böbrek ve kalp dokularında membran bütünlüğünü bozarak iyon taşıma ve enzim aktivitesi gibi işlevleri olumsuz etkiler [91]. MDA düzeyleri, özellikle 20:4n6 ve 18:2n6c gibi çoklu çift bağ içeren yağ asitlerinin oksidasyonu sırasında önemli ölçüde artış gösterir [92]. Lipid peroksidasyonu süreci, hidroperoksitlerin aldehitlere ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle sonlanır. Bu dönüşüm, MDA oluşumunun ana kaynaklarından biridir [93].



## 2.8. Redükte Glutasyon

Redükte glutasyon (GSH), glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan, molekül ağırlığı düşük ancak biyolojik açıdan son derece önemli görevleri olan bir tripeptittir. [94]. 1888 yılında De Rey-Pailhede tarafından keşfedilmiş, 1921’de ise Hopkins tarafından yapısı aydınlatılmıştır [95]. Molekülde yer alan SH grubu, sisteinin sülfidril grubunu temsil eder ve GSH’ın redoks reaksiyonlarına katılan aktif kısmını oluşturur [96]. GSH; plazma, kan hücreleri, beyin, akciğerler, böbrekler ve özellikle karaciğer gibi birçok doku ve organda bulunur. Karaciğerdeki GSH hızlı bir yarılanma süresine sahiptir; bu süre genellikle 2–4 saat arasında değişirken, mitokondride yaklaşık 30 saatlik bir yarılanma ömrüne sahiptir [97]. Vücuttaki GSH’ın büyük bir kısmı, yaklaşık %85-90’ı, hücrelerin sitozol adı verilen sitoplazma kısmında bulunur. Geri kalan kısım ise mitokondri ve diğer hücre organellerinde yer alır. Özellikle bazı özel durumlarda, mitokondrideki GSH miktarı, sitozoldaki seviyeye yaklaşabilir. Mitokondride GSH sentezleyen enzimlerin yetersiz kaldığı durumlarda, sitozolden taşınarak denge sağlanır [98]. GSH, hücre içi ortamın en önemli antioksidan moleküllerindendir. Antioksidan savunma sistemine katkıda bulunmanın yanı sıra, GSH; ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, amino asitlerin hücre içine taşınması, proteinlerdeki sülfidril gruplarının indirgenmiş halde tutulması ve bazı enzimatik reaksiyonlarda koenzim olarak görev alma gibi çeşitli biyolojik işlevlere sahiptir [99]. Pb, Cd, Cu, Cd ve Zn ve gibi ağır metal iyonlarıyla birleşerek kompleks yapılar oluşturur ve bu sayede vücuttan atılımlarını kolaylaştırır [100]. GPx enziminin substratı olan GSH, bu enzim aracılığıyla  $H_2O_2$  ve diğer organik peroksitleri detoksifiye eder [101]. Hücre içi başlıca antioksidanlardan biri olan GSH, serbest radikaller ve peroksitlerin nötralizasyonu yoluyla oksidatif hasarı önler [102]. Aynı zamanda DNA sentezi ve onarımı, metabolik süreçlerin düzenlenmesi, detoksifikasyon ve serbest radikallerin neden olabileceği hasarların önlenmesinde görev alır [103]. Vücuttaki birçok hücrede sentezlenen GSH, yüksek intraselüler konsantrasyona sahiptir ve non-protein tiyol yapısındadır [104]. Hem endojen hem de ekzojen kaynaklı oksidatif stres etkenlerine karşı hücreleri koruyan güçlü bir non-enzimatik antioksidan ve indirgen ajandır [99]. GSH seviyeleri, bağışıklık sistemi sağlığı ve hastalıklara karşı koruma açısından kritiktir. Düşük GSH düzeyleri; hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. GSH, memelilerin tüm dokularında sentezlense de özellikle karaciğerde yoğun olarak üretilir [105]. Yetişkin bir bireyde günlük yaklaşık 10 gram GSH üretildiği tahmin edilmektedir [106]. Safra asidinin salınımı sırasında GSH konsantrasyonunda belirgin bir artış

gözlenirken, ekstrasellüler sıvıda bu oran daha düşüktür. GSH molekülündeki sülfidril aktif grup, redüksiyon ve konjugasyon reaksiyonlarında rol alır ve bu sayede ksenobiyotiklerin ve peroksitlerin zararlı etkilerini ortadan kaldırır [107]. Protein mutasyonları ya da enzim stabilitesinin bozulması, glutatyon sentetaz eksikliğine yol açabilir. Bu enzimin genetik eksikliği ciddi sağlık problemleri, hatta ölümle sonuçlanabilir [108]. GSH, ksenobiyotik detoksifikasyonunda, aminoasit taşınmasında, proteinlerdeki sülfidril gruplarının korunmasında ve bazı enzimatik reaksiyonlarda koenzim olarak görev alır. Hücredeki DNA ve protein sentezinde, enzim aktivitesinin düzenlenmesinde ve oksidatif strese karşı savunmada da önemli rol oynar. GSH, memeli hücrelerde milimolar düzeyde bulunur ve büyük kısmı karaciğerdedir. Tiyol grubu içeren bu molekülün oksidasyonu sonucunda serbest radikaller oluşabilir; ancak GSH bu radikalleri etkisiz hale getirerek hücreyi korur [109]. GSH bir enzim değildir fakat antioksidan özellik gösterir. DNA sentezi, aminoasit taşınımı, peroksit metabolizması ve çeşitli enzim aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynar [110]. GSH, protein olmayan tek tiyol olup aynı zamanda sistein deposudur. Hücre dışı ortamda kararsız olan sistein hızla okside olup sistine dönüşür [111]. GSH hem doğrudan serbest radikalleri nötralize eder hem de sitozolik GSH redoks döngüsünde substrat olarak görev yapar [112]. GSH; redükte GSH ve GSSG (Glutatyon disülfür) olmak üzere iki formda bulunur ve bu iki form hücre içinde dengede tutulur [113]. Bitki hücrelerinde kloroplast, mitokondri ve plazma membranında ROS meydana gelir. Normal metabolizma sırasında peroksizomlarda  $O_2^-$  oluşur ve bu radikaller SOD ve GR gibi antioksidan enzimlerle etkisiz hale getirilir [114].

## 2.9. Glutatyon S-Transferaz

Glutatyon-S-transferaz (GST), hücrelerin savunma sistemlerinde merkezi bir rol üstlenen ve özellikle detoksifikasyon süreçlerinde görev alan önemli bir enzimdir. Bu enzimler, GSH'ın, elektrofilik özellik gösteren endojen metabolitler ve eksojen ksenobiyotik bileşiklerle konjugasyonunu kataliz ederek onların daha suda çözünebilir türevlerine dönüşmesini sağlamaktadır. Böylelikle söz konusu bileşiklerin idrar veya safra yoluyla organizmadan uzaklaştırılması kolaylaşmaktadır [115]. Özellikle karaciğer, böbrek ve bağırsak gibi detoksifikasyon açısından kritik organlarda GST aktivitesinin yüksek seviyelerde bulunduğu bildirilmektedir [116]. GST genlerinde görülen genetik varyasyonlar, bireyler arasında metabolik farklılıklara yol açmakta ve bu durum çeşitli hastalıkların gelişiminde etkili olmaktadır. Nitekim bu genetik varyasyonların kanser, kardiyovasküler

hastalıklar, diyabet ve nörodejeneratif bozukluklar gibi çok sayıda kompleks hastalık ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur [117]. GST enzimleri, yalnızca ksenobiyotiklerin uzaklaştırılmasında değil, aynı zamanda lipid peroksidasyon ürünleri ve serbest radikal kaynaklı reaktif bileşiklerin detoksifikasyonunda da önemli rol oynamaktadır. Bu özellikleri sayesinde hücreleri oksidatif stresin zararlı etkilerinden koruyarak koruyucu bir bariyer görevi görmektedir[118]. Yapısal özellikleri ve katalitik mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalar ise GST enzimlerinin sadece detoksifikasyonda değil, aynı zamanda hücresel metabolizmanın düzenlenmesinde de kritik görevler üstlendiğini göstermektedir [119]. Klinik açıdan değerlendirildiğinde, GST enzimleri özellikle onkoloji alanında önem kazanmaktadır. Bazı tümör türlerinde GST izoformlarının aşırı ekspresyonu, kemoterapötik ajanlara karşı direnç gelişimini kolaylaştırmakta ve tedavi etkinliğini sınırlamaktadır. Bu nedenle GST enzimleri ve bunların inhibitörleri, günümüzde yeni nesil antikanser tedavi yaklaşımlarında potansiyel terapötik hedefler arasında değerlendirilmektedir [120].

## **2.10. Glutasyon Redüktaz**

Glutasyon redüktaz (GR, EC 1.8.1.7), hücresel antioksidan savunmanın temel enzimlerinden biridir ve glutasyon metabolizmasında kritik rol oynar. GR, flavin adenin dinükleotid (FAD) içeren bir oksidoredüktaz olup, GSSG moleküllerini NADPH kullanarak GSH formuna dönüştürür; bu süreç hücresel redoks dengesini sağlar ve oksidatif stresin yol açtığı lipid, protein ve DNA hasarını önler [121]. GR aracılığıyla yenilenen GSH, reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin detoksifikasyonunda etkin rol oynar [122]. Enzim, özellikle karaciğer, böbrek, akciğer ve eritrositlerde yüksek aktivite gösterir ve hücresel redoks homeostazının sürdürülmesinde merkezi bir işlev üstlenir [123]. GR aktivitesindeki azalmalar, yaşlanma, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve kardiyovasküler bozukluklar gibi durumlarla ilişkilendirilmiş olup, bu nedenle GR hem antioksidan kapasitenin göstergesi hem de tedavi ve koruyucu yaklaşımların etkinliğinin değerlendirilmesinde biyobelirteç olarak kullanılır [124,125].

## **2.11.Karboksilesteraz Enzimi**

Karboksilesteraz (CaE), ester ve amid bağlarını parçalayarak karboksilik asit ve alkol türevlerinin oluşumunu sağlayan serin hidrolaz enzimidir. Yapısal olarak  $\alpha/\beta$ -hidrolaz düzenine sahip olan bu enzimler, özellikle karaciğer, bağırsak ve böbrek dokularında yoğun olarak bulunmakta ve hem endojen metabolitlerin hem de ksenobiyotik bileşiklerin

metabolizmasında önemli işlevler üstlenmektedir [126,127]. CaE1 izoformu karaciğerde baskın olarak görev yaparken, CaE2 bağırsakta daha yüksek düzeyde yer almakta ve her iki izoform da ilaç metabolizması, pro-ilaçların aktif formlarına dönüşümü ve toksik bileşiklerin detoksifikasyonu gibi süreçlerde kritik roller üstlenmektedir [128,129]. CaE1'in kan şekeri metabolizması üzerinde düzenleyici etkiler gösterdiği ve besin alımını takiben kan şekeri seviyelerinin kontrolünde görev aldığı; CaE2'nin ise lipid metabolizmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir [129,130]. Ayrıca, CaE2 aktivitesinin azalması obezite, karaciğer yağlanması ve kan şekeri düzensizlikleri ile ilişkilendirilmiş, bu enzimin yeniden işlev kazanması ise metabolik bozuklukların gerilemesini sağlamıştır [130]. Son yıllarda yapılan çalışmalar, CaE1'in karaciğer yağ birikimi ve metabolik sendromun gelişim mekanizmalarında da önemli bir düzenleyici olduğunu göstermektedir [131]. Bireyler arası genetik farklılıklar ve çevresel faktörler CaE aktivitelerini değiştirerek, bireyler arasında farmakolojik yanıt ve toksisite farklılıklarının ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır [132]. Tüm bu bulgular, CaE'lerin yalnızca farmakolojik açıdan değil, aynı zamanda metabolik hastalıkların gelişimi ve tedavisi açısından da merkezi bir rol oynadığını göstermektedir.

## 2.12. Yağ Asitleri

Yağ asitleri, lipidlerin temel yapı taşları olup, uzun hidrokarbon zinciri ve ucunda karboksil grubu (-COOH) bulunan organik asitlerdir. Zincir uzunlukları genellikle 4–24 karbon arasında değişmekte olup, doymuş (SFA) veya doymamış (USFA) yapıda olabilirler [133]. Doymuş yağ asitleri, karbon zincirinde çift bağ içermeyen, genellikle oda sıcaklığında katı halde bulunan moleküllerdir. Palmitik asit (C16:0) ve stearik asit (C18:0) en bilinen doymuş yağ asitleridir. Doymamış yağ asitleri ise bir veya birden fazla çift bağ içermekte olup cis veya trans yapıda bulunabilirler. Tekli doymamış yağ asitlerinin (MUFA) en önemlisi oleik asit (C18:1n9c), PUFA'ların başlıcaları ise linoleik asit (C18:2n6c) ve  $\alpha$ -linolenik asittir (C18:3n6) [134]. İnsan vücudu bazı yağ asitlerini sentezleyemediğinden bunlar esansiyel yağ asitleri olarak adlandırılır. C18:2n6c ve C18:3n6 bu gruba girmekte olup, beslenme yoluyla alınmaları zorunludur [135]. Metabolik açıdan yağ asitleri önemli bir enerji kaynağıdır; 1 gram yağ asidi yaklaşık 9 kcal enerji sağlar. Bunun yanında fosfolipitlerin yapısına katılarak hücre zarının bütünlüğünü korur, sinyal iletiminde görev alır ve termal izolasyon ile organ korumasında rol oynar [136]. Sağlık açısından bakıldığında, doymuş ve trans yağ asitlerinin aşırı tüketimi kardiyovasküler hastalık riskini

arttırırken, özellikle omega-3 çoklu doymamış yağ asitleri antiinflamatuvar özellikleri ve kalp sağlığı üzerine olumlu etkileri nedeniyle önem taşımaktadır [137].

### **2.13. Karaciğerin Fizyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkenlere Karşı Savunma Mekanizmaları**

Karaciğer, besin metabolizmasının düzenlenmesi, bağışıklık sisteminin desteklenmesi, kan hacminin korunması, lipid ve kolesterol metabolizmasının yönetilmesi gibi hayati işlevleri üstlenen merkezi bir organdır. Ayrıca, protein ve amino asit metabolizmasını dengeleyerek, üre döngüsü aracılığıyla azotlu atıkların uzaklaştırılmasını sağlar [138]. Karaciğerin bir diğer kritik görevi ise, yabancı bileşiklerin biyotransformasyon sürecinden geçirilerek detoksifiye edilmesidir [139]. Küresel ölçekte, karaciğer hastalıklarına bağlı ölümler yaklaşık iki milyon kişiye ulaşmaktadır [140]. Siroz ve hepatoselüler karsinom gibi hastalıklar, bu ölümlerin başlıca nedenlerindendir [141]. Alkolik karaciğer hastalığı, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, viral hepatitler ve siroz, dünya genelinde en sık karşılaşılan karaciğer patolojileri arasındadır. Bu hastalıklara viral enfeksiyonlar, alkol tüketimi ve toksik maddelere maruz kalma gibi çeşitli faktörler yol açmaktadır. Bu etkenlerin kontrol altına alınmaması durumunda, karaciğer dokusunda fibrozis ve siroz gelişebilir; ileri evrelerde ise karaciğer kanseri riski ortaya çıkmaktadır [142]. Karaciğer hastalıklarının tedavisinde konvansiyonel ilaçların yanı sıra bitkisel kökenli destek tedavileri de önemli bir yer tutmaktadır. Alkaloidler, flavonoidler ve glikozitler gibi bitkisel kaynaklı doğal bileşikler, önemli farmakolojik etkilere sahiptir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda, karaciğer rahatsızlıklarına karşı hepatoprotektif potansiyel taşıyan yeni ajanların bitkilerden izole edilmesine yönelik çalışmalar artış göstermektedir [143]. Hepatotoksisite, çeşitli ilaçlar, çevresel toksinler, alkol veya enfeksiyöz ajanların etkisiyle gelişebilir. Bu durumda hepatositlerde apoptoz, nekroz ya da steatoz gibi hasarlar oluşur ve karaciğerin fonksiyonları ciddi şekilde bozulur [144]. BFA maruziyeti, bireylerin çevresel, sosyal ve yaşa bağlı faktörlerine göre değişiklik gösterebilir. BFA, bebek mamaları için kullanılan biberonlar, içecek kapları, konserve kutuları ve bazı tıbbi cihazlarda bulunabilir. BFA'nın gıda ve içeceklerle vücuda alınması, sağlık açısından ciddi riskler teşkil eder ve karaciğer dokusu bu toksik etkilere doğrudan etkilenir [145]. Karaciğer, BFA'nın detoksifikasyonunda temel organdır. BFA, çeşitli dokularda yer alan  $\beta$ -glukuronidaz enzimiyle dekonjüge edilerek vücutta biyolojik olarak birikebilir [146]. BFA'nın çoğunluğu serum proteinlerine bağlanır ve yağ dokusunda birikim eğilimi gösterir. Bu bileşik, karaciğer

enzimlerinden AST ve ALT düzeylerinde anlamlı artışlara neden olur [145]. Ayrıca, BFA maruziyeti oksidatif stres mekanizmalarını tetikleyerek karaciğerin antioksidan savunma sistemini zayıflatmakta ve hepatoselüler hasara yol açmaktadır [147]. ROS, karaciğer hastalıklarının başlangıcında ve ilerleyişinde önemli rol oynamaktadır. ROS, özellikle lipit peroksidasyonu yoluyla hücre zarlarına zarar verir ve hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölüm yollarını aktive eder. ROS üretiminin artması, mitokondriyal membranlardan elektron sızıntısını tetikleyerek hücresel enerji metabolizmasını olumsuz etkiler [148]. Son yıllarda, bitkisel kaynaklı hepatoprotektif bileşiklerin araştırılması üzerine çok sayıda bilimsel çalışma yapılmaktadır [149]. Biyoaktif polifenollerin geniş terapötik etki spektrumu içerisinde immünomodülatör, antimikrobiyal, antioksidan, antitümör, hipolipidemik, hipoglisemik, gastroprotektif, antiinflamatuvar ve antikanser etkiler yer almaktadır [150]. Çeşitli çalışmalarda, bitkisel kökenli bileşiklerin özellikle oksidatif stresle ilişkili hastalıkların önlenmesinde terapötik potansiyel taşıdığı vurgulanmaktadır. Flavonoidler, fenolik bileşikler ve tanenler gibi polifenolik yapıların, serbest radikallerin eliminasyonunda ve hücresel hasarın önlenmesinde etkili olduğu gösterilmiştir [151]. Flavonoidler kimyasal yapılarına göre çeşitli alt gruplara ayrılmaktadır: flavan-3-oller (kateşin, epikateşin, epigallokateşin), izoflavonlar (genistein, genistin, daidzein, daidzin, biokanin A), flavonlar (luteolin, apigenin), flavanonlar (hesperetin, naringenin), flavonoller (kersetin, kaempferol, galangin, fisetin, mirisetin) ve flavononoller (taksifolin) flavonoid türevleridir [152].

#### **2.14. Çalışmanın Amacı**

BFA, organik bir yapıya sahip sentetik bir bileşiktir. BFA genel olarak plastik, epoksi reçine ve polimerlerin yapılarında olup, endüstride ham madde kaynağı olarak kullanılmaktadır. Yiyecek, içecek şişeleri gibi kapların yapımında yaygın olarak kullanılır ve yüksek sıcaklıklarda ve asidik koşullar altında bu madde insan dokularına geçer. Hesperetin flavonoidlerden olup, özellikle turuncgillerde bulunmaktadır. Farmakolojik özellikleri arasında en önemli özelliği antioksidan ve antikanserojen etkileri de literatürlerde belirtilmiştir. BFA hem toksik hem de endokrin bozucu etkilerine bağlı olarak fizyolojik fonksiyonlardaki bozulmanın tekrar düzeltilmesine yönelik yeni maddelerin veya doğal ürünlerin keşfedilmesi önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasında, BFA maddesinin oluşturduğu oksidatif stres ve toksik etkilerin azaltılmasına yönelik Hesperetin'in biyokimyasal parametreler üzerine etkileri araştırıldı.

### 3. MATERİYAL ve METOD

#### 3.1. Kimyasal Maddeler ve Organik Çözücüler

- HCl
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Trikloroasetik asit
- Fosfat tamponu
- Tris-EDTA tamponu
- İzopropil alkol
- Etil alkol
- Metanol
- n-Hekzan
- Redükte GSH
- 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoik asit
- Thiobarbiturik asit
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- EDTA-Na<sub>2</sub>
- Mineral standartları
- Fizyolojik su
- Yağ asitleri standardı

#### 3.2. İnceleme Materyali

Deneyssel uygulamada ağırlıkları birbirine yakın erkek *Sprague Dawley* (337±10 g) sıçanların karaciğer dokuları incelendi.

#### 3.3. Kullanılan Yardımcı Aletler ve Cihazlar

- Gaz Kromatografisi (GC-FID) cihazı
- Endüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS)
- Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazı
- Mikrodalga yakma cihazı
- Çelik başlı homojenizatör
- Vorteks

- Su banyosu
- Derin dondurucu (-80°C)
- Santrifüj
- Otomatik pipetler
- Cam deney tüpleri

### 3.4. Deney Hayvanları

Deneyisel çalışmada, *Sprague Dawley* cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar, Adıyaman Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim Uygulama ve Araştırma Merkezi (ADYÜ DEHAM)'nden temin edilmiş olup, deneyisel uygulama burada gerçekleştirilmiştir (Etik Kurul No: 2024/025). Sıçanlar, özel hazırlanmış sistemlerde barındırıldı ve beslendi. Gruplarda 7 sıçan olmak üzere toplamda 4 grup oluşturulmuştur. Deneylerde toplamda 28 sıçan kullanılmıştır. Deneyisel çalışma, dört gruptan oluşmaktadır.

- Kontrol grubu (K)
- Hesperetin grubu (H)
- BFA grubu (B)
- Hesperetin + BFA grubu (HB)

Hesperetin oragastrik yöntemle 30 gün, gün aşırı 75 mg/kg 1 ml distile su ile uygulaması yapıldı [153]. BFA 25 mg/kg olarak distile suda orogastrik sonda ile gün aşırı 30 gün süresince verildi [154]. Deneyisel uygulamalar tamamlanınca hayvanlar servikal dislokasyon uygulanarak elde edilen doku örneklerinde aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi. Dokular deneyisel sürece kadar -80 °C de saklandı. Karaciğer dokularında yapılacak biyokimyasal analizler aşağıda belirtilmiştir.

### 3.5. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çalışmada enzim aktiviteleri, Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS cihazı kullanılarak ölçüldü. Her bir örnek, cihazda üç tekrarlı olarak analiz edildi ve elde edilen sonuçlar, (nmol. dk<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup>) cinsinden ifade edildi.

### 3.6. Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri

Karaciğer dokuları, çelik başlıklı bir homojenizatör kullanılarak parçalandı. Karaciğer doku numunelerinin parçalanma işlemi, soğutulmuş homojenizasyon tamponu içerisinde



gerçekleştirildi. Homojenizasyon tamponu 0,1 M pH 7,4 potasyum fosfat tamponu içerisinde 0,15 M KCl, 1 mM EDTA ve 1 mM DTT içermektedir. Bu tampon, doku ağırlığının hacimce 4 katına denk gelecek şekilde (w/v) hazırlandı. Homojenizasyon işlemi, 2000 rpm hızında 30 saniye süreyle gerçekleştirildi. Elde edilen homojenatlar Eppendorf tüplerine aktarıldı ve 4 °C’de, 16000 g de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant fraksiyonunda enzim aktiviteleri belirlendi.

### **3.7. Redükte Glutasyon Analizi**

Karaciğer doku örneklerindeki GSH düzeyi, Sedlak ve Lindsay [155] tarafından tanımlanan kolorimetrik yöntem esas alınarak analiz edildi. Analizler, Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirildi. Analiz prosedürü kapsamında, homojenize edilen doku örnekleri, proteinleri çöktürmek amacıyla %50 (w/v) oranında trikloroasetik asit (TCA) ile muamele edildi. Örnekler daha sonra, 10 dakika boyunca 12000 g de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen süpernatanttan 0,5 mL alınarak üzerine 2 mL Tris-EDTA tamponu (0,2 M, pH 8,9) ve 0,1 mL DTNB (0,01 M 5,5’-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit) çözeltisi eklendi. Bu karışım, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildikten sonra, 412 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar, ( $\mu\text{mol GSH.mg protein}^{-1}$ ) cinsinden ifade edildi.

### **3.8. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesi Analizi**

Doku numunelerindeki GST enzim aktivitesi, Habig ve arkadaşları [156] tarafından geliştirilen kolorimetrik yöntem temel alınarak belirlenmiştir. Bu analiz, Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS Spektrofotometre cihazı kullanılarak 344 nm dalga boyundaki absorbans artışının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Analiz için, substrat olarak %96’lık etil alkol içinde hazırlanan 20 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) ve kofaktör olarak 0,002 M GSH kullanıldı. Analiz için 96 kuyucuklu mikropalakaya ilk olarak 10  $\mu\text{L}$  doku süpernatantı eklendi. Ardından, 100  $\mu\text{L}$  0,1 M, pH 6,5 fosfat tamponu, 100  $\mu\text{L}$  GSH çözeltisi ve 10  $\mu\text{L}$  CDBN çözeltisi ilave edildi. Kuyucuklardaki karışım, çok kanallı otomatik pipetler kullanılarak 15 saniye boyunca karıştırıldı ve hemen ardından 344 nm dalga boyunda okutularak veriler kaydedildi. Enzim aktivitesi, ( $\text{nmol.dk}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$ ) cinsinden hesaplandı.

### 3.9. Malondialdehit Analizi

Bu tez çalışmasında, doku örneklerindeki MDA seviyelerinin tespiti için literatürde sıklıkla başvurulmuş ve Placer vd. [157] tarafından geliştirilen bir yöntem kullanıldı. Bu yöntem, MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile asidik ve sıcak bir ortamda reaksiyona girerek pembe renkli bir pigment oluşturması ve bu pigmentin UV/VIS spektrofotometre ile ölçülerek miktarının belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Analiz için gerekli olan reaksiyon karışımı, %15 TCA, %0,375 TBA ve 0,25 N hidroklorik asit (HCl) çözeltilerinden hazırlandı. Doku homojenatından 500 µl alınarak 1.5 ml reaksiyon karışımı ile ağzı kapalı bir tüpte birleştirildi. Bu karışım, 30 dakika boyunca 100 °C'deki kaynar su banyosunda inkübe edildikten sonra oda sıcaklığına soğutuldu. Soğutma işleminin ardından, karışım 10 dakika boyunca 16000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant kısmından 250 µl alınarak bir mikropilaya üzerine pipetlendi. Örneklerin absorbans değerleri, Thermo-3001 Mikropilaya Ataçmanlı UV/VIS spektrofotometre cihazında 532 nm dalga boyunda, köre karşı 3 tekrarlı olarak okundu. MDA seviyeleri, (nmol MDA.g yaş doku ağırlığı<sup>-1</sup>) olarak hesaplanıp kaydedildi.

### 3.10. Karboksilesteraz Aktivitesi Analizi

Bu tez çalışmasında, doku örneklerindeki CaE enzim aktivitesi, literatürde belirtilen yöntemler temel alınarak belirlendi. Bu analizde, substrat olarak %96'lık etil alkol içinde hazırlanan 26 mM p-nitrofenil asetat (PNPA) kullanıldı. Enzim aktivitesinin ölçümü için öncelikle 5 µl doku örneği, pH 7,4 olan 0,05 M trizma çözeltisinden alınan 250 µl ile mikropilaya kuyucuklarında karıştırıldı. Bu karışım, 25 °C'de 3 dakika boyunca ön inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından, son konsantrasyonu 0,5 mM olacak şekilde 5 µl PNPA reaksiyon çözeltisine eklendi. Reaksiyon karışımının absorbans değişimleri, Thermo-3001 Mikropilaya Ataçmanlı UV/VIS spektrofotometre cihazında 405 nm dalga boyunda 2 dakika süreyle ölçüldü. Elde edilen veriler, (nmol CaE.dk<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup>) cinsinden hesaplanarak CaE aktivitesi belirlendi [158,159].

### 3.11. Asetilkolinesteraz Aktivitesi Analizi

AChE enzim aktivite ölçümleri, Ellman ve ark. [160] tarafından tanımlanan ve daha sonra Özmen ve ark. [161] tarafından modifiye edilen kolorimetrik yöntemle gerçekleştirildi. Bu analizler için Thermo-3001 Mikropilaya Ataçmanlı UV/VIS spektrofotometre kullanıldı. Her bir mikropilaya kuyucuğuna doku örneklerinden elde edilen

10 µl süpernatant ilave edildi. Bunun üzerine, pH 8,0 olan 0,1 M Trizma tamponu içerisinde hazırlanan 0,701 mM asetiltiyokolin iyodür (ATCI) ve 0,136 mM DTNB çözeltisinden 200 µl eklendi. Kuyucuklardaki karışımların absorbans değişimleri, 25 °C’de 412 nm dalga boyunda takip edildi. Sonuçlar, enzim aktivitesini ifade etmek üzere (nmol AChE.dk<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup>)olarak hesaplandı.

### 3.12. Total Protein Analizi

Toplam protein miktarının belirlenmesi, Bradford’un [162]geliştirdiği yöntem esas alınarak gerçekleştirildi. Bu yöntem, alkali koşullarda peptit bağlarının Cu iyonları ile kompleks oluşturmaya dayanmaktadır. Reaksiyon sonucunda mavi-mor renkli kompleks meydana gelmektedir. Ölçümler Thermo-3001 Mikroplate Ataçmanlı UV/VIS spektrofotometrede yapıldı. Homojenize edilen doku örneklerinden elde edilen süpernatant, 1/4 oranında seyreltilerek üzerine 250 µl Bradford çözeltisi eklendi. Karışımlar oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildikten sonra, oluşan renk değişimine bağlı olarak 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar mg protein olarak, spesifik enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanıldı.

### 3.13. Dokuların Lipit Ekstraksiyonu

Karaciğer dokusundan lipit ekstraksiyonu için 1 g doku tartılarak homojenizatör tüplerine alındı. Bu tüplere, 3:2 (v/v) oranında karıştırılmış 6 ml hekzan–izopropil alkol çözeltisi eklendi ve 30 saniye boyunca homojenize edildi. Homojenizatörün çevresi, 5 ml hekzan–izopropil alkol çözeltisi ile temizlendi. Daha sonra örnekler santrifüj tüplerine aktarıldı ve 4500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant fraksiyonu, metilleştirme işlemi için ayrı tüplere aktarıldı [163].

### 3.14. Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması

Hekzan/izopropil alkol karışımından elde edilen lipit ekstraktı santrifüj tüplerine alındı ve üzerine 5 ml %2 metanolik sülfürik asit eklendi. Karışım vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra, 50 °C su banyosunda çeker ocakta 15 saat boyunca metilleşmeye bırakıldı. Metilleme tamamlandıktan sonra tüpler su banyosundan çıkarılarak oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Soğutma işleminden sonra 5 ml %5 sodyum klorür (NaCl) eklendi ve karıştırıldı. Üzerine 5 ml hekzan ilave edilerek ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Karışım iyice karıştırıldıktan sonra faz ayrımı sağlanması için bekletildi. Ayrılan hekzan fazı pipetle başka bir cam deney

tüpüne alındı ve üzerine 5 ml %2 KHCO<sub>3</sub> eklenerek fazların ayrılması beklenildi. Hekzan fazı cam deney tüpüne alınarak ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra, yağ asidi metilleri üzerine 2 ml hekzan eklendi ve 0,22 µm şırınga ucu filtreden geçirilerek viallere aktarıldı [164]. Yağ asitlerinin yüzdeleri, Shimadzu QP 2010 Ultra Gaz Kromatografisi cihazında, TR-CN100 kolonu kullanılarak analiz edildi. Kolon sıcaklık programı Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** *TR-CN100 kolonu sıcaklık programı*

| Artış Sıcaklığı (°C/dk) | Sıcaklık (°C) | Bekleme Süresi (dk) |
|-------------------------|---------------|---------------------|
| 0                       | 140           | 6                   |
| 3                       | 240           | 20                  |

### 3.15. Element Analizi

Dokular, element analizi için 250 mg olarak tartıldı. Örnekler, mikrodalga yakma cihazında basınca ve yüksek sıcaklığa dayanıklı teflon kaplara aktarıldı. Üzerine 5 ml %65’lik nitrik asit (HNO<sub>3</sub>) çözeltisi eklenerek dokular parçalandı. Parçalama işlemi tamamlandıktan sonra, örnekler uygun seyreltmeler yapılarak ICP-MS cihazında analizi yapıldı. Mikrodalga yakma cihazına ait çalışma koşulları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** *Mikrodalga yakma cihazı çalışma şartları*

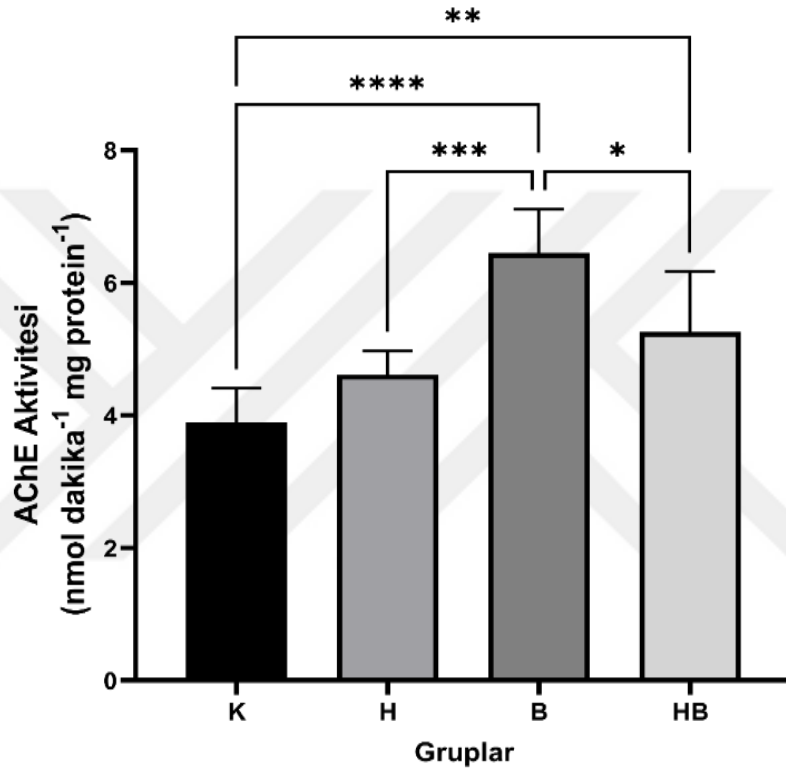
| Step       | 1   | 2   |
|------------|-----|-----|
| T (°C)     | 160 | 190 |
| P (bar)    | 40  | 40  |
| Power (%)  | 80  | 90  |
| Ta (min)   | 5   | 1   |
| Time (min) | 5   | 15  |

### 3.16. İstatistiksel Analiz

Grupların istatistiksel değerlendirilmesinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve anlamlı grupların belirlenmesinde Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak verildi. İstatistiksel çalışmalar GraphPad Prism 9 yazılımı kullanılarak yürütüldü.

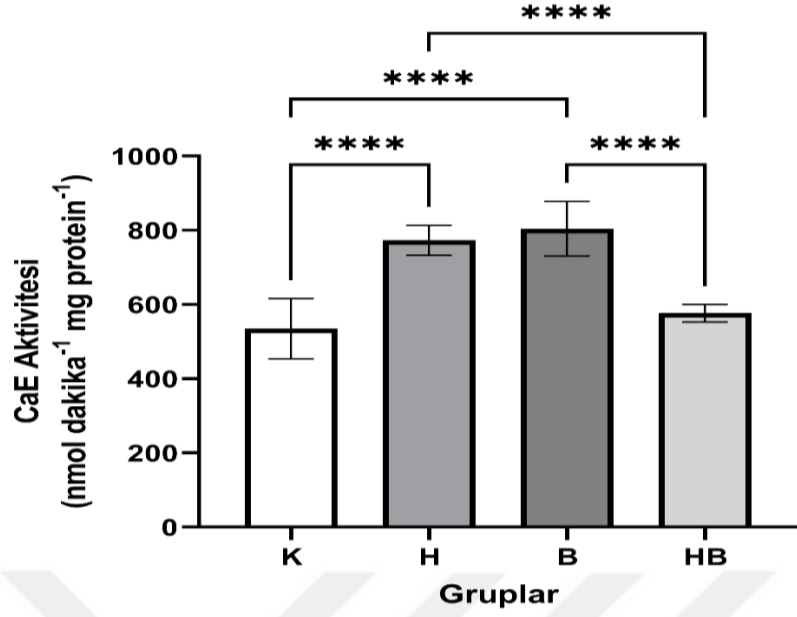
#### 4. BULGULAR

Araştırmada, karaciğer dokusu antioksidan enzim metabolizması parametrelerinden AChE, CaE,, GR ve GST enzim aktiviteleri ile MDA ve GSH düzeyleri incelendi. İstatistiksel farklılıklar (\*=  $p<0,05$ ; \*\*=  $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; \*\*\*\*= $p<0,0001$ ) şeklinde değerlendirildi.



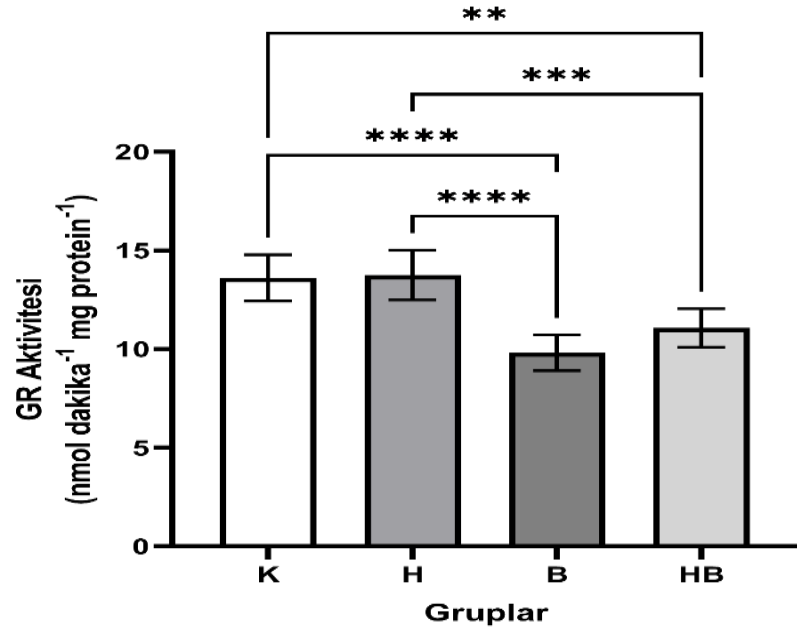
Şekil 4.1. Karaciğer dokusu AChE aktivitesi düzeyleri

K grubu AChE enzim aktivitesine göre B ve HB gruplarında arttı. B grubu AChE enzim aktivitesine göre HB grubunda azaldı (Şekil 4.1).



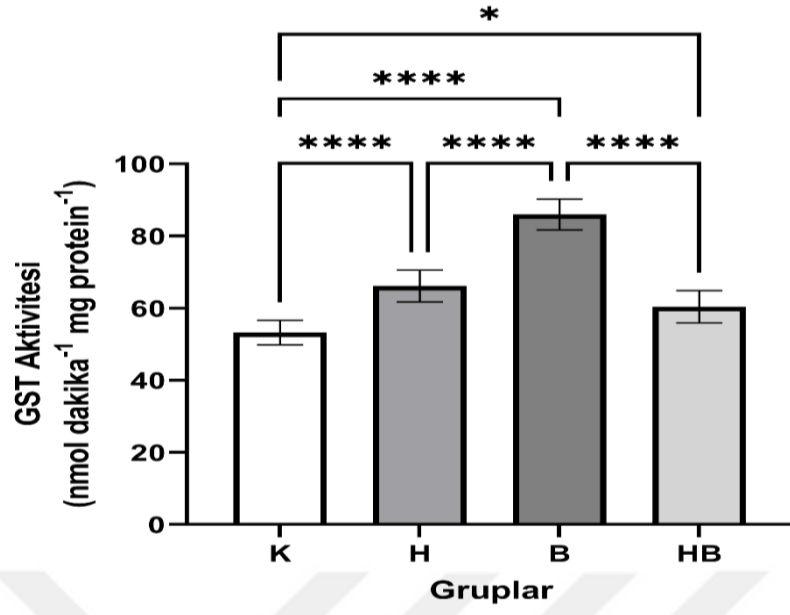
Şekil 4.2. Karaciğer dokusu CaE aktivitesi düzeyleri

K grubu CaE enzim aktivitesine göre H ve B gruplarında arttı. B grubu CaE enzim aktivitesine göre HB grubunda azaldı (Şekil 4.2).



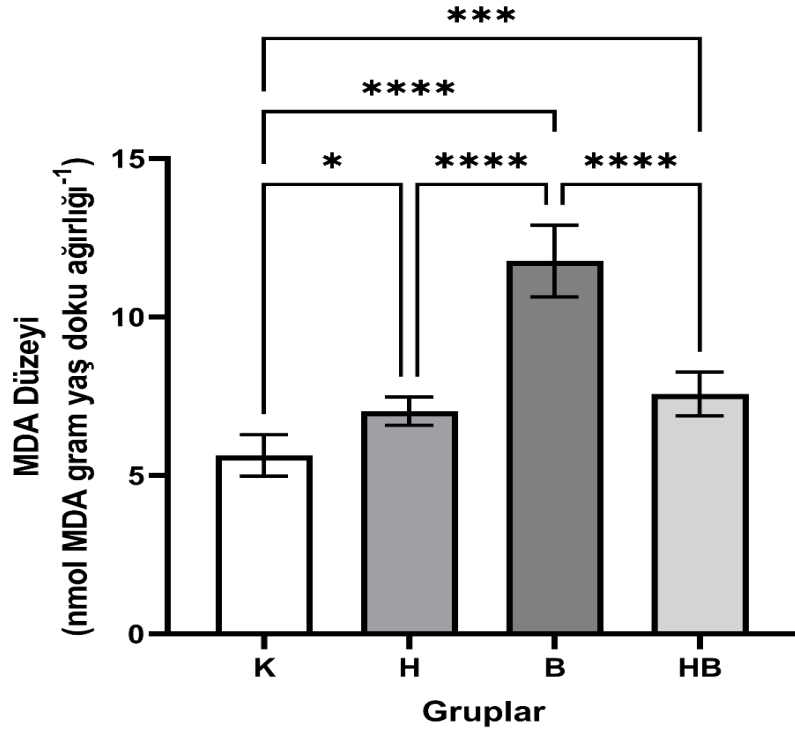
Şekil 4.3. Karaciğer dokusu GR aktivitesi düzeyleri

B grubu GR enzim aktivitesi K ve H gruplarına göre azaldı (Şekil 4.3).



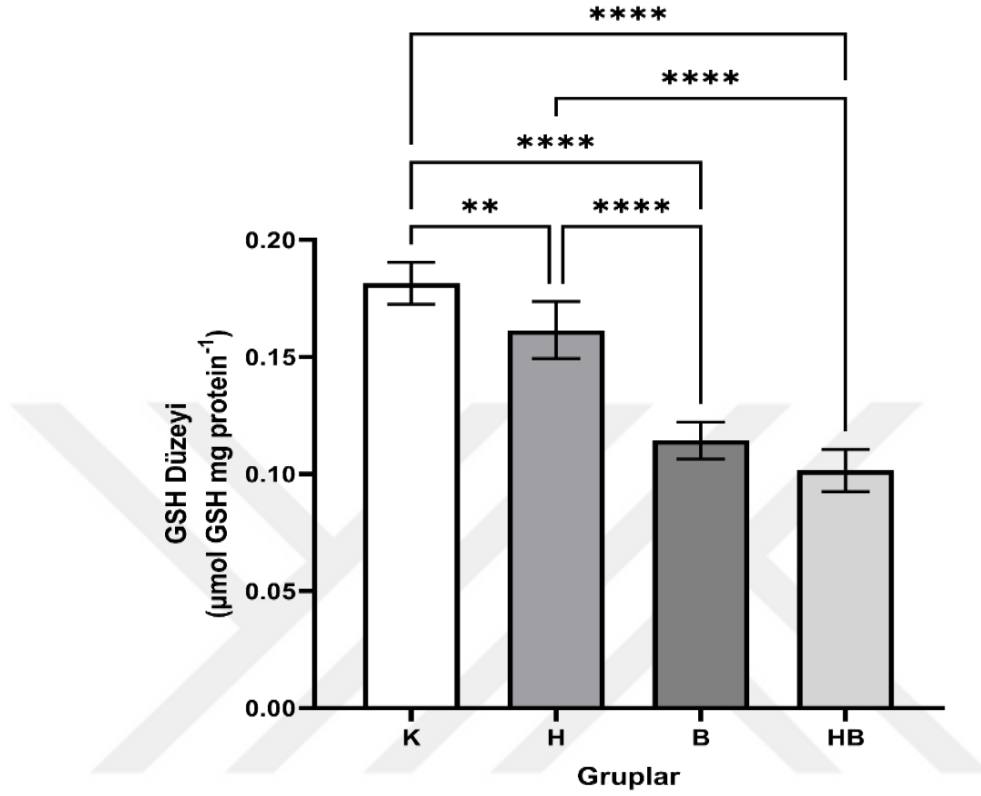
Şekil 4.4. Karaciğer dokusu GST aktivitesi düzeyleri

K grubu GST enzim aktivitesi diğer gruplara göre azaldı. En yüksek seviyede B grubunda tespit edildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.5. Karaciğer dokusu MDA düzeyleri

B grubu MDA düzeyi en yüksek seviyede tespit edildi. HB grubu MDA düzeyi B grubuna göre azaldı (Şekil 4.5).

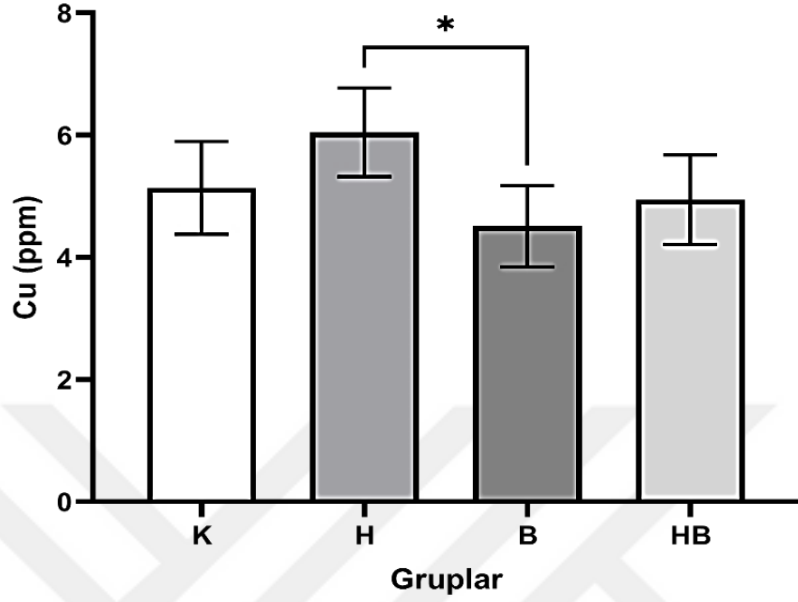


Şekil 4.6. Karaciğer Dokusu GSH düzeyleri

K grubu GSH düzeyine göre B grubunda azaldı (Şekil 4.6).

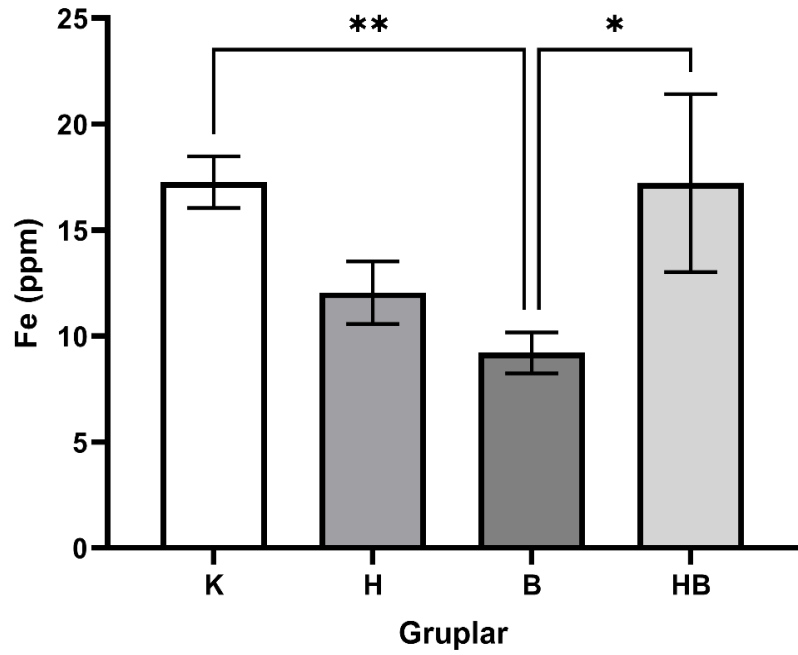


Araştırmada, karaciğer dokusu elementlerinden Cu, Fe, Mg, Mn, Zn ve Se düzeyleri incelendi.



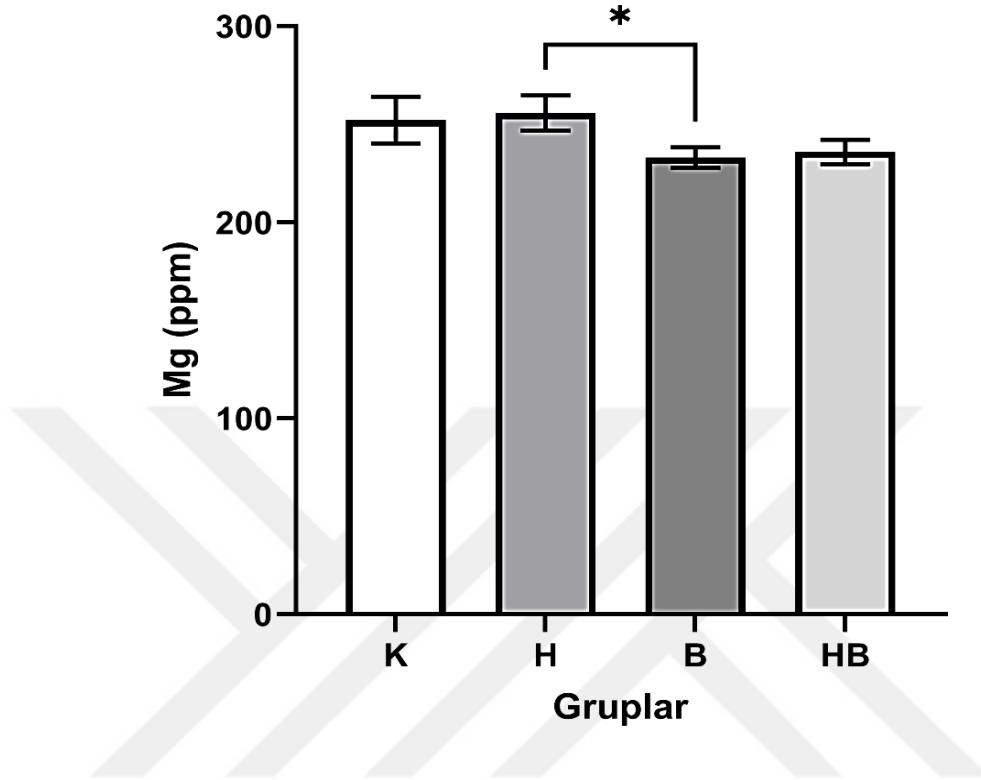
Şekil 4.7. Karaciğer dokusu Cu düzeyleri

B grubu Cu düzeyi H grubuna göre nispi oranda azaldı (Şekil 4.7).



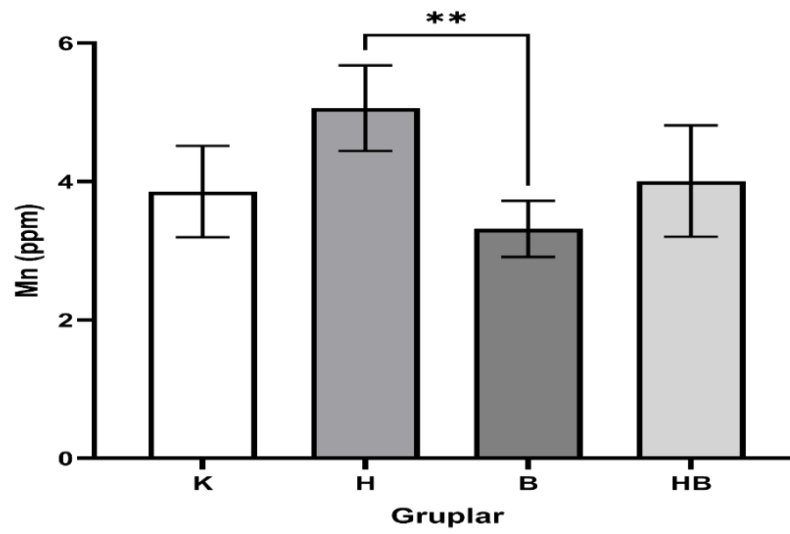
Şekil 4.8. Karaciğer dokusu Fe düzeyleri

K grubu Fe düzeyine göre B grubunda önemli düzeyde azalma tespit edildi. HB grubu Fe düzeyi B grubuna göre arttı (Şekil 4.8).



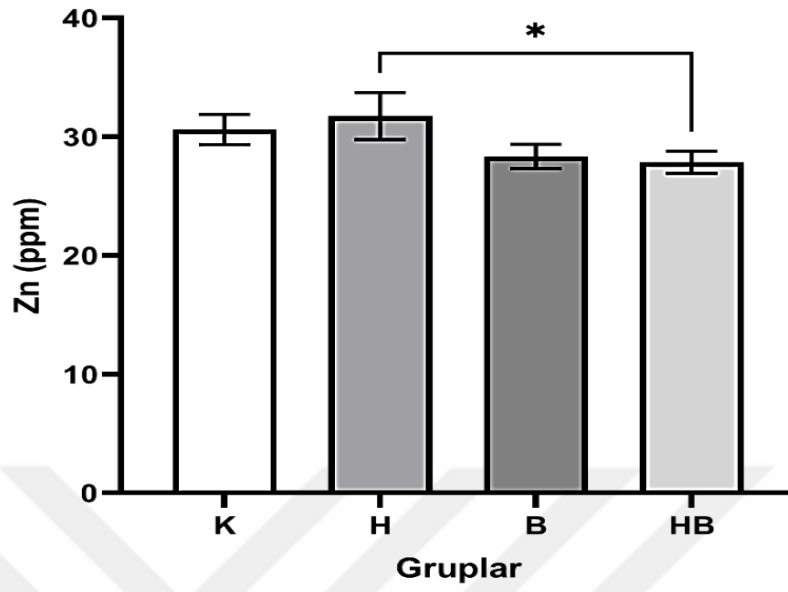
Şekil 4.9. Karaciğer dokusu Mg düzeyleri

B grubu Mg düzeyi H grubuna göre nispi oranda azaldı (Şekil 4.9).



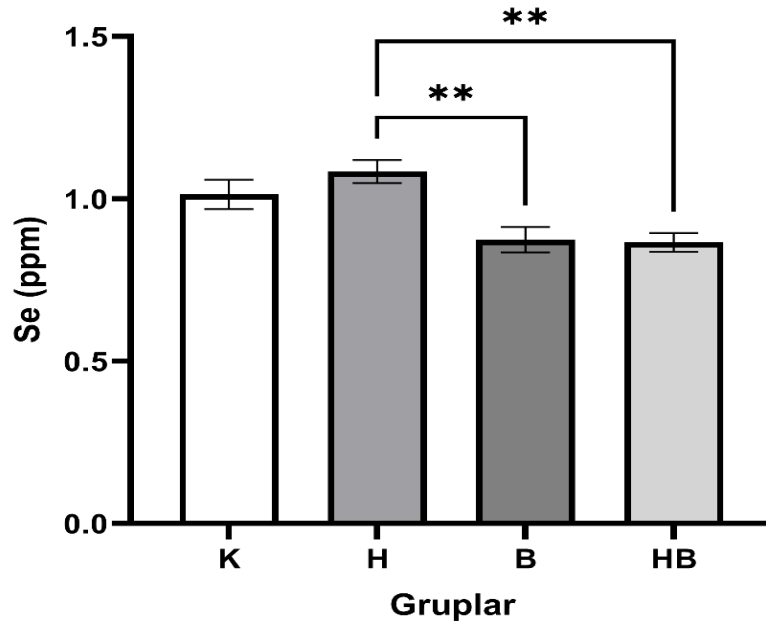
Şekil 4.10. Karaciğer dokusu Mn düzeyleri

B grubu Mn düzeyi H grubuna göre nispi oranda azaldı (Şekil 4.10).



Şekil 4.11. Karaciğer dokusu Zn düzeyleri

HB grubu Zn düzeyi H grubuna göre nispi oranda azaldı (Şekil 4.11).



Şekil 4.12. Karaciğer dokusu Se düzeyleri

B grubu Se düzeyi H grubuna göre nispi oranda azaldı. Bununla birlikte HB grubu H grubuna göre nispi oranda oranda azaldı (Şekil 4.12).

**Çizelge 4.1.** *Karaciğer dokusu yağ asit düzeyi (%)*

| Yağ asitleri | K                 | H                             | B                             | HB                            |
|--------------|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 14:0         | 0,16±0,01         | 0,19±0,02                     | 0,21±0,02                     | 0,17±0,01                     |
| 15:0         | 0,33±0,02         | 0,34±0,01                     | 0,33±0,01                     | 0,32±0,01                     |
| 16:0         | 16,04±0,25        | 16,69±0,42 <sup>x</sup>       | <b>18,55±0,22<sup>a</sup></b> | 16,54±0,39 <sup>x</sup>       |
| 17:0         | 0,96±0,05         | 0,91±0,04                     | 0,87±0,02                     | 0,91±0,03                     |
| 18:0         | 23,08±0,19        | 22,65±0,41 <sup>y</sup>       | <b>25,76±0,27<sup>a</sup></b> | 24,79±0,38                    |
| 20:0         | 0,12±0,003        | 0,19±0,004 <sup>b</sup>       | 0,17±0,004 <sup>b</sup>       | 0,17±0,007                    |
| 22:0         | 0,09±0,004        | 0,10±0,002                    | 0,10±0,002                    | 0,08±0,001                    |
| 24:0         | 0,22±0,013        | 0,23±0,009                    | 0,22±0,010                    | 0,20±0,004                    |
| ΣSFA         | <b>41,00±1,13</b> | <b>41,30±1,11<sup>z</sup></b> | <b>46,21±1,08<sup>c</sup></b> | <b>43,18±1,05<sup>y</sup></b> |
| 16:1         | 0,47±0,03         | 0,51±0,02                     | 0,47±0,02                     | 0,45±0,01                     |
| 18:1n9t      | 0,04±0,001        | 0,03±0,001                    | 0,03±0,001                    | 0,03±0,001                    |
| 18:1n9c      | 6,17±0,23         | 6,05±0,34                     | <b>5,41±0,28<sup>a</sup></b>  | 5,54±0,14                     |
| 20:1n9       | 0,27±0,021        | 0,25±0,018                    | 0,24±0,005                    | 0,24±0,007                    |
| 22:1n9       | 0,16±0,007        | 0,12±0,011                    | 0,13±0,014                    | 0,12±0,015                    |
| 24:1         | 0,11±0,006        | 0,10±0,005                    | 0,11±0,003                    | 0,09±0,002                    |
| ΣMUFA        | <b>7,22±0,26</b>  | <b>7,06±0,40</b>              | <b>6,63±0,31</b>              | <b>6,47±0,14</b>              |
| 18:2n6t      | 0,05±0,002        | 0,04±0,002                    | 0,04±0,001                    | 0,04±0,002                    |
| 18:2n6c      | <b>16,64±0,42</b> | 16,81±0,21 <sup>y</sup>       | <b>14,34±0,32<sup>b</sup></b> | <b>16,05±0,31<sup>y</sup></b> |
| 18:3n6       | 0,14±0,012        | 0,13±0,005                    | 0,12±0,004                    | 0,11±0,004                    |
| 18:3n3       | 0,54±0,04         | 0,51±0,05 <sup>x</sup>        | <b>0,38±0,02<sup>b</sup></b>  | 0,48±0,02 <sup>x</sup>        |
| 20:2n6       | 0,75±0,05         | 0,74±0,05                     | 0,76±0,04                     | 0,76±0,02                     |
| 20:3n6       | 0,79±0,02         | 0,74±0,02                     | 0,81±0,03                     | 0,89±0,04                     |
| 20:4n6       | 27,80±0,35        | 26,81±0,39                    | <b>25,65±0,54<sup>a</sup></b> | 26,98±0,33                    |
| 20:5n3       | 0,12±0,006        | 0,14±0,016                    | 0,14±0,010                    | 0,16±0,022                    |
| 22:6n3       | 4,95±0,41         | 5,64±0,37                     | 4,92±0,17                     | 4,88±0,25                     |
| ΣPUFA        | <b>51,78±1,57</b> | <b>51,64±1,62<sup>x</sup></b> | <b>47,16±1,58<sup>a</sup></b> | <b>50,35±1,31<sup>x</sup></b> |
| ΣUSFA        | <b>59,29±1,48</b> | <b>58,64±1,56<sup>y</sup></b> | <b>53,79±1,25<sup>b</sup></b> | <b>56,82±1,38<sup>x</sup></b> |

K grubuna göre karşılaştırma. a: p<0,05, b: p<0,01, c:p<0,001

B grubuna göre karşılaştırma. x: p<0,05, y: p<0,01, z:p<0,001

K grubu ΣUSFA ve PUFA düzeylerine göre B grubunda azalma saptandı (p<0,05, p<0,01). HB grubu ΣUSFA ve PUFA düzeyleri B grubuna göre arttı (p<0,05). B grubu SFA düzeyi diğer gruplara göre arttı (p<0,01, p<0,001). B grubu C16:0 ve C18:0 düzeyleri K

grubuna göre arttı ( $p<0,05$ ). B grubu C20:0 düzeyinin K grubuna göre arttığı saptanmıştır ( $p<0,01$ ). B grubu C18:1n9c düzeyi K grubuna göre azaldı ( $p<0,05$ ). B grubu C18:2n6c düzeyi K grubuna göre azaldı ( $p<0,01$ ). HB grubu C18:2n6c düzeyi B grubuna göre arttı ( $p<0,01$ ). B grubu C18:3n3 düzeyi K grubuna göre azaldı ( $p<0,01$ ). HB grubu C18:3n3 düzeyi B grubuna göre arttı ( $p<0,05$ ). K grubu C20:4n6 düzeyine göre B grubunda azalma gözlemlendi ( $p<0,05$ ).

**Çizelge 4.2.** *Sıçan ağırlıklarının değişim miktarları (g)*

| Sıçanların Tartım Sayısı | K     | H     | B     | HB    |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|
| 1. hafta                 | 337,3 | 337,3 | 336,6 | 337,3 |
| 2. hafta                 | 337,7 | 342,0 | 351,8 | 344,1 |
| 3. hafta                 | 352,3 | 350,6 | 365,6 | 352,3 |
| 4. hafta                 | 364,7 | 359,1 | 370,6 | 361,6 |
| Ortalama                 | 348,0 | 347,3 | 356,1 | 348,8 |
| Ağırlık Değişim miktarı  | 27,4  | 21,8  | 34,0  | 24,3  |

Yapılan ağırlık ölçümlerinde; kilo artış miktarı en fazla B grubunda, en düşük H grubunda gözlemlenmiştir.

## 5. TARTIŞMA

BFA, hem çevre hem de insan metabolizması üzerinde toksik etkilere sahip bir endüstriyel kimyasaldır. Sentetik bir molekül olup, insan metabolizmasında endojen hormon üretimini ve fonksiyonlarını bozarak endokrin bozucular sınıfına girmektedir. Dünya genelinde plastik üretiminin hızla artmasıyla birlikte, plastik ürünlerin ana bileşenlerinden biri olan BFA'nın yayılımı da artmaktadır. BFA; hava, su ve toprağı kirletmesinin yanı sıra, gıda ve içecek şişeleri gibi plastik ürünlerden sızarak insan vücuduna da geçebilmektedir. Özellikle ısı, sıcaklık, asidik ve bazik koşullar altında bu sızıntı daha da kolaylaşmaktadır. Vücuda girdikten sonra BFA'nın oksidatif stresi artırdığı ve birçok hastalığın gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir [61].

Hesperetin, polifenolik yapıda doğal bir antioksidan olup, yaygın olarak turuncgillerde olmak üzere birçok bitkide bulunur. Bu tez çalışması, toksik bir molekül olan BFA'nın sıçan karaciğer dokularında neden olduğu olumsuz etkilere karşı hesperetinin potansiyel düzeltici etkilerini incelemeyi amaçlamıştır. Bu çalışmada, BFA'ya maruz bırakılan sıçanların karaciğer dokularında, hesperetinin antioksidan enzimler, GSH, MDA, belirli mineraller ve yağ asitleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada, BFA'ya maruz bırakılan sıçanların karaciğer dokularında, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. Hesperetin ile desteklenen kombinasyon grubunda, hesperetinin antioksidan etkisiyle MDA düzeyinde belirgin bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca, BFA grubunda antioksidan bir molekül olan GSH düzeyinde anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir. GSH'yi kullanarak aktivite gösteren GST enzim aktivitesinin ise BFA grubunda arttığı belirlenmiştir. BFA'ya maruz bırakılan sıçanların karaciğer dokularında artan MDA seviyeleri, azalan GSH ve artan GST enzim aktivite düzeyleri, bu bileşiğin toksik etkisini net bir şekilde göstermektedir.

BFA'ya maruz bırakılan sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında *Ginkgo biloba* (GBE) yaprak ekstraktı ve melatoninin etkilerini inceleyen bir çalışmada, BFA uygulanan grupta lipid peroksidasyon ürünü olan tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) seviyelerinde artış ve GSH seviyelerinde düşüş olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, BFA uygulanan grupta CAT ve GST enzim aktivitelerinde anlamlı artışlar saptanmıştır. Bu araştırmanın sonuçları, GBE ve melatonin uygulamasının TBARS seviyelerindeki artışı azalttığını, GSH seviyelerini yükselttiğini ve karaciğer dokusundaki GST enzim aktivitesini kontrol grubunun seviyelerine yaklaştırdığını göstermektedir [165].

GSH; GPx, GR ve GST gibi antioksidan enzimlerin katalitik döngülerine katılan hücre içi bir antioksidan moleküldür [166]. 0,5-50 mg/kg doz aralığında BFA uygulanan sıçanların karaciğer dokularında, SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde azalmalar olduğu rapor edilmiştir [167]. BFA'nın karaciğer enzim sistemini bozduğu, ROS'u arttırdığı ve karaciğer dokusunda hasara yol açtığı bildirilmiştir [168,169]. Ayrıca, BFA'ya maruziyetin hepatotoksositeye neden olduğu ve karsinogenik etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir [170]. Bu araştırmada, BFA'ya maruz bırakılan sıçanların karaciğer dokularında GR enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. Hesperetin ile desteklenen kombinasyon grubunda ise, GR enzim aktivitesinin hesperetinin etkisiyle nisbi olarak arttığı saptandı. Yapılan bir çalışmada, BFA'nın farklı konsantrasyonlarının (0,2, 2 ve 20 mg/kg), dokulardaki CAT, GR, GPx ve SOD gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca, BFA konsantrasyonundaki artışa paralel olarak lipid peroksidasyonunun da arttığı rapor edilmiştir [171]. Bu araştırmanın önemli bulgularından biri de CaE enzim aktivitesi sonuçlarıdır. BFA uygulanan grupta CaE enzim aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlenirken, hesperetin ile desteklenen kombinasyon grubunda bu aktivitenin BFA grubuna göre anlamlı bir düşüş gösterdiği saptanmıştır. CaE, metabolizmada en yüksek konsantrasyonda karaciğer dokusunda bulunan bir enzimdir ve temel görevi, organizmanın detoksifikasyon süreçlerine katkı sağlamaktır.

Bu çalışmada, BFA toksisitesini hafifletmek amacıyla CaE enzim aktivitesinin artırıldığını düşünmekteyiz. Metabolizmada, kolesterol esterase, AChE, ve CaE gibi esterase grubu enzimler birçok dokuda bulunmaktadır. Bu enzimlerin aktivitesindeki artışlar, Alzheimer, hiperkolesterolemi ve beyin kanseri gibi çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir. Bu nedenle, bilimsel araştırmalar esterase inhibitörlerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. CaE enzimi; esterler, amidler ve tiyoesterlerin hidrolizini katalizleyerek ilaçlar ve xenobiyotikler üzerinde de etkili olabilmektedir [172-175].

Bu araştırmada, BFA uygulamasının sıçanların karaciğer dokularında AChE enzim aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde artırdığı gözlemlenmiştir. Hesperetin ile desteklenen kombinasyon grubunda ise, hesperetinin antioksidan etkisi sayesinde bu artışın azaldığı belirlenmiştir. BFA'nın karaciğerde bu enzimin aktivitesini yükseltmesi, toksik bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir ve literatürde esteraselar üzerine yapılan çalışmalarla uyumludur. Araştırmada, BFA'nın toksik etkisiyle artan MDA düzeyini hesperetinin kombinasyonlu grupta önemli düzeyde azalttığı tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca, BFA'nın

toksik etkisine bağı olarak artan MDA düzeyinin, hesperetin kombinasyonu ile önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır. Benzer şekilde, BFA'nın artırdığı CaE, GST ve AChE enzim aktivitelerinin, hesperetin ile tedavi edilen kombinasyon grubunda azaldığı belirlenmiştir. BFA grubunda GR enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenirken, hesperetin ile desteklenen kombinasyon grubunda bu aktivitenin nisbi olarak arttığı saptanmıştır. Ancak, BFA grubunda gözlenen azalan GSH düzeyi, kombinasyon grubunda beklenen düzelmeyi göstermemiştir. Literatürdeki çalışmalar, hesperetinin antioksidan etkilerini desteklemektedir. Miyokardiyal iskemi üzerine yapılan bir araştırmada, hesperetinin ROS seviyelerini düşürdüğü bildirilmiştir [109]. Aynı çalışmada, MDA seviyesindeki artış ve SOD, CAT ve GSH gibi antioksidan aktivitedeki azalmaların düzeltilerek farelerde kardiyoprotektif bir etki sağlandığı rapor edilmiştir. Kronik STZ (streptozotosin) kaynaklı diyabeti olan sıçanların testis dokularında MDA, ROS ve protein karbonil düzeylerinde ciddi artışlar olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, GSH, SOD, CAT ve GPx gibi antioksidan metabolizma parametrelerinin olumsuz etkilendiği ve azaldığı rapor edilmiştir. Bu olumsuz etkilerin hesperetin uygulamasıyla düzeldiği belirtilmiştir [110]. Kadmiyumun yol açtığı oksidatif strese karşı hesperetinin koruyucu etkilerinin incelendiği bir çalışmada, hesperetinin TBARS ve protein karbonil gibi oksidatif stres belirteçlerini düşürdüğü bildirilmiştir. Ek olarak, hesperetinin SOD, CAT, GPx ve GST gibi enzimlerin aktivitesini ve GSH gibi enzimatik olmayan antioksidanların düzeyini artırarak düzenlediği rapor edilmiştir [176].

Bu çalışmada, BFA uygulanan grupta yağ asidi düzeyleri incelenmiştir. BFA'nın  $\Sigma$ SFA düzeyini artırdığı, buna karşılık  $\Sigma$ PUFA ve  $\Sigma$ USFA düzeylerini azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca, BFA'nın C18:2n6c, C18:1n9c, C18:3n3 ve C20:4n6 yağ asitlerinin düzeylerinde düşüşe neden olduğu gözlenmiştir. Hesperetin ile desteklenen kombinasyon grubunda, C18:2n6c, C18:3n3 ve C20:4n6 doymamış yağ asitlerinin düzeylerinin kontrol grubu seviyelerine yükseldiği saptanmıştır. Sıçan yavrularına BFA uygulamasının karaciğer dokularında C16:0 düzeyini artırdığı, C18:2n6c, 18:3n3, 20:5n3 ve 22:n6n3 düzeylerini ise göreceli olarak azalttığı rapor edilmiştir [177]. Bu çalışmanın önemli bulgularından biri, BFA uygulanan gruptaki kilo artışının diğer gruplara kıyasla daha belirgin olmasıdır. Literatürde, BFA'nın obeziteyi tetiklediği [178] ve yağ hücresi oluşumunu artırarak lipid birikimine neden olduğu bildirilmiştir [179]. Başka bir çalışmada [180], BFA'nın düşük ve yüksek dozlarda yağ hücreleri ve pankreas  $\beta$ -hücrelerindeki östrojen reseptörleri aracılığıyla



obeziteye yol açtığı açıklanmıştır. Ayrıca, doğum öncesi BFA maruziyetinin, yavruların doğum sonrası kilo alımını artırdığı tespit edilmiştir [181].

BFA'nın obeziteyi tetiklediği bildirilmiştir [178]. Bu yönde BFA'nın yağ hücresi oluşumunu arttırdığı ve lipid birikimine neden olduğu rapor edilmiştir [179]. Yapılan başka bir çalışmada BFA'nın düşük ve yüksek doz uygulamasında yağ hücreleri ile pankreas  $\beta$ -hücrelerindeki östrojen reseptörü ile obeziteye neden olduğu açıklanmıştır [180]. Ayrıca BFA'nın doğum öncesi uygulaması sonrasında doğum sonrasındaki yavrularda kilo artışları tespit edilmiştir [181].

Araştırmada, BFA uygulanan sıçan karaciğer dokularında Cu, Mg, Mn, Zn ve Se düzeylerinde nispi azalmalar gözlenirken, Fe düzeyinde ise anlamlı bir düşüş saptanmıştır. Hesperetin ile desteklenen kombinasyon grubunda, azalan Cu, Fe ve Mn düzeylerinin kontrol grubu değerlerine yaklaştığı belirlenmiştir. Düşük (10 mg/kg/gün) ve yüksek (25 mg/kg/gün) dozlarda BFA uygulaması sonucunda sıçan dokularında Fe düzeyinin nispi olarak azaldığı, Cu düzeyinin arttığı ve Zn düzeyinin ise azaldığı rapor edilmiştir [182]. Literatür taraması, BFA ve Se arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmaların oldukça sınırlı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu araştırmanın en önemli bulgularından biri, BFA uygulanan grupta Se düzeyinin göreceli olarak azaldığının tespit edilmesidir. Se'nin metabolizmadaki kritik görevleri göz önüne alındığında, BFA-Se ilişkisinin gelecekteki araştırmalar için önemli bir potansiyel taşıdığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, BFA'nın antioksidan enzimler, bazı mineraller ve yağ asitleri üzerindeki toksik etkileri incelenmiştir. Bu olumsuz etkileri gidermek amacıyla, doğal bir flavonoid türevi olan hesperetinin potansiyeli araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, hesperetinin antioksidan metabolizmadan sorumlu enzimler, mineraller ve yağ asitleri üzerinde olumlu etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçlarının, ilgili alanlardaki gelecekteki bilimsel araştırmalara önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKÇA

- [1] Wang, K., Zhao, Z. and Ji, W. (2019). "Bisphenol A Induces Apoptosis, Oxidative Stress and Inflammatory Response in Colon and Liver of Mice in A Mitochondria-Dependent Manner". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 117, 109182.
- [2] Rahman, M. S., Kang, K. H., Arifuzzaman, S., Pang, W. K., Ryu, D. Y., Song, W. H., Park, Y. J. and Pang, M. G. (2019). "Effect of Antioxidants on BPA-Induced Stress on Sperm Function in A Mouse Model". *Scientific Reports*, 9, 10584.
- [3] Liu, P., Li, J., Liu, M., Zhang, M., Xue, Y., Zhang, Y., Han, X., Jing, X. and Chu, L. (2021). "Hesperetin Modulates the Sirt1/Nrf2 Signaling Pathway in Counteracting Myocardial Ischemia Through Suppression of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111552.
- [4] Song, C., Wang, Z., Cao, J., Dong, Y. and Chen, Y. (2024). "Hesperetin Alleviates Aflatoxin B1 Induced Liver Toxicity in Mice: Modulating Lipid Peroxidation and Ferritin Autophagy". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 284, 116854.
- [5] Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A. and Bernatoniene, J. (2020). "Flavonoids as Anticancer Agents". *Nutrients*, 12 (2), 457.
- [6] Salehi, B., Cruz-Martins, N., Butnariu, M., Sarac, I., Bagiu, I. C., Ezzat, S. M., Wang, J., Koay, A., Sheridan, H., Adentunji, C. O., Semwal, P., Schoebitz, M., Martorell, M. and Sharifi-Rad, J. (2022). "Hesperetin's Health Potential: Moving from Preclinical to Clinical Evidence and Bioavailability Issues, to Upcoming Strategies to Overcome Current Limitations". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62 (16), 4449-4464.
- [7] Sies, H. (2015). "Oxidative Stress: A Concept in Redox Biology and Medicine". *Redox Biology*, 4, 180-183.
- [8] Khan, A., Ikram, M., Hahm, J. R. and Kim, M. O. (2020). "Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Citrus Flavonoid Hesperetin: Special Focus on Neurological Disorders". *Antioxidants*, 9 (7), 609.
- [9] Zhu, C., Dong, Y., Liu, H., Ren, H. and Cui, Z. (2017). "Hesperetin Protects Against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- Triggered Oxidative Damage Via Upregulation of the Keap1-Nrf2/HO-1 Signal Pathway in ARPE-19 Cells". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 88, 124-133.
- [10] Chen, X., Wei, W., Li, Y., Huang, J. and Ci, X. (2019). "Hesperetin Relieves Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury by Mitigating Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis". *Chemico-Biological Interactions*, 308, 269-278.
- [11] Samie, A., Sedaghat, R., Baluchnejadmojarad, T. and Roghani, M. (2018). "Hesperetin, A Citrus Flavonoid, Attenuates Testicular Damage in Diabetic Rats Via Inhibition of Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis". *Life Sciences*, 210, 132-139.
- [12] Liu, Z., Tu, K., Zou, P., Liao, C., Ding, R., Huang, Z., Huang, Z., Yao, X., Chen, J. and Zhang, Z. (2023). "Hesperetin Ameliorates Spinal Cord Injury by Inhibiting NLRP3

Inflammasome Activation and Pyroptosis Through Enhancing Nrf2 Signaling". *International Immunopharmacology*, 118, 110103.

[13] Wang, S. W., Wang, W., Sheng, H., Bai, Y. F, Weng, Y. Y., Fan, X. Y., Zheng, F., Zhu, X. T., Xu, Z. C. and Zhan, F. (2020). "Hesperetin, A SIRT1 Activator, Inhibits Hepatic Inflammation Via AMPK/CREB Pathway". *International Immunopharmacology*, 89, 107036.

[14] Wang, B., Li, L., Jin, P., Li, M. and Li, J. (2017). "Hesperetin Protects Against Inflammatory Response and Cardiac Fibrosis in Postmyocardial Infarction Mice by Inhibiting Nuclear Factor Kb Signaling Pathway". *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14 (3), 2255-2260.

[15] Wang, N., Geng, C., Sun, H., Wang, X., Li, F. and Liu, X. (2019). "Hesperetin Ameliorates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice Through Regulating Thetlr4-Myd88-NF-Kb Signaling Pathway". *Archives of Pharmacal Research*, 42, 1063-1070.

[16] Wang, X., Song, Y., Yu, L., Xue, X., Pang, M., Li, Y., Luo, X., Hua, Z., Lu, C., Lu, A. and Liu, Y. (2023). "Co-Delivery of Hesperetin and Cisplatin Via Hyaluronic Acid-Modified Liposome for Targeted Inhibition of Aggression and Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer". *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15 (29), 34360–34377.

[17] Wang, Y., Liu, S., Dong, W., Qu, X., Huang, C., Yan, T. and Du, J. (2019). "Combination of Hesperetin and Platinum Enhances Anticancer Effect on Lung Adenocarcinoma". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 113, 108779.

[18] Wang, S. W., Sheng, H., Zheng, F. and Zhang, F. (2021). "Hesperetin Promotes DOT1L Degradation and Reduces Histone H3K79 Methylation to Inhibit Gastric Cancer Metastasis". *Phytomedicine*, 84, 153499.

[19] Lin, C. Y., Chen, Y. H. and Huang, Y. C. (2023). "Hesperetin Induces Autophagy and Delayed Apoptosis by Modulating the AMPK/Akt/Mtor Pathway in Human Leukemia Cells in Vitro". *Current Issues In Molecular Biology*, 45 (2), 1587-1600.

[20] Elango, R., Athinarayanan, J., Subbarayan, V. P., Lei, D. K. Y. and Alshatwi, A. A. (2018). "Hesperetin Induces An Apoptosis-Triggered Extrinsic Pathway and A P53-Independent Pathway in Human Lung Cancer H522 Cells". *Journal of Asian Natural Products Research*, 20 (6), 556-569.

[21] Ishola, I. O., Jacinta, A. A. and Adeyemi, O. O. (2019). "Cortico-Hippocampal Memory Enhancing Activity of Hesperetin on Scopolamine-Induced Amnesia in Mice: Role of Antioxidant Defense System, Cholinergic Neurotransmission And Expression of BDNF". *Metabolic Brain Disease*, 34 (4), 979-989.

[22] Babylon, L., Grewal, R., Stahr, P. L., Eckert, R. W., Keck, C. M. and Eckert G. P. (2021). "Hesperetin Nanocrystals Improve Mitochondrial Function in A Cell Model of Early Alzheimer Disease". *Antioxidants*, 10 (7), 1003.

- [23] Moghaddam, A. H., Ahmadnia, H., Jelodar, S. K. and Ranjbar, M. (2020). "Hesperetin Nanoparticles Attenuate Anxiogenic-Like Behavior and Cerebral Oxidative Stress Through the Upregulation of Antioxidant Enzyme Expression in Experimental Dementia of Alzheimer's Type". *Neurological Research*, 42 (6), 477-488.
- [24] Jing, S., Wang, X., Zhang, Z., Cao, D., Huang, K., Wang, Y., Liu, Z., Su, S. and Wang, Q. (2023). "Hesperetin Attenuates Cognitive Dysfunction Via SIRT6/NLRP3 Pathway in Scopolamine-Induced Mice". *Metabolic Brain Disease*, 38 (7), 2443-2456.
- [25] Abdou, H. M., Hamaad, F. A., Ali, E. Y and Ghoneum, M. H. (2022). "Antidiabetic Efficacy of Trifolium Alexandrinum Extracts Hesperetin and Quercetin in Ameliorating Carbohydrate Metabolism and Activating IR and AMPK Signaling in the Pancreatic Tissues of Diabetic Rats". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 149, 112838.
- [26] Rabbani, N., Xue, M., Weickert, M. O. and Thornalley, P. J. (2021). "Reversal of Insulin Resistance in Overweight and Obese Subjects by Trans-Resveratrol and Hesperetin Combination-Link to Dysglycemia, Blood Pressure, Dyslipidemia, and Low-Grade Inflammation". *Nutrients*, 13, 2374.
- [27] Yu, X., Liu, Z., Yu, Y., Qian, C., Lin, Y., Jin, S., Wu, L. and Li, S. (2024). "Hesperetin Promotes Diabetic Wound Healing by Inhibiting Ferroptosis Through the Activation of SIRT3". *Phytotherapy Research*, 38 (3), 1478-1493.
- [28] Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C. J., Kuča, K. and Musílek K. (2016). "Redox- and Non-Redox- Metal-Induced Formation of Free Radicals and Their Role in Human Disease". *Archives of Toxicology*, 90 (1), 1-37.
- [29] Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K. and Valko, M. (2023). "Reactive Oxygen Species, Toxicity, Oxidative Stress, and Antioxidants: Chronic Diseases and Aging". *Archives of Toxicology*, 97, 2499-2574.
- [30] Forman, H. J. and Zhang, H. (2021). "Targeting Oxidative Stress in Disease: Promise and Limitations of Antioxidant Therapy". *Nature Reviews Drug Discovery*, 20 (9), 689-709.
- [31] Jomova, K., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuča, K. and Valko, M. (2024). "Several Lines of Antioxidant Defense Against Oxidative Stress: Antioxidant Enzymes, Nanomaterials with Multiple Enzyme-Mimicking Activities, and Low-Molecular-Weight Antioxidants". *Archives of Toxicology*, 98 (5), 1323-1367.
- [32] Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., Dianzani, M. U., Poli, G. and Slater, T. F. (1982). "Separation and Characterization of the Aldehydic Products of Lipid Peroxidation Stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in Rat Liver Microsomes". *The Biochemical Journal*, 208 (1), 129-140.
- [33] Ayala, A., Muñoz, M. F. and Argüelles, S. (2014). "Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 8, 360438.

- [34] Cordiano, R., Gioacchino, M. D., Mangifesta, R., Panzera, C., Gangemi, S. and Minciullo, P. L. (2023). "Malondialdehyde as a Potential Oxidative Stress Marker for Allergy-Oriented Diseases: An Update". *Molecules*, 28 (16), 5979.
- [35] Li, Y., Zhang, T. and Chen, G. Y. (2018). "Flavonoids and Colorectal Cancer Prevention". *Antioxidants*, 7 (12), 187.
- [36] Al-Khayri, J. M., Sahana, G. R., Nagella, P., Joseph, B. V., Alessa, F. M. and Al-Mssallem, M. Q. (2022). "Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review". *Molecules*, 27 (9), 2901.
- [37] Panche, A. N., Diwan, A. D. and Chandra, S. R. (2016). "Flavonoids: An Overview". *Journal of Nutritional Science*, 5, 47.
- [38] Kumar, S. and Pandey, A. K. (2013). "Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview". *The Scientific World Journal*, 2013, 1-16.
- [39] Bodet, C., La, V. D., Epifano, F. And Grenier, D. (2008). "Naringenin has Anti-Inflammatory Properties in Macrophage and Ex Vivo Human Whole-Blood Models". *Journal of Periodontal Research*, 43 (4), 400-407.
- [40] Brodowska, K. M. (2017). "Natural Flavonoids: Classification, Potential Role, and Application of Flavonoid Analogues". *European Journal of Biological Research*, 7, 108-123.
- [41] Křížová, L., Dadáková, K., Kašparovská, J. and Kašparovský, T. (2019). "Isoflavones". *Molecules*, 24 (6), 1076.
- [42] Mukund, V., Mukund, D., Sharma, V., Mannarapu, M. and Alam, A. (2017). "Genistein: Its Role in Metabolic Diseases and Cancer". *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 119, 13-22.
- [43] Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T. and Lim, S. M. (2017). "Anthocyanidins and Anthocyanins: Colored Pigments as Food, Pharmaceutical Ingredients, and the Potential Health Benefits". *Food & Nutrition Research*, 61 (1), 1361779.
- [44] Fardet, A. and Rock, E. (2020). "Ultra-Processed Foods and Food System Sustainability: What Are the Links?". *Sustainability*, 12 (15), 6280.
- [45] Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R. and Law, K. L. (2015). "Plastic Waste Inputs from Land into the Ocean". *Science*, 347 (6223), 768-771.
- [46] Nahar, M. S., Liao, C., Kannan, K. and Dolinoy, D. C. (2013). "Fetal Liver Bisphenol A Concentrations and Biotransformation Gene Expression Reveal Variable Exposure and Altered Capacity for Metabolism in Humans". *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 27 (2), 116-123.

- [47] Aris, A. (2014). “Estimation of Bisphenol A (BPA) Concentrations in Pregnant Women, Fetuses and Nonpregnant Women in Eastern Townships of Canada”. *Reproductive Toxicology*, 45, 8-13.
- [48] Tsois, R. M. and Bäuml A. J. (2020). “Gastrointestinal Host-Pathogen Interaction in the Age of Microbiome Research”. *Current Opinion in Microbiology*, 53, 78-89.
- [49] Dodds, E. C. and Lawson, W. (1936). “Synthetic Strogenic Agents Without the Phenanthrene Nucleus”. *Nature*, 137 (3476), 996.
- [50] Pence, H. E. and Williams, A. (2010). “ChemSpider: An Online Chemical Information Resource”. *Journal of Chemical Education*, 87 (11), 1123-1124.
- [51] Serini, V. (2000). Polycarbonates. In *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH.
- [52] Abraham, A. and Chakraborty, P. (2020). “A Review on Sources and Health Impacts of Bisphenol A”. *Reviews on Environmental Health*, 35 (2), 201–210.
- [53] Correia-Sá, L., Kasper-Sonnenberg, M., Schütze, A., Pálmke, C., Norberto, S., Calhau, C., Domingues, V. F. and Koch, H. M. (2017). “Exposure Assessment to Bisphenol A (BPA) in Portuguese Children by Human Biomonitoring”. *Environmental Science and Pollution Research International*, 24 (35), 27502-27514.
- [54] Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y. L., Wu, Y. and Widelka, M. (2016). “Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review”. *Environmental Science & Technology*, 50 (11), 5438-5453.
- [55] Alabi, A., Caballero-Casero, N. and Rubio, S. (2014). “Quick and Simple Sample Treatment for Multiresidue Analysis of Bisphenols, Bisphenol Diglycidyl Ethers and Their Derivatives in Canned Food Prior to Liquid Chromatography and Fluorescence Detection”. *Journal of Chromatography A*, 1336, 23–33.
- [56] Pérez-Bermejo, M., Mas- Pérez, I. and Murillo-Llorente, M. T. (2021). “The Role of the Bisphenol A in Diabetes and Obesity”. *Biomedicines*, 9 (6), 666.
- [57] Runkel, A. A., Mazej, D., Snoj Tratnik, J., Tkalec, Ž, Kosjek, T. and Horvat, M. (2022). “Exposure of Men and Lactating Women to Environmental Phenols, Phthalates, and DINCH”. *Chemosphere*, 286, 131858.
- [58] Zhang, H., Yang, R., Shi, W., Zhou, X. and Sun, S. (2022). “The Association Between Bisphenol A Exposure and Oxidative Damage in Rats/Mice: A Systematic Review and Meta- Analysis”. *Environmental Pollution*, 292, 118444.
- [59] Feng, L., Chen, S., Zhang, L., Qu, W. and Chen, Z. (2019). “Bisphenol A Increases Intestinal Permeability Through Disrupting Intestinal Barrier Function in Mice”. *Environmental Pollution*, 254, 112960.

- [60] Shih, M. K., Tain, Y. L., Chen, Y. W., Hsu, W. H., Yeh, Y. T., Chang, S. K. C., Liao, J. X. and Hou, C. Y. (2021). “Resveratrol Butyrate Esters Inhibit Obesity Caused by Perinatal Exposure to Bisphenol A in Female Offspring Rats”. *Molecules*, 26 (13), 4010.
- [61] Mercea, P. (2009). “Physicochemical Processes Involved in Migration of Bisphenol A from Polycarbonate”. *Journal of Applied Polymer Science*, 112 (2), 579-593.
- [62] Fu, P. and Kawamura, K. (2010). “Ubiquity of Bisphenol A in the Atmosphere”. *Environmental Pollution*, 158 (10), 3138–3143.
- [63] Adeyi, A. A. and Babalola, B. A. (2019). “Bisphenol-A (BPA) in Foods Commonly Consumed in Southwest Nigeria and its Human Health Risk”. *Scientific Reports*, 9 (1), 17458.
- [64] De Luca, B. G., Almeida, P. P., Junior, R. R., Soares, D. J. S., Frantz, E. D. C., Miranda-Alves, L., Stockler-Pinto, M. B., Machado Dos Santos, C. and Magliano, D. C. (2025). “Environmental Contamination by Bisphenols: From Plastic Production to Modulation of the Intestinal Morphophysiology in Experimental Models”. *Food and Chemical Toxicology*, 197, 115280.
- [65] Meli, R., Monnolo, A., Annunziata, C., Pirozzi, C. and Ferrante, M. C. (2020). “Oxidative Stress and BPA Toxicity: An Antioxidant Approach for Male and Female Reproductive Dysfunction”. *Antioxidants*, 9 (5), 405.
- [66] Lin, M., Hua, R., Ma, J., Zhou, Y., Li, P., Xu, X., Yu, Z. and Quan, S. (2021). “Bisphenol A Promotes Autophagy in Ovarian Granulosa Cells by Inducing AMPK/Mtor/ULK1 Signalling Pathway”. *Environment International*, 147, 106298.
- [67] Bao, L., Zhao, C., Feng, L., Zhao, Y., Duan, S., Qiu, M., Wu, K., Zhang, N., Hu, X. and Fu, Y. (2022). “Ferritinophagy is Involved in Bisphenol A-Induced Ferroptosis of Renal Tubular Epithelial Cells Through the Activation of the AMPK-Mtor-ULK1 Pathway”. *Food and Chemical Toxicology*, 163, 112909.
- [68] Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E. and Kumar, S. S. (2016). “Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation”. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016 (13), 5276130.
- [69] Lawal, B., Shittu, O. K., Oibiokpa, F. I., Berinyuy, E. B. and Mohammed, H. (2017). “African Natural Products with Potential Antioxidants and Hepatoprotectives Properties: A Review”. *Clinical Phytoscience*, 2 (1), 1-66.
- [70] Ma, Q., Deng, P., Lin, M., Yang, L., Li, L., Guo, L., Zhang, L., He, M., Lu, Y., Pi, H., Zhang, Y., Yu, Z., Chen, C. and Zhou, Z. (2021). “Long-Term Bisphenol A Exposure Exacerbates Diet-Induced Prediabetes Via TLR4-Dependent Hypothalamic Inflammation”. *Journal of Hazardous Materials*, 402, 123926.
- [71] Maduranga Karunarathne, W. A. H., Choi, Y. H., Park, S. R., Lee, C. M. and Kim, G. Y. (2022). “Bisphenol A Inhibits Osteogenic Activity and Causes Bone Resorption Via the

Activation of Retinoic Acid-Related Orphan Receptor Alpha". Journal of Hazardous Materials, 438, 129458.

[72] Marino, P., Pepe, G., Basilicata, M. G., Vestuto, V., Marzocco, S., Autore, G., Procino, A., Gomez-Monterrey, I. M., Manfra, M. and Campiglia, P. (2023). "Potential Role of Natural Antioxidant Products in Oncological Diseases". Antioxidants, 12 (3), 704.

[73] Chuang, Y. T., Yen, C. Y., Liu, W., Chien, T. M., Chang, F. R., Tsai, Y. H., Tang, J. Y. and Chang, H. W. (2025). "The Protection of Bisphenol A-Modulated miRNAs and Targets by Natural Products". Environment International, 196, 109299.

[74] Aksoy, M. (2008). Beslenme Biyokimyası. Ankara: Hatiboğlu Yayınları.

[75] Güven, A. (2000). "Importance of Acetylcholinesterase and Its Inhibitors". Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 6 (1-2), 145-151.

[76] Rao, A. A., Sridhar, G. R. and Das, U. N. (2007). "Elevated Butyrylcholinesterase May Predict the Development of Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease". Medical Hypotheses, 69 (6), 1272-1276.

[77] Pohanka, M. (2011). "Cholinesterases, A Target of Pharmacology and Toxicology". Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky, 155 (3), 219-229.

[78] Doctor, B. P., Taylor, P., Quinn, D. M., Rotundo, R. L. & Gentry, M. K. (1998). Structure and Function of Cholinesterases and Related Proteins. New York: Plenum Press.

[79] Kuşcuoğlu, U. (2004). Deneysel Omurilik Yaralanmasında Agmatinin Doza Bağımlı Nöroprotektif Etkilerinin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi.

[80] Quinn, D. M. (1987). "Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States", Chemical Reviews, 87 (5), 955-979.

[81] Hasselmo, M. E. (2006). "The Role of Acetylcholine in Learning and Memory". Current Opinion in Neurobiology, 16 (6), 710-715.

[82] Clarke, H. T & D. Nachmansohn (1954). In Ion Transport Across Membranes. New York: Academic Press Incorporated.

[83] Smith, E. L., Hill, R. L., Lehmann, I. R., Lefkowitz, R. J., Handler, P. & White, A. (1983). Principles of Biochemistry General Aspects. New York: McGraw-Hill.

[84] Düzgüner, V. (2005). Deneysel Olarak Diyabet Oluşturulan Tavşanlarda Çinkonun Lipit Peroksidasyonu ve Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Hatay: Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

[85] Rio, D. D., Stewart, A. J. and Pellegrini, N. A. (2005). "A Review of Recent Studies on Malondialdehyde as Toxic Molecule and Biological Marker of Oxidative Stress". Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 15 (4), 316-328.



- [86] Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). "Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer". *Chemico-Biological Interactions*, 160 (1), 1-40.
- [87] De Zwart, L. L., Meerman, J. H., Commandeur, J. N. and Vermeulen, N. P. (1999). "Biomarkers of Free Radical Damage Applications in Experimental Animals and Humans". *Free Radical Biology & Medicine*, 26 (1-2), 202-226.
- [88] Polat, M. (2011). *Toxoplasma Gondii Pozitif Hastalarda Oksidatif Stres ve Protein Oksidasyon Ürünlerinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Kayseri: Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.*
- [89] Cadenas, E. (1989). "Biochemistry of Oxygen Toxicity". *Annual Review of Biochemistry*, 58, 79-110.
- [90] Pizziment, S., Ciamporocero, E., Daga, M., Pettazzoni, P., Arcaro, A., Cetrangolo, G., Minelli, R., Dianzani, C., Lepore, A., Gentile, F. and Barrera, G. (2013). "Interaction of Aldehydes Derived from Lipid Peroxidation and Membrane Proteins". *Frontiers in Physiology*, 4, 242.
- [91] Rikans, L. E. and Hornbrook, K. R. (1997). "Lipid Peroxidation, Antioxidant Protection and Aging". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1362 (2-3), 116-127.
- [92] Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press Incorporated.
- [93] Khoschsorur, G. A., Winklhofer-Roob, B. M., Rabl, H., Auer, Th., Peng, Z. and Schaur, R. J. (2000). "Evaluation of A Sensitive Hplc Method for the Determination of Malondialdehyde and Application of the Method to Different Biological Materials". *Chromatographia*, 52, 181-184.
- [94] Kidd, P. M. (1997). "Glutathione: Systemic Protectant Against Oxidative and Free Radical Damage". *Alternative Medicine Reviews*, 2 (3), 155-176.
- [95] Brittain, T. and Tottle, B. (1986). "Glutathione in the Red Blood Cells of Embryonic Mice". *Comparative Biochemistry and Physiology*, 83 (4), 843-846.
- [96] Franson, J. C., Hoffman, D. J. and Schmutz, J. A. (2002). "Blood Selenium Concentrations and Enzyme Activities Related to Glutathione Metabolism in Wild Emperor Geese". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21 (10), 2179-2184.
- [97] Reed, D. J. (2000). *Introduction to Biochemical Toxicology*. United States of America: Wiley and Sons Interscience.
- [98] Martensson, J., Lai, J. C. and Meister, A. (1990). "High Affinity Transport of Glutathione is Part of A Multi-Component System Essential for Mitochondrial Function". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87 (18), 7185-7189.

- [99] Reznick, A. Z., Packer, L., Sen, C. K., Holloszy, J. O. & Jackson, M. J. (1998). Free Radical and Oxidative Damage in Biology and Medicine: An Introduction. London: Birkhauser Publisher.
- [100] Stein, H. J., Oosthuizen, M. M., Hinder, R. A. and Lamprechts, H. (1991). "Oxygen Free Radicals and Glutathione in Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury". The Journal of Surgical Research, 50 (4), 398-402.
- [101] Erden-İnal, M., Sunal, E. ve Kanbak, G. (2002). "Age-Related changes in the Glutathione Redox System". Cell Biochemistry and Function, 20 (1), 61-66.
- [102] Çaylak, E. (2011). "Hayvan ve Bitkilerde Oksidatif Stres ve Antioksidanlar". Tıp Araştırma Dergisi, 9 (1), 73-83.
- [103] Chavan, S., Sava, L., Saxena, V., Pillai, S., Sontakke, A. and Ingole, D. (2005). "Reduced Glutathione: Importance of Specimen Collection". Indian Journal of Clinical Biochemistry, 20 (1), 150-152.
- [104] Meister, A. and Anderson, M. E. (1983). "Glutathione". Annual Review of Biochemistry, 52, 711-760.
- [105] Vignais, P.V. (2002). "The Superoxide-Generating NADPH Oxidase: Structural Aspects and Activation Mechanism". Cellular and Molecular Life Sciences, 59 (9), 1428-1459.
- [106] Meister, A (1995). "Glutathione Metabolism". Methods in Enzymology, 251, 3-7.
- [107] Meister, A. (1992). "Biosynthesis and Function of Glutathione, An Essential Biofactor". Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 38, 1-6.
- [108] Njålsson, R., Carlsson, K., Olin, B., Carlsson, B., Whitbread, L., Polekhina, G., Parker, M. W., Norgren, S., Mannervik, B., Board, P. G. and Larsson, A. (2000). "Kinetic Properties of Missense Mutations in Patients with Glutathione Synthetase Deficiency". The Biochemical Journal, 349 (1), 275-279.
- [109] Smirnoff, N. and Pallanca, J. E. (1996). "Ascorbate Metabolism in Relation to Oxidative Stress". Biochemical Society Transactions, 24 (2), 472-478.
- [110] Blokhina, O., Virolainen, E. and Fagerstedt, K. V. (2003). "Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: A Review". Annals of Botany, 91 (2), 179-194.
- [111] Yuan, L. and Kaplowitz, N. (2009). "Glutathione in Liver Diseases and Hepatotoxicity". Molecular Aspects of Medicine, 30 (1-2), 29-41.
- [112] Knapen, M. F., Zusterzeel, P. L., Peters, W. H. and Steegers, E. A. (1999). "Glutathione and Glutathione-Related Enzymes in Reproduction. A Review". European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 82 (2), 171-184.

- [113] Aktas, M., Değirmenci, U., Kul Ercan, S., Tamer, L. and Atik, U. (2005). “The Comparison of Spectrophotometric and HPLC Methods in Reduced Glutathione Measurements”. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 3 (3), 95-99.
- [114] Koç, E. ve Üstün, A. S. (2008). “Patojenlere Karşı Bitkilerde Savunma ve Antioksidanlar”. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24 (1-2), 82-100.
- [115] Hayes, J. D., Flanagan, J. U. and Jowsey, I. R. (2005). “Glutathione Transferases”. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51-88.
- [116] Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S. and Fryer, A. A. (2001). “Glutathione-S-Transferase Family of Enzymes”. *Mutation Research*, 482(1-2), 21-26.
- [117] Board, P. G. and Menon, D. (2013). “Glutathione Transferases, Regulators of Cellular Metabolism and Physiology”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830 (5), 3267–3288.
- [118] Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. and Dowd, C. A. (2001). “Structure, Function and Evolution of Glutathione Transferases: Implications for Classification of Non-Mammalian Members of An Ancient Enzyme Superfamily”. *The Biochemical Journal*, 360 (1), 1-16.
- [119] Oakley, A. (2011). “Glutathione Transferases: A Structural Perspective”. *Drug Metabolism Reviews*, 43 (2), 138–151.
- [120] Townsend, D. M. and Tew, K. D. (2003). “The Role of Glutathione-S-Transferase in Anti-Cancer Drug Resistance. *Oncogene*, 22 (47), 7369–7375.
- [121] Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., and Casini, A. F. (2003). “The Changing Faces of Glutathione, a Cellular Protagonist”. *Biochemical Pharmacology*, 66 (8), 1499–1503.
- [122] Mannervik, B. (1985). “Glutathione reductase”. *Methods in Enzymology*, 113, 483-490. Orlando: Academic Press.
- [123] Lu, S. C. (2013). “Glutathione Synthesis”. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(5), 3143–3153.
- [124] Wu, G., Fang, Y. Z., Yang, S., Lupton, J. R., and Turner, N. D. (2004). “Glutathione Metabolism and Its Implications for Health”. *The Journal of Nutrition*, 134 (3), 489-492.
- [125] Forman, H. J., Zhang, H. and Rinna, A. (2009). “Glutathione: Overview of its Protective Roles, Measurement, and Biosynthesis”. *Molecular Aspects of Medicine*, 30 (1-2), 1-12.
- [126] Satoh, T. and Hosokawa, M. (2006). “Structure, Function and Regulation of Carboxylesterases”. *Chemico-Biological Interactions*, 162 (3), 195–211.

- [127] Wang, D., Zou, L., Jin, Q., Hou, J., Ge, G. and Yang, L. (2018). "Human Carboxylesterases: A Comprehensive Review". *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8 (5), 699-712.
- [128] Laizure, C. S., Herring, V., Hu, Z., Witbrodt, K. and Barker, R. B. (2013). "The Role of Human Carboxylesterases in Drug Metabolism: Have We Overlooked Their Importance?". *Pharmacotherapy*, 33 (2), 210-222.
- [129] Xu, J., Yin, L., Xu, Y., Li, Y., Zalzal, M., Cheng, G. and Zhang, Y. (2014). "Hepatic Carboxylesterase 1 Is Induced by Glucose and Regulates Postprandial Glucose Levels". *PLOS ONE*, 9 (10), 1-7.
- [130] Ruby, M. A., Massart, J., Hunerdosse, D. M., Schöнке, M., Correia, J.C., Louie, S. M., Ruas, J. L., Näslund, E., Nomura, D. K. and Zierath, J. R. (2017). "Human Carboxylesterase 2 Reverses Obesity-Induced Diacylglycerol Accumulation and Glucose Intolerance". *Cell Reports*, 18 (3), 636-646.
- [131] Li, G., Li, X., Mahmud, I., Ysaguirre, J., Fekry, B., Wang, S., Wei, B., Eckel-Mahan, K. L., Lorenzi, P. L., Lehner, R. and Sun, K. (2013). "Interfering with lipid metabolism through targeting CES1 sensitizes hepatocellular carcinoma for chemotherapy". *Journal of Clinical Investigation Insight*, 8 (2), e163624.
- [132] Liu, Y., Li, J., and Zhu, H.J. (2024). "Regulation of Carboxylesterases and Its Impact on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: An Up-to-Date Review". *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 20 (5), 377-397.
- [133] Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2017). *Lehninger Principles of Biochemistry* (7th ed). New York: William Hillyer Freeman.
- [134] Gurr, M. I., Harwood, J. L., Frayn, K. N., Murphy, D. J. & Michell, R. H. (2016). *Lipid Biochemistry* (6th ed). Chichester: Wiley-Blackwell.
- [135] Brenna, J. T., Salem, N., Sinclair, A. J. and Cunnane, S. C. (2009).  $\alpha$ -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 80(2-3), 85-91.
- [136] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J. & Stryer, L. (2019). *Biochemistry* (9th ed.). New York: William Hillyer Freeman and Company
- [137] Simopoulos, A. P. (2016). An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, 8(3), 128. 137
- [138] Trefts, E., Gannon, M. and Wasserman, D. H. (2017). "The Liver". *Current Biology*, 27 (21), R1147-R1151.
- [139] Rai, M., Paudel, N., Sakhrie, M., Gemmati, D., Khan, I. A., Tisato, V., Kanase, A., Schulz, A. and Singh, A. V. (2023). "Perspective on Quantitative Structure-Toxicity Relationship (QSTR) Models to Predict Hepatic Biotransformation of Xenobiotics". *Livers*, 3 (3), 448-462.

- [140] Pandey B., Baral, R., Kaundinnyayana, A. and Panta, S. (2023). "Promising Hepatoprotective Agents from the Natural Sources: A Study of Scientific Evidence". *Egyptian Liver Journal*, 13 (1), 1-26.
- [141] Golabi, P., Paik, J. M., Eberly, K., de Avila, L., Alqahtani, S. A. and Younossi, Z. M. (2022). "Causes of Death in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), Alcoholic Liver Disease and Chronic Viral Hepatitis B and C". *Annals of Hepatology*, 27 (1), 100556.
- [142] Zhai, M., Liu, Z., Long J., Zhou Q., Yang, L., Zhou, Q., Liu, S. and Dai, Y. (2021). "The Incidence Trends of Liver Cirrhosis Caused by Nonalcoholic Steatohepatitis Via the GBD Study 2017". *Scientific Reports*, 11 (1), 5195.
- [143] Krishnareddy, N. T., Thomas, J. V. Nair, S. S., Mulakal, J. N., Maliakel, B. P. and Krishnakumar, I. M. (2018). "A Novel Curcumin-Galactomannoside Complex Delivery System Improves Hepatic Function Markers in Chronic Alcoholics: A Double-Blinded, randomized, Placebo-Controlled Study". *BioMed Research International*, 2018 (1), 9159281.
- [144] LeFort, K. R., Rungratanawanich, W. and Song, B. J. (2024). "Contributing Roles of Mitochondrial Dysfunction and Hepatocyte Apoptosis in Liver Diseases Through Oxidative Stress, Post-Translational Modifications, Inflammation, and Intestinal Barrier Dysfunction". *Cellular and Molecular Life Sciences*, 81 (1), 34.
- [145] Abdulhameed, A. S. A. R., Lim, V., Bahari, H., Khoo, B. Y., Abdullah, M. N. H., Tan, J. J and Yong, Y. K. (2022). "Adverse Effects of Bisphenol A on the Liver and its Underlying Mechanisms: Evidence from in Vivo and in Vitro Studies". *BioMed Research International*, 2022, 8227314.
- [146] Zhao, N. Hu, H., Zhao, M., Liu, W. and Jin, H. (2021). "Occurrence of Free-Form and Conjugated Bisphenol Analogues in Marine Organisms". *Environmental Science & Technology*, 55 (8), 4914-4922.
- [147] Pirozzi, C., Lama, A., Annunziata, C., Cavaliere, G., Ruiz-Fernandez, C., Monnolo, A., Comella, F., Gualillo, O., Stornaiuolo, M., Mollica, M. P., Raso, G. M., Ferrante, M. C. and Meli, R. (2020). "Oral Bisphenol A Worsens Liver Immune-Metabolic and Mitochondrial Dysfunction Induced by High-Fat Diet in Adult Mice: Cross-Talk between Oxidative Stress and Inflammasome Pathway". *Antioxidants*, 9 (12), 1201.
- [148] Shi, S., Wang, L., van der Laan, L. J. W., Pan, Q. and Verstegen, M. M. A. (2021). "Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Liver Transplantation and Underlying Diseases: New Insights and Therapeutics". *Transplantation*, 105 (11), 2362-2373.
- [149] Yashmi, F., Fakhri, S., Shiri Varnamkhasti, B., Amin, M. N., Khirehgesh, M. R., Mohammadi-Noori, E., Hosseini, M. and Khan, H. (2024). "Defining the Mechanisms Behind the Hepatoprotective Properties of Curcumin". *Archives of Toxicology*, 98 (8), 2331-2351.

- [150] Li, H., Liang, J., Han, M. and Gao, Z. (2025). "Polyphenols Synergistic Drugs to Ameliorate Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Via Signal Pathway and Gut Microbiota: A Review". *Journal of Advanced Research*, 68, 43-62.
- [151] Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N. V., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P. V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El Rayess, Y., El Beyrouthy, M., Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A. O., Setzer, W. N., Calina, D., Cho, W. C. and Sharifi-Rad, J. (2020). "Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases". *Frontiers in Physiology*. 11, 694.
- [152] Chen, S., Wang, X., Cheng, Y., Gao, H. and Chen, X. (2023). "A Review of Classification, Biosynthesis, Biological Activities and Potential Applications of Flavonoids". *Molecules*, 28 (13), 4982.
- [153] Rotelli, A. E., Guardia, T., Juárez, A. O., De La Rocha, N. E. and Pelzer, L. E. (2003). "Comparative Study of Flavonoids in Experimental Models of Inflammation". *Pharmacological Research*, 48 (6), 601-606.
- [154] Aydogan, M., Korkmaz, A., Barlas, N. and Kolankaya, D. (2008). "The Effect of Vitamin C on Bisphenol A, Nonylphenol and Octylphenol Induced Brain Damages of Male Rats". *Toxicology* 249 (1), 35-39.
- [155] Sedlak, J. and Lindsay, R. H. (1968). "Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent". *Analytical Biochemistry*, 25 (1), 192-205.
- [156] Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. (1974). "Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation". *The Journal of Biological Chemistry*, 249 (22), 7130-7139.
- [157] Placer, Z. A., Cushman, L.L. and Johnson, B.C. (1996). "Estimation of Product of Lipid Peroxidation (Malonyl Dialdehyde) in Biochemical Systems". *Analytical Biochemistry*, 16 (2), 359-364.
- [158] Nousiainen, U. and Törrönen, R. (1984). "Differentiation of Microsomal and Cytosolic Carboxylesterases in the Rat Liver by in Vivo and in Vitro Inhibition". *General Pharmacology: The Vascular System*, 15 (3), 223-227.
- [159] Santhoshkumar, P. and Shivanandappa, T. (1999). "In Vitro Sequestration of Two Organophosphorus Homologs by the Rat Liver". *Chemico-Biological interactions*, 119 (120), 277-282.
- [160] Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherstone, R. M. (1961). "A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity". *Biochemical Pharmacology*, 7 (2), 88-95.

- [161] Özmen, M., Dominguez, S. E. and Fairbrother, A. (1998). "Effects of Dietary Azinphos Methyl on Selected Plasma and Tissue Biomarkers of the Gray-Tailed Vole". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60 (2), 194-201.
- [162] Bradford, M. M. (1976). "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding". *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254.
- [163] Hara, A. and Radin, N. S. (1978). "Lipid Extraction of Tissues with A Low-Toxicity Solvent". *Analytical Biochemistry*, 90 (1), 420-426.
- [164] Christie, W. W. (1992). *Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide*. Glasgow: The Oily Press.
- [165] Wahby, M. M., Abdallah, Z. M., Abdou, H. M., Yousef, M. I. and Newairy, A. S. A. (2017). "Mitigating Potential of Ginkgo Biloba Extract and Melatonin Against Hepatic and Nephrotoxicity Induced by Bisphenol A in Male Rats". *Egyptian Journal of Basic and Applied Science*, 4 (4), 350-357.
- [166] Melov S. (2002). "Animal Models of Oxidative Stress, Aging, and Therapeutic Antioxidant Interventions". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34 (11), 1395-1400.
- [167] Eid, J. I. Eissa, S. M. and El-Ghor, A. A. (2015). "Bisphenol A Induces Oxidative Stress and DNA Damage in Hepatic Tissue of Female Rat Offspring". *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 71, 10-19.
- [168] Moon, K. Y., Kim, M. J., Jung, I. K., Koo, Y. D., Ann, H. Y., Lee, K. J., Kim, S. H., Yoon, Y. C., Cho, B. J., Park, K. S., Jang, H. C. and Park, Y. J. (2012). "Bisphenol A Impairs Mitochondrial Function in the Liver at Doses Below the No Observed Adverse Effect Level". *Journal of Korean Medical Science*, 27 (6), 644-652.
- [169] Asahi, J., Kamo, H., Baba, R., Doi, Y., Yamashita, A., Murakami, D., Hanada, A. and Hirano, T. (2010). "Bisphenol A Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Associated Apoptosis in Mouse Non-Parenchymal Hepatocytes". *Life Sciences*, 87 (13-14), 431-438.
- [170] Bauer, G. (2000). "Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Efficient, Selective, and Interactive Signals During Intercellular Induction of Apoptosis". *Anticancer Research*, 20 (6B), 4115-4139.
- [171] Santhi, V. A., Sakai, N., Ahmad, E. D. and Mustafa A. M. (2012). "Occurrence of Bisphenol A in Surface Water, Drinking Water and Plasma from Malaysia with Exposure Assessment from Consumption of Drinking Water". *Science of the Total Environment*, 427-428, 332-338.
- [172] Alipour, M., Khoobi, M., Foroumadi, A., Nadri, H., Moradi, A., Sakhteman, A., Ghandi, M. and Shafiee, A. (2012). "Novel Coumarin Derivatives Bearing N-Benzyl Pyridinium Moiety: Potent and Dual Binding Site Acetylcholinesterase Inhibitors". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20 (24), 7214-7222.

- [173] Ross, M. K., Borazjani, A., Edwards, C. C. and Potter, P. M. (2006). "Hydrolytic Metabolism of Pyrethroids by Human and Other Mammalian Carboxylesterases". *Biochemical Pharmacology*, 71 (5), 657-669.
- [174] Morgan, E. W., Yan, B. F., Greenway, D. and Parkinson A. (1994). "Regulation of Two Rat-Liver Microsomal Carboxylesterase Isozymes - Species-Differences, Tissue Distribution, and the Effects of Age, Sex, and Xenobiotic Treatment of Rats". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315 (2), 513-526.
- [175] Holmes, R. S., Wright, M. W., Laulederkind, S. J. F., Cox, L. A., Perkins, E. J., Potter, P. M., Redinbo, M. R., Robert, J., Satoh, T., Yamashita, T., Yan, B., Yokoi, T., Zechner, R. and Maltais, L. J. (2010). "Recommended Nomenclature for Five Mammalian Carboxylesterase Gene Families: Human, Mouse, and Rat Genes and Proteins". *Mammalian Genome*, 21 (9-10), 427-441.
- [176] Blokhina, O. B., Chirkova, T. V. and Fagerstedt, K. V. (2001). "Anoxic Stress Leads to Hydrogen Peroxide Formation in Plant Cells". *Journal of Experimental Botany*, 52 (359), 1179-1190.
- [177] Dunder, L., Lejonkloua, M. H., Lind, L., Risérus, U. and Lind, P. M. (2018). "Low-Dose Developmental Bisphenol A Exposure Alters Fatty Acid Metabolism in Fischer 344 Rat Offspring". *Environmental Research*, 166, 117-129.
- [178] Sakurai, K., Kawazuma, M., Adachi, T., Harigaya, T., Saito, Y., Hashimoto, N. and Mori, C. (2004). "Bisphenol A Affects Glucose Transport in Mouse 3T3-F442A Adipocytes". *British Journal of Pharmacology*, 141 (2), 209-214.
- [179] Wang, J., Sun, B., Hou, M., Pan, X. and Li, X. (2013). "The Environmental Obesogen Bisphenol A Promotes Adipogenesis by Increasing the Amount of 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 in the Adipose Tissue of Children". *International Journal of Obesity*, 37 (7), 999-1005.
- [180] Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll C., Fuentes, E. and Nadal, A. (2006). "The Estrogenic Effect of Bisphenol A Disrupts Pancreatic Beta-Cell Function in Vivo and Induces Insulin Resistance". *Environmental Health Perspectives*, 114 (1), 106-112.
- [181] Marmugi, A., Ducheix, S., Lasserre, F., Polizzi, A., Paris, A., Priymenko, N., Bertrand-Michel, J., Pineau, T., Guillou, H., Martin, P. G. P. and Mselli-Lakhal, L. (2012). "Low Doses of Bisphenol A Induce Gene Expression Related to Lipid Synthesis and Trigger Triglyceride Accumulation in Adult Mouse Liver". *Hepatology*, 55 (2), 395-407.
- [182] Rehman, A., Akhtar, T., Hameed, N. and Sheikh, N. (2020). "In Vivo Assessment of Bisphenol A Induced Histopathological Alterations and Inflammatory Gene Expression in Lungs of Male Wistar Rats". *Human & Experimental Toxicology* 40 (3), 538-549.