



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

**SIÇANLARDA AFLATOKSİN B₁- İNDÜKLÜ KARACİĞER
HASARINA KARŞI CHRYSİN'İN KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Veteriner Hekim ESRA ZEYBEK

DOKTORA TEZİ

VETERİNER FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Asım KART

BURDUR-2024

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

**SIÇANLARDA AFLATOKSİN B₁- İNDÜKLÜ KARACİĞER
HASARINA KARŞI CHRYSİN'İN KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Vet. Hek. Esra ZEYBEK

DOKTORA TEZİ

VETERİNER FARMAKOLOJİ ve TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Asım KART

Bu Araştırma “Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü” tarafından “0827-DR-22” proje numarası ile “Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)” tarafından Acil Destek Programı (1002-B) “1230601” numaralı proje ile desteklenmiştir.

BURDUR-2024

KABUL ve ONAY SAYFASI

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Esra ZEYBEK tarafından **Prof. Dr. Asım KART** yönetiminde hazırlanan “*Sıçanlarda Aflatoksin B₁-indüklü karaciğer hasarına karşı Chrysin’in koruyucu etkisinin araştırılması.*” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 13.08.2024

Prof. Dr. Yavuz Osman BİRDANE

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Veteriner Fakültesi

Farmakoloji ve Toksikoloji AD

Başkan

Prof. Dr. Özlem ÖZMEN

Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Patoloji AD

Jüri

Prof. Dr. Asım KART

Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji AD

Jüri

Prof. Dr. Fatma KOCASARI

Burdur Mehmet Akif Ersoy
Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji AD

Jüri

Prof. Dr. Ebru YILDIRIM

Kırıkkale Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji AD

Jüri

ONAY

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

Prof. Dr. Ramazan ADANIR

Müdür

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmamın yürütülmesi sırasında, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yol gösteren samimiyetini benden esirgemeyen ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım çok kıymetli danışman hocam sayın Prof. Dr. Asım KART'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Değerli bilgi, tecrübe ve destekleri için, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Fatma KOCASARI, Doç. Dr. Hidayet TUTUN, Dr. Öğr. Üyesi Murat BAYEZİT, Prof. Dr. Firdevs MOR SAVAŞ ve tez çalışmamın uygulama sürecinde yardımlarını esirgemeyen ve çalışmamıza yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı değerli hocam Patoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Özlem ÖZMEN'e teşekkür ederim. Tez çalışmamın analizlerine katkılarından dolayı Öğr. Gör. Muhammet Mükerrer KAYA, Arş. Gör. Mehmet Ali YÖRÜK ve Arş. Gör. Melike USLUER'e, teşekkürlerimi sunarım. Tez dönemim boyunca bilgisi, tecrübesi ve manevi desteği ile yanımda olan Vet. Hekim Dr. Simge GARLI ve Arş. Gör. Remziye ÖZBEK'e teşekkürlerimi sunarım. Beni bugünlere getiren, tüm hayatım ve eğitimim boyunca her konuda sevgi ve sabır ile bana destek olan annem Vecide ORTAÇ'a ve babam Ferit ORTAÇ'a teşekkürlerimi sunarım. Lisans ve doktora dönemlerimde desteğini esirgemeyen, her koşulda yanımda olan eşim Zafer ZEYBEK'e sonsuz teşekkür ediyorum.

Bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAP) (Proje No: 0827-DR-22) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) (Proje No: 123O601) teşekkür ederim.

ETİK BEYAN

“Sıçanlarda Aflatoksin B₁- indüklü karaciğer hasarına karşı Chrysin’in koruyucu etkisinin araştırılması” başlıklı tez çalışmamdaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Asım KART danışmanlığında Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Esra ZEYBEK

Tarih:

İmza:

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ETİK BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	x
SİMGELEr ve KISALTMALAR	xi
TÜRKÇE ÖZET	xii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mikotoksinler	3
2.1.1. Aflatoksin B ₁ (AFB ₁)	4
2.1.1.1. Aflatoksin B ₁ 'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	4
2.1.1.2. Aflatoksin B ₁ 'in Etki Mekanizması	5
2.1.1.3. Aflatoksin B ₁ 'in Toksisitesi	7
2.1.1.4. Aflatoksin B ₁ 'in Akut ve Kronik Toksik Etkileri	7
2.1.1.5. Aflatoksin B ₁ 'in Mutajenik ve Karsinojenik Etkileri	8
2.1.1.6. Aflatoksin B ₁ 'in Oksidatif Stres Üzerindeki Etkileri	9
2.1.1.7. Aflatoksin B ₁ 'in İnflamasyon Üzerindeki Etkileri	12
2.2. Flavanoidler	13
2.2.1. Chrysin (Ch)	15
2.2.1.1. Chrysinin Kaynakları ve Kimyasal Yapısı	15
2.2.1.2. Chrysinin Farmakokinetiği	17
2.2.1.3. Chrysinin Antioksidan Etkileri	19
2.2.1.4. Chrysinin Antiinflatuar Etkileri	21
2.2.1.5. Chrysinin Antikanserojen Etkileri	23
2.2.1.6. Chrysinin Toksisitesi	25
2.2.2. Sirtuin Proteinleri ve Sirtuin 1	26
2.2.3. Sialik Asit	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Gereçler	30
3.1.1. Kullanılan Hayvan Materyali	30
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	31
3.2. Yöntemler	33
3.2.1. Kan ve Doku Analizleri	33
3.2.2. Karaciğer, ve Böbrek Dokularının Homojenizasyonu ve Homojenatın Hazırlanması	33
3.2.3. Glutatyon (GSH) Analizi	33
3.2.4. Malondialdehid (MDA) Analizi	35
3.2.5. 8-Hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) Analizi	36
3.2.6. Nükleer Faktör Kappa B-p65 (NFkB-p65) Analizi	37
3.2.7. Tümör Nekroz Faktör α (TNF- α) Analizi	39
3.2.8. NAD-Bağımlı Protein Deasetilaz Sirtuin-1 (Sirt 1)	40

3.2.9. Dokulardaki Total Protein Yoğunluğu	42
3.2.10. Total Sialik Asit (TSA) Ölçümü	42
3.2.11. Histopatoloji Yöntemi	44
3.2.12. İmmunohistokimya Yöntemi	45
3.2.13. İstatistiksel Hesaplamalar	47
4. BULGULAR	48
4.1. Biyokimyasal Parametreler	48
4.2. Antioksidan-Oksidatif Stres Parametreleri	49
4.3. İnflamatuar Parametreler ve Transkripsiyon Faktör Parametreleri	52
4.4. Deney Gruplarında Serum Total Sialik Asit Seviyeleri	55
4.5. Histopatolojik Bulgular	56
4.6. İmmunohistokimyasal Bulgular	59
4.6.1. Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulguları	59
4.6.2. Kaspaz-9 İmmunohistokimyasal Bulguları	61
4.6.3. Ki-67 İmmunohistokimyasal Bulguları	62
4.6.4. PCNA İmmunohistokimyasal Bulguları	64
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR	84
ÖZGEÇMİŞ	101

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Aflatoksin B ₁ 'in kimyasal yapısı (Özkaya ve Temiz 2003)	5
Şekil 2.2.	Aflatoksin B ₁ 'in biotransformasyon ürünleri ve toksik etki mekanizması (Sabuncuoğlu ve ark., 2008)	6
Şekil 2.3.	Flavanoid iskeleti (Kocabaş, 2008)	14
Şekil 2.4.	Chrysin Kimyasal Yapısı (Muñoz ve ark., 2016; Pusz ve ark., 2000)	15
Şekil 2.5.	Chrysin türevleri (Nabavi ve ark., 2015)	16
Şekil 2.6.	Chrysin kaynakları: A. Propolis, B. Passiflora Sp., C. Pleurotus ostreatus, D. Radix scutellariae (Naz ve ark., 2019)	16
Şekil 2.7.	Chrysin tarafından engellenen yolaklar (Zeinali ve ark., 2017)	22
Şekil 2.8.	Chrysinin kanserlere karşı etki mekanizmaları (Moghadam ve ark., 2020)	25
Şekil 3.1.	Glutatyon (GSH) standart grafiği	34
Şekil 3.2.	Malondialdehid (MDA) standart grafiği	36
Şekil 3.3.	8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) standart grafiği	37
Şekil 3.4.	Nükleer Faktör Kappa B P65 (NFKB-p65) standart grafiği	39
Şekil 3.5.	Tümör nekroz faktör- α (TNF- α) standart grafiği	40
Şekil 3.6.	NAD-Bağımlı Protein Deasetilaz Sirtuin-1(Sirt-1) standart grafiği	42
Şekil 3.7.	Total Sialik Asit Standart Grafiği (OD: Optik Dansite, NANA: N-asetil nöraminik asit)	43
Şekil 4.1.	Deney gruplarının serum AST, ALT ve GGT seviyeleri	48
Şekil 4.2.	Deney gruplarının serum BUN ve kreatinin seviyeleri	49
Şekil 4.3.	Karaciğer dokularında GSH, MDA ve 8-OHdG parametreleri	50
Şekil 4.4.	Böbrek dokularında GSH, MDA, 8-OHdG parametreleri	52
Şekil 4.5.	Karaciğer dokularında NFKB-p65, TNF- α ve Sirt-1 parametreleri	53
Şekil 4.6.	Böbrek dokularında NFKB-p65, TNF- α ve Sirt-1 parametreleri	55
Şekil 4.7.	Araştırma gruplarının total serum sialik asit düzeyi	56
Şekil 4.8.	AFB ₁ grubunda bir ratın karaciğerinin mikroskopik görünümü	57
Şekil 4.9.	Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait histopatolojik görünimleri	57
Şekil 4.10.	AFB ₁ grubunda bir ratın böbreğinin histopatolojik görünümü	58
Şekil 4.11.	Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait histopatolojik görünimleri	59
Şekil 4.12.	Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünimleri	60
Şekil 4.13.	Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünimleri	60
Şekil 4.14.	Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait kaspaz-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünimleri	61
Şekil 4.15.	Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait kaspaz-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünimleri	62
Şekil 4.16.	Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait Ki-67 ekspresyonlarının görünümü	63

Şekil 4.17.	Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait Ki-67 ekspresyonlarının görünümü	63
Şekil 4.18.	Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait PCNA ekspresyonlarının görünümü	64
Şekil 4.19.	Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait PCNA ekspresyonlarının görünümü	65



TABLÖLAR

Tablo 3.1.	Araştırmada kullanılan hayvan gruplarına verilen maddeler ve verildiği günler (n:40)	30
Tablo 3.2.	Çalışmada kullanılan cihaz ve Laboratuvar Malzemeleri	31
Tablo 3.3.	Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	32
Tablo 4.1.	Araştırma gruplarının serum ALT, AST, GGT, BUN ve kreatinin seviyeleri	49
Tablo 4.2.	Araştırma gruplarının karaciğer dokularında GSH, MDA, 8-OHdG seviyeleri	51
Tablo 4.3.	Araştırma gruplarının böbrek dokularında GSH, MDA, 8-OHdG seviyeleri	51
Tablo 4.4.	Araştırma gruplarının karaciğer dokularında NFkB-p65, TNF- α ve Sirt-1 seviyeleri	54
Tablo 4.5.	Araştırma gruplarının böbrek dokularında NFkB-p65, TNF- α ve Sirt-1 seviyeleri	54
Tablo 4.6.	Aflatoksin B ₁ indüklü karaciğer hasarına karşı chrysinin deneysel gruplarda serum Total Sialik Asit Konsantrasyonu üzerine etkileri	56
Tablo 4.7.	Araştırma gruplarında organlara göre immunopozitif hücre sayılarının istatistik analizi	65

SİMGELER ve KISALTMALAR

8-OHDG	8-hidroksideoksiguanozin
AF	Aflatoksin
AFB₁	Aflatoksin B ₁
Akt	Apoptoz bağılı yolak
ALT	Alanin aminotransferaz
Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
AF	Aflatoksin
AST	Aspartat aminotransferaz
Bax	Bcl-2 ile ilişkili X proteini
Bcl-2	B hücreli lenfoma
Bcl-xL	Bcl-2 ailesi üyesi
CaCo-2	İnsan epitelyal kolorektal adenokarsinom
Ch	Chrysin
CAT	Katalaz
COX	Siklooksijenaz
CuSO₄	Bakır sülfat
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ERK	Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz
GABA	Gama-aminobutirik asit
GLUT	Glikoz taşıyıcıları
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon transferaz
HE	Hematoksileneozin
HCC	Hepatoselüler karsinom
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HO-1	Hem oksijenaz-1
HOO⁻	Perhidroksi radikalleri
ICAM-1	Hücreler arası adhezyon molekülü-1
IKK	İkB kinazlar
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
Keap1	Kelch benzeri ECH'ye bağlı protein-1
LOX	Lipooksijenaz
LPO	Lipit peroksidasyonu
LPS	Lipopolisakkarit
LOAEL	Gözlemlenen yan etki seviyeleri
MAPK	Mitojenle etkinleşen protein kinaz
MCP-1	Monosit kemotaktik protein-1
MDA	Malondialdehit
MRP2	İlaça dirençli protein pompası
NAD⁺	Nikotinamid adeninin dinükleotit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NOAEL	Gözlenemeyen yan etki seviyesi
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NLR	NOD benzeri reseptörler
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NOX	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilgili faktör 2
OH	Hidroksil
O₂⁻	Süperoksit anyonları
LD₅₀	Öldürücü doz 50
PARP	Poli (ADP-riboz) polimera
PBMC	Peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptörler gama
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SGLT1	Sodyuma bağlı glukoz kotransporter
SMCT	Sodyum/monokarboksilat taşıyıcı
SOD	Süperoksit dismutaz
SİRT 1	Sirtuin 1
TBARS	Tiyobarbitürat asit reaktif maddeleri
TLR	Toll benzeri reseptörler
TSA	Total sialik asit
TBA	Tiyobarbütirik asit
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa

ÖZET

Sıçanlarda Aflatoksin B₁- İndüklü Karaciğer Hasarına Karşı Chrysin'in Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Bu araştırmada sıçanlarda aflatoksin B₁ (AFB₁) ile indüklenen karaciğer ve böbrek hasarına karşı chrysinin (Ch) koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. 40 adet Wistar albino erkek rat 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna 11 gün süreyle %5 dimetilsülfoksit, Ch grubuna 11 gün süreyle 25 mg/kg/c.a/gün chrysin, AFB₁ grubuna 7 gün süreyle 0.5 mg/kg/c.a/gün AFB₁, Ch + AFB₁ grubuna ise 11 gün 25 mg/kg/c.a/gün Ch + 7 gün 0.5 mg/kg/c.a/gün AFB₁ oral gavajla uygulandı. Çalışma 14. günde sonlandırılarak serum örneklerinde *alanin aminotransferaz* (ALT), *aspartat aminotransferaz* (AST), *gamma glutamil transferaz* (GGT) enzim aktiviteleri ile kreatinin, kan üre azotu (BUN) ve total sialik asit düzeyleri analiz edildi. Karaciğer ve böbrek homojenatlarında glutatyon (GSH), malondialdehit (MDA), 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG), nükleer faktör kappa B-p65 (NFKB-p65), tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve NAD-bağımlı protein deasetilaz sirtuin-1 (Sirt-1) düzeyleri ölçüldü. Ayrıca karaciğer ve böbrek örneklerinde histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler yapıldı. Aflatoksin B₁ grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum AST, ALT, GGT değerlerinde önemli düzeyde artış ($p<0,05$) tespit edilirken kreatinin ve BUN değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Ch + AFB₁ grubunda AFB₁ grubuna göre AST, ALT ve GGT değerlerinde önemli bir düşüş ($p<0,05$) saptandı. Karaciğer ve böbrek dokularında AFB₁ grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GSH düzeyinde önemli bir düşüş ($p<0,05$), MDA ve 8-OHdG düzeyinde önemli bir artış ($p<0,05$) tespit edildi. Chrysin+AFB₁ grubunda ise AFB₁ grubuna göre MDA ve 8-OHdG düzeyinde önemli bir düşüş ($p<0,05$); GSH düzeyinde ise önemli bir artış ($p<0,05$) belirlendi. AFB₁ grubunda kontrol grubuna göre karaciğer NFKB-p65, TNF- α ve Sirt-1, böbrek TNF- α ve Sirt-1 seviyelerinde önemli bir artış ($p<0,05$) görülmüştür. Böbrek NFKB-p65 seviyesinde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Chrysin+AFB₁ grubunda ise AFB₁ grubuna göre NFKB-p65, TNF- α ve Sirt-1 düzeyinde önemli bir düşüş ($p<0,05$) belirlendi. Karaciğer ve böbrek dokularında AFB₁ grubunda histopatolojik değişiklikler ile kaspaz-3, kaspaz-9, PCNA ve Kİ-67 ekspresyonlarında önemli artış ($p<0,001$) tespit edildi. Chrysin + AFB₁ grubunda ise dokularda patolojik lezyonlarda belirgin bir azalma ile kaspaz-3, kaspaz-9, PCNA ve Kİ-67 ekspresyonlarında önemli düşüşler ($p<0,001$) saptandı. AFB₁'in karaciğer ve böbrek dokularında hasara yol açtığı, chrysin uygulamasının ise histopatolojik ve biyokimyasal hasar belirteçlerini azaltarak karaciğer ve böbrek toksisitesini önlediği tespit edildi. Sonuç olarak, chrysinin AFB₁ ile indüklenen karaciğer ve böbrek hasarına karşı koruyucu bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin B₁, Chrysin, Oksidatif Stres, Sirtuin-1, Sialik asit

ABSTRACT

Investigation Of the Protective Effect of Chrysin Against Aflatoxin B₁-Induced Liver Damage in Rats

This study aimed to investigate the protective effect of chrysin (Ch) against aflatoxin B₁ (AFB₁)-induced liver and kidney damage in rats. 40 Wistar albino male rats were divided into 4 groups. Control group received 5% dimethylsulfoxide for 11 days, Ch group received 25 mg/kg/b.w/day chrysin for 11 days, AFB₁ group received 0.5 mg/kg/b.w/day AFB₁ for 7 days, and Ch + AFB₁ group received 25 mg/kg for 11 days. /b.a/day Ch plus 0.5 mg/kg/b.a/day AFB₁ for 7 days by oral gavage. The study was terminated on the 14th day and *alanine aminotransferase* (ALT), *aspartate aminotransferase* (AST), *gamma glutamyl transferase* (GGT) enzyme activities and creatinine, blood urea nitrogen (BUN) and total sialic acid levels were analyzed in serum samples. Glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), nuclear factor kappa B-p65 (NFkB-p65), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and NAD-dependent protein in liver and kidney homogenates. Deacetylase sirtuin-1 (Sirt-1) levels were measured. In addition, histopathological and immunohistochemical examinations were performed on liver and kidney samples. While a significant increase in serum AST, ALT, GGT values was detected in the aflatoxin B₁ group compared to the control group ($p < 0.05$), no statistically significant difference was detected in creatinine and BUN values ($p > 0.05$). A significant decrease ($p < 0.05$) was detected in AST, ALT and GGT values in the Ch+AFB₁ group compared to the AFB₁ group. A significant decrease in GSH level ($p < 0.05$) and a significant increase in MDA and 8-OHdG levels ($p < 0.05$) were detected in the liver and kidney tissues of the AFB₁ group compared to the control group. In the Chrysin+ AFB₁ group, there was a significant decrease in MDA and 8-OHdG levels compared to the AFB₁ group ($p < 0.05$); A significant increase ($p < 0.05$) was determined in GSH level. A significant increase ($p < 0.05$) was observed in liver NFkB-p65, TNF- α and Sirt-1, kidney TNF- α and Sirt-1 levels in the AFB₁ group compared to the control group. No significant difference was detected in kidney NFkB-p65 level ($p > 0.05$). A significant decrease ($p < 0.05$) was detected in the levels of NFkB-p65, TNF- α and Sirt-1 in the Chrysin+AFB₁ group compared to the AFB₁ group. Histopathological changes and a significant increase ($p < 0.001$) in the expressions of caspase-3, caspase-9, PCNA and KI-67 were detected in the AFB₁ group in liver and kidney tissues. In the Chrysin+AFB₁ group, a significant decrease in the expression of caspase-3, caspase-9, PCNA and KI-67 was detected, with a significant decrease in pathological lesions in the tissues ($p < 0.001$). It was determined that AFB₁ caused damage to liver and kidney tissues, and chrysin application prevented liver and kidney toxicity by reducing histopathological and biochemical damage markers. It was concluded that chrysin can be used as a protective agent against AFB₁-induced liver and kidney damage.

Keywords: Aflatoxin B₁, Chrysin, Oxidative stress, Sirtuin 1, Sialic acid

1. GİRİŞ

Bitkisel ürünlerde hasat öncesi veya sonrasında uygun olmayan depolama koşullarında *Aspergillus*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Penicillium* ve *Fusarium* gibi mantar türlerinin ikincil metabolizması sonucu üretilen mikotoksinler insan ve hayvan sağlığı üzerinde güçlü akut ve kronik zehirlenmelere sebep olan ürünlerdir. Mikotoksinler arasında doğada sık rastlanmaları insan ve hayvanlar üzerinde teratojenik, nefrotoksik, hepatotoksik, nörotoksik, mutajenik, immünosupresif özelliklerinden dolayı en önemli grubu aflotoksinler oluşturur (Girgin ve ark., 2001; Richard, 2007; Gumus ve ark., 2018). Aflatoksin'ler (AF), *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus flavus* mantarları tarafından üretilen mikotoksinlerdir. AF'ler diğer mikotoksinlere göre yaygın olarak bulunmaları, hayvan ve insanlar üzerinde zehirli etkilerinin yüksek oluşu, çiftlik hayvanlarında hastalıklara, ekonomik kayıplara yol açması ve kanserojen özellikleri nedeniyle büyük risk taşımaktadır. Aflatoksin'ler çiftlik hayvanları tarafından kontamine yemlerin tüketilmesinden sonra yenilebilir dokulara, yumurta ve süte de geçer; böylelikle besin zinciriyle insanları da kontamine eder (Preetha ve ark., 2006). Aflatoksin'ler arasında doğal olarak üretilen Aflatoksin B₁ (AFB₁) en güçlü hepatokarsinojen maddelerden biridir. Aflatoksin'lerin uzun süre düşük dozda alınması hayvanlarda büyümenin yavaşlamasına ve karaciğer büyümesine sebep olurken fazla miktarda AF dozuna maruz kalmanın ise hepatoselüler nekroza neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca alınan toksinin miktarına ve hayvanların duyarlılığına bağlı olarak aflatoksinlerin akut, subakut ve kronik zehirlenmelere neden olduğu, kronik zehirlenmelerin ise hayvanlarda özellikle bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olarak birçok hastalığın çıkmasına sebep olduğu rapor edilmiştir (Richard, 2007).

Bitkilerde bulunan önemli bioaktif maddelerden bir grubunu flavonoidler oluşturur. Flavonoidler polifenolik bileşiklerdir, özellikle sağlığa yararlı çok sayıda etkiye sahip olan fitokimyasalların en yaygın kimyasal sınıfı olarak bilinir (Samarghandian ve ark., 2017). Chrysin, son yıllarda farmakoterapötik etkileri üzerinde çalışmaların yoğun bir şekilde yapıldığı önemli bir fitokimyasaldır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki chrysin bal, propolis, radix scutellariae, passiflora bitkisinde yaygın olarak bulunurken, sentetik benzerleri de farmakolojik amaçlar için

kullanılmaktadır (Naz ve ark., 2019). Chrysin, çok sayıda değişik farmakolojik etkilere sahip olmasının yanında özellikle güçlü antikanserojen, antioksidan ve anksiyolitik özellikleri ile öne çıkan önemli bir flavonoid maddedir (Farkhondeh ve ark., 2019; Naz ve ark., 2019; Salama ve ark., 2021).

Bu araştırma kapsamında, Aflatoksinler arasında güçlü hepatokarsinojen ve hepatotoksik etkinliği olan AFB₁'e karşı chrysin'in biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal göstergeler ışığında karaciğer üzerinde koruyucu etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikotoksinler

Mikotoksin kelimesi Yunanca, mantar anlamına gelen ‘mykes’ ve Latince, zehir anlamına gelen ‘toxicum’ kelimelerinden oluşmaktadır. Mikotoksinler gıda maddeleri ve yemlerde bulunan *Aspergillus*, *Claviceps*, *Alternaria* ve *Penicillium*, *Fusarium* gibi mantar çeşitlerinin ikincil metabolizması sonucu üretilen, düşük molekül ağırlıklı, farklı kimyasal yapıya sahip doğal toksinlerdir. İnsan ve hayvan sağlığı üzerinde farklı toksik etkiler oluşturmaktadır (Gumus ve ark., 2018).

Mantar ve mikotoksin üretimi çevresel, fiziksel, kimyasal, biyolojik faktörlerden etkilenir. Fiziksel ve çevresel faktörler arasında böceklerin verdiği zararın boyutu, zaman, iklim, ışık, sıcaklık, hava basıncı, rüzgâr, yağış, nem, toprağın pH'ı, mineral tuzları, su tutma kapasitesi ve gazlar (oksijen, karbondioksit ve nitrojen) bulunmaktadır. Kimyasal faktörler tarımda kullanılan gübreler ve diğer kimyasalları içerir. Biyolojik faktörler ise toksijenik mantar türleridir (Ekwomadu ve ark., 2022). Mikotoksinleri üreten mantarlar hava akımlarıyla her yere taşınabilir. Mikotoksin kontaminasyon seviyesi coğrafi konuma, iklim koşullarına, ürünün türüne bağlı olarak mevsimden mevsime farklılık gösterebilir (Bakırcı, 2014).

Mikotoksinler gastro intestinal sistem ve solunum yolu ile vücuda girebilir ve hayati organlara ulaşabilir. Mikotoksinler insan ve hayvan hücrelerine nüfuz ederek mutasyonlara ve kalıcı hasara neden olabilir. Normal hücre bölünmesi süreçleri sırasında, bu mutasyonlar ortaya çıkabilir ve potansiyel olarak normal hücresel büyümeyi şiddetlendirebilir (Ekwomadu ve ark., 2022). Mikotoksinlerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu hastalığa “mikotoksikoz” denir. Mikotoksinlerin hepatotoksik, nörotoksik, dermatotoksik, kanserojenik, mutajenik, teratojenik, östrojenik etkiler gibi birçok zararlı etkileri bulunmaktadır. Toksisite derecesini maruziyet düzeyi, maruz kalınan mikotoksin türü, miktarı, beslenme, cinsiyet, yaş ve sağlık problemleri etkilemektedir (Girgin ve ark., 2001).

Mikotoksinlerden insan ve hayvan sağlığı açısından en tehlikelisinin aflatoksinler olduğu saptanmıştır. Aflatoksinlerin zararlı etkilerinin ortaya çıkmasında geçmişte afet görünümündeki olaylar rol almıştır. Mikotoksin ismi ilk kez 1960 yılında İngiltere’de hindilerin ölümü ile sonuçlanan olay sonrası ortaya çıkmıştır. Bu lmlere *Aspergillus flavus* toksini olan aflatoksin B₁ ile kontamine olmuş yer fıstığı içeren yemlerin neden olduğu rapor edilmiştir. Bu vaka Turkey X disease olarak da bilinir (Ismail ve Papenbrock, 2015).

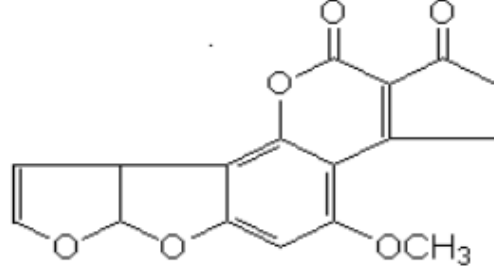
2.1.1. Aflatoksin B₁

2.1.1.1. Aflatoksin B₁’in Kimyasal Yapısı ve zellikleri

Aflatoksin’ler genellikle furanokumarinler olarak sınıflandırılan, ısıya ve ışığa karşı nispeten stabil olan, kaynaşmış dihidrofuran (difurokumarosiklopentenon, difurokumarolakton) parçaları içeren yüksek oranda kumarin türevleri olan bir bileşik sınıfıdır. Difurokumarosiklopentanon içeren AFB₁, AFB₂, AFB₂A, AFM₁, AFM₂, AFM₂A difurakumarolakton içeren AFG₁ ve AFG₂ ’i dir. B toksinleri kumarin yapıdaki lakton halkasına eklenmiş siklopentenon halkası, G toksinleri ek bir lakton halkası içermektedir. Bildirilen 20 AF’den 4 tanesi önem arzetmekte olup bunlar floresan özellikleri ve kromatogramlardaki hareketliliklerine göre adlandırılmıştır. Ultraviyole ışık altında yeşil floresans verenler AFG₁ ve AFG₂ mavi floresans verenler ise AFB₁ ve AFB₂, olarak adlandırılmaktadır (Zheng ve ark., 2005; Yentür ve Er, 2011). AFB₂, B₁’in, AFG₂ de G₁’in dihidro türevleridir ve “*in vivo*” koşullarda metabolik olarak B₁ ve G₁’e okside olmadıkları sürece biyolojik olarak inaktiftirler (zkaya ve Temiz, 2003). Ayrıca AFB₁ ve AFB₂ ile kontamine yemlerle beslenen ineklerin sütünde rastlanan, ana moleküle benzer daha az biyolojik etki gösteren türevler ise AFM₁ ve AFM₂ olarak adlandırılmaktadır. Bunlar süt, süt ürünleri ve ette bulunabilen AFB₁ ve B₂’nin hidroksillenmiş türevleridir (Verma, 2004).

Aflatoksin B₁ molekülünün fizikokimyasal ve biyokimyasal özellikleri incelendiğinde toksikolojik affinitesinde iki önemli bölge vardır. İlk bölge furofuran halkasının C–8, 9 pozisyonundaki çift bağdır ve aflatoksinin DNA ve protein etkileşimlerine neden olmaktadır. İkinci reaktif grup ise kumarin fonksiyonel grubuna

bağlı lakton halkasıdır. Bu halka kolay hidrolize olur. Bu sebeple de degradasyon için zayıf bölgedir (verna 2004)



Şekil 2.1. Aflatoksin B₁'in kimyasal yapısı (Özkaya ve Temiz 2003).

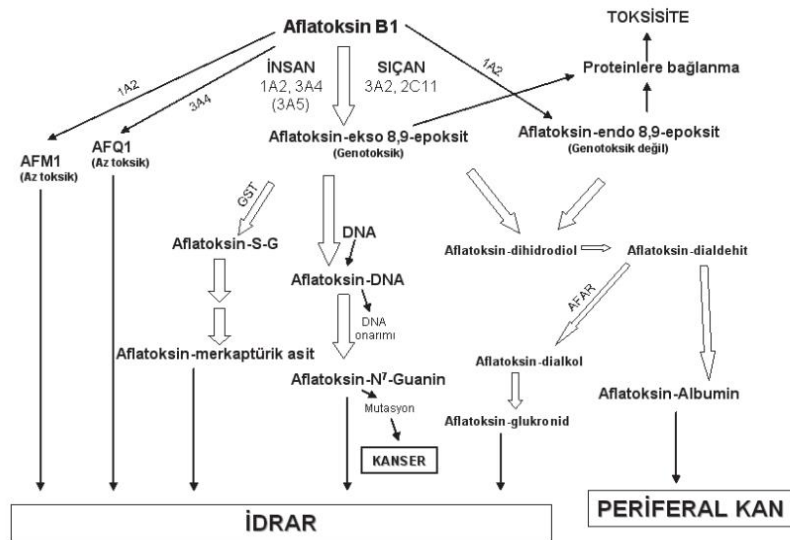
Aflatoksin'ler, *Aspergillus parasiticus* ve *Aspergillus flavus* mantarları tarafından üretilen mikotoksinlerdir. *A. parasiticus* AFB₁, AFB₂, AFG₁ ve AFG₂ aflatoksinlerinin hepsini üretirken *A. flavus* nadiren AFG₁ ve AFG₂ üretmektedir. Aflatoksinlerin neden olduğu hastalığa aflatoksikozis denir (Kos ve ark., 2020).

Aflatoksinler su ve hidrokarbonlarda kısmen çözünür ancak hidrofobik çözücülerde çözünemezler. Aflatoksinler alkol, kloroform ve aseton gibi polar çözücülerde tamamen çözünebilir. Aflatoksinleri parçalamak için ışığa ve havaya maruz bırakılabilir. Ayrıca UV ışığına, güçlü bazik çözeltiye, güçlü asit çözeltisine maruz bırakılarak da parçalanabilirler. Aflatoksinler çok yüksek sıcaklık koşullarına (237-299 °C) maruz bırakılarak parçalanabilirler. Normal pişirme sıcaklıkları AF'leri parçalayamaz. Aflatoksinler tamamen yok edilmesi, sodyum hipoklorit içeren ağartıcı ile işlendiklerinde veya amonyakla otoklavlandıklarında mümkündür (Mutocheluh ve Narkwa, 2022).

2.1.1.2. Aflatoksin B₁'in Etki Mekanizması

Aflatoksin B₁'in mutajenitesi ve karsinojenitesi vücuttaki biyotransformasyonu sonucunda ortaya çıkmaktadır. AFB₁ insan ve hayvanların sağlığını tehdit eden aflatoksin türleri arasında en toksik olanıdır (Kos ve ark., 2020). Karaciğer, AFB₁'in ana metabolik ve detoksifikasyon organıdır, ayrıca karaciğer

AFB₁' in toksik etkileri açısından birincil hedef organdır. AFB₁ alımından sonra bağırsaktan emilip karaciğer de sitokrom P450 ve aril hidrokarbon hidroksilaz enzimleri tarafından AFB₁'i reaktif ara ürün olan AFB₁-8,9-epoksit'e dönüştürülür. Aflatoksin'lerin epoksit türevleri, karaciğerde GSH-S-transferaz (GST) enzimi tarafından katalize edilen tepkimeler sonucunda indirgenmiş glutatyon (GSH) ile konjuge edilerek veya epoksit hidrataz enzimi tarafından aflatoksikole çevrilerek zararsız hale getirilir (Şekil 2.2). Yüksek miktarda ve uzun süre AF alımı halinde detoksifikasyon işlemi yetersiz kalır ve sağlık sorunları oluşturur. Aflatoksin B₁ DNA gibi hücresel makromoleküllere kovalent bağlanma affinitesi vardır. Özellikle DNA zincirindeki guanozin G'nin amino asit kalıntılarındaki 7. azot atomu (N7) ile birleşerek DNA mutasyonlarına ve ciddi karaciğer kanserlerine neden olduğu bildirilmiştir (Lin ve ark., 2012; Lin ve ark., 2014). Aflatoksin B₁'in metabolizması sonucu süperoksit anyonu (O₂⁻), hidroksil radikali (OH) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) karaciğerde aşırı üretimini ve oksidatif stresi indükler, bu da proteinlerin, lipidlerin ve DNA'nın yapısının bozulması, apoptoz, otofaji, karaciğer nekrozu, skleroz, akut karaciğer hasarı ve hatta karaciğer tümörleri ile sonuçlanabilir (Liu ve ark., 2021).



Şekil 2.2. Aflatoksin B₁'in biotransformasyon ürünleri ve toksik etki mekanizması (Sabuncuoğlu ve ark., 2008).

2.1.1.3. Aflatoksin B₁'in Toksisitesi

Aflatoksin'ler farklı tarımsal ürünlerde bildirilmesine rağmen en yaygın kontaminasyon tahıllar, yağlı tohumlar (mısır, yer fıstığı) ve baharatlar da görülmüştür (Kos ve ark., 2018). Aflatoksin'ler çeşitli gıda ve yemlerin önemli kirleticisidir. AF'ler çiftlik hayvanları tarafından kontamine yemlerin tüketilmesinden sonra yenilebilir dokulara, yumurta ve süte de geçer; böylelikle besin zinciriyle insanları da kontamine eder (Preetha ve ark., 2006). Bildirilen yaklaşık 20 AF'den 5 tanesi (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ ve AFM₁) doğal olarak meydana gelir. Aflatoksinler içerisinde en yüksek toksisiteyi AB₁ göstermektedir. AFB₁, *Aspergillus* türleri tarafından üretilen doğal olarak oluşan ve bilinen en güçlü karaciğer kanserojenidir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), AF'leri (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFM₁) 1. sınıf insan kanserojenleri olarak sınıflandırırken bunlar arasında da AFB₁'in en yaygın ve en belirgin kanserojen etkiye sahip toksin olduğunu bildirmiştir (Kos ve ark., 2020). Ayrıca daha önce yapılan çalışmalar, AFB₁'in büyüme geriliği, biyolojik malformasyonlar, sindirim sistemi bozukluklarına neden olduğunu bildirmiştir (Jin ve ark., 2020). Aflatoksin'lerin fazla miktarda alınması hepatoselüler nekroza, uzun süre düşük dozlarına maruz kalmanın ise hayvanlarda büyümenin yavaşlamasına ve karaciğer büyümesine sebep olduğu bildirilmiştir. Ayrıca alınan toksinin miktarına ve hayvanların duyarlılığına bağlı olarak aflatoksinlerin akut, subakut ve kronik özellikte zehirlenmelere yol açtığı, kronik zehirlenmelerin ise hayvanlarda özellikle bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olarak birçok hastalığın çıkmasına sebep olduğu rapor edilmiştir (Çelik, 2001).

AFB₁'in hayvanlara verildiğinde %50 oranında ölüme yol açan doz (LD₅₀) değerinin 2,71 mg/kg olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte sıçanlarda 1,0 mg/kg AFB₁ uygulamasının ardından ölüm gözlenmediğini bildirmiştir (McKean ve ark., 2006).

2.1.1.4. Aflatoksin B₁'in Akut ve Kronik Toksik Etkileri

Aflatoksinler yüksek dozda alınması akut toksisiteye düşük dozda sürekli alınması kronik toksisiteye neden olmaktadır. Aflatoksinlerden çoğu hayvan

etkilenmesine rağmen duyarlılık türden türe değişmektedir. Aynı türün genç olanları yaşlı olanlardan daha duyarlıdır. Toksik etki hayvanın cinsine, sağlık durumuna, yaşına, toksinin alım miktarına göre değişmektedir. En duyarlı hayvanlar kümes hayvanları içinde ördek yavrularıdır. Bunu sırasıyla hindi yavruları, sülün palazları izler. Memeli hayvanlar arasında ise 3-12 haftalık domuz, gebe domuzlar, sığır ve koyunlardır (Bullerman, 1979). Akut aflatoksikoziste görülen klinik bulgular iştah azalması, kilo kaybı, vücut boşluklarında sıvı birikmesi, mukoz membranlarda sararma, nörolojik bozukluklar görülmektedir (Butler, 1964). Sıçanlara 1,0 mg/kg dozunda AFB₁ oral yoldan verilmesi ile oluşturulan akut toksisitede karaciğerde hepatik nekroz ve safra kanallarının proliferasyonunu içeren belirgin mikroskobik değişiklikler görüldüğü bildirilmiştir (Kumagai ve ark., 1998). Kronik aflatoksikozda hayvanlarda görülen klinik tablo karkasta sararma ve karaciğerde siroz görülmüştür (Li ve ark., 2022). Histopatolojik olarak, Abdel ve ark. (2017), diyet ile alınan AFB₁'in hayvanların karaciğerinde vakuolizasyon, fokal nekroz alanları, safra kanalları ve sinüzoidlerin mononükleer hücre infiltrasyon hiperplazisi ile yağlı dejenerasyon gösterdiği bildirilmiştir.

İnsanlarda da AFB₁'e bağlı akut ve kronik toksisiteye bağlı ölümler Hindistan ve Kenya' da bildirilmiştir. Etkilenen kişilerin bir ay boyunca günlük 2 ila 6 mg aflatoksin ile kontamine gıda tüketmiş olabileceğini bildirilmiştir. Nekropsi sırasında alınan karaciğer örneklerinde safra kesesi proliferasyonu ve dev hücreler görüldüğü rapor edilmiştir (Krishnamachari ve ark., 1975; Probst ve ark., 2007).

2.1.1.5. Aflatoksin B₁'in Mutajenik ve Karsinojenik Etkileri

Aflatoksin B₁ 8, 9-epoksite metabolize edilir ve bu ara ürün, eklentiler oluşturmak üzere nükleik asitlere bağlanır. Bu eklentiler, transkripsiyonu ve translasyonu bloke edebilir, böylece fonksiyonel gen ekspresyonunun düzenlenmesini etkileyebilir ve sonuçta hepatotoksisiteye neden olabilir. Aflatoksin B₁ DNA onarım enzimlerine bağlanarak ve hasar vererek dolaylı olarak mutasyonları indükleyebilir (Kamdem ve ark., 2006). Kararsız yapısı göz önüne alındığında, AFB₁ kendiliğinden AFB₁ dihidrodiole hidrolize olabilir ve bu da farklı proteinlerle konjuge olarak doku

hasarına, inflamasyona ve aşırı hücre çoğalmasına neden olup karsinogeneze neden olur (Iyer ve ark., 1994).

Aflatoksin B₁ CP450 enzimi tarafından 8,9-epoksite epoksidasyonu hepatosellüler karsinom yolunda önemli bir rol oynar, özellikle p53 geninin 249. kodonunun üçüncü bazındaki guanin bazlarına bağlanarak aflatoksin-N7-guanin (AFB₁-N7-Gua) oluşturur. Aflatoksin-N7-guanin, hücre döngüsü ilerlemesini önlemekten sorumlu olan p53 baskılayıcı genini etkileyebileceği gözlemlenmiştir (Kucukcakan ve Hayrulai-Musliu, 2015). p53 geni, insan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğrayan bir tümör baskılayıcısıdır. Bu gen mutasyona uğradığında apoptozu inhibe ederek ve çoğalma oranlarını artırarak tümör gelişimini destekler. AFB₁ ayrıca, DNA onarım enzimlerine bağlanarak ve hasar vererek dolaylı olarak mutasyonları indükleyebilir (Weng ve ark., 2017). Clifford ve Rees (1967), sıçanlara tek doz AFB₁ (7 mg/kg vücut ağırlığı) uygulamasının ardından toksinin karaciğer hücresinin çekirdeğinde tespit edildiği ve *in vitro* DNA ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Aflatoksin B₁'in RNA polimeraz tarafından DNA'nın transkripsiyonunu engelleyerek nükleer RNA üretimini önlediği bunun sonucunda DNA ile etkileşiminin mitoz üzerindeki inhibitör etkisine ve nekrojenik etkisine yol açtığı ileri sürülmektedir.

Aflatoksin B₁ kaynaklı hepatotoksisite aynı zamanda DNA ile etkileşime giren ve mutasyonlara yol açan hidroksil radikallerinin öncüleri olan reaktif oksijen türlerinin birikmesinden de kaynaklandığı bildirilmiştir. AFB₁'in karaciğer hücrelerinde metabolize olması fazla miktarda ROS üretir ve membran fosfolipitlerinin doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen atomunun çıkarılması yoluyla lipid peroksidasyonunu (LPO) başlatır. LPO yan ürünleri de DNA ile reaksiyona girerek hepatokarsinogeneze neden olabilir (Weng ve ark., 2017).

2.1.1.6. Aflatoksin B₁'in Oksitadif Stres Üzerindeki Etkileri

Oksidatif stres, hücresel metabolizma sırasında oluşan O₂⁻, H₂O₂ ve OH⁻, perhidroksi radikalleri (HOO⁻) ile nitrik oksit (NO) içeren ROS'nin artışı ve reaktif nitrojen türleri (RNS) ile onları nötralize eden, antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanır. Endojen ROS üretiminin birincil

kaynakları plazma zarı, mitokondri, peroksizomlar ve endoplazmik retikulumdur. Ayrıca oksidatif stres hidrokinon ve katekolaminler gibi farklı bileşiklerin enzimatik reaksiyonları ve otooksidasyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla gerçekleşir. Ultraviyole ışınlar, iyonlaştırıcı radyasyon, patojen enfeksiyonları, tütün dumanı, çevresel toksinler ve herbisitlere maruz kalma gibi farklı eksojen uyaranlar ROS üretiminin eksojen kaynaklarıdır. Üretilen ROS canlı organizmanın hücrel hasarı ortadan kaldırma ve hücrel hasarı onarma yeteneğini aştığında oksidatif stresle sonuçlanır, böylece DNA, proteinler ve lipidler dahil biyomoleküllerin oksidasyonuna yol açar (Ayala ve ark., 2014; Forman ve Zhang, 2021).

Serbest radikallerin karbon-karbon çift bağ içeren lipidlerle ve doymamış yağ asitleri ile oksidasyonu sonucu lipid peroksidasyonu oluşur. Lipid peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) ve tiyobarbitürik asit reaksiyona giren maddelerdeki (TBARS) değişiklikler izlenerek ölçülebilir. Malondialdehit, tiyobarbitürik asit (TBA) ile kolay reaksiyona girdiği için, lipid peroksidasyonunu belirlemede uygun bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Ayala ve ark., 2014).

Aflatoksin B₁, canlıların bağışıklık sisteminin baskılanmasına neden olup ROS oluşumunu artırarak oksidatif hasara neden olan oldukça toksik bir mikotoksindir (Ma ve ark., 2021). Aflatoksin B₁ karaciğerdeki enzimler tarafından 8,9 epoksite dönüşür. Tamamen detoksifiye olmak için epoksit, mitokondri zarını geçer ve burada glutatyon transferazlar gibi detoksifikasyon enzimleri tarafından faz II metabolizmasından geçer (Deng ve ark., 2018). Mitokondri, detoksifikasyon fonksiyonlarının yanı sıra, elektron taşıma zinciri tarafından oksidasyon süreci ve reaktif oksijen türlerinin üretimi gibi diğer biyolojik süreçlere de dahil olur. Mitokondri AFB₁'in metabolizması ve detoksifikasyonundaki önemi mitokondriyi AFB₁'patogenezinde de önemli kılmaktadır (Wang ve ark., 2017). Membranın geçirgenliği kısmen membran taşıyıcılarına ve lipid bileşimine bağlıdır. AFB₁ lipid metabolizmasını bozar ve oksidatif stresi tetikler (Rotimi ve ark., 2016, 2018).

Owumi ve ark. (2023), sıçanlarda 28 gün boyunca AFB₁ uygulamasının sıçanların testislerinde ksantin oksidaz, reaktif oksijen, nitrojen türleri ve lipid peroksidasyonu artırdığını bildirmiştir. Ahmed ve ark. (2022), AFB₁ (7,5 g/kg canlı

ağırlık/gün, oral) uygulaması ile oluşturdukları karaciğer hasarında oksidatif stres ve plazma MDA düzeylerinde önemli ölçüde artırdığını vurgulamışlardır. Rotimi ve ark. (2019), sıçanlara sırasıyla 1, 4 ve 7 gün boyunca 1 mg/kg vücut ağırlığında AFB₁ uygulamasının ardından oluşan akut AFB₁ maruziyetinin hepatik mitokondriyal lipidleri bozarak oksidatif stres biyobelirteçlerini artırır. Rotimi ve ark. (2018), albino sıçanlara 8 hafta boyunca AFB₁ (40 ppb) uygulamasının incelenen dokularda oksidatif stres biyobelirteçlerini artırdığını belirtmiştir. Ayrıca glutatyon (GSH) konsantrasyonunda azalma mevcutken, dokulardaki TBARS anlamlı derecede arttığı, antioksidan enzimleri azalttığı ve dokulardaki oksidan durumu artırdığı rapor edilmiştir. Aleissa ve ark. (2020), Wistar albino sıçanlarına 2 hafta boyunca (50 µg/kg/ip) uygulan AFB₁ ile oluşturulan hepatorenal hasar sonucu lipid peroksidasyonun arttığı bildirilmiştir.

Reaktif oksijen türlerinin oluşmasını, birikmesini ve lipid peroksidasyonun başlamasını önleyen, bu bileşiklerin oluşturduğu hasarı engellemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere vücutta görev yapan savunma sistemleri “antioksidan savunma sistemleri” ya da “antioksidanlar” olarak bilinir. Canlı organizmada ROS öncelikli olarak enzimatik antioksidanlar tarafından engellenir. Bu enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH- Px)’dır. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise glutatyon (GSH), alfatokoferol, askorbik asit, β-Karoten, seroplazmin ve diğer antioksidanlardan oluşur (Karabulut ve Gülay, 2016).

Owumi ve ark. (2023), sıçanlara 28 gün boyunca 70 µg/kg AFB₁ uygulamasının, dokularda (hipotalamus, epididimis ve testis) GSH, CAT, SOD, GSH- Px ve glutatyon-S-transferaz aktivitelerini azalttığını rapor etmiştir. Ahmed ve ark. (2022), AFB₁ (7,5 g/kg canlı ağırlık/gün, oral) uygulamasının enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan düzeylerini düşürdüğünü bildirmişlerdir. Aflatoksin B₁ uygulamasının deney hayvanlarına uygulamasının GSH seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (Ma ve ark., 2021). Altyar ve ark. (2023), sıçanlarda AFB₁ (2,5 mg/kg) uygulaması ile oluşturulan hepatik hasarda GSH, GSH-Px, SOD ve CAT düzeylerinde azalma olduğu bildirmiştir. Aleissa ve ark. (2020), Wistar albino

sıçanlarına 2 hafta boyunca (50 µ g/kg/ip) uygulanan AFB₁ ile oluşturulan hepatorenal hasar sonucu GSH, CAT, SOD, GSH- Px düzeylerinin azaldığını rapor etmiştir.

Aflatoksin B₁'in toksik etki mekanizmasında oksidatif stres önemli bir role sahiptir. Bu nedenle antioksidan maddelerin yemlere katılması veya kullanılması AFB₁ kaynaklı hasarlara karşı hücre ve dokuların ROS ve diğer serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı koruyucu özellik gösterir (Muzaffer ve ark., 2010). Bilimsel araştırmalar, fitokimyasalların biyotransformasyonu yoluyla AFB₁'in detoksifikasyon yolunu indükleyebileceğini ve böylece AFB₁'in zararlı etkilerini azaltabileceğini göstermiştir. Klinik tedavide, düşük toksisite ve yan etkilerin az olması gibi avantajlarından dolayı bazı fitokimyasallar karaciğer hasarının tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmıştır (Fan ve ark., 2021).

2.1.1.7. Aflatoksin B₁'in İnflamasyon Üzerindeki Etkileri

Oksidatif stres metabolizması sonucu üretilen aşırı ROS ve RNS farklı inflamatuvar uyarılar ile proinflamatuvar sitokinlerin sentezi ve salgılanmasıyla sonuçlanan inflamatuvar süreci başlatır. Oksidanların hasarlı dokudan endojen molekülleri salması ile Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ve nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon (NOD) benzeri reseptörler (NLR'ler) gibi doğuştan gelen bağışıklık reseptörleri aktive etmektedir. Toll benzeri reseptörler ve NLR'ler, vücudun bağışıklık sisteminin önemli reseptörleridir bu reseptörler hücre içi inflamatuvar sinyal yollarını harekete geçirir T ve B lenfositlerden oluşan kazanılmış (adaptif) immun yanıtı başlatırlar (Lugrin ve ark., 2014). Bu reseptörler liganda bağlanınca aktive olur ve intraselüler kısmı aracılığı ile nükleer faktör- kapa beta (NF-κB) ve mitojenle aktive edilen protein kinaz ailelerini uyarır. NF-κB; TNF-α, IL-1 ve IL-6 gibi sitokin ve proinflamatuvar ürünlerin genlerini aktive eder (İnci ve Bişkin, 2007).

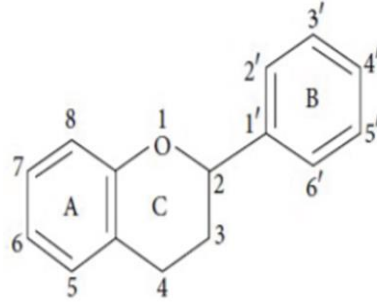
Aflatoksin B₁ maruziyeti karaciğer hücrelerinde ROS üretimini tetikleyerek oksidatif strese, inflamasyona ve karaciğer hasarına yol açabilir. Ayrıca AFB₁ uygulanan sıçanların karaciğerinde pro-inflamatuvar sitokinlerin (TNF-α ve IL-1α) aşırı ekspresyon gösterdiği bildirilmiştir (Singh ve ark., 2015). Proinflamatuvar bir faktör olarak siklooksijenaz-2 (COX-2), ksenobiyotikler tarafından indüklenen karaciğer

inflamasyonunda yaygın olarak rol oynar. Aflatoksin B₁ maruziyetinin karaciğer hücrelerinde Kupffer hücrelerini aktive ettiği ve COX-2 yoluyla karaciğerde inflamatuvar yanıtı başlattığını bildirmiştir (Zhang ve ark., 2019). Abdel ve ark. (2017), AFB₁'in (0,3 mg/kg diyet) tavşanlarda uygulamasının inflamasyonla ilişkili genlerin (TNF α , NF-kB, IL6 ve Cox-2) hepatik ekspresyonunda da önemli bir artışa yol açtığı bildirilmiştir. Demirkapi ve ark. (2023), AFB₁'in (0,75 mg/kg) 28 gün boyunca günlük uygulanması karaciğer COX-2, TNF- α , NFkB ve IL-6, ekspresyon düzeylerini artırdığını rapor etmiştir.

2.2. Flavonoidler

Bitkilerde bulunan önemli bioaktif maddelerden bir grubunu flavonoidler oluşturur. Flavonoidler polifenolik bileşiklerdir, özellikle sağlığa yararlı çok sayıda etkiye sahip olan fitokimyasalların en yaygın kimyasal sınıfı olarak bilinir (Samarghandian ve ark., 2017). Flavonoidler insan ve hayvanlarda sağlık üzerine olumlu etkileri olan, doğal olarak oluşan, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir (Feliccia ve ark.,1997). Flavonoidler ile ilgili ilk çalışmalar, 1936'da Szent-Georgye ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. İskorbüt hastası kobayları turuncgil ve biber kabuklarından elde ettikleri preparatlarla tedavi etmiş ve tedavi sonucunda iyileştirmişlerdir (Chichester ve ark., 1987). Flavonoidler farklı gruplara ayrılırlar ve genel olarak 6 grup flavonoid sınıfı bildirilmektedir. Bunlar; flavonlar, flavonoller, flavanonlar, antosiyaninler, isoflavonoidler ve flavanollerdir. Bu 6 flavonoid grubu, insan sağlığı üzerine olumlu işlevlere sahiptir (Peterson ve Dwyer, 1998).

Flavonoidler fenolik yapılarıyla doğal bileşenler içeren bir gruptur. Kapalı formülü, C₆-C₃-C₆ konfigürasyonda düzenlenmiş 15 karbon atomundan oluşan, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Değişik flavonoidler arasındaki farklar, bağlanan hidroksil gruplarının sayısından, doymamışlık derecesinden ve üçlü karbon segmentinin oksidasyon düzeyinden kaynaklanmaktadır (Şekil 2.3). Bazen bu üç karbonlu zincir açık olabilir. Flavonoid iskeleti flavonoidlerin karakteristik özelliklerini bu heterosiklik halka belirler (Kocabaş, 2008).



Şekil 2.3. Flavanoid iskeleti (Kocabaş, 2008).

Flavonoidler, bitkilerin yaşamsal fonksiyonları ile ilgili birçok işlevden sorumlu olan sekonder metabolitlerdir (Bronze ve ark., 2012). Flavanoidler, bulunduğu bitkisel üründe tat, renk, yağ oksidasyonunun engellenmesi, enzim ve vitaminlerin korunmasını sağlayan etkileri vardır (Yao ve ark., 2004; Wang ve ark., 2009). Flavonoidlerin ana kaynağını meyve ürünleri (örn. Turunçgiller, kuşburnu, kayısı, kiraz, üzüm, siyah kuş üzümü, yaban mersini, elma), sebzeler (örneğin brokoli, soğan, yeşil biber, ıspanak, domates), soya fasulyesi, çay yaprakları ve tıbbi bitkiler (örn. *Silybum marianum*, *Alpinia officinarum*, *Hypericum perforatum*) oluşturur (Hodek ve ark., 2002).

Flavonoidlerin normal bir diyet ile günlük ortalama 1-2 g düzeyinde alındığı bildirilmiştir (De Vries ve ark., 1997). Flavonoidlerin, memeli metabolizması üzerinde antialerjik, antienflamatuar, antiviral, antiproliferatif ve antikarsinogenik aktiviteler olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu bildirilmiştir (Ren ve ark., 2003). Flavonoidler, mide ve duodenum ülserleri, alerjiler, vasküler kırılabilirlik, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar gibi bazı patolojik bozuklukları, kanser ve kardiyovasküler hastalıkları antioksidan etkisi ile önlemede yararlı etkileri nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Zand ve ark., 2002). Epidemiyolojik çalışmalar, kanser riskini ve kardiyovasküler hastalıkları azaltması nedeniyle flavonoid bileşiklerinin önemini göstermiştir (Wang ve ark., 2009).

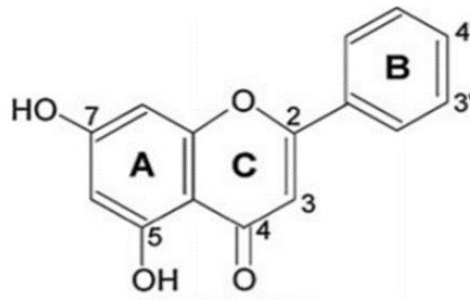
Chrysin, kimyasal yapısına bağlı olarak flavonoidler sınıfı altında kategorize edilen farmakolojik ve yararlı bioetkinlik vaadeden bir fitokimyasaldır. Çeşitli

dejeneratif bozuklukların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Naz ve ark., 2019).

2.2.1. Chrysin

2.2.1.1. Chrysinin Kimyasal Yapısı ve Kaynakları

Chrysin (Ch) (5,7-dihidroksi-2-fenil-4H-kromen-4-on; 5,7-dihidroksiflavon) 15 karbon iskeletinden oluşan doğal polifenolik bir bileşiktir. Yapısal olarak, Ch 2 benzen halkası (A, B) ve 1 oksijen içeren heterosiklik halkadan oluşur (C). 3-karbon hidroksil grubundan yoksun iken, 4. karbona bağlı bir karbonil grubu ile 2-3 çift bağlı karbona sahiptir. Bu yapısal sınıflandırmaya dayanarak, Ch flavonlar sınıfına girer. Ayrıca 5. ve 7. karbon atomlarında OH grupları içerir. Çeşitli flavonoidlerin aksine, Ch, halka-B'de herhangi bir oksijenasyonu paylaşmaz. Esas olarak, A halkası oksijenasyonundaki çeşitlilik chrysinin türevlerinden (wogonin, oroksilin A ve baicalein) sorumludur (Şekil 2.5.). Chrysin, A ve C olmak üzere 2 kaynaşmış halka ve C halkasının ikinci pozisyonuna bağlı bir fenil halkası B'den oluşan ortak bir kimyasal yapıya sahiptir. A halkasının 5. ve 7. kısmında ilave bir hidroksil grubu ile flavon yapısını (Şekil 2.4) paylaşır (Muñoz ve ark., 2016; Pusz ve ark., 2000).

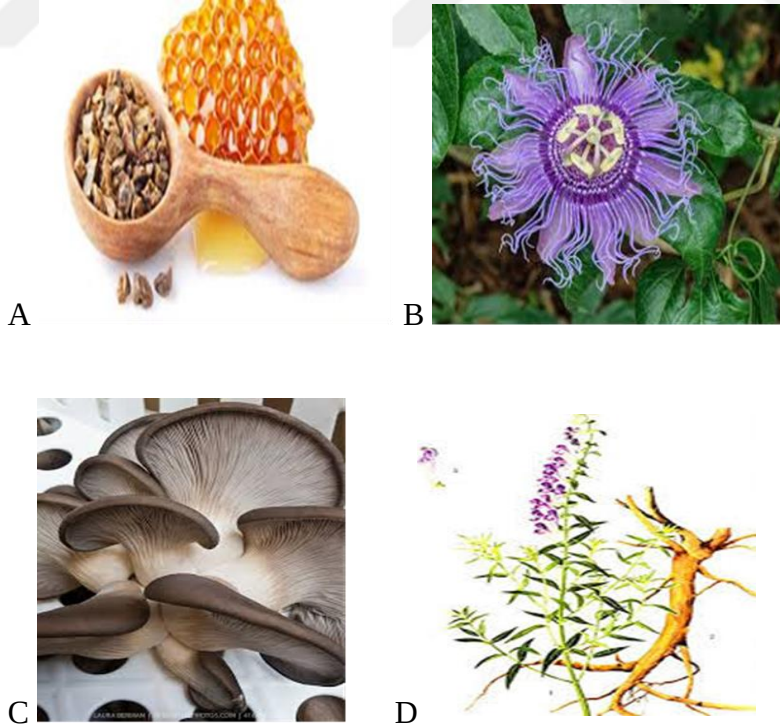


Şekil 2.4. Chrysin kimyasal yapısı (Muñoz ve ark., 2016; Pusz ve ark., 2000).



Şekil 2.5. Chrysin türevleri (Nabavi ve ark., 2015).

Chrysin, propolis, mavi tutku çiçeği (*Passiflora caerulea*), tıbbi etkisi ve ekonomik değeri olan bal da dahil olmak üzere birçok üründe çok miktarda bulunan bir fitokimyasaldır (Mani ve Natesan, 2018). Yüksek seviyede Ch flavonoid birikimi propolis ve balda tanımlanmıştır (Siess ve ark., 1996). Ayrıca *Pleurotus ostreatus* gibi mantarlar ve diğer çeşitli meyveler iyi Ch kaynaklarıdır. Chrysin ve türevlerinin, tıbbi bir bitki olan *Radix scutellariae*'nin ana bileşenleri olduğu gösterilmiştir (Naz ve ark., 2019) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Chrysin kaynakları: A. Propolis, B. *Passiflora* Sp., C. *Pleurotus ostreatus*, D. *Radix scutellariae* (Naz ve ark., 2019).

Passiflora cinsinden, genellikle tutku meyveleri veya tutku çiçekleri olarak adlandırılan bitkiler, insan sağlığı üzerindeki etkileri ile bilinir. Yenilebilir kısımlar nutrasötik ya da fonksiyonel gıda olarak bilinir (Zeraik ve ark., 2010). *Passiflora* bitkilerinin bazı kısımları (çiçek, yaprak gibi) çeşitli etkileri nedeniyle infüzyon, ekstrakt veya tentür olarak kullanılır. Elde edilen Ch ekstraktın anti-depresif, anksiyolitik (Miyasaka ve ark., 2007), yatıştırıcı, uyku bozuklukları önleyici (Guerrero ve Medina, 2017), anti-spazmolitik, anti-astmatik, solunum bozukluklarını önleyici etkileri gösterilmiştir (Miroddi ve ark., 2013). Bu etkiler biyoaktif polifenoller flavonoidler (Gadioli ve ark., 2018) ve antioksidanları, antimikrobiyal, prebiyotik, antienflamatuar ve analjezik aktiviteleri ile ilişkilendirilmiştir (Nguyen ve ark., 2015). *Passiflora caerulea*'da doğal olarak oluşan bir mono flavonoid olan chrysin'in merkezi ve periferik benzodiazepin reseptörleri için bir ligand olduğu bulunmuştur (Medina ve ark., 1990).

Propolis'teki Ch içeriğinin 28 g/L kadar olduğu bildirilmiştir (Mani ve Natesan, 2018). Chrysin içeriği, bal özünde 0,10 mg / kg ve orman ballarında 5,3 mg / kg'dır (Hadjmohammadi ve ark., 2010).

2.2.1.2. Chrysinin Farmakokinetiği

Flavonoidler gastrointestinal lümen, bağırsak duvarı hücreleri ve karaciğerde metabolize olurlar. Metabolizma genellikle bir bileşiğin biyolojik aktivitesini ve hücrelere girme yeteneğini etkiler. Flavonoidlerin ortak bir özelliği, kan dolaşımında glukuronid ve sülfat konjugatları olarak ortaya çıkmalarıdır (Erlund, 2004). Aglikonlar ince bağırsaktan emilebilir. Bununla birlikte, çoğu flavonoid, gıdalarda, doğal formlarında emilemeyen esterler, glikozitler veya polimerler formunda bulunur. Bu maddeler emilmeden önce bağırsak enzimleri veya kolon mikroflorası tarafından hidrolize edilmelidir. Flora dahil olduğunda, emilim verimliliği genellikle azalır, çünkü flora aynı zamanda serbest bıraktığı aglikonları bozar ve bu işlemde çeşitli basit aromatik asitler üretir. Emilim sırasında flavonoidler ince bağırsakta ve daha sonra karaciğerde konjüge edilir. Bu işlem esas olarak metilasyon, sülfatlama ve glukuronidasyonu içerir. Bu, potansiyel toksik etkilerini kısıtlayan ve hidrofilikliklerini artırarak safra ve idrar eliminasyonunu kolaylaştıran çoğu

ksenobiyotikte yaygın olan metabolik bir detoksikasyon sürecidir (Crespy ve ark., 2003). Flavonoidler, safra yoluyla duodenuma salgılanır, burada bağırsakların distal segmentlerinde bakteriyel enzimlerin, özellikle de *glukronidazın* etkisine maruz kalırlar, daha sonra tekrar emilebilirler. Bu enterohepatik geri dönüşüm vücutta daha uzun süre flavonoidlerin kalmasına neden olur (Manach ve ark., 2004).

Chrysin ve diğer doğal olarak oluşan fitokimyasalların faydalı etkileri biyoyararlanımlarına, *in vivo* ulaşılabilir konsantrasyonlarına ve bu bileşiklerin çözünürlüğüne bağlıdır. Bir çalışmada, bu flavonoidin 400 mg'lık tek bir oral dozunun 7 sağlıklı gönüllü insanda uygulamasını takiben değişmemiş Ch plazma konsantrasyonlarında çok düşük olduğu bildirilmiştir (Walle ve ark., 2001). Chrysin bağırsaktan zayıf emilime sahiptir ve serumdaki maksimum konsantrasyonu 12 ila 64 nM'dir (Kao ve ark., 1998). Chrysinin plazma proteinlerine bağlanmasının > % 99 olduğu tahmin edilmiştir (Boulton ve ark., 1998). Bu dağılım hacmini kullanarak, Walle ve ark. (2001) chrysinin oral biyoyararlanımının % 0,003 ve 0,02 olduğunu bildirmiştir. Chrysin için serum konsantrasyonları bildirilmemesine rağmen, genel olarak flavonoid aglikonlar için tahmini maksimum serum konsantrasyonu 1 mmol/L'dir. Bu nedenle, Ch ile tedavi mikromolar aralıktadır.

İnsan kolon hücre hattı Caco-2'yi bağırsak emilimi modeli olarak kullanan bir dizi çalışma, Ch uygun membran taşıma özelliklerine sahip olduğunu, ancak bu hücrelerde etkili glukuronidasyon ve sülfatlama nedeniyle bağırsak emiliminin sınırlı olduğu sonucuna varmıştır. Chrysin metabolitlerinin ortadan kaldırılması, MRP2 (ilaca dirençli protein pompası) taşıyıcısının akışına bağlı olabilir. Bağırsak içine geçtikten sonra bu konjugatlar, dışkı örneklerinde gözlendiği gibi sülfatazlar ve glukuronidazlar tarafından chrysin'e hidrolize edilebilir. Bununla birlikte, dışkı örneklerinde büyük miktarlarda değişmemiş Ch görünümü, Ch'in zayıf bağırsak emilimine sahip olduğunu gösterir (Walle ve ark., 1999).

2.2.1.3. Chrysinin Antioksidan Etkileri

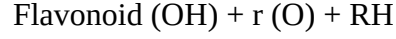
Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri oluşumu ile hücre içindeki antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki bir dengesizliktir, bu da membran lipitlerinin ROS aracılı peroksidasyonuna ve DNA ve proteinlerin oksidatif hasarına neden olur (Karrari ve ark., 2013).

Chrysin, B ve C halkasındaki oksijenasyon eksikliğinden dolayı antioksidan etkiden, antikanser vb. etkilere kadar değişen bir dizi farmakolojik aktivite ile ilişkilendirilmiştir (Habtemariam, 1997). Flavonların kimyasal yapılarındaki farklılıkların antioksidan aktiviteyi etkilediği gösterilmiştir. 3' ve 4'Hidroksilasyonun varlığı, 2 ve 3 karbonlar arasında bir çift bağ ve 4 karbon üzerinde bir karbonil grubunun varlığının Ch'in antioksidan aktivite özelliği için gerekli olduğu bildirilmiştir (Harris ve ark., 2006). Chrysin'in, ROS'u temizleyen, LPO azaltan ve CAT, SOD GPx ve HO-1 dahil olmak üzere antioksidan enzimleri uyaran ve böylece hücre bileşenlerini oksidatif hasara karşı koruyan güçlü bir antioksidan olduğu bildirilmiştir (Farkhondeh ve ark., 2019).

Flavonoidlerin ksantin oksidazı inhibe ettiği ve süperoksit radikalini süpürme özelliğine sahip olduğu bildirilmiştir. *Ksantin oksidaz* inhibitörleri ve *ksantin oksidaz* enziminin etkisi ile üretilen süperoksit radikalinin temizleyicileri olarak flavonoidlerin yapı-aktivite ilişkisi araştırılmıştır. C-5 ve C-7'deki hidroksil grupları ve C-2 ve C-3 arasındaki çift bağ, *ksantin oksidaz* üzerinde yüksek bir inhibitör aktivite için esastır. Antioksidanlar olarak etki mekanizması, A-halkası üzerindeki hidroksil grupları ile ilişkili gibi görünmektedir, ancak A-halkası düzenlemesinin antioksidan aktivitesi üzerindeki etkisi yeterince açık değildir (Cos ve ark., 1998).

Flavonoidler, serbest radikallerin çeşitli şekillerde neden olduğu hasarları önleyebilir bunu serbest radikal süpürürücü ve şelatlama özelliği ile yaptığı belirtilmiştir. Flavonoidler radikaller tarafından oksitlenir, bu da daha kararlı, daha az reaktif bir radikal ile sonuçlanır. Başka bir deyişle flavonoidler, radikalın reaktif bileşiği ile reaksiyona girerek reaktif oksijen türlerini stabilize eder. Flavonoidlerin

hidroksil grubunun yüksek reaktivitesi nedeniyle, radikaller, Korkina ve Afanasev (1996), tarafından verilen aşağıdaki denklemde açıklandığı gibi pasif hale getirilir.



Khan ve ark. (2012), yaptığı bir çalışmada, Wistar sıçanlarında *cisplatin* (CDDP)'nin neden olduğu oksidatif stres, apoptotik cevap ve kolon hasarına karşı Ch'in koruyucu rolünü araştırmıştır. Farklı dozlarda Ch (20 ve 40 mg / kg b.w.) uygulanması, *sitokrom P450 2E1*, *alkol dehidrojenaz* ve *ksantin oksidazı* inhibe ederek Wistar sıçanlarının karaciğer ve böbreklerinde oksidatif stresi önlemiştir. Ayrıca serum AST, ALT, kan *kreatinin*, BUN ve *laktat dehidrojenaz* düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir.

Anand ve ark. (2012), yaptığı çalışmada Ch'in, deneysel bir sıçan modelinde D-galaktoza bağlı yaşlanma üzerindeki varsayılan koruyucu rolünü değerlendirmişlerdir. Sıçanlar 8 haftalık deney süresinin sonunda öldürüldükten sonra, doku örneklerinde SOD, CAT, *glutasyon-S-transferaz*, *glutasyon peroksidaz*, *glutasyon redüktaz*, *glikoz-6-fosfat dehidrojenaz*, *indirgenmiş glutasyon*, *malondialdehit* analizleri ve histopatolojik muayeneleri yapılmıştır. D-galaktoza maruz bırakılmamış tedavi edilmemiş sıçanlardan alınan doku örnekleri düşük seviyede enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ve yüksek malondialdehit ve protein karbonil seviyeleri göstermiştir. Chrysin D-galaktoza maruz kalmayla birlikte 8 haftalık bir süre boyunca oral yoldan uygulanması, oksidatif hasara karşı koruduğu ve tüm parametreleri normal seviyelerde tuttuğu görülmüştür. Histopatolojik çalışmalar dokularda sadece D-galaktozun neden olduğu oksidatif hasarı doğrulamış ve D-galaktoz ve chrysin alan sıçanlarda Ch'in doku koruyucu rolünü göstermiştir.

Jiang ve ark. (2014), modifiye edilmiş ağırlık düşürme yöntemi kullanılarak omurilik hasarı (SCI) oluşturulan Wistar sıçanlarında Ch'in etkinliğini araştırmışlardır. SCI'li sıçanlar, omurilik sıvısı içeriğinde NF-κB p65 birimi, TNF- α, IL-1β, IL-6, iNOS, NO üretimi ve *kaspaz-3* artışı olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, bir Ch takviyesi, nöronal fonksiyonun iyileşmesini önemli ölçüde arttırdığı ve SCI'li sıçanlarda enflamatuar faktörlerin yanı sıra iNOS yolunu bastırdığı tespit edilmiştir.

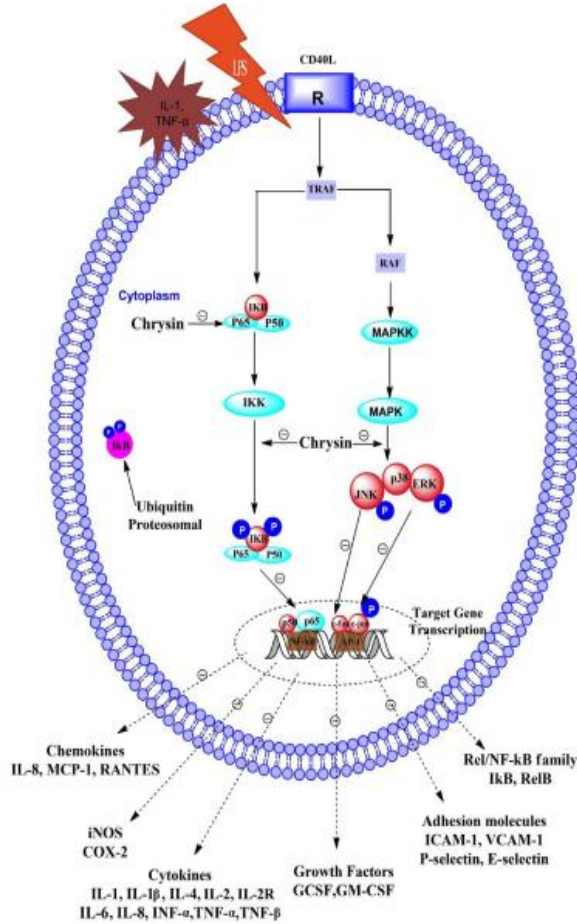
Bulgular, Ch'in sıçanlarda SCI sonrası nöral fonksiyonu iyileştirdiğini ve bunun inflamasyonu ve iNOS yolunu baskılamakla bağlantılı olabileceğini göstermektedir.

Vedagiri ve Thangarajan (2016), nörotoksik bir ajan olan amiloid- β 25-35' (A β 25-35) ile sıçanlarda oluşturdıkları Alzheimer hastalığı (AD) üzerinde Ch yüklü katı lipit nanopartikülleri (SLN'ler) nin nöron hasarını hafifletmedeki terapötik rolünü araştırmışlardır. Sıçanları 8 eşit gruba ayırmışlardır. Ap25-35 enjekte edilen grupta hipokampustaki tüm antioksidan enzimler ve antioksidan olmayan enzimlerin önemli ölçüde azaldığı, LPO ve *asetilkolin estera*zın anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir. Chrysin yüklü katı lipit nanopartiküllerin 21 günlük uygulanmasından sonra, hipokampustaki antioksidan seviyelerini ve antioksidan olmayan enzimlerin anlamlı şekilde arttığı ifade edilmiştir. Chrysinin, LPO, *asetilkolinesteraz*ı ve nöronal hasarı azaltmasının yanı sıra hafıza kaybını da azalttığı belirtilmiştir. Ayrıca Ch'nin SLN'lerle kapsüllenmesiyle Ch'in terapötik etkinliğinin daha düşük dozda elde edilebileceğini ve oral biyoyararlanımının, arttırılabileceğini belirtmişlerdir.

2.2.1.4. Chrysinin Antiinflamatuvar Etkileri

Chrysinin anti-enflamatuar mekanizması, ağırlıklı olarak *peroksizom proliferatör ile aktive edilmiş reseptörler gama* (PPARc) agonisti olarak ve sonuçta iNOS ve COX-2 üretimini aşağı yönlü regüle etmesine dayandırılmıştır (Bae ve ark., 2011). Ayrıca, antiinflamatuvar etkisinin makrofajların seçici olarak ortadan kaldırılmasıyla bağlantılı olabileceği bildirilmiştir (Hougee ve ark., 2005). Chrysin güçlü bağışıklık koruyucu etkilere sahiptir ve bağışıklık sistemindeki iltihabı bastırır, bu da nötrofiller ve makrofajların neden olduğu hasarları önler ve immüno-enflamatuar yanıtları bastırır. Chrysin, makrofajlar, nötrofiller ve diğer bağışıklık-enflamatuar yanıtlar yoluyla oluşan hasarı azaltmak için bağışıklık sisteminin iltihaplanmasını azaltılmasında önemli bir rol oynar. Chrysin tümör *nekroz faktör alfa* (TNF- α), NF- κ B, p65 ünitesi, *interlökin-1 β* (IL-1 β), IL-17A, *interferon gama* (IFN- γ), IL-12 ve IL-6 inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiştir (Zeinali ve ark., 2017). IL-1 ve TNF- α ailesi gibi bazı proinflamatuvar sitokinler, NF- κ B ve MAPK sinyal yollarını aktive edebilir. Chrysin TNF- α ekspresyonunu inhibe ederek NF- κ B ve MAPK sinyal yollarının aktive olmasını engelleyerek inflamasyonu önler. Chrysin I- κ B kinaz

(IKK) aktivitesini inhibe edebilir ve NF- κ B'nin DNA bağlanmasını bloke edebilir, böylece NF- κ B nükleer translokasyonunu bloke ederek yangıyı önler (Şekil 2.7) (Zeinali ve ark., 2017).



Şekil 2.7. Chrysin tarafından engellenen yollar (Zeinali ve ark., 2017).

Rauf ve ark. (2015), yaptığı bir çalışmada, erkek farelerde klasik inflamasyon modelleri üzerinde Ch'in etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla *Potentilla evestita* 'dan elde edilen Ch kullanılmıştır. Siklooksijenaz ürünlerinin salıverilmesine bağlı oluşan ağrı indüksiyonunda, Ch'in bu ürünlerin oluşumunda rol alan enzimleri inhibe ederek etki gösterdiği ifade edilmiştir. Ayrıca reseptör ligand kompleksi analizinde, chrysinin COX-1 bağlanma bölgesi ile zayıf etkileşime girerken COX-2 ile dikkate değer bir etkileşim sergilediği bildirilmiştir. Elde edilen bulgular, *in vivo* olarak Ch'in anti-

enflamatuar etkinlik gösterdiği, bunu COX-2 bağlanma bölgesi ile etkileşerek oluşturduğu belirtilmiştir.

Yao ve ark. (2016), yaptığı bir çalışmada, Ch'in kronik astım modeli ve alerjik havayolu inflamasyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Dört gruba ayrılan dişi farelerde ovalbümin (OVA) kullanılarak hava yolu aşırı duyarlılığı (AHR) ve iltihaplanma oluşturulmuştur. Chrysin kullanılan grupta deneysel veriler, chrysin'in OVA kaynaklı AHR'yi hafifletebileceğini göstermiştir. Chrysinin ayrıca bronşioalveoler lavaj sıvısında eozinofiller, IL-4 ve IL-13'teki enflamatuar hücre sayısındaki artışları azalttığı bildirilmiştir. Chrysin, bronkoalveoler lavaj sıvısında, IFN- γ seviyesini de azaltmıştır. Histolojik çalışmalar Ch'in hava yolundaki enflamatuar hücrelerin infiltrasyonunu azaltabildiğini göstermiştir. Chrysin, nötrofiller, eozinofiller, lenfositler, makrofajlar ve monositler üzerinde doza bağlı etkiler gösterdiği ve ayrıca bronkoalveoler lavaj sıvısında toplam enflamatuar hücre sayısını azalttığı belirtilmiştir. Chrysin uygulanması hem solunum yolu inflamasyonunu hem de akciğer dokularındaki yapısal değişiklikleri önemli ölçüde azaltabilir, bu da Ch'in kronik astım tedavisi için umut verici bir ajan olabileceğini göstermiştir.

2.2.1.5. Chrysinin Antikanserojen Etkileri

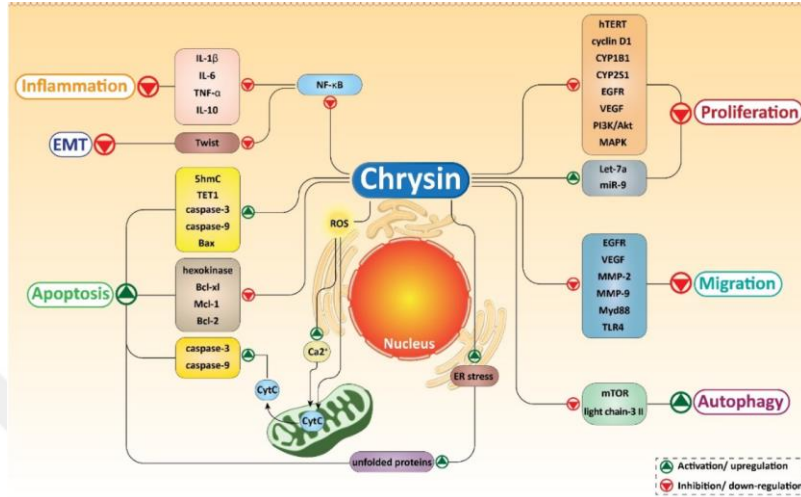
Chrysin, anti-kanserojen özellikleri nedeniyle günümüzde araştırılmakta olan doğal bir flavonoiddir. Test edilen kanser hücrelerinin çoğunda, Ch'in hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Yine Ch lösemi hücreleri üzerinde test edilen diğer flavonoidlerden daha etkili olduğu gösterilmiş ve burada Ch'in *kaspaz* aktivasyonu ve hücrelerde Akt (insan kanser hücrelerinde apoptoza aracılık eden yolak) fosforilasyon yoluyla etkisini gösterdiği bildirilmiştir. Chrysin'in kimyasal yapısının, lösemi hücrelerinde güçlü sitotoksikite için flavonoidlerin temel yapısal gereksinimlerini karşıladığını ortaya çıkarmıştır (Khoo ve ark., 2010). Chrysin fosfoinozitid 3-kinaz/protein kinaz B/memeli rapamisin hedefi (PI3K/AKT/mTOR) ve mitojenle aktive edilen protein kinaz/hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (MAPK/ERK) sinyallemesini bloke ederek farklı kanserleri engeller (Şekil 2.8) (Moghadam ve ark., 2020; Shahbaz ve ark., 2023). Mitojenle aktive edilen

protein kinaz sinyal yollarının, kanser hücrelerinin proliferasyonu ve metastazındaki artıştan sorumlu olduğunu ve bunların inhibisyonunun kanser tedavisinde önemli olduğu bildirilmiştir (Moghadam ve ark., 2020). Nükleer faktör-kappa B sinyal yolu inflamasyonu ve kanserin ilerlemesini teşvik eder. Chrysin uygulamasının NF- κ B aşağı regülasyonu yoluyla IL-1 β , IL-6, IL-10 ve TNF- α gibi proinflamatuvar faktörlerin seviyelerini azalttığı görülmüştür (Puar ve ark., 2018).

Chrysin, apoptozu aktive ederek anti kanser etkinlik göstermektedir. Apoptoz, hücrelerin hasara maruz kaldıklarında görülen hücre bütünlüğünün kaybı, şişmesi ve bozulması ile sonuçlanan hücre nekrozundan bazı farklılıklar gösterir. Nekroz sırasında, hücresel içerikler kontrol edilemez bir şekilde hücre dışı ortama salınır, bu da çevre hücrelere zarar verir ve ilgili dokularda güçlü bir inflamatuvar yanıtı neden olur. Bunun yanı sıra, apoptoz nükleer çevrede hücre büzülmesini, kromatin yoğunlaşmasını ve marjinlenmesini indükler, sonuçta çevre dokularda inflamatuvar süreçleri tetiklemeden fagositoz olan organel, sitosol ve nükleer fragmanları içeren membrana bağlı apoptotik cisimler oluşur (Gewies, 2003).

Zhang ve ark. (2004), chrysin ve türevlerinin dietil chrysin-7-il fosfat (CPE: C₁₉H₁₉O₇P) ve chrysin tetraetil bis-fosforik esterinin (CP: C₂₃H₂₈O₁₀P₂) insan servikal karsinomunda potansiyel anti-kanser etkileri sergilediğini göstermiştir. Bu çalışmada, Ch ve fosforile chrysin, servikal kanser hücrelerinin (HeLa) büyümesini, apoptoz indüksiyonu yoluyla etkili bir şekilde inhibe ettiği ve hücrelerde çoğalan *hücre nükleer antijenini* (PCNA) aşağı yönlü düzenlendiğini göstermiştir. Chrysinin, insan kolorektal kanser hücre hattı (HCT-116), insan karaciğer kanseri hücre hattı (HepG2) ve insan nazofaringeal karsinom hücre hattı (CNE-1)'daki TNF- α ile indüklenen apoptozu önemli ölçüde duyarlılaştırdığı bulunmuştur (Li ve ark., 2010). Khan ve ark. (2012), yaptığı bir çalışmada, Wistar sıçanlarında CDDP'nin neden olduğu oksidatif stres, apoptotik cevap ve kolon hasarına karşı Ch'in koruyucu rolünü araştırmıştır. Farklı dozlarda Ch (20 ve 40 mg / kg b.w.) uygulanması, *sitokrom P450 2E1*, *alkol dehidrojenaz* ve *ksantin oksidazı* inhibe ederek Wistar sıçanların karaciğer ve böbreklerinde oksidatif stresi önlemiştir. Woo ve ark. (2004), chrysinin *kaspaz-3*'ün aktivasyonu ile ilişkili olarak apoptozu indüklediğini, U937 hücrelerinde apoptoz proteini inhibitörünün sinyal ve aşağı regülasyonunu içeren aktivasyonuna yol açtığını

bildirmiştir. Tüm bu çalışmalar, Ch'in potansiyel bir anti-lösemik aktivite sergilediğini ve potansiyel bir lösemi ajanı olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Chrysin dahil olmak üzere flavonoidlerin çoğunun lösemi hücrelerinde proliferasyon inhibe edici etkilerinin doza bağımlı olduğu görülmektedir (Chang ve ark., 2007).



Şekil 2.8. Chrysinin kanserlere karşı etki mekanizmaları (Moghadam ve ark., 2020).

Çoğu çalışma, Ch'in çeşitli tümör hücre dizilerinde apoptozu indüklediği sonucunu desteklese de, apoptozun mekanizması belirsizliğini korumaktadır. Şimdiye kadar yayınlanan çalışmalar çelişkilidir. Bu nedenle, insan kanserinde apoptozun modüle edilmesinde rol oynayan Ch'in potansiyel moleküler hedefini belirlemek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (Khoo ve ark., 2010).

2.2.1.6. Chrysinin Toksisitesi

Flavonoidlerin düşük dozlarda oldukça etkili olduğu, ancak bunların fazla veya daha yüksek miktarlarda tüketilmesi durumunda insan vücudu üzerinde toksik etkiler oluşturabildiği bildirilmiştir. Bu bağlamda, faydalı etkiler elde etmek ve toksik durumlardan kaçınmak için günlük olarak alınacak etkili dozlar önemlidir. Önerilen günlük Ch miktarının 0,5-3 g olduğu kabul edilir. Bununla birlikte, literatürde günlük Ch miktarının bile karaciğer hücresinde toksisite indükleyebileceği bildirilmiştir (Tsuji ve Walle, 2008).

Chrysinin sitotoksik etkileri, hepatositlerde *peroksidaz* benzeri aktivitesine atfedilir ve bu da Ch'in oksidasyonuna ve toksik yan ürünlerinin üretimine neden olur. Chrysin *de novo* DNA sentezini etkiler ve sonuçta hücre sayılarını azaltır. Nötrofillerde, *miyeloperoksidazın* Ch kaynaklı toksisiteden sorumlu olduğuna inanılmaktadır (Brown ve ark., 2007). *Miyeloperoksidaz* ve *topoizomeraz II*'nin, diyet flavonoidlerinin neden olduğu toksisiteden sorumlu olabileceği gösterilmiştir (Gardner ve ark., 2005).

Chrysinin güvenirliliğini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada Sprague Dawley sıçanlarda, akut (5000 mg/kg) ve subkronik (1000 mg/kg) Ch'in oral uygulamasının sonrasında elde edilen sonuçlara göre Ch'in LD₅₀ değeri 4350 mg/kg olarak belirlenirken, Ch'in gözlemlenmeyen yan etki seviyeleri (NOAEL) ve en düşük gözlemlenen yan etki seviyeleri (LOAEL) değeri sırasıyla 500 ve 1000 mg/kg olarak bulunmuştur (Yao ve ark., 2021).

2.2.2. Sirtuin Proteinleri ve Sirtuin 1

Sirtuin protein ailesi olarak bilinen ve apoptosisi indükleyerek tümör baskılanmasına yol açan bir grup protein araştırma konusu olmuştur. İlk sirtuin 1984 yılında mayada keşfedilmiş olmasına rağmen (Shore ve ark., 1984), daha sonra 1997'de *Saccharomyces cerevisiae* mayası (Sinclair ve Guarente, 1997), 2001 yılında *Caenorhabditis elegans*'daki nematod kurdu (Tissenbaum ve Guarente, 2001) ve 2004'te meyve sineği *Drosophila melanogaster* gibi daha yüksek ökaryotlarda olmak üzere keşfedilmiş ve yaşam süresi üzerinde bir etkisi görülene kadar pek ilgi görmemiştir (Rogina ve Helfand, 2004). Sirtuinler bir NAD⁺ bağlayıcı katalitik alanı paylaşırlar ve dahil oldukları biyolojik süreçlere bağlı olarak çeşitli substratlar üzerinde spesifik olarak hareket edebilirler. Sınıf III histon deasetilazlara ait olan, evrimsel olarak korunmuş proteinler olan memeli sirtuin ailesi 7 üyeden oluşur. Sirt'ler, hem N- hem de C-terminal alanlarında uzunluk ve sıra bakımından çeşitlilik gösterir ve bu da farklı lokalizasyonlarını ve işlevlerini kısmen açıklar (Carafa ve ark., 2012).

Sirtuin 1 (Sirt 1), histon H1 üzerinde lizin K26, H3 üzerinde K9 ve histon H4, K16 üzerinde deasetilasyon yoluyla heterokromatin oluşumuna aracılık eder. Sirtuin 1'in prometafaz sırasında seviyesi artar ve telofaza kadar mitotik kromatin ile birleşir. Histon H1 ve yoğunlaşan kondensin I kompleksinin kromatine yüklenmesine aracılık ederek kromozomal yoğunlaşmaya katkıda bulunur (Fatoba ve Okorokov, 2011). Erken mitozda kromatinin uygun şekilde yoğunlaştırılmaması, kromozomların kırılması veya hücre ölümüyle sonuçlanan ayrışma problemlerine neden olur (Schvartzman ve ark., 2010). Sirtuin 1, çeşitli substratları deasetile etme kabiliyeti nedeniyle, gen ekspresyonunun kontrolü, metabolizma, tümörjenez ve yaşlanma dahil olmak üzere geniş bir fizyolojik fonksiyona sahiptir (Alcaín ve Villalba, 2009).

Sirtuin 1 çekirdekte lokalizedir (Michishita ve ark., 2005), ancak insülin sinyalinin inhibisyonu sırasında olduğu gibi sitoplazmik hedefler üzerinde hareket etmesi gerektiğinde sitoplazmaya da hareket edebilir (Tanno ve ark., 2007). Yedi sirtuinden en fazla çalışılanı Sirt 1 olmuştur. Bu enzim beyinin yanı sıra; karaciğer, böbrek, kalp, iskelet kası, pankreas, dalak ve beyaz yağ dokusunda yüksek oranda bulunduğu ifade edilmiştir (Voelter-Mahlknecht ve Mahlkecht, 2006). Sirt 1 hücrel enerji seviyesinin düşük olduğu durumlarda NAD⁺ seviyeleri yükselir ve NAD⁺ tarafından Sirt 1 etkinleştirilir. Sirtuin 1, anabolik süreçleri inhibe ederken katabolik süreçleri indükleyen farklı proteinleri deasetile ederek, hücrel enerji depolarını koordine eder ve sonuç olarak enerji homeostazını korur (Nogueiras ve ark., 2012). Sirtuin 1, karaciğerde glikoz üretiminin önemli bir transkripsiyonel düzenleyicisi olan *Peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama koaktivatör 1-alfa* (PGC-1 α) ile etkileşime girer. Besin yoksunluğuna yanıt olarak Sirt 1 indüklendiğinde, NAD⁺ 'ye bağlı bir şekilde spesifik lizin kalıntılarındaki PGC-1 α ile etkileşime girerek ve deasetile ederek hepatositlerdeki glikolizi artırır (Rodgers ve ark., 2005). Memelilerde, besin yoksunluğunda enerji ve besin homeostazının korunması, periferik dokularda mitokondriyal yağ asidi oksidasyonunun artması ile sağlanır. Bu hücrel oksidatif süreci yönlendiren önemli bir bileşen olan transkripsiyonel koaktivatör PGC-1 α 'dır. İskelet kasında, besin yoksunluğu durumlarında mitokondriyal yağ asidi oksidasyon genlerini indüklemek için Sirt 1 aracılı PGC-1 α deasetilasyonun gerekli olduğu bildirilmiştir (Gerhart-Hines ve ark., 2007). Sirtuinlerin karsinogenezdeki işlevlerine dair çok az

bilgi mevcuttur. Ancak etkilerinin karmaşıklığı ve farklılığı nedeniyle, mekanizmaların belirsizliğini koruduğu ve henüz kanserdeki rollerinin tam olarak ne olduğu konusunda bir fikir birliği olmadığı bildirilmiştir. Bununla beraber, genel olarak, Sirt 2 ve Sirt 6'nın tümör baskılayıcıları olabileceği bildirilirken, Sirt 1'in hem bir tümör baskılayıcı hem de bir onkogenik faktör gibi etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Bosch-Presegué ve Vaquero, 2011). p53 bozuklukları anormal hücre bölünmesine sebep olup kanserleşmeye neden olur. Günümüzde insan kanserlerinin %50 den fazlasının p53 mutasyonu ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Çoğu kanser çeşidinde kanser hücrelerinde p53'ün çalışan kopyaları bulunmamaktadır. Sirtuin genlerinden Sirt 1 ve Sirt 7, p53'ü aktive etmeleri ile kanser oluşumunu engelledikleri bildirilmiştir (De Nigris ve ark., 2002). Başka bir çalışmada ise Sirt 1'in insan kolon kanserine karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu ve bunu kolon kanserinde β – *katenin* sinyalini sınırlayarak hücre proliferasyonunu engellediği bildirilmiştir (Firestein ve ark., 2008). Yang ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada Ch'in, karagenan kaynaklı akciğer hasarına karşı nötrofil hücrelerinde NF- κ B aktivasyonunu inhibe edebileceğini, SIRT1/NRF2 yolunu aktive edebileceğini ve akciğer dokularında adezyon molekülünün ekspresyonunu azaltabileceğini göstermiştir. Ayrıca oksidatif stres tepkisinin inhibisyonu yoluyla karagenan kaynaklı akciğer hasarını hafifletebileceğini ve bu etkinin, SIRT1/NRF2 sinyal yolunun yukarı regülasyonu ile ilgili olduğunu belirtmiştir. Bu çalışma aynı zamanda SIRT1/NRF2'nin karagenan kaynaklı akciğer hasarına karşı koruma sağlamak için etkili bir farmakolojik hedef olduğunu göstermiştir.

2.2.3. Sialik Asit

Sialik asit nöranamik asitten oluşur. Nöranamik asitin asetillenmiş hali olan sialik asitin diğer adı N-Asetil-Nöranamik (NANA) Asittir. Sialik asitler hücre yüzeyinde bulunan glikan molekülünün terminal pozisyonunda yer alan 9-karbonlu asidik monosakkaritlerdir. Sialik asitler karbonhidrat-protein etkileşimleri yoluyla hücresel tanıma ve iletişim, hücresel agregasyon ve gelişim, organizmalarda glikokonjugatların yaşam sürelerini kontrol etme, viral ve bakteriyel enfeksiyonlara aracılık etme, tümör büyümesi ve metastazında yer alma, immünolojide, hücre sinyalizasyonunda, üreme biyolojisinde, nörobiyolojide, malignant kanserlerin

ilerlemesi ve yayılmasında dahil olmak üzere birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol aldığı bildirilmektedir (Schauer ve Kamerling 2018; Adams ve ark., 2018). Sialik asitler, çoğu tümörle ilişkili sialil T, sialil Tn (sTn), sialil Lewisa (sLea) ve sialil LewisX (sLeX) gibi karbonhidrat antijenlerinde bulunur. Bu antijenlerin fazla miktarda üretilmesi genellikle kötü huylu kanser hücrelerinde görüldüğü bildirilmiştir. Ayrıca antijenlerdeki sialik asitlerin, kanser gelişiminin farklı evrelerinde önemli roller aldığı belirtilmiştir (Adak ve ark., 2013). Hücre yüzeyindeki sializasyonunun derecesi ile tümör oluşumu, metastaz ve klinik seyir arasında korelasyon mevcuttur. Kanserde artan polisialik asit üretiminde içeren sialilasyon farklı kanser türleriyle ilişkilidir (Adams ve ark., 2018). Kronik hepatitis ve siroz gibi diğer karaciğer hastalıklarına göre hepatosellüler karsinom (HCC)'dan köken alan kolanjiokarsinom (CCA) tümörlü hastaların serum toplam sialik asit (TSA) seviyesinin yüksek olduğu rapor edilmiştir. Serum TSA seviyesi ölçümü CCA tanısı için faydalı olabileceği düşünülmektedir (Kongtawelert ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda HCC'da sialik asidin aşırı eksprese edildiği ve bununda karaciğer patolojisinde, özellikle primer kanser, siroz ve toksik hepatitte önemli bir tanı aracı olabileceği bildirilmiştir (Chrostek ve ark., 2016; Kang ve ark., 2021). Serum sialik asit miktarının karaciğer sirozunun ileri dönemlerinde arttığı görülmüştür. Serum TSA, karaciğer sirozunun prognozunu değerlendirmek için önemli bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Arif ve ark., 2005).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Hayvan Materyali

Araştırma Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (16.03.2022/866) onayı doğrultusunda gerçekleştirildi. Araştırmada hayvan materyali olarak kullanılan ratlar Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezinden temin edildi. Araştırmada yaklaşık 150-180 g ağırlığında 8-10 haftalık Wistar Albino cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlara test materyali uygulanmadan 1 hafta önce ortama adaptasyonları sağlandı. Bu araştırmada kontrol (C), Chrysin (Ch), AflatoksinB₁ (AFB₁) ve Chrysin ile AflatoksinB₁ (Ch+AFB₁)'in birlikte verildiği toplam 4 grup oluşturuldu. Her bir grupta 10 adet olmak üzere toplam 40 adet erkek rat kullanıldı (Tablo 1). Hayvanlar 12 saat ışık/karanlık sikluslu ayarlanabilir odalarda uygun nem (%55-65 nem) ve sıcaklık (21-23 °C) koşullarında tutuldu. Tüm hayvanlara *ad libitum* pelet yem ve su verildi. Deneme süresi boyunca hayvanlara %24 ham protein, %6,19 ham selüloz ve 3.100 kcal/kg metabolik enerji içeren rat pelet yemi kullanıldı. Hayvanlara verilecek AFB₁ dozu Karaca ve ark. (2021), Chrysin dozu ise Pushpavalli ve ark. (2010) yaptıkları araştırmalardan yararlanılarak belirlenmiştir.

Tablo 3.1.1. Araştırmada kullanılan hayvan gruplarına verilen maddeler ve verildiği günler (n:40).

Deney Grupları	Verilen maddeler- Verildiği günler
Kontrol	Dimetilsülfoksit (DMSO) 0.5 mg/kg/c.a/gün oral gavajla-11 gün
Ch	25 mg/kg/c.a/gün Chrysin (% 5'lik DMSO) oral gavajla-11 gün
AFB ₁	0.5 mg/kg/c.a/gün AFB ₁ (% 5'lik DMSO) oral gavajla- 7 gün
Ch+AFB ₁	25 mg/kg/c.a/gün Chrysin + 0.5 mg/kg/c.a/gün AFB ₁ oral gavajla (Chrysin AFB ₁ uygulamasından 1 gün önce başlanılacak AFB ₁ uygulaması bittikten sonra 3 gün daha verilecektir). 7 gün AFB ₁ +11 gün Chrysin

Hayvanların tamamı ketamin (90 mg/kg periton içi) ve ksilazin (10 mg/kg periton içi) ile anesteziye alınarak kalpten kan alma işlemi gerçekleştirildi ve hayvanlar anestezi altındayken servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi edildi. Kan ve doku (karaciğer ve böbrek) örnekleri alındı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan cihaz ve Laboratuvar Malzemeleri Tablo 3.2’de, kimyasallar ise Tablo 3.3’te verilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihaz ve Laboratuvar Malzemeleri.

Kullanılan Cihaz/Gereç	Marka ve Kodu
Bilgisayar	HP
ELISA okuyucu	ELx800-Biotek
Hassas terazi	Shimadzu-BX 4200H
Spektrofotometre	Thermo Multiskan GO
Homojenizatör	IKA-T18 digital ULTRA TURRAX
Işık mikroskobu	Olympus-CX21
Etüv	Termal
Magnetik karıştırıcı	IKA-RH Basic 2
Mikrotom	Leica-2155 rotary
Parafin cihazı	Lecia Histocore
Otoanalizör	GesanChem-200
Ototeknikon	Leica-SP300S
pH metre	Metrohm-704
Soğutmalı santrifüj	Eppendorf-5810R
Sekiz kanallı pipet	Isolab
Otomatik pipet seti	Isolab
Vorteks	Yellowline-TTS2
Kamera	Olymus-DP26
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (-20 °C)	Bosch

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.

Kullanılan Kimyasallar	Marka ve Kodu
Tümör nekroz faktör α ELISA kiti	BLS-1396Ra-Bostonchem
Malondialdehid ELISA kiti	BLS-8612Ra-Bostonchem
Glutasyon ELISA kiti	BLS-8577Ra-Bostonchem
8-hidroksideoksiguanozin ELISA kiti	BLS-8994Ra-Bostonchem
Nükleer Faktör Kappa B p65 ELISA kiti	BLS-1693Ra-Bostonchem
Bakır sülfat	Aldrich-451657
Dimetil sülfoksit	Tekkim-201790.01000
Ketamin	Vetaketam
Ksilazin	Vetaxyl
Chrysin	BCM-805131-1G Bostonchem
Aflatoksin B ₁	Cayman-11293
Sodyum bikarbonat	Merck-1613655
Sodyum hidroksit	Merck 106482
Sodyum klorür	Merck-106400
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck 104873
Potasyum sodyum tartarat	Merck 108087
Disodyum hidrojen fosfat	Merck-106580
Dipotasyum fosfat	Merck-1551128
Formaldehit	Merck 103999
Anti-Kaspaz-3 Antikoru	Eabscience
Anti-Kaspaz-9 Antikoru	Eabscience-DK5107
Kİ-67	IHCproteintch
PCNA	Biolegend-B340862
Hidroklorik asit	Merck 1.00314.2500
N-Asetilnöraminik asit	Sigma-Aldrich 002076496
Perklorik asit	Merck 1.09065.1000
P-dimetilaminobenzaldehid	Sigma-Aldrich 101785787
Serum fizyolojik	Polifarma

3.2. Yöntemler

3.2.1. Kan ve Doku Analizleri

Kanlar direkt olarak serum (antikoagölansız) tüplerine alındı ve 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilerek; AST, ALT, kreatinin, BUN ve GGT değerleri otoanalizör (Randox Monaco) uygun ticari kitler kullanılarak ölçüldü.

3.2.2. Karaciğer ve Böbrek Dokularının Homojenizasyonu ve Homojenatın Hazırlanması

Dokular öncelikli olarak %0,9'luk tuzlu su ile yıkandı. Daha sonra dokular kitlerde belirtilen 0,01 M pH: 7.4 fosfat tampon çözeltisi (1 g doku/9 ml PBS, 1:10 sulandırıldı) ile homojenize edildi. Homojenat daha sonra 15000 devirde 45 dakika (4°C) santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi. Örnekler analizleri yapılincaya kadar -20 °C'de saklandı.

Doku homojenat örneklerinde GSH, MDA, TNF- α , NFkB-p65, 8-OHdG ve Sirtuin-1 düzeyleri ölçüldü.

3.2.3. Glutasyon (GSH) Analizi

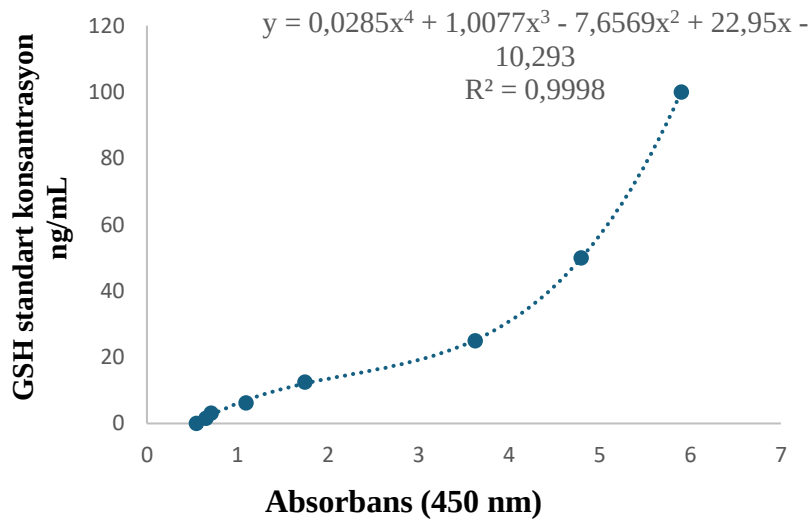
Doku homojenat örneklerindeki GSH etkinliği ticari kit (BLS-8577Ra ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz, kit ile birlikte gelen kılavuzda belirtilen prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 0,48 ng/mL'dir. Tespit edilebilir aralığı ise 1,57-100 ng/mL'dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su). Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltildi.

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 7 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 500 μ l standart sulandırma çözeltisi eklendi.

- Konsantre standart solüsyonundan (100 ng/mL) 1. tüpe 500 µl eklendi ve karıştırıldı (50 ng/mL).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (25 ng/mL).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (12,5 ng/mL).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (6,25 ng/mL).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (3,13 ng/mL).
- 6. tüpe 5. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (1,57 ng/mL).

Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 50 µl ilave edildi. Kuyucuklara 50 µl biotinle işaretlenmiş konjugat solüsyonundan ilave edilerek mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.1). Ölçülen GSH etkinliği homojenat örneklerinde ng/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 3.1. Glutatyon (GSH) standart grafiği.

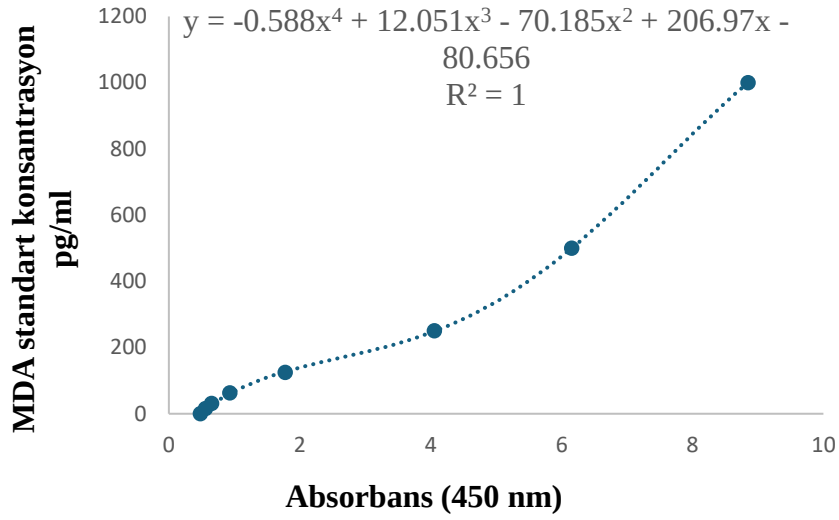
3.2.3. Malondialdehid (MDA) Analizi

Doku homojenat örneklerindeki MDA düzeyi ticari kit (BLS-8612 Ra ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 5,39 pg/mL'dir. Tespit edilebilir aralığı ise 15,63-1000 pg/mL'dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su). Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltilti.

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 7 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 500 µl standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (1000 pg/mL) 1. tüpe 500 µl eklendi ve karıştırıldı (500 pg/mL).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (250 pg/mL).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (125 pg/mL).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (62,5 pg/mL).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (31,25 pg/mL).
- 6. tüpe 5. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (15,63 pg/mL).

Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 50 µl ilave edildi. Kuyucuklara 50 µl biotinle işaretlenmiş konjugat solüsyonundan ilave edilerek mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm'de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.2). Ölçülen MDA düzeyi homojenat örneklerinde pg/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 3.2. Malondialdehid (MDA) standart grafiği.

3.2.4. 8-Hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) Analizi

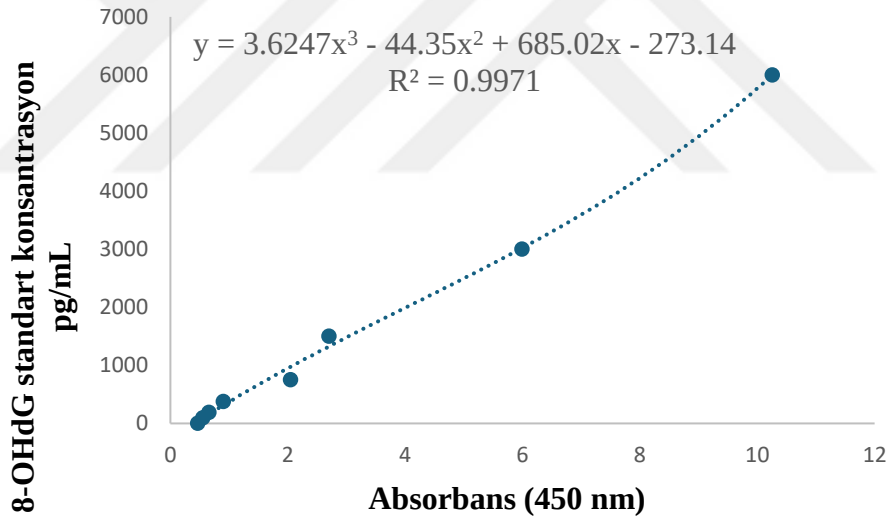
Doku homojenat örneklerindeki 8-OHdG düzeyi ticari kit (BLS-8994Ra ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitle belirtilen prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 26,29 pg/mL'dir. Tespit edilebilir aralığı ise 93,75-6000 pg/mL'dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su).

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 7 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 500 µl standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (6000 pg/mL) 1. tüpe 500 µl eklendi ve karıştırıldı (3000 pg/mL).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (1500 pg/mL).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (750 pg/mL).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (375 pg/mL).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (187,5 pg/mL).
- 6. tüpe 5. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (93,75 pg/mL).

Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltilti. Standartlardan (7

standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 50 µl ilave edildi. Kuyucuklara 50 µl biotinle işaretlenmiş konjugat solüsyonundan ilave edilerek mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.3). Ölçülen 8-OHdG düzeyi homojenat örneklerinde pg/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 3.3. 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) standart grafiği.

3.2.5. Nükleer Faktör Kappa B-p65 (NFKB-p65) Analizi

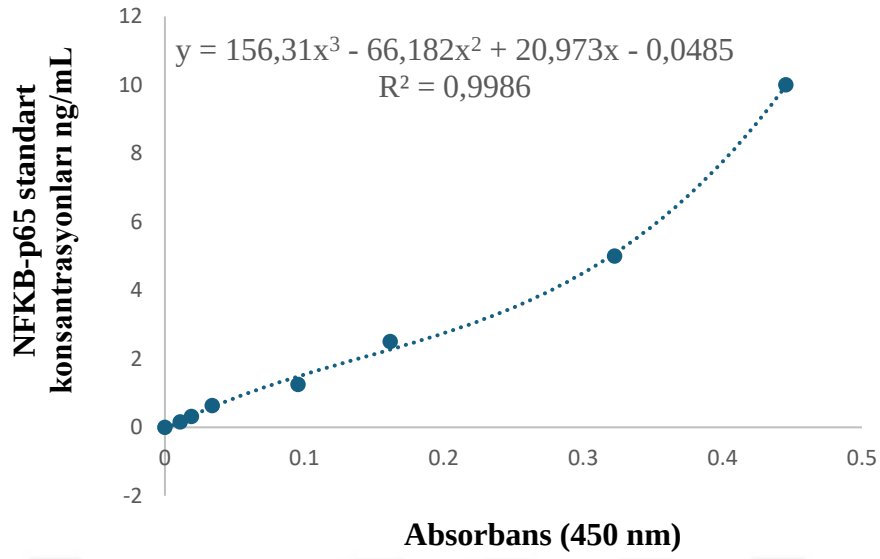
Doku homojenat örneklerindeki NFKB-p65 etkinliği ticari kit (BLS-1693Ra ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitle belirtilen prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 0,058 ng/mL’dir. Tespit edilebilir aralığı ise 0,16-10

ng/mL'dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su).

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 7 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 500 µl standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (10 ng/mL) 1. tüpe 500 µl eklendi ve karıştırıldı (5 ng/mL).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (2,5 ng/mL).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (1,25 ng/mL).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (0,63 ng/mL).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (0,32 ng/mL).
- 6. tüpe 5. tüpten 500 µl eklendi ve karıştırıldı (0,16 ng/mL).

Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltildi. Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 100 µl ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C'de 80 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl dilue edilmiş biotinle işaretlenmiş antikor solüsyonundan ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 C'de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edilerek mikropleytin üstü kapatıldı ve 37 C'de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm'de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.4). Ölçülen NFkB-p65 etkinliği homojenat örneklerinde ng/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 3.4. Nükleer Faktör Kappa B P65 (NFKB-p65) standart grafiği.

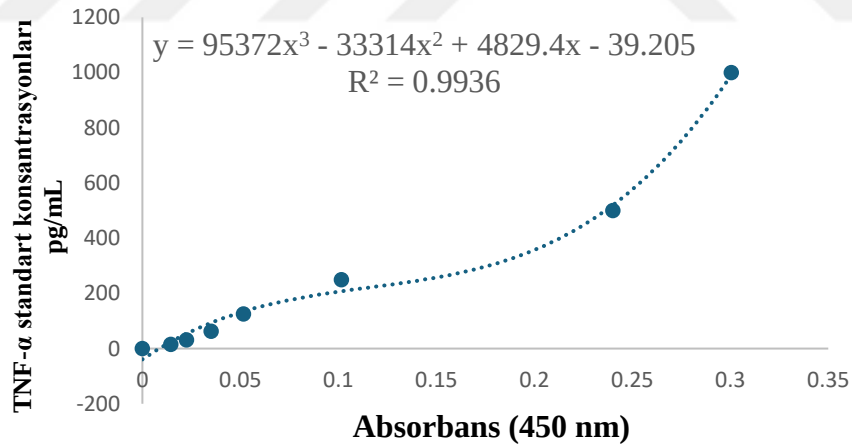
3.2.6. Tümör Nekroz Faktör α (TNF- α) Analizi

Doku homojenat örneklerindeki TNF- α etkinliği ticari kit (BLS-1396Ra ELISA Kiti, Bostonchem) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 6,1 pg/mL'dir. Tespit edilebilir aralığı ise 15,63-1000 pg/mL'dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su). Biotinlenmiş antikor ve streptoavidin-HRP 100 kat sırasıyla biotinlenmiş antikor sulandırma ve HRP sulandırma çözeltisi ile seyreltildi.

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 7 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 500 μ l standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (1000 pg/mL) 1. tüpe 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (500 pg/mL).
- 2. tüpe 1. tüpten 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (250 pg/mL).
- 3. tüpe 2. tüpten 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (125 pg/mL).
- 4. tüpe 3. tüpten 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (62,5 pg/mL).
- 5. tüpe 4. tüpten 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (31,25 pg/mL).
- 6. tüpe 5. tüpten 500 μ l eklendi ve karıştırıldı (15,63 pg/mL).

Standartlardan (7 standart), blankten ve doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte 100 µl ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C’de 80 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl dilue edilmiş biotinle işaretlenmiş antikor solüsyonundan ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 3 kere yıkandı. Kuyucuklara 100 µl streptoavidin-HRP ilave edilerek mikropleytin üstü kapatıldı ve 37 C’de 50 dakika inkübe edildi. Mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Kuyucuklara 90 µl TMB substratı ilave edilerek 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi. Sonra kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm’de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.5). Ölçülen TNF-α etkinliği homojenat örneklerinde pg/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 3.5. Tumor nekroz faktör-α (TNF-α) standart grafiği.

3.2.7. NAD-Bağımlı Protein Deasetilaz Sirtuin-1 (Sirt 1)

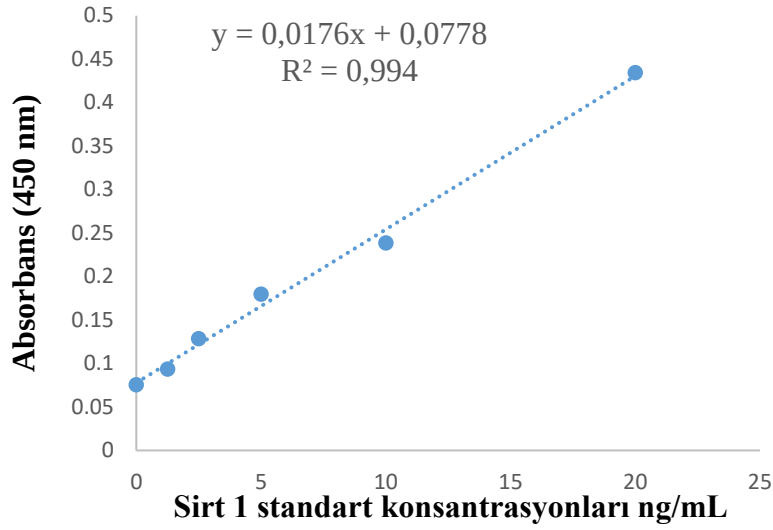
Doku homojenat örneklerindeki Sirt 1 etkinliği ticari kit (E1145Ra ELISA Kiti, Bioassay Technology Laboratory) kullanılarak yapıldı. Analiz kitte belirtilen

prosedüre göre yapıldı. Yöntemin duyarlılığı 0,05 ng/ml'dir. Tespit edilebilir aralığı ise 0,1-38 ng/ml'dir. Analize başlamadan önce yıkama solüsyonu, 25 kat sulandırıldı (20 ml konsantre yıkama solüsyonu + 480 ml deiyonize su).

Standartların hazırlanması aşağıdaki şekilde yapıldı:

- Konsantre standart çözeltisi dahil toplam 6 standart tüpü hazırlandı.
- Her bir tüpe 120 µl standart sulandırma çözeltisi eklendi.
- Konsantre standart solüsyonundan (40 ng/ml) 1. tüpe 120 µl eklendi ve karıştırıldı (20 ng/ml).
- 2. tüpe 1. tüpten 120 µl eklendi ve karıştırıldı (10 ng/ml).
- 3. tüpe 2. tüpten 120 µl eklendi ve karıştırıldı (5 ng/ml).
- 4. tüpe 3. tüpten 120 µl eklendi ve karıştırıldı (2,5 ng/ml).
- 5. tüpe 4. tüpten 120 µl eklendi ve karıştırıldı (1,25 ng/ml).

Standartlardan (6 standart), standart kuyucuklarına 50 µl standart, 50 µl blankten ve 40 µl doku homojenat örneklerinden antikor kaplı mikropleyte ilave edildi. Daha sonra numune kuyucuklarına 10 µl anti-Sirt-1 antikorunu eklendi, ardından numune kuyucuklarına ve standart kuyucuklara 50 µl streptavidin-HRP (blanke eklenmeyecek) ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Sonra mikropleytteki içerikler dökülerek yıkama solüsyonuyla 5 kere yıkandı. Ardından her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A eklendi ve sonra her kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu B ilave edildi. Mikropleytin üstü kapatılıp 37 C'de 10 dakika inkübe edildi. Sonra her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu ilave edilerek hemen 450 nm'de okundu. Elde edilen absorbans değerleri ile standart grafik çizilerek konsantrasyon değerleri hesaplandı (Şekil 3.6). Ölçülen Sirt-1 etkinliği homojenat örneklerinde ng/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 3.6. NAD-Bağımlı Protein Deasetilaz Sirtuin-1(Sirt-1) standart grafiği.

3.2.8. Dokulardaki Total Protein Yoğunluğu

Dokulardaki total protein yoğunluğu Gornal ve ark. (1949) bildirdiği Biüret metoduna göre yapıldı. Yöntemin prensibi Biüret ayracında bulunan Cu^{+2} 'nin proteinlerin yapısındaki azot atomları ile mavi renkli kompleks oluşturması ve bu kompleksin 540 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanmaktadır. Analizde 1 ml homojenat üzerine (kör için 1 ml su üzerine) 4 ml Biüret ayırıcı ($\text{Na-K tartarat}^+\text{CuSO}_4$) karıştırılarak oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ve absorbans 540 nm'de spektrofotometrede okundu. Dokulardaki total protein miktarı mg/ml olarak ifade edildi.

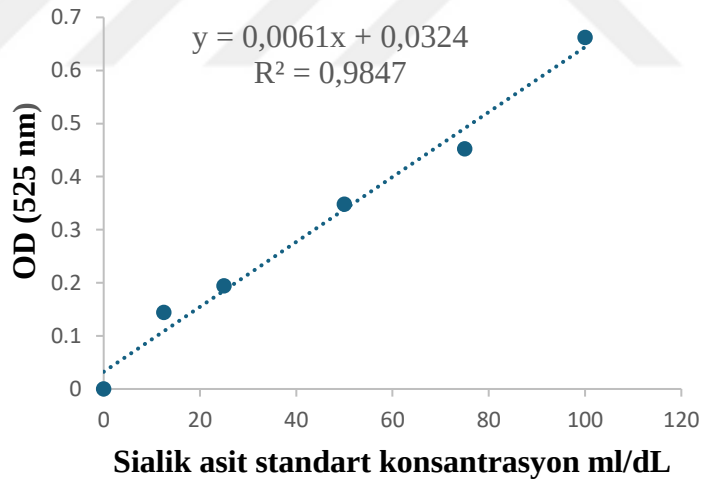
3.2.9. Total Sialik Asit (TSA) Ölçümü

Perklorik Asit Çözeltisi (V/V): %5'lik Perklorik asitten 7,04 ml alınarak distile su bulunan balon jøjeye eklendi daha sonra hacim olarak 100 ml'ye tamamlandı.

Ehrlich Ayracı: Hassas terazi ile tartılan 5 g P-dimetilaminobenzaldehid 50 ml yoğun hidroklorik asit içinde çözdürüldü ve distile su konularak hacimce 100 ml'ye tamamlandı.

Sydow'un total sialik asit ölçüm metoduna göre yapıldı (Sydow, 1985). Serumlardan 0,2 ml alınarak deney tüplerine konuldu ve sonra 1,5 ml perklorik asit çözeltisi eklendi. Beş dakika süresince 100 °C'da su banyosunda kaynatıldı sonra soğutulma işlemine geçildi. Tüpler 2500 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan temiz tüplere 1 ml aktarıldı. Daha sonra 100 °C'da 15 dakika kaynatılmak üzere 0,2 ml Ehrlich ayracı eklendi. Kaynama sonrası tüpler soğutuldu ve spektrofotometrik okuma için 1 ml distile su eklendi. 525 nm'de optik dansiteleri (OD) okundu ve standart eğri aracılığıyla değerlendirildi.

NANA (Sigma) standardından 100 mg/dl stok standart çözeltisi hazırlandı. Stok standart çözeltiden, 100, 75, 50, 25 ve 12,5 mg/dl konsantrasyonunda dilüsyonlar yapıldı. Elde edilen standart dilüsyonlarda TSA metodu 3'er kez çalışılarak OD'leri okundu. Elde edilen OD'lerin ortalama değerleri alınarak standart eğri oluşturuldu ve bu standart eğriden örneklerin TSA değerleri hesaplandı. Şekil 3.7'de Total Sialik Asit Standart Grafiği verilmiştir.



Şekil 3.7. Total Sialik Asit Standart Grafiği (OD: Optik Dansite, NANA: N-asetil nöraminik asit).

3.2.10. Histopatoloji Yöntemi

Çalışma sonunda yapılan nekropsi sırasında tüm ratlardan karaciğer ve böbrek dokusu örnekleri toplandı. Tüm doku örnekleri histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için %10'luk nötral formaldehit solüsyonuna atılarak tespit işlemi gerçekleştirildi. Tespit solüsyonunun dokular içine daha net penetre olabilmesi amacıyla karaciğer ve böbrek dokularına bistüri ile küçük kesiler yapıldı. Formaldehit solüsyonunda 2 gün süreyle bekletilen karaciğer ve böbrek örnekleri bu süre sonunda trimlenerek doku takip kasetleri içine yerleştirildi. Kasetlere çalışma için hayvanlara verilen numaralar yazıldı tekrar yeni hazırlanan formaldehit solusyonuna atılarak 1 gün daha tespit işlemi için bekletildi. Süre sonunda dokuların bulunduğu kasetler tam otomatik doku takip cihazına (Leica ASP300S; Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) yerleştirildi ve rutin doku takip prosedürü gerçekleştirildi. Bu işlem sırasında dokular gece boyunca dereceleri artan alkol serilerinden (%70'den %100'e) geçirildi. Böylelikle dokulardaki sular alınarak dokular dehidre edildi. Bu aşamadan sonra iki adet ksilol serisinden geçirildi ve dokulardaki yağlar eritilerek alındı. Su ve yağın alınması ile boşalan doku boşluklarına sıcak parafinin dolması sağlandı. Gece boyunca takip cihazında rutin doku takip prosedüründen geçirilen doku örnekleri ertesi sabah blokaj için doku gömme cihazına alındı. Burada blokaj işlemi yapmak için doku gömme cihazının sıcak tablalı bölümüne (Leica Histocore Arcadia H) (Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) alındı. Burada özel metal blokaj kalıpları içine doku büyüklüğüne göre yerleştirildi ve üzerlerine hayvan numarası yazılı kasetler kapatılıp sıcak parafin ile dolduruldu. Bu aşamadan sonra doku gömme ünitesinin soğuk tablalı bölümüne alındı ve burada 1 saat kadar bekletilerek dokuların içerisine yerleşen parafinin soğuması ve donması sağlandı. Buzdolabında 4-5 saat soğutmadan sonra bloklardan hem histopatolojik hemde immunohistokimyasal incelemeler için Leica 2155 rotary mikrotom (Leica Microsystem, Nussloch, Almanya) ile 5 mikron kalınlıkta toplamda 5 seri kesit alındı. Histopatolojik inceleme için kesitler normal lamlar üzerine çekilirken immunohistokimyasal inceleme için poli-L-lizin kaplı lamlara çekildi. Normal lamlara alınan bir seri kesit histopatolojik inceleme için rutin boyama yöntemi olan hematoksilin eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Bu

amaçla lamlara çekilen karaciğer ve böbrek kesitleri önce oda ısısında ardından etüvde 2 saat süreyle 60°C’de tutularak kurutuldu ve kesitlerin lamaların üstüne tamamen tutunması sağlandı. Etüvde parafinin bir kısmı eritildi geri kalan kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla 30’ar dakikalık sürelerle 3 ayrı ksilol serisinden geçirilerek bu aşama tamamlandı. Hemen ardından yüksek dereceli alkollerden düşük dereceli alkollere (sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70’lik alkoller) geçirildi ve kesitlere su verilerek rehidre edildi. Rehidre edilen kesitler Harris hematoksilen ile yaklaşık 15 dakika ve hemen ardından eozin ile yaklaşık 3 dakika kadar boyanarak rutin hematoksilen-eozin (HE) boyaması gerçekleştirildi. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra kesitler dehidre edildi bu amaçla sırasıyla %70, 80, 90, 96 ve 100’lük alkoller (düşük dereceliden yüksek dereceli alkollere doğru) geçirilerek dokulardaki suyunun tamamen alınması gerçekleştirildi. Ksilol ile parlatmanın ardından kesitlerin üstüne entellan konularak lamel ile kaplandı ve kurutulduktan sonra ışık mikroskobu ile incelendi.

3.2.11. İmmunohistokimya Yöntemi

Karaciğer ve böbrek kesitleri ayrıca immunohistokimyasal olarak kaspaz-3, kaspaz-9, PCNA ve Ki67 ekspresyonlarının değerlendirilmesi için poli-L-lizini lamlara çekilerek ve yukarıda açıklanan deparafinizasyon ve rehidrasyon aşamaları ardından streptoavidin-biotin peroksidaz yöntemi kullanılarak boyandı. İmmunohistokimyasal inceleme için Kaspaz-3 (CASP3 Polyclonal Antibody [E-AB-13815] (Elabscience, ABD); Kaspaz-9 (CASP9 Polyclonal Antibody [E-AB-30760] (Elabscience, ABD); PCNA (Purified anti human/mouse/rat PCNA) (PC10) 307902 (Biolegend, ABD) ve Ki67 (Mouse monoclonal antibody (sc-23900) (Santa cruz, ABD) primer antikorları kullanıldı. Tüm primer antikorlar 1/100 oranında antikor sulandırma sıvıları kullanılarak sulandırıldı. Yöntem için üretici firma tavsiyelerine uyuldu ve boyama işlemi bu sulandırılmış antikorlarla gerçekleştirildi. İmmunohistokimyasal yöntem için 5 mikron kalınlığında alınan, deparafinize ve rehidre edilen kesitler bu aşamaların ardından 10 dakika kadar distile su içinde yıkandı. Daha sonra dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için %3’lük metanolde hazırlanmış hidrojen peroksit içinde 25 dakika kadar inkübasyona bırakıldı. Boyanma reaksiyonunun şiddetini güçlendirmek için kesitler sitrat tampon solüsyonu

içinde 700'lük ayarda ve 5 dakika süreyle 2 defa mikrodalga fırında kaynatma işlemine tabi tutuldu. Bu aşamanın ardından kesitler 2 defa 10'ar dakika sürelerle fosfat tamponu (PBS) içinde yıkandı. Hemen ardından kesitlerde olabilecek nonspesifik bağlanma ve boyanmaları önlemek için normal serumla 15 dakika süreyle inkübe edildi. Bu aşamanın ardından dokular yıkanmadan ve üzerlerindeki normal serumun fazlası dökülerek her bir markır için birer takım seri kesit ayrılarak primer serumlar ile ayrı ayrı inkübasyona alındı. Yöntemin bu inkübasyon aşaması buzdolabı içinde +4 °C'de tüm gece boyunca her bir antikor ayrı chamber içinde olacak şekilde gerçekleştirildi. Ertesi sabah tüm chamberler buzdolabından alındı ve kesitlere 2 kez 10 dakikalık süreler halinde PBS ile yıkama yapıldı. Bu aşamanın ardından kesitlerin üstüne streptoavidin damlatıldı, 30 dakika süreyle oda ısısında bekletildi ve hemen ardından kesitlerin kurumasına izin vermeden PBS ile yukarıda belirtilen sürelerle yıkama işlemi gerçekleştirildi. Takiben kesitlerin üstüne biotinli serum damlatılarak 30 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Ardından tüm dokular PBS ile aynı süre ve şekilde yıkandı. Bu aşamadan sonra kesitlerdeki reaksiyon yeni hazırlanana DAB (3,3 diaminobenzidine) kromojenle inkübasyonun ardından görünür hale getirildi. Bu çalışmada sekonder kit olarak Abcam firmasının kullanıma hazır Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection Kit –Micropolymer (ab236466) kiti kullanıldı. Tüm bu aşamaların ardından kesitler Harris hematoksilin ile zıt boyama yapılarak boyandı. Takiben dehidre edilen ve ksilolde parlatılan kesitlerin üzeri entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı. Bir gece oda ısısında bekletilerek kurutulan preparatlar araştırma mikroskobu ile değerlendirildi. Negatif kontrol için ise kesitlerin üstüne primer antikor aşamasında onun yerine antikor sulandırma sıvıları konuldu ve diğer aşamalar anlatıldığı gibi gerçekleştirildi.

Immunohistokimyasal olarak pozitif hücreler sayılarak pozitif hücre yüzdesi belirlendi ve sonuçlar gruplar arasında karşılaştırıldı. Bu amaçla karaciğer ve böbrek kesitleri ayrı ayrı değerlendirildi. Pozitif hücre yüzdesi toplamda 100 hücre rastgele 5 ayrı bölgeden 20'şer hücre, 40X objektif altında sayılarak belirlendi. Immunohistokimyasal olarak kaspaz-3, kaspaz-9, PCNA ve Ki-67 ile pozitif olarak boyanan hücrelerin sayılarının tespiti için Image J 1.46r (National Institutes of Health, Bethesda MD) programı kullanıldı. Bu amaçla preparat içinde sadece belirgin olarak

kahverengi olan hücreler pozitif olarak kabul edildi. Programda değişik renkler seçilerek fotoğraf üzerindeki hücrelere tıklanarak işaretlendi. Sonuçların fotoğraflanması için Olympus CX41 model mikroskop ile morfometrik inceleme ve mikrofotografi için Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kullanıldı.

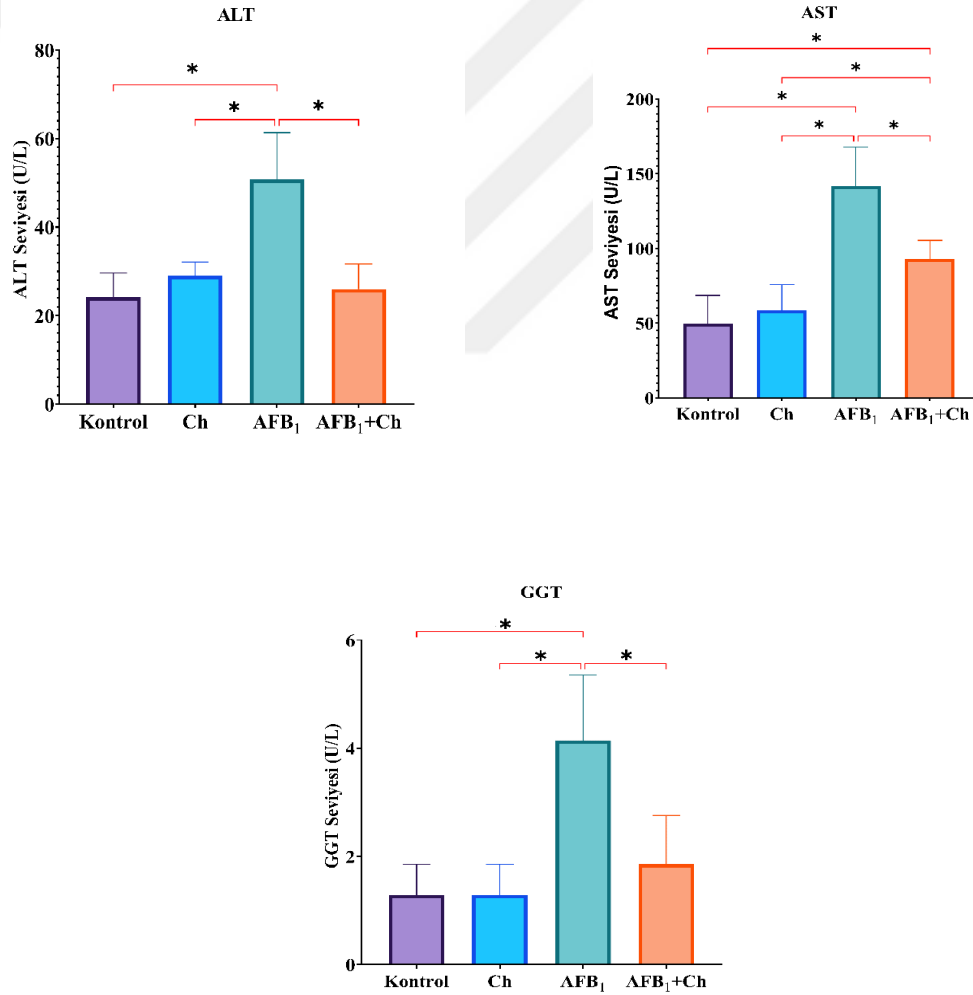
3.2.12. İstatistiksel Hesaplamalar

Çalışmadan elde edilen veriler SPSS 22 programı ile değerlendirildi. Sonuçlar aritmetik ortalama $\pm$ standart hata (SE) ile ifade edildi. Elde edilen verilerin öncelikli olarak Shapiro Wilk testi ile parametrik-nonparametrik olup olmadıkları analiz edildi. Biyokimyasal sonuçlar, GSH, MDA, 8OHdG, TNF-a, NFkB-p65, Sirt-1 düzeyleri normal dağılım gösterdiği için One-Way ANOVA ve ardından gruplar arası ikili karşılaştırmalar (post hoc testler) için Tukey testi ile değerlendirildi. $p<0,05$ altındaki değerler anlamlı kabul edildi. Histopatolojik skorların ve immunhistokimyasal olarak pozitif boyanan hücre sayılarının gruplar arasında karşılaştırılmalarında SPSS-22.00 paket program kullanıldı. Sonuçlar aritmetik ortalama $\pm$ standart hata (SE) ile ifade edildi. Elde edilen verilerin öncelikli olarak Shapiro Wilk testi ile parametrik-nonparametrik olup olmadıkları analiz edildi. Patolojik skorlamalar normal dağılım göstermediği için Kruskal-Wallis testi ve Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. “ $p<0,05$ ” olan değerler istatistik olarak önemli kabul edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi.

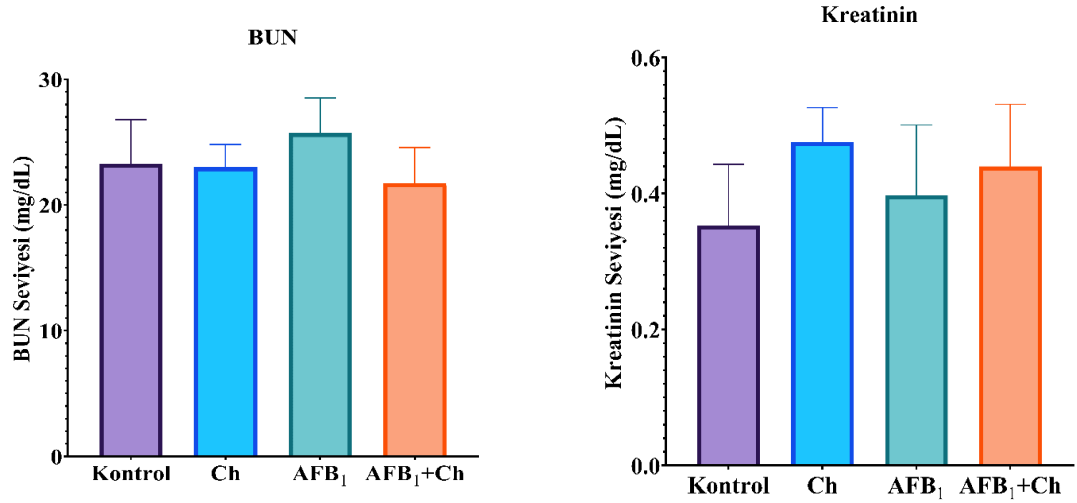
4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Parametreler

Aflatoksin B₁ verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında serum AST, ALT, GGT değerlerinde önemli düzeyde artış ($p<0,05$) tespit edilirken kreatinin ve BUN değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Aflatoksin B₁'in tek başına verildiğinde artan AST, ALT ve GGT değerleri kombinasyon (AFB₁+Ch) grubunda önemli bir düşüş ($p<0,05$) gösterdi (Tablo 4.1; Şekil 4.1- 4.2).



Şekil 4.1. Araştırma gruplarının serum AST, ALT ve GGT seviyeleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.



Şekil 4.2. Araştırma gruplarının serum BUN ve kreatinin seviyeleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p < 0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

Tablo 4.1. Araştırma gruplarının serum ALT, AST, GGT, BUN ve kreatinin seviyeleri.

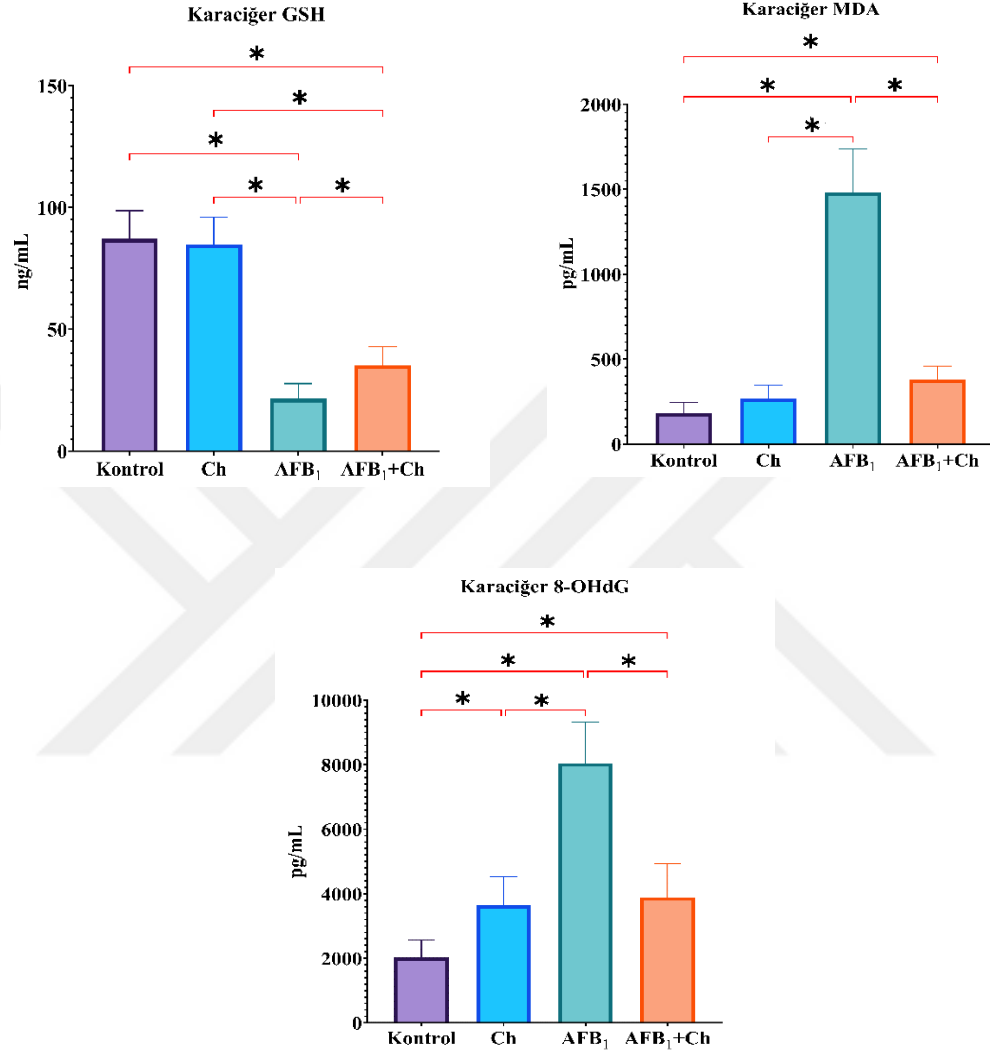
Parametreler	Gruplar			
	Kontrol	Ch	AFB ₁	AFB ₁ +Ch
ALT (U/L)	24,14 $\pm$ 2,06 ^a	29,00 $\pm$ 1,17 ^a	50,71 $\pm$ 4,00 ^b	26,00 $\pm$ 2,13 ^a
AST (U/L)	49,71 $\pm$ 7,12 ^a	58,57 $\pm$ 6,49 ^a	141,57 $\pm$ 9,88 ^c	92,85 $\pm$ 4,72 ^b
Kreatinin (mg/dL)	0,35 $\pm$ 0,03 ^a	0,47 $\pm$ 0,01 ^a	0,39 $\pm$ 0,39 ^a	0,44 $\pm$ 0,03 ^a
BUN (mg/dL)	23,28 $\pm$ 1,32 ^a	23,00 $\pm$ 0,69 ^a	25,71 $\pm$ 1,06 ^a	21,71 $\pm$ 1,08 ^a
GGT (U/L)	1,28 $\pm$ 0,21 ^a	1,28 $\pm$ 0,21 ^a	4,14 $\pm$ 0,45 ^b	1,85 $\pm$ 0,34 ^a

Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

4.2. Antioksidan-Oksidatif Stres Parametreleri

Aflatoksin B₁ verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer ve böbrek doku örneklerinde GSH düzeyinde önemli bir düşüş ($p < 0,05$) MDA ve 8-OHdG düzeyinde önemli bir artış ($p < 0,05$) tespit edildi. Chrysin ve Aflatoksin B₁'in birlikte verildiği grupta ise Aflatoksin B₁'in tek başına verildiğinde artan MDA ve 8-

OHdG düzeyinde önemli bir düşüş ($p<0,05$); GSH düzeyinde ise önemli bir artış ($p<0,05$) belirlendi (Tablo 4.2-4.3; Şekil 4.3-4.4).



Şekil 4.3. Karaciğer dokularında GSH, MDA ve 8-OHdG parametreleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

Tablo 4.2. Araştırma gruplarının karaciğer dokularında GSH, MDA, 8-OHdG seviyeleri.

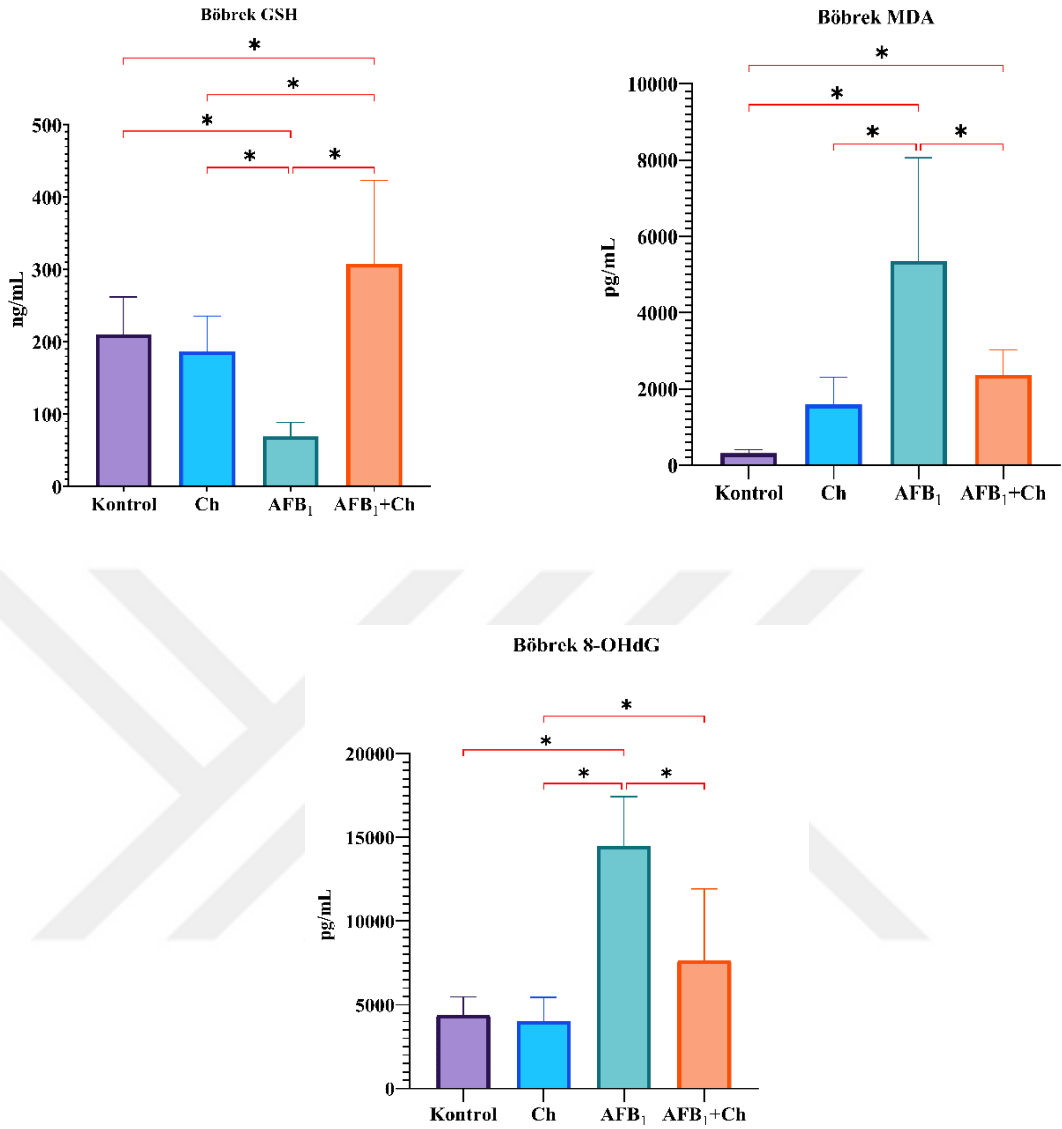
Gruplar	Parametreler		
	GSH	MDA	8-OHdG
Kontrol	87,10±3,87 ^c	183,23±20,61 ^a	2032,32±180,02 ^a
AFB ₁	2154,88±1,93 ^a	1479,55±81,89 ^c	8046,86±403,51 ^c
Ch	84,88±3,48 ^c	268,85±24,03 ^{ab}	3644,56±277,25 ^b
AFB ₁ +Ch	35,25±2,42 ^b	380,06±24,00 ^b	3890,68±331,96 ^b

Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. a, b, c: Gruplar arası karşılaştırmada farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel farkı göstermektedir (p < 0.05). GSH (ng/mg protein), MDA (pg/ mg protein), 8-OHdG (pg/ mg protein).

Tablo 4.3. Araştırma gruplarının böbrek dokularında GSH, MDA, 8-OHdG seviyeleri.

Gruplar	Parametreler		
	GSH	MDA	8-OHdG
Kontrol	210,59±17,17 ^b	311,47±32,13 ^a	4391,11±356,49 ^{ab}
AFB ₁	69,64±5,95 ^a	5351,41±855,38 ^c	14471,59±934,82 ^c
Ch	187,22±15,25 ^b	1595,08±222,94 ^{ab}	4009,99±455,33 ^a
AFB ₁ +Ch	307,66±36,45 ^c	2371,86±204,09 ^b	7661,84±1345,55 ^b

Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. a, b, c: Gruplar arası karşılaştırmada farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel farkı göstermektedir (p < 0.05). GSH (ng/ mg protein), MDA (pg/ mg protein), 8-OHdG (pg/ mg protein).

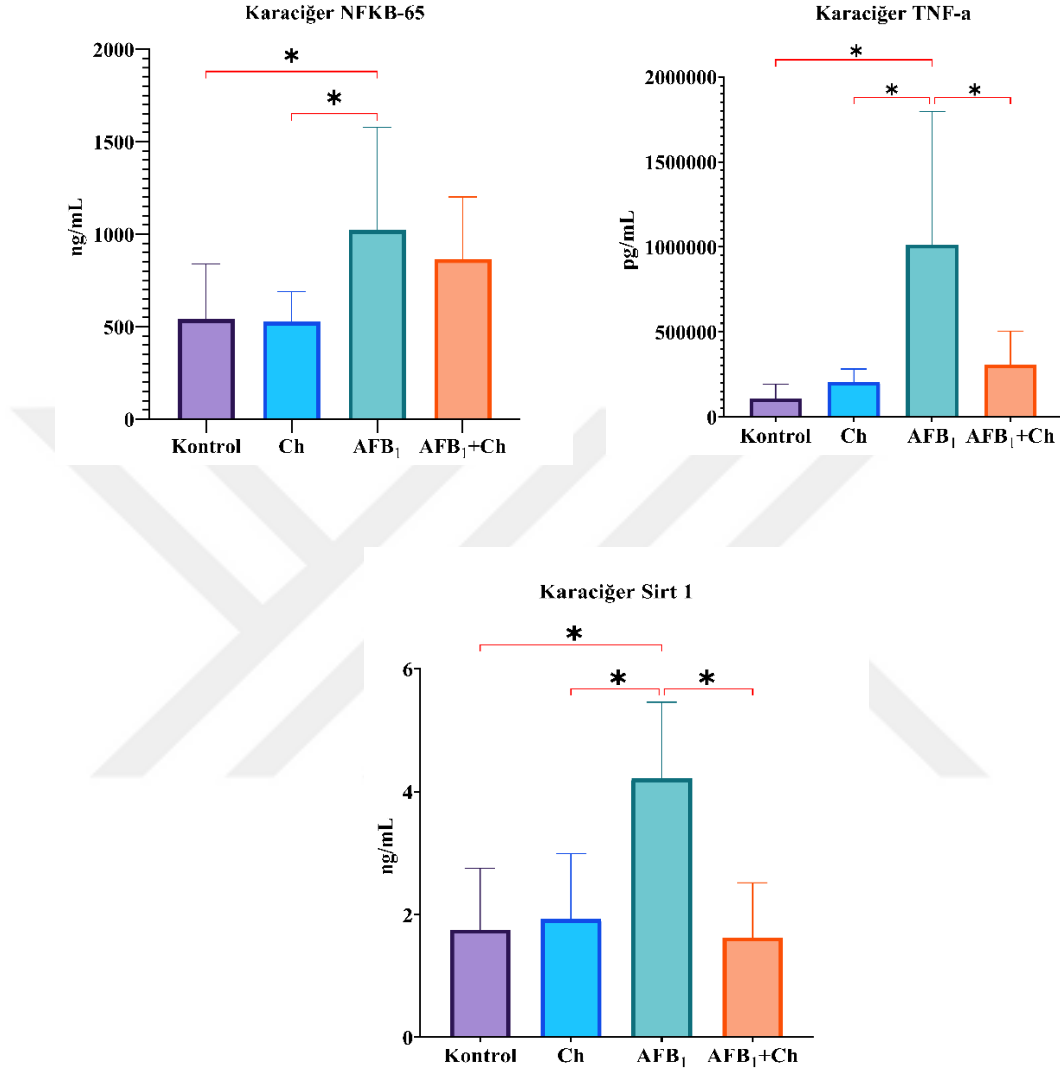


Şekil 4.4. Böbrek dokularında GSH, MDA, 8-OHdG parametreleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

4.3. İnflamatuar Parametreler ve Transkripsiyon Faktör Parametreleri

Aflatoksin B₁ verilen grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karaciğer doku örneklerinde NFkB-p65, TNF- α ve Sirt-1 seviyelerinde önemli bir artış ($p<0,05$) tespit edildi. Böbrek dokusunda ise TNF- α ve Sirt-1 seviyelerinde önemli bir artış ($p<0,05$) görülürken NFkB-p65 seviyesinde anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Aflatoksin B₁'in tek başına verildiğinde artan NFkB-p65, TNF- α ve Sirt-1 düzeyleri

kombinasyon (AFB₁+Ch) grubunda önemli bir düşüş ($p<0,05$) gösterdi (Tablo 4.4-4.5; Şekil 4.5-4.6).



Şekil 4.5. Karaciğer dokularında NFKB-p65, TNF- α ve Sirt-1 parametreleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

Tablo 4.4. Araştırma gruplarının karaciğer dokularında NFKB-p65, TNF- α ve Sirt-1 seviyeleri.

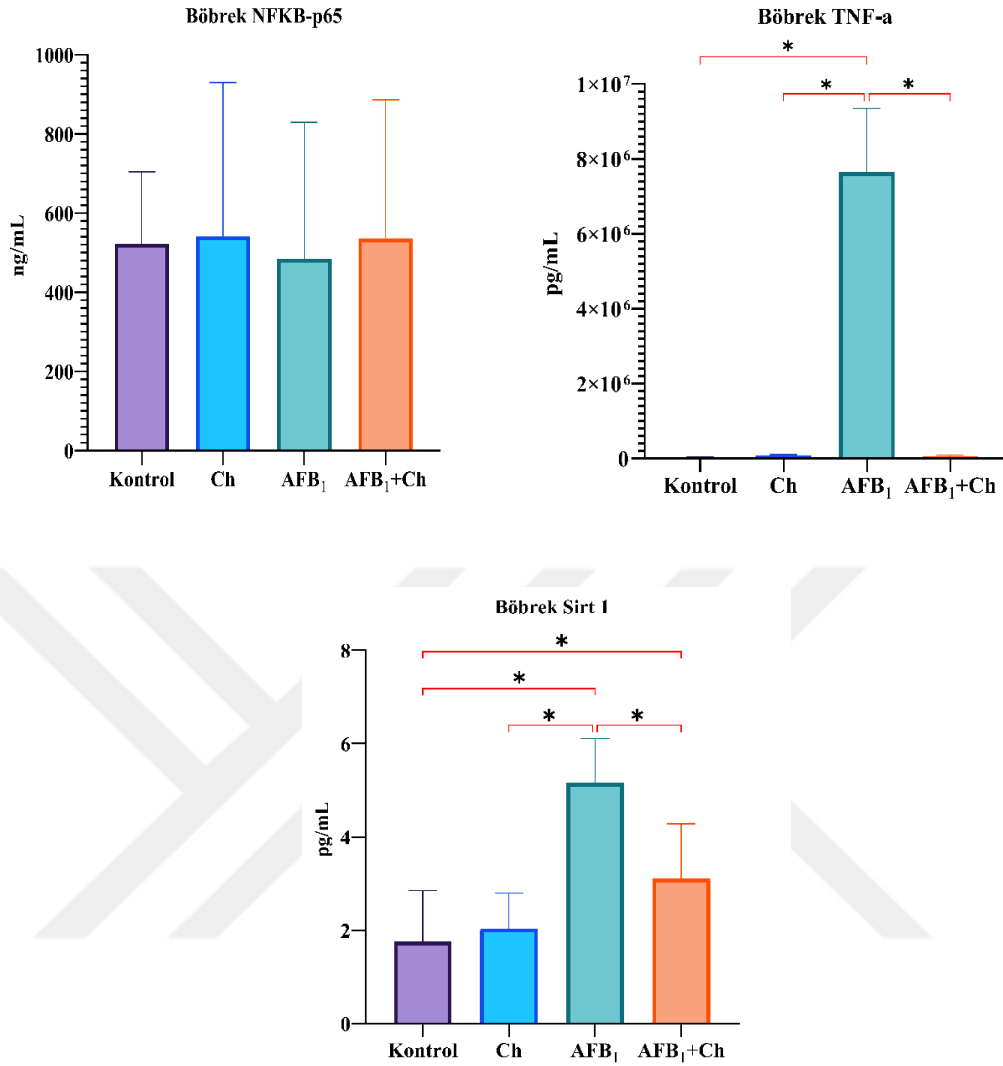
Gruplar	Parametreler		
	TNF α	NFKB-p65	Sirt1
Kontrol	109940,89 $\pm$ 27232,80 ^a	541,81 $\pm$ 99,18 ^a	1,75 $\pm$ 0,33 ^a
AFB ₁	1011065,75 $\pm$ 248497,57 ^b	1023,63 $\pm$ 175,12 ^b	4,21 $\pm$ 0,39 ^b
Ch	206138,18 $\pm$ 24045,07 ^a	528,77 $\pm$ 51,13 ^a	1,92 $\pm$ 0,33 ^a
AFB ₁ +Ch	3079942,68 $\pm$ 62278,00 ^a	865,83 $\pm$ 106,08 ^{ab}	1,62 $\pm$ 0,28 ^a

Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c: Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel farkı göstermektedir (p<0,05). TNF α (pg/ mg protein), NFKB-p65 (ng/ mg protein), Sirt-1 (ng/ mg protein).

Tablo 4.5. Araştırma gruplarının böbrek dokularında NFKB-p65, TNF- α ve Sirt-1 seviyeleri.

Gruplar	Parametreler		
	TNF α	NFKB-p65	Sirt1
Kontrol	32553,50 $\pm$ 3309,79 ^a	522,57 $\pm$ 60,52 ^a	1,75 $\pm$ 0,36 ^a
AFB ₁	764588,47 $\pm$ 538909,51 ^b	485,07 $\pm$ 108,75 ^a	5,15 $\pm$ 0,29 ^c
Ch	75436,95 $\pm$ 7980,24 ^a	541,46 $\pm$ 122,67 ^a	2,03 $\pm$ 0,23 ^{ab}
AFB ₁ +Ch	55586,77 $\pm$ 9660,13 ^a	536,37 $\pm$ 110,63 ^a	3,10 $\pm$ 0,37 ^b

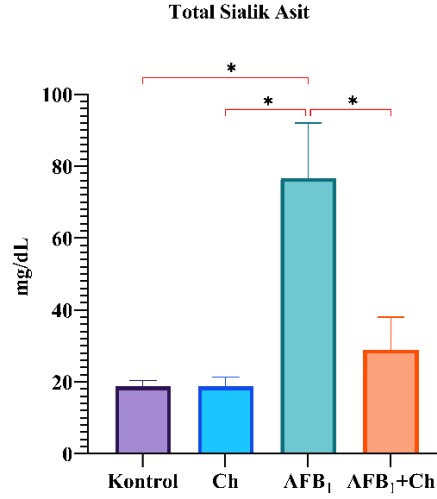
Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c: Gruplar arası karşılaştırmada farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel farkı göstermektedir (p < 0.05). TNF α (pg/ mg protein), NFKB-p65 (ng/ mg protein), Sirt1 (ng/ mg protein).



Şekil 4.6. Böbrek dokularında NFKB-p65, TNF- α ve Sirt-1 parametreleri. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p<0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

4.4. Deney Gruplarında Serum Total Sialik Asit Seviyeleri

Aflatoksin B₁ grubu ile kontrol grubu serum sialik asit değerleri karşılaştırıldığında AFB₁ grubunda kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,05$). Chrysin grubu ile AFB₁ grubu karşılaştırıldığında sialik asit değerleri açısından anlamlı bir fark tespit edildi ($p<0,05$). Chrysin ve Aflatoksin B₁'in birlikte verildiği grupta ise Aflatoksin B₁'in tek başına verildiğinde artan sialik asit düzeyinde önemli bir düşüş ($p<0,05$) belirlendi (Tablo 4.6; Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Araştırma gruplarında total serum sialik asit düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. Çizgiler ile istatistiki açıdan anlamlı farklar gösterilmiştir (*: $p < 0,05$). Arasında çizgi bulunmayan gruplar arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark mevcut değildir.

Tablo 4.6. Aflatoksin B₁ indüklü karaciğer hasarına karşı chrysinin deneysel gruplarda serum Total Sialik Asit Konsantrasyonu üzerine etkileri.

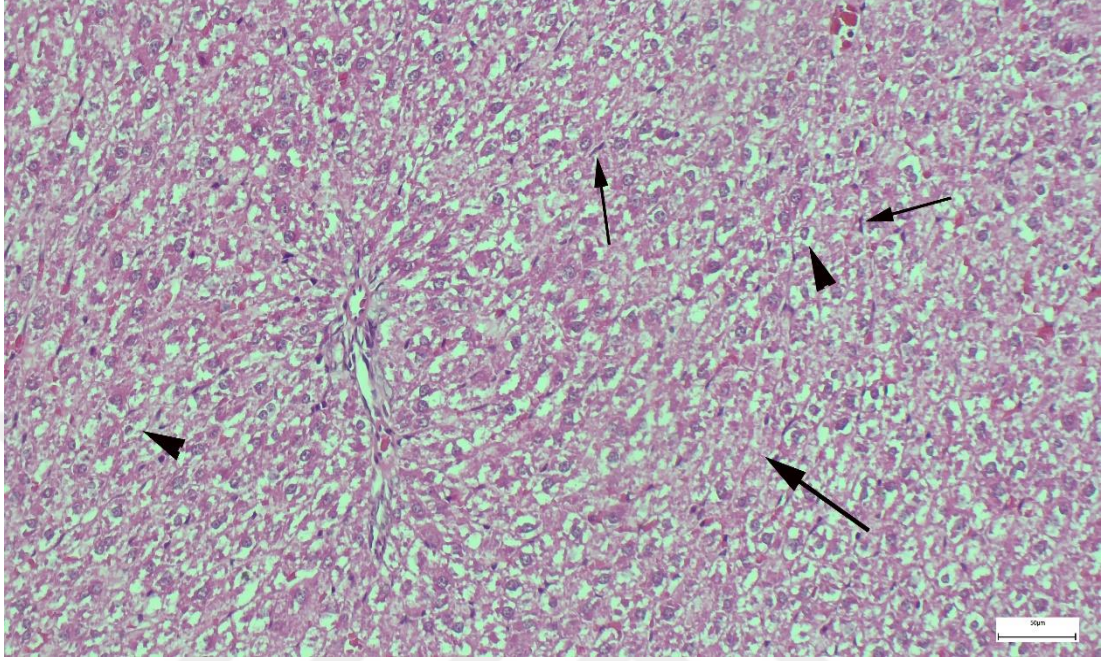
Gruplar	Sialik Asit (mg/dL)
Kontrol	63,34 $\pm$ 10,07 ^a
Ch	35,88 $\pm$ 2,7 ^a
AFB ₁	50,67 $\pm$ 5,12 ^b
AFB ₁ +Ch	40,33 $\pm$ 3,93 ^a

Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak verilmiştir. a, b, c: Gruplar arası karşılaştırmada farklı harflerle gösterilen gruplar arasında istatistiksel farkı göstermektedir ($p < 0,05$).

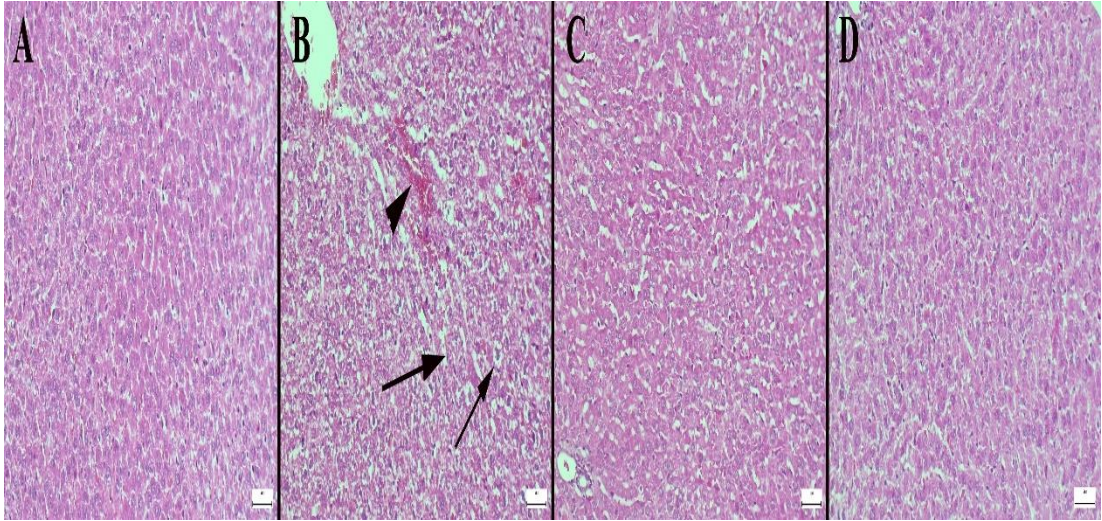
4.5. Histopatolojik Bulgular

Gruplara göre karaciğer kesitleri incelendiğinde, kontrol ve Ch grubundaki ratların karaciğerlerinin normal görünümde olduğu görüldü. AFB₁ grubundaki ratların karaciğerlerinde şiddetli hiperemi, yer yer mikrokanamalar, Kupffer hücre proliferasyonları, hepatositlerde yağlanma, dejenerasyon ve nekrozlar ile bazılarında megalokaryozis ve çift çekirdek oluşumları dikkati çekti. Ch tedavisinin AFB₁'nin

oluşturduğu patolojik bulguları AFB₁+Ch grubunda önemli ölçüde iyileştirdiği saptandı (Şekil 4.8-4.9).

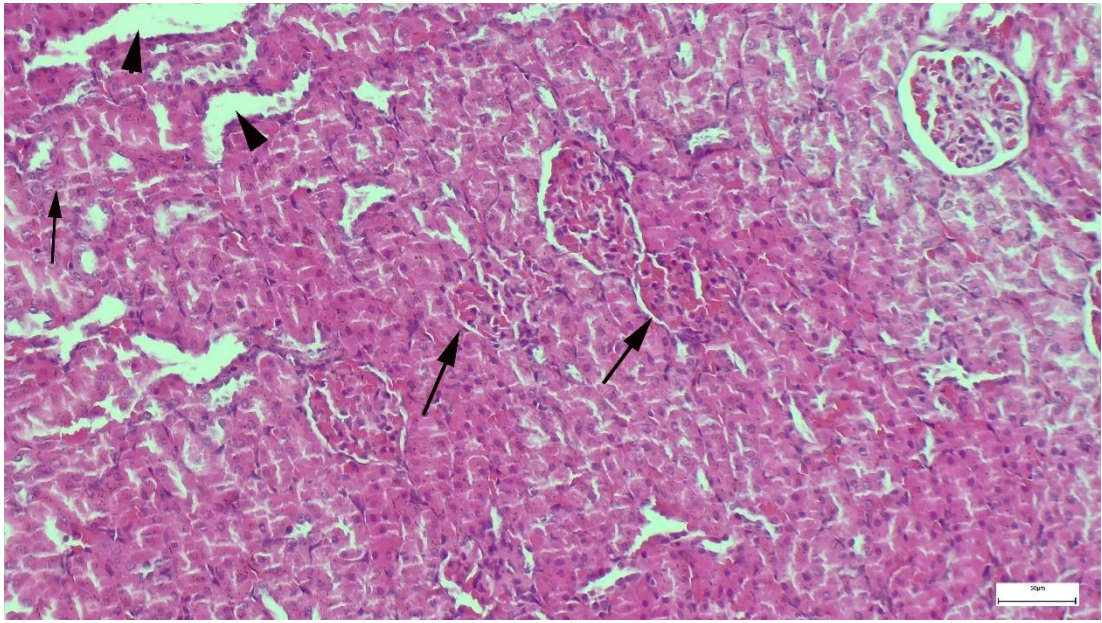


Şekil 4.8. AFB₁ grubunda bir ratın karaciğerinin mikroskopik görünümü, Kupffer hücre proliferasyonları (ince oklar), hepatositlerde yağlanma (ok başı) ve nekrotik alanlar (kalın ok), HE, Bar=50µm.

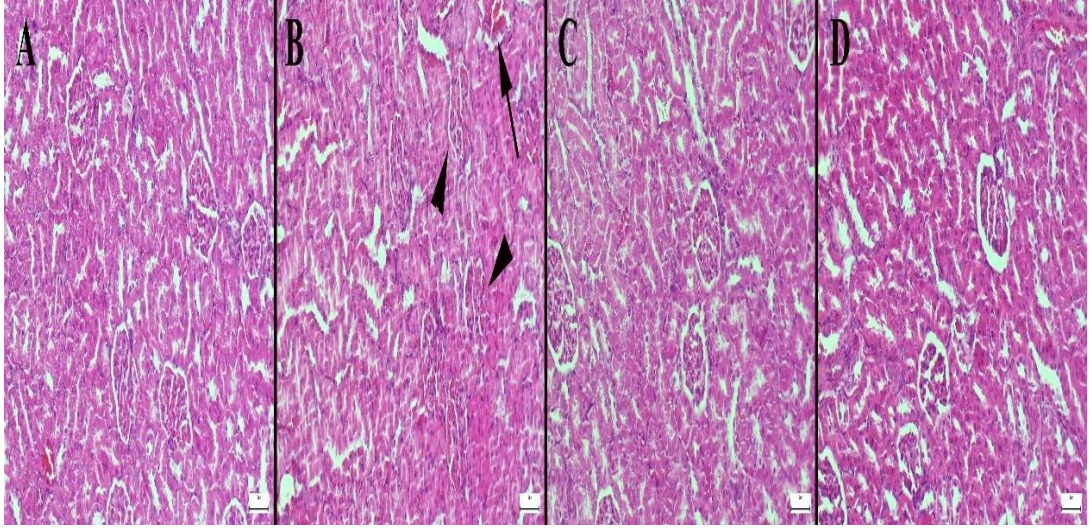


Şekil 4.9. Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait histopatolojik görünümleri, (A) Kontrol grubunda normal histoloji, (B) AFB₁ grubunda kanama (ok başı), hepatositlerde şiddetli yağlanma (ince ok) ve nekrozlar (kalın ok); (C) AFB₁+Ch grubunda patolojik bulgularda belirgin iyileşme; (D) Ch grubunda normal karaciğer mikroskobisi, HE, Barlar=50µm.

Gruplara göre ratların böbrekleri histopatolojik olarak incelendiğinde kontrol ve Ch grubunda böbreklerin normal histolojik yapıya sahip oldukları gözlenirken AFB₁ grubundaki hayvanların böbreklerinde hiperemi, bazı hayvanlarda küçük kanama odakları görüldü. Glomeruluslarda büzüşmeler ve glomerülosklerozi tabloları dikkati çekti. Tubullerde genişlemeler, epitellerde dökülmeler ve megalokaryozise rastlandı. Ch tedavisinin AFB₁'nin böbreklerde şekillendirdiği patolojik bulguları AFB₁+Ch grubunda belirgin şekilde iyileştirdiği gözlemlendi (Şekil 4.10-4.11).



Şekil 4.10. AFB₁ grubunda bir ratın böbreğinin histopatolojik görünümü, glomerulosklerozi (ince oklar), tubulerde dilatasyonlar (ok başları) ve tubul epitellerinde megalositozis (ince ok), HE, Bar=50µm.

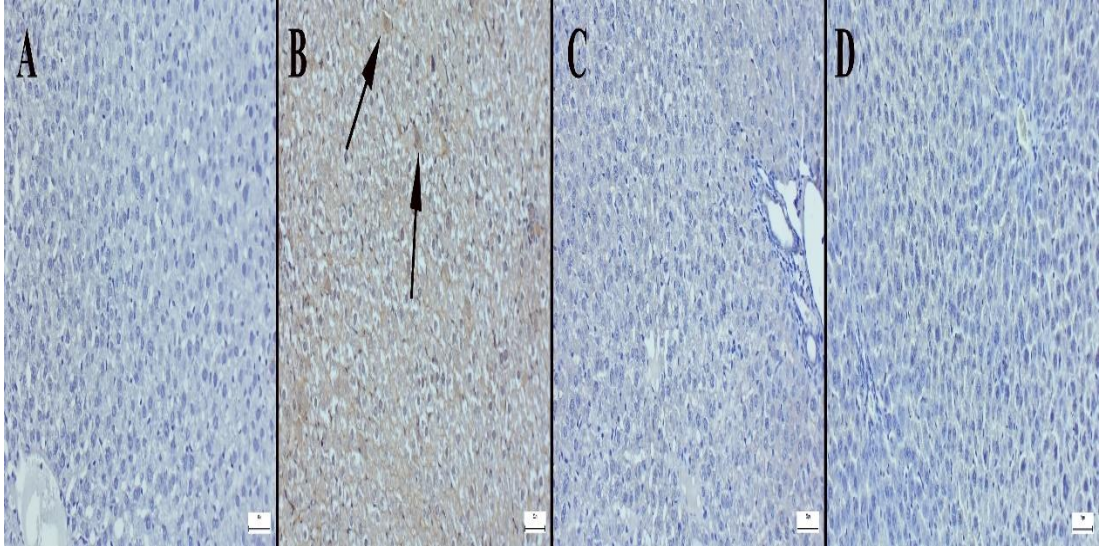


Şekil 4.11. Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait histopatolojik görünümleri, (A) Kontrol grubunda normal böbrek histolojisi, (B) AFB₁ grubunda şiddetli hiperemi (ince ok), ve glomeruler sklerozis (ok başı); (C) AFB₁+Ch grubunda böbrekteki patolojik bulgularda önemli ölçüde iyileşme; (D) Ch grubunda normal böbrek histolojisi, HE, Barlar=50µm.

4.6. İmmunohistokimyasal Bulgular

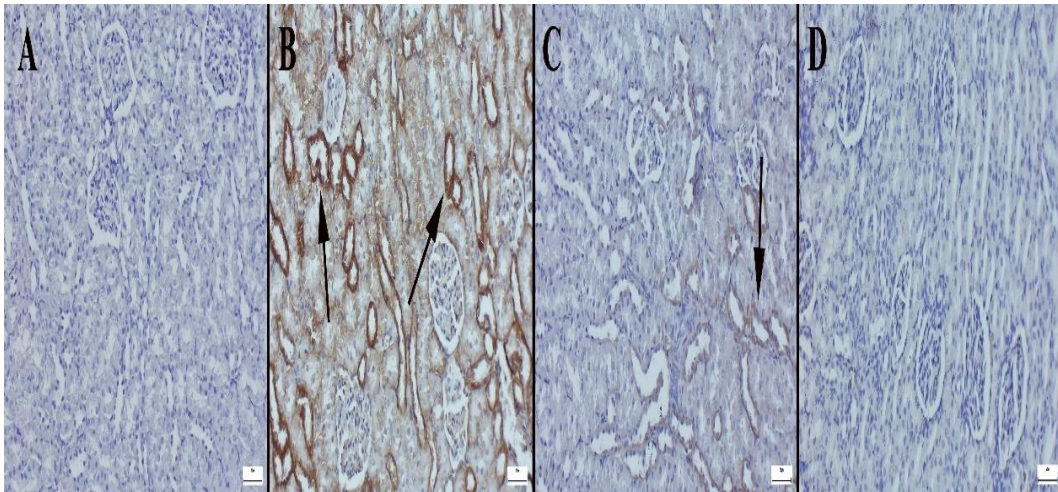
4.6.1. Kaspaz-3 İmmunohistokimyasal Bulguları

Kaspaz-3 ekspresyonlarının hücrelerin sitoplazmalarında yerleştiği gözlemlendi. Gruplara göre karaciğer dokularının kaspaz-3 immunohistokimyasal ekspresyonları incelendiğinde kontrol ve Ch gruplarında negatif veya çok hafif şiddette olan ekspresyonların AFB₁ grubunda belirgin şekilde arttığı gözlemlendi. AFB₁+Ch grubunda ise ekspresyonlarda azalmalar şekillendiği dikkati çekti (Şekil 12).



Şekil 12. Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B) AFB₁ grubunda belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar), (C) AFB₁+Ch grubunda belirgin şekilde azalmış ekspresyonlar, (D) Ch grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

Gruplardaki ratların böbreklerinin kaspaz-3 ekspresyonlarının incelemesinde kontrol ve Ch gruplarında negatif veya çok hafif ekspresyonlar gözlenirken AFB₁ grubunda özellikle tubul epitellerinde ekspresyonlarda belirgin şekilde artışlar saptandı. Chrysin tedavisinin AFB₁+Ch grubunda böbrekteki ekspresyonları belirgin şekilde azalttığı dikkati çekti (Şekil 13).

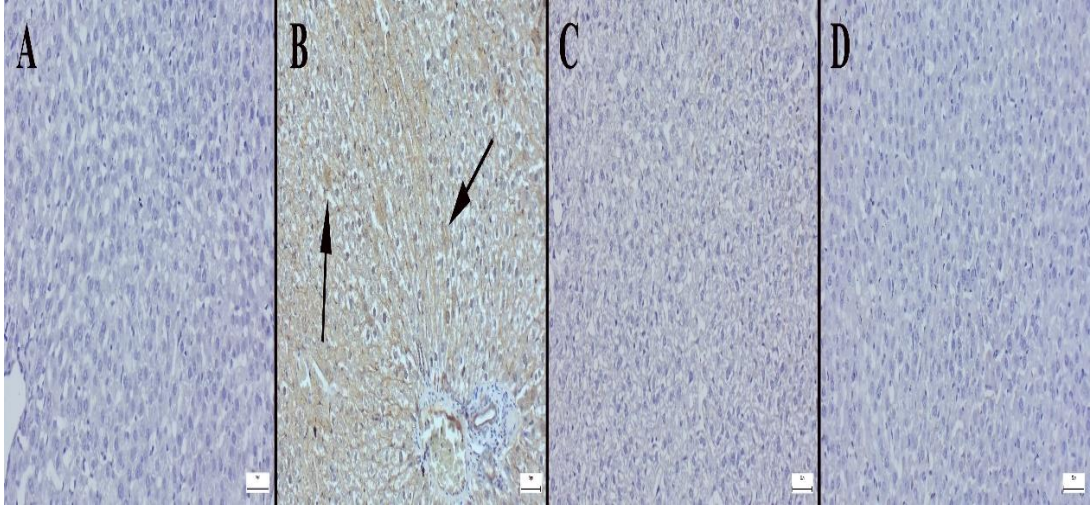


Şekil 13. Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait kaspaz-3 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B)

AFB₁ grubunda özellikle tubul epitellerinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar), (C) AFB₁+Ch grubunda önemli ölçüde azalmış ekspresyonlar (oklar), (D) Ch grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

4.6.2 Kaspaz-9 İmmunohistokimyasal Bulguları

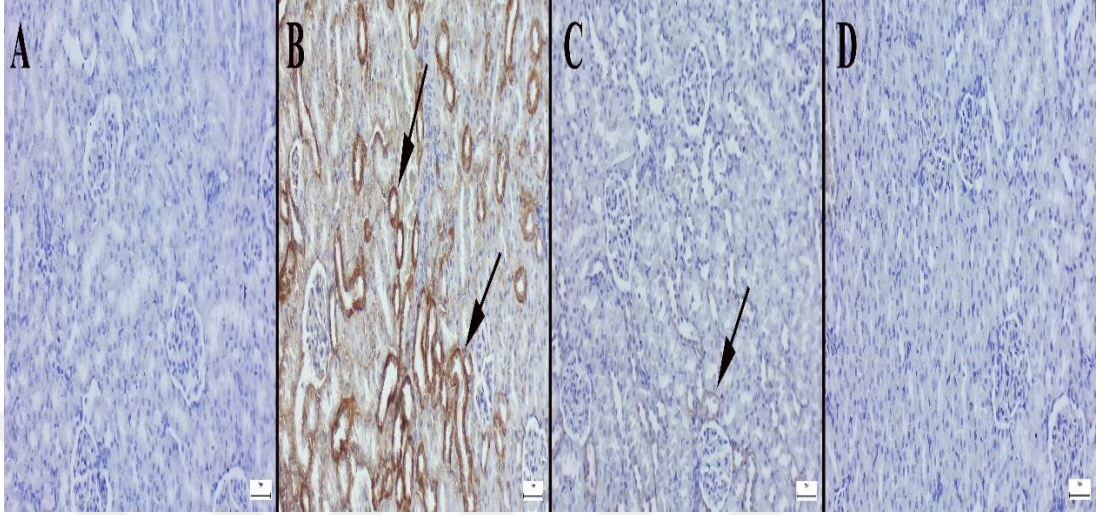
Kaspaz-9 ekspresyonları hücrelerin sitoplazmalarında saptandı. Gruplara göre karaciğerlerin kaspaz-9 ekspresyonları incelendiğinde kaspaz-3 ekspresyonlarına benzer şekilde kontrol ve Ch gruplarında negatif veya çok hafif olan ekspresyonların AFB₁ grubundaki ratların karaciğerlerinde belirgin şekilde arttığı görüldü. Chrysin tedavisinin AFB₁'nin karaciğerlerde kaspaz-9 ekspresyonlarını önemli şekilde azalttığı dikkati çekti (Şekil 14).



Şekil 14. Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait kaspaz-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünümüleri, (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B) AFB₁ grubunda önemli ölçüde artmış ekspresyonlar (oklar), (C) AFB₁+Ch grubunda belirgin şekilde azalmış ekspresyonlar, (D) Ch grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

Gruplarının böbrek örneklerinin kaspaz-9 ekspresyonlarının incelemesinde kontrol ve Ch gruplarında negatif veya çok hafif olan ekspresyonların AFB₁ grubunda özellikle tubul epitellerinde belirgin şekilde arttığı dikkati çekti. Chrysin

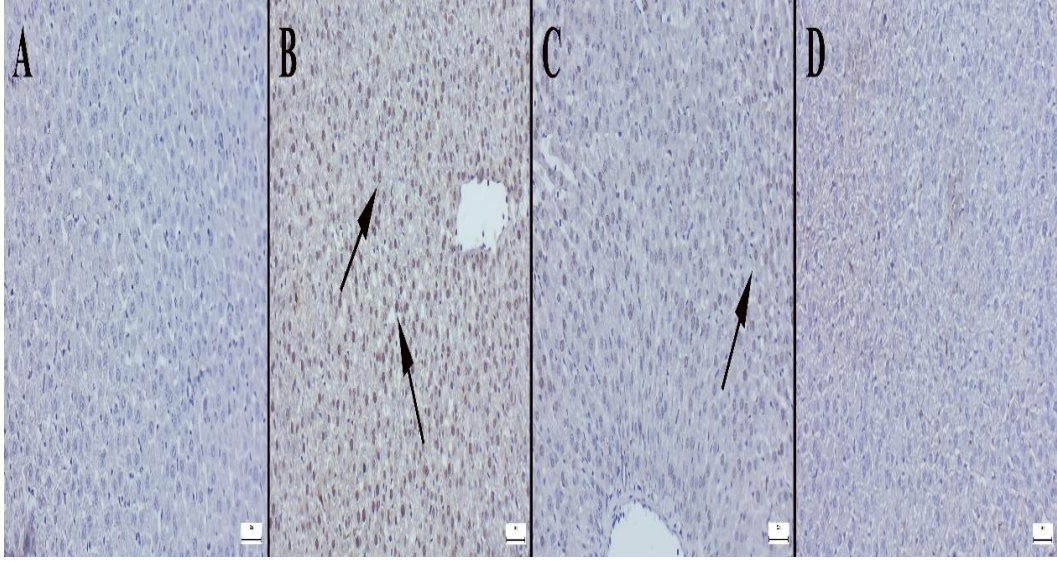
uygulamasının AFB₁+Ch grubunda ekspresyonları belirgin olarak azalttığı gözlemlendi (Şekil 15).



Şekil 15. Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait kaspaz-9 ekspresyonlarının immunohistokimyasal görünüşleri, (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B) AFB₁ grubunda özellikle tubul epitellerinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar), (C) AFB₁+Ch grubunda önemli ölçüde azalmış ekspresyonlar (oklar), (D) Ch grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

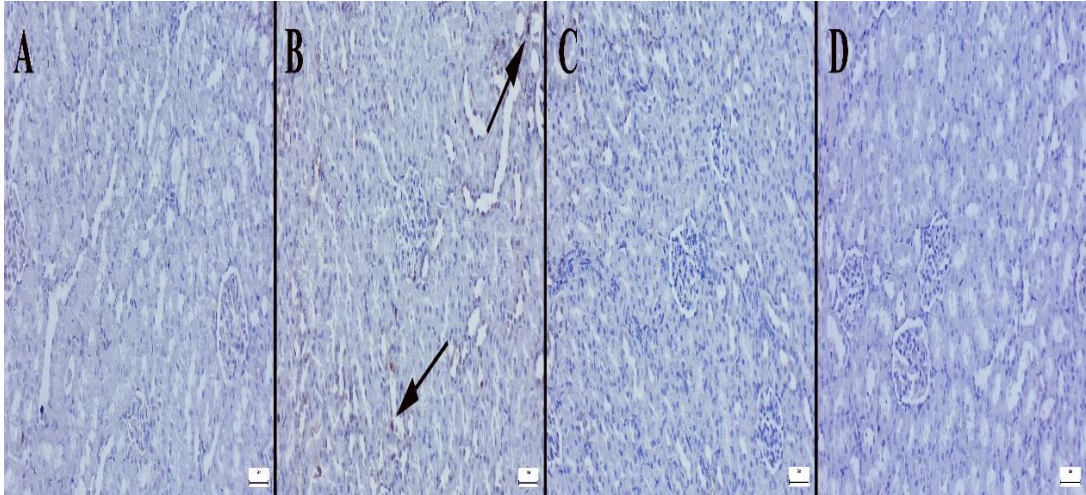
4.6.3. Ki-67 İmmunohistokimyasal Bulguları

Mikroskopik incelemede Ki-67 ekspresyonları hücrelerin çekirdeklerinde görüldü. Grupların karaciğerlerinde Ki-67 immunoekspresyonlarının incelenmesinde kontrol ve Ch gruplarında negatif veya tek tük hücrede hafif şekilde ekspresyonlar gözlemlendi. AFB₁ uygulamasının ekspresyonları önemli ölçüde arttırdığı dikkati çekti. Ch uygulamasının ise ekspresyonları belirgin şekilde azalttığı saptandı (Şekil 16).



Şekil 16. Araştırma gruplarının karaciğerlerinin Ki-67 ekspresyonlarının görünümü, (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B) AFB₁ grubunda hepatositlerin çekirdeklerinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar), (C) AFB₁+Ch grubunda belirgin şekilde azalmış ekspresyonlar (ok), (D) Ch grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

Grupların böbreklerinin Ki-67 immunoekspresyonları değerlendirildiğinde kontrol ve Ch gruplarında negatif veya çok hafif şekilde ekspresyonlar gözlemlendi. AFB₁ grubunda ise ekspresyonlarda belirgin artışlar şekillendiği dikkati çekti. Chrysin uygulamasının ise ekspresyonları azalttığı saptandı (Şekil 17).

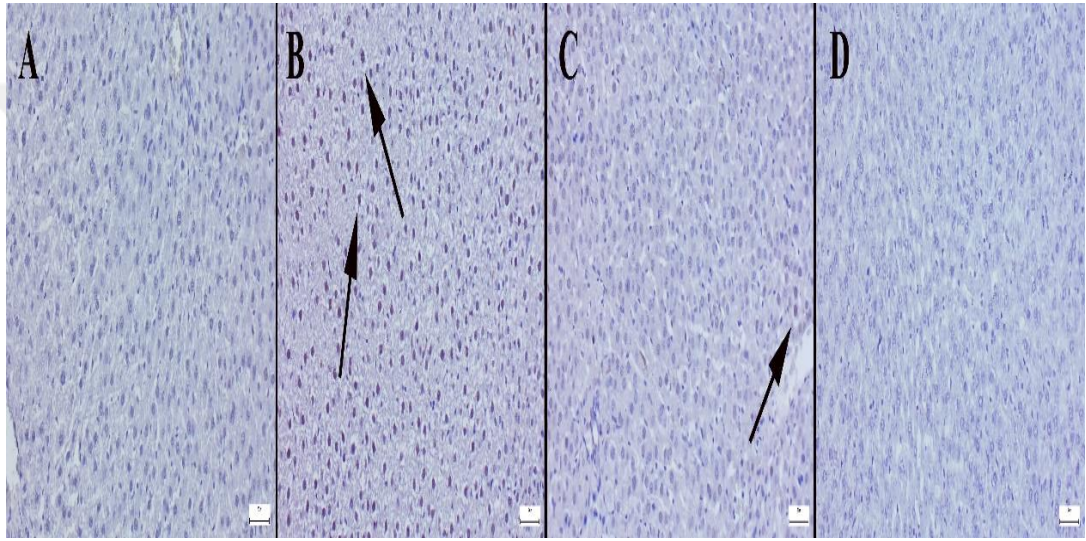


Şekil 17. Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait Ki-67 ekspresyonlarının görünümü, (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B) AFB₁ grubunda hücre çekirdeklerinde artmış ekspresyonlar (oklar), (C) AFB₁+Ch grubunda belirgin şekilde

azalmış ekspresyonlar, (D) Ch grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

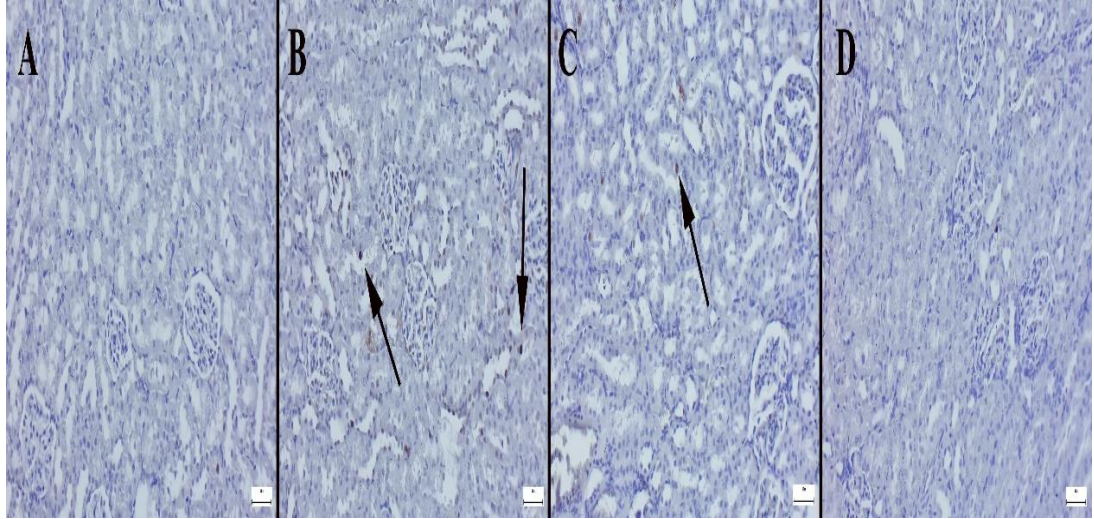
4.6.4. PCNA İmmunohistokimyasal Bulguları

Gruplara göre karaciğerlerin PCNA immunoreaksiyonlarının incelenmesinde kontrol ve Ch gruplarında negatif veya çok hafif şekilde ekspresyonlar saptandı. AFB₁ uygulamasının ekspresyonları önemli ölçüde arttırdığı gözlemlendi. Ch uygulamasının ise ekspresyonları belirgin şekilde azalttığı dikkati çekti (Şekil 18).



Şekil 18. Araştırma gruplarının karaciğer dokularına ait PCNA ekspresyonlarının görünümü, (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B) AFB₁ grubunda hepatositlerin çekirdeklerinde belirgin şekilde artmış ekspresyonlar (oklar), (C) AFB₁+Ch grubunda belirgin şekilde azalmış ekspresyonlar (ok), (D) Ch grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

Grupların böbreklerinin PCNA immunoekspresyonları değerlendirildiğinde kontrol ve Ch gruplarında negatif veya çok hafif şekilde ekspresyonlar gözlemlendi. AFB₁ grubunda ise ekspresyonlarda belirgin artışlar şekillendiği dikkati çekti. Chrysin uygulamasının ise ekspresyonları azalttığı saptandı (Şekil 19).



Şekil 19. Araştırma gruplarının böbrek dokularına ait PCNA ekspresyonlarının görünümü, (A) Kontrol grubunda negatif ekspresyon, (B) AFB₁ grubunda hücre çekirdeklerinde artmış ekspresyonlar (oklar), (C) AFB₁+Ch grubunda belirgin şekilde azalmış ekspresyonlar, (D) Ch grubunda negatif ekspresyonlar, Streptavidin biyotin peroksidaz metodu, Barlar=50µm.

Tablo 4.7. Araştırma gruplarında organlara göre immunopozitif hücre sayılarının istatistik analizi.

Parametreler	Gruplar				P değeri
	Kontrol	AFB ₁	AFB ₁ +Ch	Ch	
Cas-3 Karaciğer	2.00±1.63 ^a	47.60±2.41 ^b	14.40±3.09 ^c	1.10±1.10 ^a	<0.001
Cas-3 Böbrek	1.80±1.61 ^a	53.70±2.66 ^b	16.90±2.80 ^c	1.80±1.13 ^a	<0.001
Cas-9 Karaciğer	1.10±1.28 ^a	43.20±3.01 ^b	10.40±1.57 ^c	1.00±1.15 ^a	<0.001
Cas-9 Böbrek	1.10±1.10 ^a	49.60±2.01 ^b	14.20±2.34 ^c	1.30±1.49 ^a	<0.001
Ki-67 Karaciğer	1.50±1.17 ^a	63.30±2.71 ^b	15.10±2.99 ^c	1.00±1.15 ^a	<0.001
Ki-67 Böbrek	0.90±1.19 ^a	30.40±2.27 ^b	8.80±1.93 ^c	0.60±1.07 ^a	<0.001
PCNA Karaciğer	0.90±1.10 ^a	25.50±5.46 ^b	9.70±7.57 ^c	0.80±1.13 ^a	<0.001
PCNA Böbrek	1.30±1.25 ^a	21.10±1.28 ^b	5.90±5.82 ^c	0.60±0.83 ^a	<0.001

Veriler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. a,b,c : Aynı satırda üst simgesi farklı olan harfler gruplar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ($p<0,001$).

Bu çalışmanın sonuçları AFB₁'nin karaciğer ve böbreklerde önemli patolojik değişikliklere neden olduğunu, ancak Ch tedavisinin AFB₁'nin oluşturduğu patolojik bulguların düzeltilmesinde etkili olduğunu göstermiştir.



5. TARTIŞMA

Aflatoksinler, çiftlik ve kümes hayvancılığında akut-subakut ve kronik zehirlenmelere bağlı olarak önemli ekonomik kayıplara neden olan ve tüm dünyada insan sağlığını etkileyen mikotoksinlerdir (Kos ve ark., 2020). AFB₁, besin zinciri yoluyla insan vücuduna girerek insan- hayvan sağlığına ciddi şekilde zarar vererek kronik karaciğer hasarına neden olmaktadır. AFB₁ toksisitesinin temel olarak karaciğerde ve böbrekte olduğu kabul edilir. Ayrıca patogenezinde mitokondriyal bozulmanın ve lipid peroksidasyonunun, aşırı oksidan üretiminin, hücresel antioksidan yetersizliğinin rol oynadığı bildirilmektedir (Abdel-Daim ve ark., 2021).

Flavonoidler, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşik ailesidir. Flavonoller, flavanlar, flavononlar gibi farklı sınıflardan oluşur. Bir flavanoid olan chrysin çok sayıda epidemiyolojik çalışmada antikanserojen özelliğe sahip oldukları ve hem *in vitro* hem de *in vivo* hayvan modellerinde karaciğer, ovaryum ve akciğer kanseri hücreleri dahil olmak üzere tümör hücrelerinin proliferasyonunu engelledikleri gösterilmiştir. Bununla birlikte chrysinin bu etkilerinin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Flavonoidler genellikle güvenlidir ve düşük toksisite ile ilişkilidir, bu da onları birçok patolojik hasara karşı koruyucu ajan haline getirir (Li ve ark., 2010; Shahbaz ve ark., 2023).

Bu çalışmada AFB₁ ile indüklenen karaciğer ve böbrek hasarında chrysinin koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Ratlara 7 gün boyunca ağızdan 0,5 mg/kg/c.a olarak verilen AFB₁ oksidan/antioksidan dengesi önemli ölçüde değiştirdiği belirlenmiştir. Çalışmamızda karaciğer ve böbrek dokularında AFB₁ verilen grupta, kontrol grubuna göre GSH düzeyinde önemli bir düşüş ($p<0,05$); MDA düzeyinde ise önemli bir artış ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Glutatyon, düşük molekül ağırlığa sahip, vücutta glutamik asit, glisin ve sistein aminoasitlerinden oluşmuş bir tripeptit olup, yüksek miktarda karaciğerde bulunan çözünabilir antioksidandır (Ruffmann ve Wendel, 1991). Glutatyon hücre metabolizmasına katılır ve hücre bütünlüğünün korunmasında esansiyel bir antioksidandır. Enzimatik olmayan antioksidan olarak oksidatif hasara ve serbest radikallere karşı etkinlik gösteren glutatyon, doğrudan reaksiyona girerek serbest radikallerin toksisitelerini önleyebilmektedir. Ayrıca GSH,

protein sentezi, DNA, hücre çoğalması, lipid ve insülin metabolizmasına katılmak, sitokin ekspresyonu ve bağışıklık tepkisi gibi hücresel olayları düzenler ve proteinleri oksidasyondan korur (Zhao ve ark., 2011). Malondialdehit hücrelerde çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir. Serbest radikallerdeki artış MDA'nın aşırı üretimine neden olur. Malondialdehit düzeyi yaygın olarak oksidatif stresin ve antioksidan durumun bir belirteci olarak bilinir. Lipid oksidasyonu bir dizi ikincil ürünün ortaya çıkmasına neden olur. Bu ürünler esas olarak oksidatif hasarı şiddetlendirme yeteneğine sahip aldehitlerdir. Bu ürünler nükleik asitler ve proteinler gibi biyomoleküllerle etkileşime girerek hücre işlevselliğinde yer alan hassas mekanizmalara çoğu zaman geri dönülemez şekilde zarar verir (Marnett, 1999; Del Rio ve ark., 2005). Aflatoksin B₁ oksidan/antioksidan dengesini bozarak, lipidler, nükleik asitler ve proteinler dahil olmak üzere hücresel makromoleküllere zarar vererek hücresel oksidatif hasara yol açmaktadır (Deng ve ark., 2018; Ma ve ark., 2021). Membran geçirgenliği membran taşıyıcılarına ve onun lipid bileşimine bağlıdır. AFB₁ lipid metabolizmasını bozar ve oksidatif stresi tetikler (Rotimi ve ark., 2016; Rotimi ve ark., 2018). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki AFB₁'in toksik mekanizmasında oksidatif stres önemli bir role sahiptir (Meki ve ark., 2001; Rotimi ve ark., 2019; Ahmed ve ark., 2022; Altyar ve ark., 2023). Ahmed ve ark. (2022), AFB₁ 7,5 g/kg canlı ağırlık/gün, oral uygulaması ile oluşturdukları karaciğer hasarında oksidatif stres ve plazma MDA düzeylerinde önemli ölçüde artırdığını vurgulamışlardır. Rotimi ve ark. (2019), sıçanlara sırasıyla 1, 4 ve 7 gün boyunca 1 mg/kg vücut ağırlığı AFB₁ uygulamasının ardından oluşan akut AFB₁ maruziyetinin GSH düzeyini azaltıp MDA düzeyini anlamlı bir şekilde artırdığı bildirilmiştir. Altyar ve ark. (2023), sıçanlarda AFB₁ 2,5 mg/kg uygulaması ile oluşturulan hepatik hasarda GSH, düzeylerinde azalma MDA düzeyinde artış olduğu bildirmiştir. Meki ve ark. (2001), sıçanlara (50 µg/kg bw) AFB₁ uygulamasının GSH seviyesini azalttığı MDA seviyesini yükselttiğini tespit etmiştir. Bu çalışmada da diğer araştırmalara benzer şekilde AFB₁ dokularda MDA düzeylerinde artışa neden olarak lipid peroksidasyona yol açtığı ve antioksidan savunma sistemini etkileyerek (GSH düzeyi düşürerek) oksidatif hasara neden olduğu tespit edilmiştir. Chrysin+ AFB₁ birlikte verildiği grupta AFB₁ tek başına verilen gruba göre GSH düzeyi etkinliğinde önemli bir artış ($p<0,05$); MDA düzeyinde ise önemli bir düşüş ($p<0,05$) belirlenmiştir. Farklı ksenobiyotiklerle

indüklenen oksidatif hasara karşı chrysinin koruyucu etkinlik gösterdiği çalışmalar mevcuttur (Khan ve ark., 2012; Parlak ve ark., 2021). Önceki çalışmaların sonuçları ile bu çalışmanın bulguları paralelik göstermektedir. Parlak ve ark., (2021), karbon tetraklorür ile oluşturulan testis hasarına karşı chrysinin (100 mg/kg/bw/gün) 14 gün boyunca uygulanması GSH seviyesini arttırdığı, MDA seviyesini azalttığını tespit etmiştir. Khan ve ark. (2012), Wistar sıçanlarında *cisplatin* 'nin neden olduğu oksidatif strese karşı chrysinin koruyucu rolünü araştırmıştır. Farklı dozlarda chrysin (20 ve 40 mg / kg b.w.) uygulanması, GSH düzeyini artırdığı bildirilmiştir. Ali ve ark. (2014), chrysin'in sıçanlarda metotreksat kaynaklı hepatik oksidatif strese karşı koruyucu etkisini belirlediği çalışmada chrysin (20 mg/kg ve 80 mg/kg) uygulamasının doza bağlı MDA düzeyini düşürdüğü GSH düzeyini artırdığını rapor etmiştir.

8-Hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) DNA hasarını gösteren bir biyo belirteçdir. Hidroksil radikalleri gibi serbest radikallerin, DNA'da oluşturduğu oksidatif hasar zincir kırıklarına, şeker ve baz hasarına, DNA protein çapraz bağlanması gibi bozukluklara neden olur. Pürin bazından üretilmiş hasarlı yapı 8-hidroksiadenin (8-OH-Ade) olup DNA'daki adeninin C-8 pozisyonuna hidroksil radikallerinin eklenmesiyle oluşmaktadır. 8-Hidroksi-2-deoksiguanozin deneysel koşullar altında *in vitro* ve *in vivo* olarak serbest radikallerin DNA hasarını gösteren biyobelirteçtir (Jaruga ve ark., 2001; Ercan ve Fidancı, 2012). Biyolojik maddelerdeki oksidatif stres DNA baz oksidasyonuna neden olup bunun da hastalıkların başlamasında ve ilerlemesine katkı sağladığı belirlenmiştir (Ercan ve Fidancı, 2012). AFB₁'in neden olduğu oksidatif hasarlar, DNA hasarının temel mekanizmalarından biri olabilir ve tümör oluşumuna yol açabilir (Shen ve ark., 1994). Aleissa ve ark. (2020), wistar albino sıçanlarına AFB₁ (50 µg/kg/i.p) uygulanarak oluşturulan hepatorenal toksisite de 8-OHdG aktivitesini artırdığını belirtmiştir. Yang ve ark. (200), Fischer 344 sıçanlarına 24 hafta boyunca gavaj yoluyla AFB₁ (0,4 mg/kg vücut ağırlığı, haftada bir) uygulayarak oluşturdukları hepatokarsinogenezde AFB₁ uygulamasının 8-OHdG düzeyini artırdığını tespit etmişlerdir. Altyar ve ark. (2023), sıçanlara iki kez AFB₁ (2,5 mg/kg dozunda) oral olarak verilerek oluşturulan akut aflatoksin B₁ kaynaklı hepatik oksidatif streste 8-OHdG seviyesinde artış olduğunu belirtmişlerdir. Albadrani ve ark. (2024), yaptıkları çalışmada deneyin 12 ve 14

gününde iki kez AFB₁ (2,5 mg/kg dozunda) oral olarak uygulamasının 8-OHdG seviyesini önemli ölçüde artırdığını bildirmiştir. Bu çalışmada da daha önce yapılan araştırmalara (Yang ve ark., 2000; Aleissa ve ark., 2020; Altyar ve ark. 2023; Albadrani ve ark., 2024) benzer şekilde AFB₁ uygulamasının 8-OHdG seviyelerinde önemli bir artışa ($p<0,05$) yol açtığı tespit edilmiştir. Chrysinin antioksidan yapısı nedeniyle 8-OHdG seviyelerinde düşüşe yol açabileceği düşünülmektedir. Demir ve ark. (2023), sıçanlara 2 mg/kg chrysin uygulamasının ovaryum dokusunda 8-OHdG seviyelerinde doza bağlı bir şekilde anlamlı derecede ($p<0,05$) düşürdüğünü belirtmiştir. Çomaklı ve ark. (2023), oluşturdukları hepatorenal hasara karşı farklı dozlarda chrysin uygulamasının (20mg/kg, 50 mg/kg) karaciğer ve böbrekte 8-OHdG seviyelerinde doza bağımlı bir şekilde önemli bir azalma olduğunu rapor etmiştir. Kucukler ve ark. (2021), farklı dozlarda 7 gün boyunca (25 ve 50 mg/kg/bw) oral yoldan chrysin uygulamasının doza bağımlı bir şekilde sıçanlarda kurşun asetat kaynaklı böbrek hasarında artan 8-OHdG seviyelerini önemli ($P < 0,05$) ölçüde azalttığını belirtmiştir. Bu çalışmada da AFB₁ uygulanan grupta artan 8-OHdG seviyesinin 11 gün boyunca chrysinin 25 mg/kg/c.a/gün uygulaması ile önemli bir düşüş ($p<0,05$) olduğu tespit edilmiştir.

Tümör nekroz faktör α (TNF- α) güçlü proinflamatuvar aktivitelere sahip farklı proinflamatuvar aracılardan salgılanmasını destekleyebilen proinflamatuvar bir sitokindir. TNF- α biyoaktiviteleri esas olarak TNF reseptörü 1 (TNFR1)'e bağlanarak NF- κ B ve MAPK sinyal yollarını aktive ederek doğrudan inflamasyonu teşvik eder. Bu yollar toplu olarak sitokinler ve kemokinler gibi proinflamatuvar medyatörleri kodlayan genlerin transkripsiyonel yukarı regülasyonuna yol açar (Van Loo ve Bertrand, 2023). Lipid peroksidasyonu, oksidatif hasarın başlıca belirtilerinden biridir ve birçok kanserojenin toksisitesinden sorumludur. Aflatoksin B₁, serbest radikallerin üretilmesi ve lipid peroksidasyonunun uyarılması yoluyla hayvanlarda ve insanlarda oksidatif stres kaynaklı hücre hasarına neden olur. Oksidatif stres, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin aktivasyonu yoluyla AFB₁'in neden olduğu toksisitede rol oynar (Shen ve ark., 1994). Bu çalışmada AFB₁'in TNF- α seviyesinde önemli artışa ($p<0,05$) yol açtığı belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada AFB₁'in oksidatif hasar oluşturarak TNF- α seviyesinde artışa neden olduğu düşünülmektedir. Daha önce

yapılan çalışmalarda bu çalışma sonuçlarını desteklemektedir (Singh ve ark., 2015; Wang ve ark., 2016; Hatipoğlu ve Keskin, 2022; Ahmed ve ark., 2022; Hassaneen ve ark., 2023;). Hatipoğlu ve Keskin, (2022), AFB₁ (250 µg/kg/gün, oral) 60 gün boyunca uygulanması karaciğer dokusunda AFB₁ grubundaki TNF-α düzeyleri diğer deney gruplarına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek ($p < 0,05$) olduğunu tespit etmişlerdir. Hassaneen ve ark. (2023), sıçanlara 28 gün boyunca 1,4 mg aflatoksin/kg dozunda aflatoksinle kirlenmiş diyet verilip oluşturulan karaciğer hasarında TNF-α düzeyinin arttığını rapor etmişlerdir. Singh ve ark. (2015), iki doz 1 mg AFB₁/kg vücut ağırlığı AFB₁ uygulanan sıçanların karaciğerinde proinflamatuvar sitokinlerin (TNF-α ve IL-1α) aşırı ekspresyon gösterdiği bildirilmiştir. Wang ve ark. (2016), sıçanlara farklı dozlarda AFB₁ (2,5 ve 5 mg/kg) tek doz oral uygulanması proinflamatuvar sitokinlerin (TNF-α ve IL-1β) serum seviyelerinin zaman ve doza bağlı bir şekilde arttığını ($p < 0,05$) bildirmiştir. Ahmed ve ark. (2022), sıçanlara 28 gün boyunca 200 µg/kg vücut ağırlığında AFB₁ uygulanarak oluşturulan karaciğer hasarında TNF-α ekspresyonunun arttığını rapor etmiştir. Chrysin uygulamasının proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonlarını aşağı yönlü regüle ettiğine dair çalışmalar bulunmaktadır (Li ve ark., 2010; Yao ve ark., 2016; Koc ve ark., 2020; Kucukler ve ark., 2021). Li ve ark. (2010), chrysinin TNF-α ekspresyonunu azalttığını bildirmiştir. Kucukler ve ark. (2021), kurşun asetat ile oluşturdukları karaciğer hasarına karşı farklı dozlarda (25 ve 50 mg/kg) 7 gün boyunca chrysin uygulamasının TNF-α ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde aşağı yönlü regüle ettiğini tespit etmiştir. Koc ve ark. (2020), LPS ile oluşturulan sepsise karşı chrysin 10 gün boyunca farklı dozlarda (50 mg/kg b.w. ve 100 mg/kg b.w.) uygulamasının TNF-α ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde azalttığını rapor etmişlerdir. Ayrıca sepsis ile ilişkili doku hasarını prositokinlerin inhibisyonu yoluyla baskılayabildiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada da chrysinin 11gün boyunca 25 mg/kg/c.a/gün dozda uygulanması TNF-α ekspresyonunu anlamlı ($p < 0,05$) bir şekilde düşürdüğünü gözlemlendi. Elde ettiğimiz bulgular diğer çalışma sonuçları ile uyumlu olduğu görülmektedir (Li ve ark., 2010; Koc ve ark., 2020; Kucukler ve ark., 2021).

Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB) inflamatuvar genlerin üretiminden sorumlu olan redoks duyarlı transkripsiyon faktörüdür. Nükleer Faktör Kappa B bütün

hücrelerin sitoplazmasında inaktif şekilde bulunur, aktif hale gelince hücrenin çekirdeğine girer. T hücreleri, makrofajlar ve diğer hücreler tarafından üretilen proinflamatuvar sitokinler hedef hücreler üzerindeki etkilerini NF- κ B'nin aktivasyonu ile gösterirler. NF- κ B aktivasyonunun, hücre proliferasyonu, apoptoz, anjiyogenez, tümör metastazı, proinflamatuvar yanıt mekanizmaları yoluyla tümör ilerlemesini desteklediği bilinmektedir (Lee ve Kim, 2009). Nükleer Faktör Kappa B sitokinler (TNF, IL-1, IL-6, IL-8 ve kemokinler), viral faktörler, enzimler (iNOS ve COX-2), hücre döngüsünü düzenleyici molekülleri tarafından aktive olurlar. NF- κ B'nin kontrollü aktivasyonu hücrenin hayatta kalması için çok önemli olmasına rağmen, düzensiz NF- κ B aktivasyonu, kanser, inflamatuvar hastalıklar ve otoimmün hastalıklar dahil birçok hastalıkla ilişkilidir (Lee ve Kim, 2009; Friedmann-Morvinski ve ark., 2016). Nükleer Faktör Kappa B-p65 (NF κ B-p65) NF- κ B protein ailesinden biridir, kanser gelişimi ve ilerlemesine katkıda bulunur (Lee ve Kim, 2009). Aflatoksin B₁ metabolizması sonucu üretilen ROS'ların indüklediği doku hasarına bağlı olarak NF- κ B/p65 aktivasyonu artmaktadır. Aflatoksin B₁ bu parametreler üzerine yaptığı değişiklikler ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Huang ve ark., 2019; Ahmed ve ark., 2022; Altıyar ve ark., 2023). Ahmed ve ark. (2022), ROS kaynaklı karaciğer hasarında AFB₁ 200 μ g/kg vücut ağırlığı maruziyetinden sonra NF- κ B/p65 ekspresyonunda artış olduğunu bildirilmiştir. TNF- α ve NF- κ B/p65 yolları, iltihaplanma bölgesine lökositlerin toplanmasını uyaran yapışma molekülleriyle birlikte IL-6 ve iNOS dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin aktivasyonunu tetikler (Ahmed ve ark., 2022). Altıyar ve ark. (2023), sıçanlara AFB₁'in deneyin 12. ve 14. günlerinde iki kez 2,5 mg/kg dozunda oral olarak uygulamasının ardından oluşan karaciğer hasarında NF- κ B/p65 düzeyinin arttığını bildirmiştir. Huang ve ark. (2019), AFB₁'in 21gün boyunca farelere 300 μ g AFB₁ /kg vücut ağırlığı uygulamasından sonra NF- κ B/p65 düzeyinin yükseldiğini rapor etmiştir. Bu çalışmada diğer çalışmalara benzer şekilde AFB₁ verilen grupta karaciğer dokusunda kontrol grubuna göre NF- κ B/p65 düzeylerinde önemli bir artış ($p<0,05$) tespit edilmiştir, ancak böbrek dokusunda anlamlı bir artış ($p>0,05$) tespit edilmedi. Bu farkın uyguladığımız dozun ya da gün sayısının bu yolak üzerinde etki etmesi için yetersiz gelmesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Chrysin inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynayan NF- κ B yolu üzerinde inhibe edici etkiler göstermiştir (Hougee ve ark., 2005). Bu çalışmada da

chrysin uygulamasının karaciğer dokusunda artan NF- κ B/p65 ekspresyonunu aşağı yönlü regüle ettiği tespit edilmiştir. Bu araştırmanın bulguları daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. Khan ve ark. (2011), *N*-nitrosodietilamin ile oluşturdukları hepatokarsinogenezde sıçanlara 3 hafta boyunca haftada üç kez oral 250 mg/kg vücut ağırlığı chrysin uygulamasının NF κ B/p65 ekspresyonunu mRNA ve protein seviyelerinde önemli ölçüde düşürdüğünü belirtmiştir. Jiang ve ark. (2014), sıçanlarda omurilik yaralanması sonrası 26 gün boyunca 30 ve 100 mg/kg chrysin uygulamasının NF κ B/p65 ekspresyonunu anlamlı bir şekilde ($p < 0,01$) azalttığını tespit etmiştir. Yang ve ark. (2018), karboksimetilselüloz sodyum ile oluşturdukları akut miyokart enfarktüsli sıçanlara 4 hafta boyunca intragastrik uygulama yoluyla chrysin (40 mg/kg/gün) uygulamasının inhibitör kappa B kinaz β fosforilasyonunu baskılayarak NF- κ B yolunu inhibe ettiğini bildirmiştir.

Sirtuin 1, maya sessiz bilgi düzenleyicisi 2'nin (sir2) memeli homologudur ve en kapsamlı çalışılan üyesidir. Sirt 1, çeşitli substratları deasetile etme kabiliyeti nedeniyle, gen ekspresyonunun kontrolü, metabolizma, tümörijeniz ve yaşlanma dahil olmak üzere geniş bir fizyolojik fonksiyona sahiptir (Alcaín ve Villalba, 2009). Sirt 1'in hem bir tümör baskılayıcı hem de bir onkojenik faktör gibi etkilerinin olduğu belirtilmiştir (Bosch-Presegué ve Vaquero, 2011). Sirt 1, farklı insan tümörlerinde aşırı eksprese edilir ve tümör baskılayıcılarını susturmaya hizmet edebilir, böylece kanser gelişimini desteklediği bildirilmiştir (Deng, 2009). Meme kanseri (WY Chen ve ark., 2005), prostat kanseri (Huffman ve ark., 2007), kolon kanseri (Stünkel ve ark., 2007), pankreas kanseri (Zhao ve ark., 2011) artmış Sirt 1 ekspresyonu bildirilmiştir. Bunun aksine bazı çalışmalar Sirt 1'in tümör baskılayıcı olduğunu bildirmiştir. p53 bozuklukları anormal hücre bölünmesine neden olduğu için kanserleşmeye neden olur. İnsan kanserlerinin %50 den fazlasının p53 mutasyonu ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Çoğu kanser çeşidinde kanser hücrelerinde p53'ün çalışan kopyaları bulunmamaktadır. Sirtuin genlerinden Sirt 1 ve Sirt 7, p53'ü aktive etmeleri ile kanser oluşumunu engelledikleri bildirilmiştir (De Nigris ve ark., 2002). E14 lenfoma hücrelerinde resveratrol, Sirt 1'i artırır ve NF- κ B'yi aşağı yönlü regüle eder, böylece apoptozu teşvik eder ve tümör büyümesini baskılama potansiyeli gösterir (Singh ve ark., 2011). Sirt 1 insan kolon kanserine karşı koruyucu bir etkiye sahiptir ve kolon

kanserinde β – katenin sinyali sınırlayarak hücre proliferasyonunu engellediği bildirilmiştir (Firestein ve ark., 2008). Bu çalışmada da diğer çalışmalara benzer şekilde AFB₁ verilen grupta dokularda kontrol grubuna göre Sirtuin 1 düzeylerinde önemli bir artış ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Önceki çalışmalarda (Luo ve ark., 2001; Stünkel ve ark., 2007; Zhao ve ark., 2011) Sirt 1'in aşırı ekspresyonunun DNA hasarı ve oksidatif strese yanıt olarak hücre döngüsü durmasını ve apoptozu baskılayarak bir onkogenik faktör olduğu bildirilmiştir. Rawat ve ark. (2020), sıçanlara iki doz AFB₁ (1 mg/kg b.w, intraperitoneal) uygulanarak oluşturdıkları hepato karsinomda Sirt 1 ifadesinde anlamlı bir artış olduğunu ($P <0,001$) bildirmiştir. Ayrıca yüksek Sirt 1 ekspresyonu böbrek toksisitesini artırabileceğini ve Sirt 1 ekspresyonunun baskılanmasının böbrek toksisitesinde potansiyel bir tedavi olabileceğini bildirilmiştir. Literatür taramamız sonucunda AFB₁'in metabolizması sonucu Sirt 1 seviyesinin arttığına dair başka çalışma bulunmamaktadır. Yang ve ark. (2018), chrysinin sıçanlarda karragenan kaynaklı akciğer hasarı Sirt 1/NRF2 yolunu aktive edebildiğini ve akciğer dokularında adezyon molekülünün ekspresyonunu azaltabildiğini göstermiştir. Nükleer transkripsiyon faktörü eritroid-2 benzeri faktör 2 (NRF2), redoks homeostazının düzenlenmesinde ve birçok sitoprotektif protein ve antioksidan genin ekspresyonunda önemli bir rol oynar (Niture ve ark., 2014). Nükleer transkripsiyon faktörü eritroid-2 benzeri faktör 2'nin transkripsiyonel aktivitelerini teşvik ederek ve aşağı yöndeki gen ekspresyonunu, HO-1 ve GSH'yi teşvik ederek ROS seviyelerinin azalmasına neden olur (Yang ve ark., 2018). Alanazi ve ark. (2024), hepatotoksite oluşturulan sıçanlara 10 gün boyunca 50 mg/kg dozunda chrysin uygulamasının Sirt 1/NRF2 yolunu aktive ederek bu hasarı hafiflettiği bildirilmiştir. Lee ve ark. (2024), yaptıkları çalışmada chrysinin Sirt 1 ekspresyonunu indükleyerek MAPK ve NF- κ B sinyal yollarını inhibe ederek Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) kaynaklı inflamatuvar sitokin üretimini zayıflattığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmada daha önce yapılan çalışmalardan (Alanazi ve ark., 2024; Lee ve ark., 2024) farklı olarak chrysin uygulamasının Sirt 1 düzeylerinde önemli bir azalış gösterdiği ($p<0,05$) tespit edilmiştir. Bu farklılık muhtemelen chrysinin başka bir yolak üzerinden Sirt 1 düzeyini düşürerek oluşan hepatorenal hasarı hafiflettiği düşünülmektedir.

Sialik asit hücre zarında önemli görevleri olan glikoprotein ve glikolipitlerin oligosakkarit zincirlerinin son bölgelerine bağlı şeker zincirleridir. Sialik asitler karbonhidrat-protein etkileşimleri yoluyla hücrel tanırma ve iletişim, viral ve bakteriyel enfeksiyonlara aracılık etme, tümör büyümesi ve metastazında yer alma, immün yanıt oluşumunda, hücre sinyalizasyonunda, üreme biyolojisinde, nöron biyolojisinde, malignant kanserlerin ilerlemesi ve yayılması da dahil olmak üzere birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rol aldığı bildirilmektedir (Schauer ve Kamerling 2018). Sialik asitlerin biyolojik çok yönlülüğü, doğal değışikliklerden ve altta yatan glikanlara, glikokonjugatlara (N-/O-glikanlar, glikolipidler) farklı bağlantılarına atfedilir (Visser ve ark., 2021). Sialik asitlerin kronik karaciğer hastalıkları, pnömoni, romatoid artrit, böbrek hastalıkları gibi bazı hastalıklarda da serum sialik asit seviyesinde yükselme olduğu bildirilmiştir (Hekim, 2008; Öksüz ve ark., 2020). Ayrıca sialik asitler insan patojenleri için bağlanma bölgeleri olarak hizmet eder ve anormal sialoglikan ekspresyonu tümör büyümesi ve metastaz ile ilişkilendirilmiştir (Öksüz ve ark., 2020). Daha önce yapılan çalışmalar farklı hastalıklarda ve kanser çeşitlerinde sialik asit seviyelerinin arttığını göstermiştir. Arif ve ark. (2005), karaciğer sirozunda sialik asit seviyelerinin anlamlı derecede arttığını tespit etmişlerdir. Cemek ve ark. (2010) karbon tetraklorür indüklü toksisitede sialik asit düzeylerinin arttığını bildirmiştir. Hodgson ve ark. (2024) sialiltransferaz ST6GAL1 aracılı N-glikanların anormal sialilasyonunu prostat tümörü büyümesini ve hastalık ilerlemesini teşvik ettiğini ancak sialik asit blokajının prostat kanserinin kemiğe metastatik yayılmasını engellediğini rapor etmişlerdir. Ertekin ve Bildik, (1996), karbontetraklorür ile deneysel siroz oluşturulan tavşanlarda sialik asit düzeylerinin arttığını belirtmiştir. Bu araştırmada da AFB₁ ile oluşturduğumuz hepatorenal hasarda AFB₁ uygulanan grupta serum sialik seviyesinin anlamlı bir şekilde ($p<0,05$) arttığını tespit ettik. Önceki çalışmalar (Ertekin ve Bildik, (1996; Arif ve ark., 2005; Cemek ve ark., 2010; Hodgson ve ark., 2024) bu çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir. Ayrıca literatür taraması sonucu AFB₁ ile oluşturulan hasarlarda sialik asit düzeylerinin araştırıldığı başka çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapılan bazı çalışmalar flavanoidlerin yapısı gereği sialik asidin hücrel ekspresyonunun kontrolü için kullanılabileceğini bildirmiştir (Nagai ve ark., 1989; Hidari ve ark., 2009; Yoshinaga ve ark., 2016). Nagai ve ark. (1989), *Scutellaria baicalensis* yaprağından elde edilen izoscutellarein-8- O -glukuronid, 40

μM dozda uygulamasının fare karaciğerinde siyalidazının inhibe ettiğini göstermiştir. Yoshinaga ve ark. (2016), insan kanser hücrelerinde (HeLa ve A549) farklı naringin konsantrasyonlarının uygulaması ile kanser hücrelerinde sialidazı inhibe ederek kanser hücresinin büyümesini engellediğini bildirmiştir. Raja ve ark. (2018), apigenin sarkoma 180 hücre hattında artan sialik asit düzeyini düşürdüğünü bildirmiştir. Bu çalışmada chrysin uygulamasının artan serum sialik asit düzeyini düşürdüğünü tespit ettik. Daha önce yapılan benzer araştırmalarla bu araştırmanın bulguları paralellik göstermektedir. Chrysinin *in vivo* olarak sialik asit düzeyleri ile ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanılmamıştır.

Aflatoksin B₁ gibi farklı ksenobiyotiklerin neden olduğu organ hasarlarını, biyokimyasal parametrelerin düzeyleri ölçülerek tanı konulmaktadır. Karaciğer hasarında serum ALT, AST ve GGT enzim etkinliklerinde artışlar (Jayabalan ve ark., 2010); böbrek hasarında ise kreatinin ve üre düzeylerinde artışlar meydana gelir (Kamal, 2014). AST ve ALT kan düzeyleri karaciğer hücre zarı hasar gördüğünde artar hepatosellüler hasarı işaret eder. GGT karaciğer ve safra epitel hücrelerinde bulunur ve hepatobiliyer hastalığın hassas bir belirtecidir. Ayrıca GGT oksidatif stresin bir belirteci olarak da işlev görmektedir (van Beek ve ark., 2013). Serumda AST, ALT ve GGT enzim etkinlikleri, üre ve kreatinin AFB₁'in metabolizması sonucu indüklediği doku hasarına bağlı artan parametrelerdir. AFB₁'in bu parametreler üzerine yaptığı değişiklikler ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Preetha ve ark., 2006; Naaz ve ark., 2014; Rotimi ve ark., 2016; Rotimi ve ark., 2018; Wang ark., 2020; AbdelDaim ve ark., 2021; Xu ve ark., 2021; Hatipoğlu ve Keskin, 2022; Altyar ve ark., 2023). Altyar ve ark. (2023), Sıçanlara 2,5 mg/kg vücut ağırlığı iki kez dozunda oral yolla, Rotimi ve ark. (2016), sıçanlara (40 ppb) oral yolla, Preetha ve ark. (2006), sıçanlara (1 mg/kg/ vücut ağırlığı) 7 gün boyunca oral yolla, Wang ark. (2020), domuzlara (250 ila 800 ppb) oral yolla, Xu ve ark. (2021), fare 30 gün boyunca intragastrik uygulama yoluyla (0, 0.375, 0.75 ve 1,5 mg/kg vücut ağırlığı) AFB₁'e maruz bırakıldığında serum AST, ALT ve GGT enzimlerinin etkinliğinde önemli artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da diğer çalışmalara (Rotimi ve ark., 2016; Wang ark., 2020; AbdelDaim ve ark., 2021; Xu ve ark., 2021) benzer şekilde AFB₁ uygulanan grupta kontrol grubu

ile karşılaştırıldığında serum ALT, AST ve GGT değerlerinde önemli ($P<0,05$) düzeyde bir artış olduğu belirlenmiştir.

Klinik olarak böbrek fonksiyonunu izlemek için kan üre nitrojeni (BUN) ve kreatinin kullanılır. Bu maddeler böbrekler tarafından atılan normal metabolik atık ürünlerdir. BUN, kandaki üre nitrojen miktarını ölçen böbrek ve canlı fonksiyonun ölçümüdür. BUN böbreğin boşaltım fonksiyonuyla doğrudan ilgilidir. Kreatinin testleri böbrek fonksiyon bozukluğunu teşhis eder ve kandaki kreatinin fosfat miktarını ölçer (Kamal, 2014). Aflatoksine bağlı oksidatif stresin renal vazokonstriksiyona sebep olduğu ve glomerüler kılcal ultrafiltrasyon katsayısını azalttığı ve dolayısıyla glomerüler filtrasyon hızının azalması nedeniyle böbrek fonksiyonunu doğrudan etkileyebilecek farklı vazoaktif medyatörlerin oluşumuna neden olduğu rapor edilmiştir (Garcia-Cohen ve ark., 2000). AFB₁ ve metabolitlerinin, nefronun aflatoksinlere duyarlı farklı kısımlarında vücuttan atılmadan önce nefrotoksisiteye neden olduğu bildirilmiştir (Sharma ve ark., 2011). Naaz ve ark. (2014), farelere 90 gün boyunca (66,60 µg/kg vücut ağırlığı/gün) dozunda oral yoldan, AbdelDaim ve ark., (2021) AFB₁ 14gün boyunca (50 µg/kg, i.p.), Hatipoğlu ve Keskin, (2022) sıçanlara (250 µg/kg) 60 gün boyunca oral yolla, Rotimi ve ark. (2018), sıçanlara (40 ppb) sekiz hafta boyunca diyetle AFB₁'in uygulamasının BUN ve kreatinin düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada araştırma grupları arasında kreatinin, BUN değerlerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. AFB₁ maruziyetinin etkileri doza ve uygulama süresine bağlıdır (Shen ve ark., 1994; Aleissa ve ark., 2020). Bu çalışmanın diğer araştırma sonuçlarından farklı olması AFB₁ (0.5 mg/kg/c.a/gün) 7 gün boyunca deney gruplarına verilmesi ya doz olarak yada verilen gün sayısının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Mohammadi ve ark. (2019), chrysinin akut asetaminofen kaynaklı hepatotoksisite üzerindeki koruyucu etkisini araştırıldığı çalışmada 14 gün boyunca 40 mg/kg chrysin uygulamasının ALT ve AST karaciğer enzim seviyelerini azalttığını ($p < 0,05$) tespit etmişlerdir. Baykalir ve ark. (2020), sıçanlarda karbon tetraklorürün neden olduğu karaciğer ve böbrek dokusu hasarına karşı chrysinin koruyucu etkilerinin araştırıldığı çalışmada 14 gün boyunca 100 mg/kg/c.a chrysin uygulamasının AST, ALT, üre ve kreatinin düzeyleri ($p < 0,05$) anlamlı düzeylerde

düşürdüğü bildirilmiştir. Pushpavalli ve ark. (2010), Wistar albino sıçanlarında d - galaktozamin indüklü hepatotoksositeye karşı chrysin (25, 50 ve 100 mg/kg/ c.a.) uygulamasının hepato ve nefro toksisite biyobelirteçleri olan AST, ALT, GGT, üre, kreatin düzeylerini düşürdüğünü rapor etmişlerdir. Coşkun ve ark. (2021), ratlarda kurşun asetat kaynaklı karaciğer hasarı üzerine chrysinin etkilerinin araştırıldığı çalışmada chrysin (50 mg /kg/ bw) 7 gün boyunca uygulamasının AST, ALT enzim etkinliğini azalttığını tespit etmiştir. Ramanathan ve ark. (2014), hipertansif sıçanlara chrysinin 25 mg/kg c.a./gün 4 hafta boyunca uygulamasının karaciğer enzimlerini (GGT, AST) düşürdüğünü bildirmiştir. Bu araştırmada yapılan diğer çalışmalar (Pushpavalli ve ark., 2010; Ramanathan ve ark., 2014; Mohammadi ve ark., 2019; Baykalir ve ark., 2020; Coşkun ve ark., 2021) ile paralelik gösterip chrysin uygulamasının AST, ALT ve GGT seviyelerinde anlamlı ($p < 0.05$) şekilde azalma görüldüğü tespit edildi.

Aflatoksin B₁'in karaciğerdeki metabolizma süreci hepatositlerde lipid peroksidasyonuna neden olur. Karaciğer ve böbrek dokularının tipik histolojik özelliklerindeki değişiklikler, AFB₁'in toksisitelerinin değerlendirilmesinde klinik açıdan önemlidir. Kupffer hücreleri ve intraglomerüler mesangial hücreler karaciğer ve böbrekte aktive olur, çoğalır ve proinflamatuvar fenotiplere farklılaşır. Bu hücreler, hepatositlerde ve nefronlarda çeşitli inflamasyon belirteçlerinin ortaya çıkmasına ve hücrenin özelliklerini kaybetmesine neden olur (Owumi ve ark., 2023). Sitokrom CYP450 enzim sisteminin aktivasyonu, oksidatif stres hasarına ve apoptoza neden olabilecek büyük miktarda ROS ürettiği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2020). AFB₁'in karaciğerde tıkanıklığa, renk değişikliğine, şişmeye ve nekroza neden olduğunu ayrıca kronik ve akut karaciğer hücre hasarını indüklediği rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2010). AFB₁, sitokrom P-450 monooksijenazlar tarafından hücrel makromoleküllere bağlanan ve karaciğerin periportal bölgelerinde hasara neden olan reaktif AFB₁-8,9-epoksite metabolize edilir. AFB₁-8,9-epoksit, AFB₁-N7-guanin eklentisini oluşturmak için DNA'ya kolayca bağlanabilir veya glutatyonla konjuge değilse AFB₁-albümin üretmek için albüminle reaksiyona girebilir. Bu hasar, kanama, parankimal hücre nekrozu ve intrahepatik safra kanallarında yaralanma şeklinde kendini gösterir (Lin ve ark., 2012; Lin ve ark., 2014; Lu ve ark., 2017). Çalışmamızda yapılan histopatolojik

incelemeler sonucunda tek başına AFB₁ uygulanan grupta, karaciğerde şiddetli hiperemi, yer yer mikrokkanamalar, kupffer hücre proliferasyonları, hepatositlerde yağlanma, dejenerasyon ve nekrozlar ile bazılarında megalokaryozis ve çift çekirdek oluşumları dikkati çekti. Böbrek dokusunda da hiperemi, bazı hayvanlarda küçük kanama odakları görüldü. Glomeruslarda büzüşmeler ve glomerülosklerozis tabloları dikkati çekti. Tubullerde genişlemeler, epitellerde dökülmeler ve megalokaryozise rastlandı. AFB₁ ile yapılan başka *in vivo* çalışmalarda, bizim bulgularımıza benzer histopatolojik bulgular tespit edilmiştir (Chen ve ark. 2010; Lu ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2020; Hatipoğlu ve Keskin, 2022). Rotimi ve ark. (2017), (0.25, 0.5 ve 1 mg/kg vücut ağırlığı) AFB₁ uygulamasının hepatik lobüllerde minimal tıkanıklığa, az sayıda makrovezikül ile mikroveziküler dejenerasyona yol açtığını rapor etmişlerdir. 0,5 mg/kg AFB₁ ile tedavi edilen sıçanların karaciğeri, sinüzoid ve damarlarda tıkanmanın yanı sıra porta üçlüsü etrafındaki inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu hasar oluştuğunu belirtmiştir. AFB₁'e maruz kalma, ROS varlığını artırarak antioksidan savunma sisteminin bozulmasına ve böbreklerde nefrotoksisiteye neden olur. Ayrıca tübüler lümen tıkanıklığına, tübüler epitelyumun dejenerasyonuna, glomerüler bazal membranın kalınlaşmasına neden olduğu bildirilmiştir (Hatipoğlu ve Keskin, 2022). AFB₁ (50 µg/kg, ip) verilen sıçanların karaciğerinde piknotik hepatositlerin yağlı dejenerasyonu, damar tıkanıklığını ve inflamatuvar alanların gözlendiği belirtilmiştir. Böbreklerinde ise glomerüler atrofi, proksimal tübüllerde dejenerasyon, tübüler dilatasyon gözlenmiştir (Abdel-Daim ve ark., 2021). Owumi ve ark. (2020), AFB₁ 75 µg/kg vücut ağırlığı uygulanan sıçanların böbreklerinde şiddetli yaygın tübüler nekroz, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve yayılmış segmental glomerüler nekroz görülmüştür. Karaciğerlerinde ise belirgin yayılmış portal fibrozis, tıkanıklık, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve nekroz görülmüştür. Abdel-Wahhab, (2015), AFB₁'in kovalent eklentiler oluşturabilen toksin moleküllerinden kaynaklanan mutajenitesi, DNA replikasyonunun bozulmasına neden olabileceği ve AFB₁ kaynaklı hepatokarsinogenezin başlatılmasında bir adım olabileceğini rapor etmiştir.

Aflatoxin B₁'in mitokondriyal ROS oluşumunu uyarıp, mitokondriyal membran potansiyelini azaltır ve primer broyler hepatositlerinde apoptozu indükler. AFB₁, apoptotik hücrelerin yüzdesini kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonunu arttırdığı

gösterilmiştir (Liu ve Wang, 2016). Kaspazlar, çok hücreli organizmalarda yüksek oranda korunan ve apoptozun merkezi düzenleyicileri olarak işlev gören, sisteinil aspartata özgü proteazlardır (D'amelio ve ark., 2010). Kaspaz-3, hücrenin parçalanması ve apoptotik cisimciklerin oluşumu ile ilişkili belirli süreçler için gereklidir. Kaspaz-9 apoptozun başlaması için gereklidir (Porter ve Jänicke, 1999; Li ve ark., 2017). AFB₁ uygulaması ile kaspaz-3 ve kaspaz-9, ekspresyonunun yükseldiği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2021). AFB₁ (75 µg/kg vücut ağırlığı) uygulanan sıçanların böbrek ve karaciğerinde kaspaz-3 aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Owumi ve ark., 2020). Wang ve ark. (2022), AFB₁ (750 µg/kg canlı ağırlık) uygulanan BALB/c farelerinde Kaspaz-3, Kaspaz-9 ekspresyonunun anlamlı bir şekilde arttığını belirtmiştir. Çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA), replikasyon ve onarım mekanizmasının bir bileşeni olarak nükleik asit metabolizmasında önemli bir rol oynar (Kelman,1997). Qin ve ark. (2016), AFB₁ uygulanan rat (1 mg/kg) karaciğerinde nekroz ve hücre çoğalmasının bir belirteci olarak kullanılan PCNA ekspresyonunun bariz bir şekilde arttığını gözlemlemiştir. Abdel-Daim ve ark. (2021), AFB₁ (50 µg/kg, ip) uygulanan sıçanlarda hepatorenal hasar oluşturup karaciğer ve böbrek dokularındaki DNA hasarı PCNA'nın aşırı ekspresyonunu rapor etmişlerdir. Altyar ve ark. (2024), Wistar albino sıçanlarına AFB₁ uygulayarak oluşturulan hepatotoksisite de DNA hasarını gösteren PCNA ekspresyonunun arttığını göstermiştir. Singh ve ark. (2015), AFB₁ ile tedavi edilen sıçanların karaciğerinde proinflamatuvar sitokinlerin ve PCNA'nın aşırı ekspresyonunu rapor etmiştir. Çalışmamızda yapılan immunohistokimyasal incelemeler sonucunda AFB₁ uygulanan grupta kaspaz-3, kaspaz-9, PCNA ve Ki-67 ekspresyonlarının arttığını gözlemledik. Ki-67 proteininin ekspresyonu hücre proliferasyonu ile ilişkilidir. Ki-67 proteininin hücre döngüsünün tüm aktif fazları (G1, S, G2 ve mitoz) sırasında mevcut olması ancak dinlenme hücrelerinde bulunmaması (G0) onu hücre döngüsünün belirlenmesinde bir belirteç haline getirir. Ki-67 antijeni çoğalan tüm hücrelerde (normal ve tümör hücreleri) mevcut olduğundan, bu yapının varlığının belirli bir hücre popülasyonunun büyüme fraksiyonunu belirlemek için bir belirteçtir. Bu nedenle Ki-67 proteinine karşı antikolar, farklı neoplazm türlerinde teşhis aracı olarak kullanılmaya başlandığı rapor edilmiştir (Scholzen ve Gerdes, 2000). Ki-67 proteini patolojide kullanılan önemli bir proliferasyon belirtecidir. Kanseri dokusuna özgü belirteçlerle desteklenen Ki-67, tanı

ve prognoz için genel bir gösterge görevi görür (Uxa ve ark., 2021). Literatür taraması sonucu AFB₁ uygulaması ile Kİ-67 bakılan araştırmalara rastlanılmamıştır.

Bilimsel araştırmalar, fitokimyasalların, AFB₁'in biyotransformasyonu yoluyla detoksifikasyon yolunu indükleyebildiğini ve AFB₁'in insan vücuduna verdiği zararı azalttığını bildirmiştir (Fan ve ark., 2021). Sağlığa faydalı olan fitokimyasalların alınması, karaciğer hasarını belirli bir dereceye kadar etkili bir şekilde hafifletebilir ve karaciğer sirozu, karaciğer kanserini önleyebilir. Çeşitli çalışmalar, bitkilerden elde edilen biyoaktif bileşenlerin, AFB₁'in karaciğer (Wang ve ark., 2018), böbrek (Hatipoğlu ve Keskin, 2022), üzerindeki hasarını hafifletebildiğini göstermiştir. Al-Shahari ve ark. (2022), quercetin'in hepatositlerin antioksidan savunma sistemini güçlendirerek ve lipid peroksidasyon düzeyini inhibe ederek karaciğeri koruyabileceğini bildirmiştir. Rastogi ve ark. (2001), AFB₁ ile zehirlenmiş sıçanlarda (2 mg/kg/gün, 6 hafta) silimarinin uygulamasının (20 mg/kg/gün, 14 gün), lipid peroksit ve enzimatik antioksidan düzeylerini normale yakın seviyelere getirebildiğini bildirmiştir. Karaca ve ark. (2021), AFB₁ verilen ratlarda (0,5 mg/kg/gün, 7 gün) likopen uygulamasının (5 mg/kg/gün, 15 gün) hepatositlerde koruyucu etki gösterdiğini rapor etmiştir. AFB₁ (80 µg/kg b.w.) gavaj yoluyla uygulamasından sonra quersetin (50mg/kg b.w.) uygulamasının serbest radikallerinin, inflamatuvar sitokinlerin azaltılması, antioksidan kapasitesinin artırılması ve antioksidan gen ekspresyonu korumayı içeren mekanizmalar yoluyla bu toksik etkiyi azalttığı bildirilmiştir (Abdel-Wahhab, 2015).

Bu çalışmada AFB₁'in neden olduğu hepatotoksik ve nefrotoksik etkilere karşı bir fitokimyasal olan chrysin uygulaması ile iyileşme sağlandığı ve bu iyileşmenin *in vivo* olarak çeşitli araştırmalarla paralellik gösterdiği ortaya konulmuştur (Zhang ve ark., 2004; Woo ve ark., 2004). Zhang ve ark. (2004), chrysin ve türevlerinin dietil chrysin-7-il fosfat (CPE: C₁₉H₁₉O₇P) ve chrysin tetraetil bis-fosforik esterinin (CP: C₂₃H₂₈O₁₀P₂) insan servikal karsinomunda potansiyel anti-kanser etkileri sergilediğini göstermiştir. Bu çalışmada, chrysin ve fosforile chrysin, servikal kanser hücrelerinin (HeLa) büyümesini, apoptoz indüksiyonu yoluyla etkili bir şekilde inhibe ettiği ve hücrelerde çoğalan PCNA ekspresyonunu aşağı yönlü düzenlendiğini göstermiştir. Woo ve ark. (2004), chrysinin kaspaz-3'ün aktivasyonu ile ilişkili olarak

apoptozu indüklediğini, U937 hücrelerinde apoptoz proteini inhibitörünün (XIAP) sinyal ve aşağı regülasyonunu içeren aktivasyonuna yol açtığını bildirmiştir. Khoo ve ark. (2010), Chrysin'in kanser hücrelerinde proliferasyonu engellediği ve hücrelerde kaspazların aktivasyonunu engellediği belirtilmiştir. Gur ve ark. (2022), aktif merkezlerinde sistein kalıntıları bulunan ve aspartata özgü olan kaspazlar apoptotik sürecin merkezinde yer alan proteolitik enzimlerdir. Mitokondri tarafından üretilen serbest radikallerin sitokrom c salınımına ve bu da kaspaz-9 aktivasyonuna neden olur. Kaspaz-9 aktivasyonu ile apoptozun en önemli belirteçlerinden biri olan kaspaz-3 etkin hale gelmektedir. Chrysinin Kaspaz-3 ekspresyonlarını baskılayarak koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda Ch+AFB₁ grubunda chrysin uygulaması kaspaz-3, kaspaz-9, PCNA, KI-67 ekspresyonlarını azalttığı saptandı. Coşkun ve ark. (2021), kurşun asetat kaynaklı karaciğer hasarı üzerine chrysinin etkilerinin araştırıldığı çalışmada chrysin'in antioksidan etki göstererek karaciğer üzerinde koruyucu etki gösterir. Seven ve ark. (2018), chrysin tedavisinin bakır uygulanan sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında dejenerasyon, nekroz ve apoptozu hafiflettiğini belirtmiş. Chrysin'in serbest radikalleri temizleyerek ve antioksidanların aktivitesini artırarak karaciğer ve böbrek dokuları üzerindeki hasarı iyileştirdiğini rapor etmiştir. Temel ve ark. (2020), Sıçanlarda Siklofosamid kaynaklı hepatotoksisite ve nefrotoksisiteye karşı chrysin'in koruyucu rolünün araştırıldığı çalışmada chrysinin inflamatuvar, apoptotik ve otofajik parametrelerin seviyelerini düşürüp antioksidan enzim seviyesini artırarak hepatorenal toksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiğini belirtmiştir. Çalışmamızda AFB₁ uygulanarak oluşturulan hepatorenal hasarın chrysinin ile tedavi edilmesinden sonra bu hasarın hafiflediğini gözlemledik.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırma bulgulara bağlı olarak, 0,5 mg/kg/c.a dozunda uygulanan AFB₁ ROS'ların indüklediği doku hasarı sonucunda lipid peroksidasyona, antioksidan savunma sisteminin etkinliğinde azalmaya, sitokinlerin seviyelerinde artmaya, yangısal enzimlerin etkinliğinde artışa yol açtığı belirlenmiştir. Ayrıca AFB₁'in immunohistokimyasal ve histopatolojik değişikliklere (kaspaz-3, kaspaz-9, KI-67, PCNA ekspresyonlarında artışa) neden olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan 25 mg/kg c.a chrysin uygulamasının AFB₁'in yol açtığı biyokimyasal ve histopatolojik değişiklikleri önlediği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, chrysinin AFB₁ ile indüklenen karaciğer ve böbrek hasarlarına karşı antioksidan, antiinflamatuvar ve antikanser bir ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

Abdel-Daim MM, Abdeen A, Jalouli M, Abdelkader A, Megahed A, Alkahtane A, Aleya L (2021). Fucoïdan supplementation modulates hepato-renal oxidative stress and DNA damage induced by aflatoxin B1 intoxication in rats. *Sci. Total Environ.*, **768**, 144781.

Abdelhady DH, El-Abasy MA, Abou-Asa SSE, Elbialy ZI, Shukry M, Hussein AH, El-Magd MA (2017). The ameliorative effect of *Aspergillus awamori* on aflatoxin B1-induced hepatic damage in rabbits. *World Mycotoxin J.*, **10(4)**, 363-373.

Abdel-Wahhab MA, Aljawish A, El-Nekeety AA, Abdel-Aiezm SH, Abdel-Kader HA, Rihn BH, Joubert O (2015). Chitosan nanoparticles and quercetin modulate gene expression and prevent the genotoxicity of aflatoxin B1 in rat liver. *Toxicol. Rep.*, **2**, 737-74.

Adak AK, Yu CC, Liang CF, Lin CC (2013). Synthesis of sialic acid-containing saccharides. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **17(6)**, 1030-1038.

Adams OJ, Stanczak MA, von Gunten S, Läubli H (2018). Targeting sialic acid–Siglec interactions to reverse immune suppression in cancer. *Glycobiology.*, **28(9)**, 640-647.

Ahmed N, El-Rayes SM, Khalil WF, Abdeen A, Abdelkader A, Youssef M, Shanab O (2022). Arabic gum could alleviate the aflatoxin B1-provoked hepatic injury in rat: the involvement of oxidative stress, inflammatory, and apoptotic pathways. *Toxins.*, **14(9)**, 605.

Alanazi ST, Salama SA, El-Ebiary AM, Altowairqi AK, Alharthi AT, Alzahrani SM, Tammam AAE (2024). Targeting SIRT1, NLRP3 inflammasome, and Nrf2 signaling with chrysin alleviates the iron-triggered hepatotoxicity in rats. *Toxicology.*, **504**, 153766.

Albadrani GM, Altyar AE, Kensara OA, Haridy MA, Zaazouee MS, Elshanbary AA, Abdel-Daim MM (2024). Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-DNA damage effects of carnosic acid against aflatoxin B1-induced hepatic, renal, and cardiac toxicities in rats. *Toxicol. Res.*, **13(3)**, tfae083.

Alcaín FJ, Villalba JM (2009). Sirtuin inhibitors. Expert opinion on therapeutic patents., **19(3)**, 283-294.

Aleissa MS, Alkahtani S, Abd Eldaim MA, Ahmed AM, Bungău SG, Almutairi B, Abdel-Daim MM (2020). Fucoïdan ameliorates oxidative stress, inflammation, DNA damage, and hepatorenal injuries in diabetic rats intoxicated with aflatoxin B1. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2020(1)**, 9316751.

Ali N, Rashid S, Nafees S, Hasan SK, Sultana S (2014). Beneficial effects of Chrysin against Methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis., *Mol. Cell. Biochem.*, **385**, 215-223.

Al-Shahari EA, El-Kott AF, Abdelaal K, Alm-Eldeen AA (2022). Quercetin modulates aflatoxin B1 induced hemato-biochemical alterations and oxidative stress in rats. *Parameters.*, **1(G2)**, G3.

Altyar AE, Kensara OA, Sayed AA, Aleya L, Almutairi MH, Zaazouee MS, Abdel-Daim MM (2023). Acute aflatoxin B1-induced hepatic and cardiac oxidative damage in rats: Ameliorative effects of morin. *Heliyon.*, **9(11)**, 2405-8440

Anand KV, Mohamed Jaabir MS, Thomas PA, Geraldine P (2012). Protective role of chrysin against oxidative stress in d-galactose-induced aging in an experimental rat model. *Geriatr. Gerontol. Int.*, **12(4)**, 741-750.

Arif S, Hanif R, Khan AS, Mufti TA (2005). Variations of serum sialic acid level in liver cirrhosis. *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad.*, **17(3)**, 116–124.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2014(1)**, 360438.

Bae Y, Lee S, Kim SH (2011). Chrysin suppresses mast cell-mediated allergic inflammation: involvement of calcium, caspase-1 and nuclear factor- κ B. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **254(1)**, 56-64.

Bakırcı GT (2014). Tahıl ve tahıl ürünlerinin aflatoksin, okratoksin a, zearalenon, fumonisin ve deoksinivalenol mikotoksinleri yönünden incelenmesi. *Akademik Gıda.*, **12(2)**, 46-56.

Baykalir BG, Arslan AS, Mutlu SI, Ak TP, Seven I, Seven PT, Gul HF (2020). The protective effect of chrysin against carbon tetrachloride-induced kidney and liver tissue damage in rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, **1-12**

Bosch-Presegué L, Vaquero A (2011). The dual role of sirtuins in cancer. *Genes cancer.*, **2(6)**, 648-662.

Boulton DW, Walle UK, Walle T (1998). Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J. Pharm. Pharmacol.*, **50(2)**, 243-249.

Bronze MR, Figueira ME, Mecha E (2012). *Flavonoids and its contribution to a healthier life*. In: Kazuya Yamane, Yuudai Kato (eds.), Handbook on Flavonoids: Dietary sources, properties and health benefits, USA: Nova Biomedical P:197-247.

Brown E, Hurd NS, McCall S, Ceremuga TE (2007). Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin, a Passiflora incarnata extract, in the laboratory rat. *AANA J.*, **75(5)**, 333-7.

Bullerman LB (1979). Significance of mycotoxins to food safety and human health. *J. Food Prot.*, **42(1)**, 65-86.

Butler WH (1964). Acute toxicity of aflatoxin B1 in rats. *Br. J. Cancer.*, **18(4)**, 756.

Carafa V, Nebbioso A, Altucci L (2012). Sirtuins and disease: the road ahead. *Front Pharmacol.*, **3**, 4.

Cemek M, Aymelek F, Büyükokuroğlu ME, Karaca T, Büyükben A, Yilmaz F (2010). Protective potential of Royal Jelly against carbon tetrachloride induced-toxicity and changes in the serum sialic acid levels. *FCT.*, **48(10)**, 2827-2832.

Chang H, Mi MT, Gu YY, Yuan JL, Ling WH, Lin H (2007). Effects of flavonoids with different structures on proliferation of leukemia cell line HL-60. *Ai. Zheng.*, **26(12)**, 1309-1314.

Chichester CO, Mrak EM, Stewart GF (1964). Advances in food research. *Adv. Nutr.*, **13**.

Chrostek L, Cylwik B, Panasiuk A, Brodowska-Adamusiak D, Gruszevska E (2016). Lipid-bound sialic acid (LSA) in liver diseases of different etiologies. *Ann. Hepatol.*, **10(2)**, 150-154.

Clifford JI, Rees KR (1967). The action of aflatoxin B1 on the rat liver. *Biochem. J.*, **102(1)**, 65.

Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Berghe DV (1998). Structure– activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.*, **61(1)**, 71-76.

Coşkun P, Benzer F, Kandemir F, Yıldırım S, Küçükler S (2021). Ratlarda kurşun asetat kaynaklı karaciğer hasarı üzerine Chrysin'in etkilerinin araştırılması. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi.*, **8(2)**, 250-261.

Crespy V, Morand C, Besson C, Cotellet N, Vézin H, Demigné C, Rémésy C (2003). The splanchnic metabolism of flavonoids highly differed according to the nature of the compound. *Am.J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, **284(6)**, G980-G988.

Çelik S (2001). Karaciğer karsinojeni olan aflatoksinlerin biyokimyasal, histolojik etkileri ve sağaltım seçenekleri. *Uludağ Univ. Vet. Fak. Derg.*, **20(3)**, 131-136.

Çomaklı S, Özdemir S, Güloğlu M (2023). Chrysin attenuates paclitaxel-induced hepatorenal toxicity in rats by suppressing oxidative damage, inflammation, and apoptosis. *Life Sci.*, **332**, 122096.

D'amelio M, Cavallucci V, Cecconi F (2010). Nöronal kaspaz-3 sinyali: yalnızca hücre ölümü değil. *Hücre Ölümü ve Farklılaşması.*, **17 (7)**, 1104-1114.

De Nigris F, Cerutti J, Morelli C, Califano D, Chiariotti L, Viglietto G, Santelli G, Fusco A (2002). Isolation of a SIR-like gene, SIR-T8, that is overexpressed in thyroid carcinoma cell lines and tissues. *Br. j. cancer.*, **86(6)**, 917-923.

De Vries JH, Janssen PLTMK, Hollman PC, van Staveren WA, Katan MB (1997). Consumption of quercetin and kaemferol in free-living subjects eating a variety of diets. *Cancer Lett.*, **114(1-2)**, 141-44.

Decker K (1972). Galactosamine induced liver injur. *Pharmacology. Comp. Biochem. Physiol.*, 71.

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 15(4), 316-328.

Demir EA, Mentese A, Demir S, Küçük H, Türkmen N, Aliyazıcıoğlu Y (2023). Evaluation of therapeutic effect of chrysin against 5-fluorouracil-induced ovarian damage in rats. *Farabi Med. J.*, 2(1), 1-7.

Demirkapi EN, Ince S, Demirel HH, Arslan-Acaroz D, Acaroz U (2023). Polydatin reduces aflatoxin-B1 induced oxidative stress, DNA damage, and inflammatory cytokine levels in mice. *ESPR.*, 30(27), 70842-70853.

Deng J, Zhao L, Zhang NY, Karrow NA, Krumm CS, Qi DS (2018). AflatoksinB1 metabolism: Regulation by phase I and II metabolizing enzymes and chemoprotective agents. *Mutat. Res.*, 778 (2018), 79-89.

Ekwomadu T, Mwanza M, Musekiwa A (2022). Mycotoxin-linked mutations and cancer risk: A global health issue. *IJERPH.*, 19(13), 7754.

Ercan N, Fidancı UR (2012). Piyodermalı köpeklerde idrarda 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri. *Ank. Univ. Vet. Fak. Derg.*, 59(3), 163-168.

Erlund I (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res. Rev.*, 24(10), 851-874.

Ertekin A, Bildik A (1996). Karbontetraklorür ile deneysel siroz oluşturulan tavşanlarda sialik asit, lipid-bağlı sialik asit, total protein ve bazı spesifik karaciğer enzimlerinin aktivitelerinin araştırılması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi.*, 3(1), 52-57.

Fan T, Xie Y, Ma W (2021). Research progress on the protection and detoxification of phytochemicals against aflatoxin B1-Induced liver toxicity. *Toxicon.*, 195, 58-68.

Farkhondeh T, Samarghandian S, Roshanravan B (2019). Impact of chrysin on the molecular mechanisms underlying diabetic complications. *J. Cell. Physiol.*, 234(10), 17144-17158.

Farkhondeh T, Samarghandian S, Bafandeh F (2019). The cardiovascular protective effects of chrysin: a narrative review on experimental researches. *Cardiovascular Hematological Agents in Medicinal Chemistry.*, 17(1), 17-27.

Farkhondeh T, Samarghandian S, Roshanravan B (2019). Impact of chrysin on the molecular mechanisms underlying diabetic complications. *J. Cell. Physiol.*, 234(10), 17144-17158.

Fatoba ST, Okorokov AL (2011). Human SIRT1 associates with mitotic chromatin and contributes to chromosomal condensation. *Cell Cycle.*, **10(14)**, 2317-2322.

Firestein R, Blander G, Michan S, Oberdoerffer P, Ogino S, Campbell J, Bhimavarapu A, Luikenhuis S, de Cabo R, Fuchs C, Hahn WC, Guarente LP, Sinclair DA (2008). The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One.*, **3(4)**, e2020.

Forman HJ, Zhang H (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **20(9)**, 689-709.

Friedmann-Morvinski D, Narasimamurthy R, Xia Y, Myskiw C, Soda Y, Verma IM (2016). Targeting NF- κ B in glioblastoma: A therapeutic approach. *Sci. Adv.*, **2(1)**, e1501292.

Gadioli IL, da Cunha MDSB, de Carvalho MVO, Costa AM, Pineli LDLDO (2018). A systematic review on phenolic compounds in Passiflora plants: Exploring biodiversity for food, nutrition, and popular medicine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **58(5)**, 785-807.

Garcia-Cohen EC, Marin J, Diez-Picazo LD, Baena AB, Salaices M, Rodriguez-Martinez MA (2000). Oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide causes vasoconstriction in the aorta from hypertensive and aged rats: role of cyclooxygenase-2 isoform. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **293(1)**, 75-81.

Gardner I, Popović M, Zahid N, Uetrecht JP (2005). A comparison of the covalent binding of clozapine, procainamide, and vesnarinone to human neutrophils in vitro and rat tissues in vitro and in vivo. *Chem. Res. Toxicol.*, **18(9)**, 1384-1394.

Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, Alt FW, Wu Z, Puigserver P (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 α . *The EMBO j.*, **26(7)**, 1913-1923.

Gewies A (2003). Introduction to apoptosis. *Aporeview.*, 1–26.

Girgin G, Başaran N, Şahin G (2001). Dünyada ve Türkiye de İnsan Sağlığını Tehdit Eden Mikotoksinler. *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi.*, **58(3)**, 97-118.

Guerrero FA, Medina GM (2017). Effect of a medicinal plant (Passiflora incarnata L) on sleep. *Sleep. Sci.*, **10(3)**, 96.

Gumus R, Ercan N, Imik H (2018). Determination of ochratoxin A levels in mixed feed and feed stuffs used in some laying hens and ruminant enterprises of Sivas City. *Braz. J. Poult. Sci.*, **20**, 85-90.

Gur C, Kandemir O, Kandemir FM (2022). Evaluation of the effects of chrysin on diclofenac-induced cardiotoxicity in rats by the markers of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Kocatepe Vet. J.*, **15**, 151-160.

Harris GK, Qian Y, Leonard SS, Sbarra DC, Shi X (2006). Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin-E2 formation in RAW 264.7 cells. *J. Nutr.*, **136(6)**, 1517-1521.

Hassaneen NH, Hemeda SA, El Nahas AF, Fadel SE, El-Diasty EM (2023). Ameliorative effects of camel milk and silymarin upon aflatoxin B1 induced hepatic injury in rats. *Sci. Rep.*, **13(1)**, 15092.

Hatipoğlu D, Keskin E (2022). Ameliorative effects of curcumin on aflatoxin b1-induced nephrotoxicity in wistar-albino rats. *Vet. Fak. Derg.*, **11(1)**, 1-1.

Hekim K (2008). Egzersizde oksidatif stres ve siyalik asit düzeyleri. Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Denizli, Türkiye.

Hidari KI, Oyama KI, Ito G, Nakayama M, Inai M, Goto S, Suzuki T (2009). Identification and characterization of flavonoids as sialyltransferase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **382(3)**, 609-613.

Hodek P, Trefil P, Stiborová M (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact.*, **139(1)**, 1-21.

Hodgson K, Orozco-Moreno M, Goode EA, Fisher M, Garnham R, Beatson R, Munkley J (2024). Sialic acid blockade inhibits the metastatic spread of prostate cancer to bone. *EBioMedicine.*, **104**, 105163.

Hougee S, Sanders A, Faber J, Graus YM, van den Berg WB, Garssen J, Oijer MA (2005). Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochem. pharmacol.*, **69(2)**, 241-248.

Huang L, Zhao Z, Duan C, Wang C, Zhao Y, Yang G, Li S (2019). Lactobacillus plantarum C88 protects against aflatoxin B 1-induced liver injury in mice via inhibition of NF-κB-mediated inflammatory responses and excessive apoptosis. *BMC microbiol.*, **19**, 1-9.

Ismail AA, Papenbrock J (2015). Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. *Agriculture.*, **5(3)**, 492-537.

Iyer RS, Coles BF, Raney KD, Thier R, Guengerich FP, Harris TM (1994). DNA adduction by the potent carcinogen aflatoxin B1: mechanistic studies. *J. Am. Chem. Soc.*, **116(5)**, 1603-1609.

İnci A, Bişkin Z (2007). Toll-like reseptörler ve protozoon enfeksiyonlarındaki rolleri. *Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **4(2)**, 121-129.

Jaruga P, Rodriguez H, Dizdaroglu M (2001). Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyadenosine in DNA by liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Radical Biol. Med.*, **31(3)**, 336-344.

Jayabalan R, Baskaran S, Marimuthu S, Swaminathan K, Yun SE (2010). Effect of Kombucha tea on Aflatoxin B 1 induced acute hepatotoxicity in albino rats-prophylactic and curative studies. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.*, **53**, 407-416.

Jiang Y, Gong FL, Zhao GB, Li J (2014). Chrysin suppressed inflammatory responses and the inducible nitric oxide synthase pathway after spinal cord injury in rats. *Int. J. Mol. Sci.*, **15(7)**, 12270-12279.

Jin S, Yang H, Jiao Y, Pang Q, Wang Y, Wang M, Feng X (2021). Dietary curcumin alleviated acute ileum damage of ducks (*Anas platyrhynchos*) induced by AFB1 through regulating Nrf2-ARE and NF- κ B signaling pathways. *Foods*, **10(6)**, 1370.

Kamal A (2014). Estimation of blood urea (BUN) and serum creatinine level in patients of renal disorder. *Indian J. Fundam Appl. Life Sci.*, **4(4)**, 199-202.

Kamdem LK, Meineke I, Gödtel-Armbrust U, Brockmöller J, Wojnowski L (2006). Dominant contribution of P450 3A4 to the hepatic carcinogenic activation of aflatoxin B1. *Chem. Res. Toxicol.*, **19(4)**, 577-586.

Kang BY, Hur W, Kim SM, Kim S, Lee J, Tak E, Yoon SK (2021). Phenylboronic acid conjugated to doxorubicin nanocomplexes as an anti-cancer drug delivery system in hepatocellular carcinoma. *Nanotechnol. Biol. Med.*, **34**, 102389.

Kao YC, Zhou C, Sherman M, Laughton CA, Chen S (1998). Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. *Environ. Health. Perspect.*, **106(2)**, 85-92.

Karabulut H, Gülay MŞ (2016). Antioksidanlar. *MAEU Vet. Fak. Derg.*, **1(1)**, 65-76.

Karrari P, Mehrpour O, Afshari R, Keyler D (2013). Pattern of illicit drug use in patients referred to addiction treatment centres in Birjand, Eastern Iran. *J. Pak. Med. Assoc.*, **63(6)**, 711-6.

Karaca A, Yilmaz S, Kaya E, Altun S (2021). The effect of lycopene on hepatotoxicity of aflatoxin B1 in rats. *Arch. Physiol. Biochem.*, **127(5)**, 429-436.

Kelman Z (1997). PCNA: yapısı, işlevleri ve etkileşimleri. *Onkogen.*, **14 (6)**, 629-640.

Keppler DO, Rudigier JF, Bischoff E, Deckker KF (1970). The trapping of uridine phosphates by d-galactosamine, d-glucosamine, and 2-deoxy-d-galactose: A study on the mechanism of galactosamine hepatitis. *Eur. J. Biochem.*, **17(2)**, 246-253.

Khan MS, Devaraj H, Devaraj N (2011). Chrysin abrogates early hepatocarcinogenesis and induces apoptosis in N-nitrosodiethylamine-induced preneoplastic nodules in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **251(1)**, 85-94.

Khan R, Khan AQ, Qamar W, Lateef A, Tahir M, Rehman MU, Sultana S (2012). Chrysin protects against cisplatin-induced colon toxicity via amelioration of oxidative stress and apoptosis: probable role of p38MAPK and p53. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **258(3)**, 315-329.

Khoo BY, Chua SL, Balaram P (2010). Apoptotic effects of chrysin in human cancer cell lines. *Int. J. Mol. Sci.*, **11(5)**, 2188-2199.

Koc F, Tekeli MY, Kanbur M, Karayigit MÖ, Liman BC (2020). The effects of chrysin on lipopolysaccharide-induced sepsis in rats. *J. Nutr. Biochem.*, **44(9)**, e13359.

Kocabaş, N. (2008). Homosisteinin indüklediği oksidatif stres üzerinde quercetinin koruyucu etkisi. *Kocatepe J. Vet.*, **3**, 1-8.

Kongtawelert P, Tangkijvanich P, Ong-Chai S, Poovorawan Y (2003). Role of serum total sialic acid in differentiating cholangiocarcinoma from hepatocellular carcinoma. *WJG.*, **9(10)**, 2178–2181.

Korkina LG, Afanas' Ev IB (1996). Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv. Pharmacol. sci.*, **38**, 151-163.

Kos J, Hajnal EJ, Malachová A, Steiner D, Stranska M, Krska R, Sulyok M (2020). Mycotoxins in maize harvested in Republic of Serbia in the period 2012–2015. Part 1: Regulated mycotoxins and its derivatives. *Food chemistry.*, **312**, 126034.

Kos J, Hajnal E, Šarić B, Jovanov P, Mandić A, Đuragić O, Kokić B (2018). Aflatoxins in maize harvested in the Republic of Serbia over the period 2012–2016. *Food Additives and Contaminants: Part B publishes surveillance.*, **11(4)**, 246-255.

Krishnamachari KAVR, Nagarajan V, Bhat R, Tilak TBG (1975). Hepatitis due to aflatoxicosis: an outbreak in western India. *The Lancet.*, **305(7915)**, 1061-1063.

Kucukcakan B, Hayrulai-Musliu Z (2015). Challenging role of dietary aflatoxin B1 exposure and hepatitis B infection on risk of hepatocellular carcinoma. *Open Access Maced. J. Med. Sci.*, **3(2)**, 363.

Kucukler S, Benzer F, Yildirim S, Gur C, Kandemir FM, Bengu AS, Dortbudak MB (2021). Protective effects of chrysin against oxidative stress and inflammation induced by lead acetate in rat kidneys: a biochemical and histopathological approach. *Biol. Trace Elem. Res.*, **199(4)**, 1501-1514.

Kumagai S, Sugita-Konishi Y, Hara-Kudo Y, Ito Y, Noguchi Y, Yamamoto Y, Ogura A (1998). The fate and acute toxicity of aflatoxin B1 in the mastomys and rat. *Toxicon.*, **36(1)**, 179-188.

Lee CH, Kim SY (2009). NF- κ B and therapeutic approach. *Biomol. Ther.*, **17(3)**, 219-240.

Lee JH, Ko YB, Choi YM, Kim J, Cho HD, Choi H, Yuk JM (2024). CM1, a chrysin derivative, protects from endotoxin-induced lethal shock by regulating the excessive activation of inflammatory responses. *Nutrients.*, **16(5)**, 641.

Li C, Liu X, Wu J, Ji X, Xu Q (2022). Research progress in toxicological effects and mechanism of aflatoxin B1 toxin. *PeerJ.*, **10**, e13850.

Li X, Huang Q, Ong CN, Yang XF, Shen HM (2010). Chrysin sensitizes tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in human tumor cells via suppression of nuclear factor-kappaB. *Cancer Lett.*, **293(1)**, 109-116.

Li P, Zhou L, Zhao T, Liu X, Zhang P, Liu Y, Li Q (2017). Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget.*, **8(14)**, 23996.

Lin XH, Hu X, Li FQ (2012). Development of an in vitro digestion model for assessing the bioaccessibility of aflatoxin B group in foods. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.*, **46(10)**, 937-941.

Lin YC, Li L, Makarova AV, Burgers PM, Stone MP, Lloyd RS (2014). Error-prone replication bypass of the primary aflatoxin B1 DNA adduct, AFB1-N7-Gua. *J. Biol. Chem.*, **289(26)**, 18497-18506.

Liu F, Wang Y, Zhou X, Liu M, Jin S, Shan A, Feng X (2021). Resveratrol Relieved Acute Liver Damage in Ducks (*Anas platyrhynchos*) Induced by AFB1 via Modulation of Apoptosis and Nrf2 Signaling Pathways. *Animals.*, **11(12)**, 3516.

Liu Y, Wang W (2016). Aflatoxin B1 impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis and involves Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes. *Anim. Sci. J.*, **87(12)**, 1490-1500.

Lu H, Liu F, Zhu Q, Zhang M, Li T, Chen J, Sheng J (2017). Aflatoxin B1 can be complexed with oxidised tea polyphenols and the absorption of the complexed aflatoxin B1 is inhibited in rats. *J. Sci. Food Agric.*, **97(6)**, 1910-1915.

Lugrin J, Rosenblatt-Velin N, Parapanov R, Liaudet L (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biol. Chem.*, **395(2)**, 203-230.

Luo J, Nikolaev AY, Imai S (2001). Sir2alpha tarafından p53'ün negatif kontrolü, stres altında hücrenin hayatta kalmasını destekler. *Hücre.*, **107**, 137-148.

Ma J, Liu Y, Guo Y, Ma Q, Ji C, Zhao L (2021). Transcriptional profiling of aflatoxin B1-induced oxidative stress and inflammatory response in macrophages. *Toxins.*, **13(6)**, 401.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, **79(5)**, 727-747.

Mani R, Natesan V (2018). Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. *Phytochem. Lett.*, **145**, 187-196.

Marnett LJ (1999). Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, **424(1-2)**, 83-95.

McKean C, Tang L, Tang M, Billam M, Wang Z, Theodorakis CW, Wang JS (2006). Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in animals and human cells. *FCT.*, **44(6)**, 868-876.

Medina JH, Paladini AC, Wolfman C, de Stein ML, Calvo D, Diaz LE, Peña, C (1990). Chrysin (5, 7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties. *Biochem. Pharmacol.*, **40(10)**, 2227-2231.

Meki ARM, Abdel-Ghaffar SK, El-Gibaly I (2001). Aflatoxin B1 induces apoptosis in rat liver: protective effect of melatonin. *Neuro Endocrinol. Lett.*, **22(6)**, 417-426.

Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I (2005). Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol. Biol. Cell.*, **16(10)**, 4623-4635.

Miroddi M, Calapai G, Navarra M, Minciullo PL, Gangemi S (2013). Passiflora incarnata L.: ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. *J. Ethnopharmacol.*, **150(3)**, 791-804.

Missassi G, dos Santos Borges C, de Lima Rosa J, Villela e Silva P, da Cunha Miyasaka LS, Atallah AN, Soares B (2007). Passiflora for anxiety disorder. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **(1)**.

Moghadam ER, Ang HL, Asnaf SE, Zabolian A, Saleki H, Yavari M, Kumar AP (2020). Broad-spectrum preclinical antitumor activity of chrysin: current trends and future perspectives. *Biomolecules.*, **10(10)**, 1374.

Mohammadi A, Kazemi S, Hosseini M, Najafzadeh Varzi H, Feyzi F, Morakabati P, Moghadamnia AA (2019). Chrysin effect in prevention of acetaminophen-induced hepatotoxicity in rat. *Chem. Res. Toxicol.*, **32(11)**, 2329-2337.

Muñoz VA, Ferrari GV, Sancho MI, Montaña MP (2016). Spectroscopic and thermodynamic study of chrysin and quercetin complexes with Cu (II). *J. Chem. Eng. Data.*, **61(2)**, 987-995.

Mutocheluh M, Narkwa PW (2022). Aflatoxin B 1: An Immunomodulator and Cancer Agent. *Aflatoxins-Occurrence, Detection and Novel Detoxification Strategies*. intechopen p:188.

Taş M, Saruhan BG, Kurt D, Yokuş B, Denli M (2010). Protective role of lycopene on aflatoxin b1 induced changes sperm characteristics and testicular damages in rats. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **16(4)**, 597-604.

- Naaz F, Abidin MZ, Javed S (2014).** Protective effect of esculin against prooxidant aflatoxin B 1-induced nephrotoxicity in mice. *Mycotoxin Res.*, **30**, 25-32.
- Nagai T, Miyaichi Y, Tomimori T, Yamada H (1989).** Inhibition of mouse liver sialidase by plant flavonoids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163(1)**, 25-31.
- Naz S, Imran M, Rauf A, Orhan IE, Shariati MA, Shahbaz M, Heydari M (2019).** Chrysin: Pharmacological and therapeutic properties. *Life Sci.*, 116797.
- Nguyen TY, To DC, Tran MH, Lee JS, Lee JH, Kim JA, Min BS (2015).** Anti-inflammatory flavonoids isolated from *Passiflora foetida*. *Nat. Prod. Commun.*, **10(6)**, 1934578X1501000634.
- Niture SK, Khatri R, Jaiswal AK (2014).** Regulation of Nrf2—a mupdate. *Free Radic. Biol. Med.*, **66**, 36-44.
- Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, Finan B, Banks AS, Dietrich MO, Horvath TL, Sinclair DA, Pfluger PT, Tschöp MH (2012).** Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiological reviews*.
- Owumi SE, Umez AO, Arunsi U, Irozuru CE (2023).** Dietary aflatoxin B1 and antimalarial—a lumefantrine/artesunate—therapy perturbs male rat reproductive function via pro-inflammatory and oxidative mechanisms. *Sci. Rep.*, **13(1)**, 12172.
- Owumi S, Najophe ES, Farombi EO, Oyelere AK (2020).** Gallic acid protects against Aflatoxin B1-induced oxidative and inflammatory stress damage in rats kidneys and liver. *J. Food Biochem.*, **44(8)**, e13316.
- Öksüz E, Buğday MS, Demir F, Ekin S, Arıhan O, Oto G (2020).** Serum total sialic acid and lipid-linked sialic acid may be the new potential biomarkers in paracetamol nephrotoxicity. *Turkish. J. Nephrol.*, **29(4)**, 273-278.
- Özkaya Ş, Temiz A (2003).** Aflatoksinler: Kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi.*, **1(01)**, 1-21.
- Parlak Ak T, Yaman M, Tatli Seven P, Gül B, İflazoğlu Mutlu S, Sur Arslan A, Seven I (2021).** Effects of chrysin on carbon tetrachloride-induced testicular damage in rats: biochemical, histopathological and immunohistochemical evaluation. *Atarürk üni.Vet. Fak. Derg.*, **16(3)**, 320-329.
- Peterson J, Dwyer J (1998).** Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr. Res. Rev.*, **18(12)**, 1995-2018.
- Pinho SS, Reis CA (2015).** Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat. Rev. Cancer.*, **15**, 540-555.
- Porter AG, Jänicke RU (1999).** Apoptozda kaspaz-3'ün ortaya çıkan rolleri. *Hücre ölümü ve farklılaşması.*, **6(2)**, 99-104.

- Preetha SP, Kanniappan M, Selvakumar E, Nagaraj M, Varalakshmi P (2006).** Lupeol ameliorates aflatoxin B1-induced peroxidative hepatic damage in rats. Comparative biochemistry and physiology part C. *Toxicol. Pharmacol.*, **143(3)**, 333-339.
- Probst C, Njapau H, Cotty PJ (2007).** Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: identification of the causal agent. *Environ. Microbiol.*, **73(8)**, 2762-2764.
- Prolo LM, Vogel H, Reimer RJ (2009).** The Lysosomal Sialic Acid Transporter Sialin Is Required for Normal CNS Myelination. *Neurosci. J.*, **29**, 15355-15365.
- Puar YR, Shanmugam MK, Fan L, Arfuso F, Sethi G, Tergaonkar V (2018).** Ana Transkripsiyon Faktörü NF- κ B'nin Kanserin Başlatılması ve İlerlemesine Katkısı İçin Kanıt. *Biyotıp.*, **6**, 82.
- Pushpavalli G, Veeramani C, Pugalendi KV (2010).** Influence of chrysin on hepatic marker enzymes and lipid profile against D-galactosamine-induced hepatotoxicity rats. *Food Chem. Toxicol.*, **48(6)**, 1654-1659.
- Pusz J, Nitka B, Zielińska A, Wawer I (2000).** Synthesis and physicochemical properties of the Al (III), Ga (III) and In (III) complexes with chrysin. *Microchem. J.*, **65(3)**, 245-253.
- Qin H, Li H, Zhou X, Peng C, Tan H, Wang M (2016).** Effect of superoxide and inflammatory factor on aflatoxin B1 triggered hepatocellular carcinoma. *Am. J. Transl. Res.*, **8(9)**, 4003.
- Raja MJ, Mathuram LN, Kumanan K (2018).** Antiproliferative effect of apigenin: A flavonoid in sarcoma 180 cell line. *J. Pharmacognosy Phytother.*, **7(5)**, 2450-2452.
- Ramanathan V, Thekkumalai M (2014).** Role of chrysin on hepatic and renal activities of N ω -nitro-l-arginine-methylester induced hypertensive rats. *Int. J. Nutr. Pharmacol. Neurol. Dis.*, **4(1)**, 58-63.
- Rastogi R, Srivastava AK, Rastogi AK (2001).** Aflatoksin B1'in sıçan karaciğeri ve böbreğinde lipid peroksidasyonu üzerine uzun vadeli etkisi: pikroliv ve silimarin'in etkisi. *Fitoterapi Araştırması.*, **15 (4)**, 307-310.
- Rauf A, Khan R, Raza M, Khan H, Pervez S, De Feo V, Mascolo N (2015).** Suppression of inflammatory response by chrysin, a flavone isolated from *Potentilla evestita* Th. Wolf. In silico predictive study on its mechanistic effect. *Fitoterapia.*, **103**, 129-135.
- Rawat D, Shrivastava S, Naik RA, Chhonker SK, Koiri RK (2020).** SIRT1-mediated amelioration of oxidative stress in kidney of alcohol-aflatoxin-B1-induced hepatocellular carcinoma by resveratrol is catalase dependent and GPx independent. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **34(11)**, e22576.
- Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L (2003).** Flavonoids: promising anticancer agents. *Med. Res. Rev.*, **23(4)**, 519-534.

Richard JL (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *Int. J. Food Microbiol.*, **119(1-2)**, 3-10.

Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC1 α and SIRT1. *Nature.*, **434(7029)**, 113-118.

Rogina B, Helfand SL (2004). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *PNAS USA.*, **101(45)**, 15998-16003.

Rotimi OA, Rotimi SO, Goodrich JM, Adelani IB, Agbonihale E, Talabi G (2019). Time-course effects of acute aflatoxin B1 exposure on hepatic mitochondrial lipids and oxidative stress in rats. *Front. Pharmacol.*, **10**, 467.

Rotimi OA, Rotimi SO, Oluwafemi F, Ademuyiwa O, Balogun EA (2016). Coexistence of aflatoxicosis with protein malnutrition worsens hepatic oxidative damage in rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **30(6)**, 269-276.

Rotimi OA, Rotimi SO, Oluwafemi F, Ademuyiwa O, Balogun EA (2018). Oxidative stress in extrahepatic tissues of rats co-exposed to aflatoxin B1 and low protein diet. *Toxicol. Res.*, **34**, 211-220.

Rotimi OA, Rotimi SO, Duru CU, Ebebeinwe OJ, Abiodun AO, Oyeniyi BO, Faduyile FA (2017). Acute aflatoxin B1-Induced hepatotoxicity alters gene expression and disrupts lipid and lipoprotein metabolism in rats. *Toxicol. Rep.*, **4**, 408-414.

Ruffmann R, Wendel A (1991). GSH rescue by N-acetylcysteine. *Klin. Wochenschr.*, **69**, 857-862.

Sabuncuoğlu SA, Baydar T, Giray B, Şahin G (2008). Mikotoksinler: Toksik etkileri, degradasyonları, oluşumlarının önlenmesi ve zararlı etkilerinin azaltılması. *HUJPHARM.*, **(1)**, 63-92.

Salama AA, Allam RM (2021). Promising targets of chrysin and daidzein in colorectal cancer: Amphiregulin, CXCL1, and MMP-9. *Eur. J. Pharmacol.*, **892**, 173763.

Samarghandian S, Farkhondeh T, Azimi-Nezhad M (2017). Protective effects of chrysin against drugs and toxic agents. *Dose-Response.*, **15(2)**, 1559325817711782.

Schauer R, Kamerling JP (2018). Exploration of the sialic acid world. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, **75**, 1-213.

Scholzen T, Gerdes J (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.*, **182(3)**, 311-322.

Schvartzman JM, Sotillo R, Benezra R (2010). Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nat. Rev. Cancer.*, **10(2)**, 102-115.

Seven PT, Baykalır BG, Seven I, Ak TP, Türkmen NB, Güllüoğlu H (2018). The protective effects of chrysin and flunixin meglumine against excess copper in male rats. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **42(5)**, 376-387.

Shahbaz M, Naeem H, Imran M, Ul Hassan H, Alsagaby SA, Al Abdulmonem W, Ihsan A (2023). Chrysin a promising anticancer agent: Recent perspectives. *Int. J. Food Prop.*, **26(1)**, 2294-2337.

Sharma V, Sharma C, Sharma S (2011). Influence of Curcuma Longa and Curcumin on blood profile in mice subjected to aflatoxin B1. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, **2(7)**, 1740.

Shen HM, Shi CY, Lee HP, Ong CN (1994). Aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **127(1)**, 145-150.

Shore D, Squire M, Nasmyth KA (1984). Characterization of two genes required for the position-effect control of yeast mating-type genes. *EMBO j.*, **3(12)**, 2817-2823.

Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-Lavier MC, Amiot MJ, Sabatier S, Aubert SY, Suschetet M (1996). Flavonoids of Honey and Propolis: Characterization and Effects on Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes and Benzo [a] pyrene- DNA Binding in Rats. *J. Agric. Food Chem.*, **44(8)**, 2297-2301.

Sinclair DA, Guarente L (1997). Extrachromosomal rDNA circles - A cause of aging in yeast. *Cell.*, **91(7)**, 1033-1042.

Singh KB, Maurya BK, Trigun SK (2015). Activation of oxidative stress and inflammatory factors could account for histopathological progression of aflatoxin-B1 induced hepatocarcinogenesis in rat. *Mol. Cell. Biochem.*, **401**, 185-196.

Tanner ME (2005). The enzymes of sialic acid biosynthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **33(3)**, 216-228.

Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem.*, **282(9)**, 6823-6832.

Temel Y, Küçükler S, Yıldırım S, Çağlayan C, Kandemir FM (2020). Krisinin, oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozun inhibisyonu yoluyla siklofosamidin neden olduğu hepatotoksisite ve nefrotoksisite üzerindeki koruyucu etkisi. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, **393**, 325-337.

Tissenbaum HA, Guarente L (2001). Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.*, **410(6825)**, 227-230.

Tsuji PA, Walle T (2008). Cytotoxic effects of the dietary flavones chrysin and apigenin in a normal trout liver cell line. *Chem. Biol. Interact.*, **171(1)**, 37-44.

Uxa S, Castillo-Binder P, Kohler R, Stangner K, Müller GA, Engeland K (2021). Ki-67 gene expression. *Cell Death Differ.*, **28(12)**, 3357-3370.

van Beek JH, de Moor MH, de Geus EJ, Lubke GH, Vink JM, Willemsen G, Boomsma DI (2013). The genetic architecture of liver enzyme levels: GGT, ALT and AST. *Behav. Genet.*, **43**, 329-339.

Van Loo G, Bertrand MJ (2023). Death by TNF: a road to inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, **23(5)**, 289-303.

Varki A (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol. Med.*, **14**, 351-360.

Varki NM, Varki A (2007). Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab. Invest.*, **87**, 851-857.

Vedagiri A, Thangarajan S (2016). Mitigating effect of chrysin loaded solid lipid nanoparticles against Amyloid β 25–35 induced oxidative stress in rat hippocampal region: An efficient formulation approach for Alzheimer's disease. *Neuropeptides.*, **58**, 111-125.

Verma RJ (2004). Aflatoxin cause DNA damage. *Int. J. Hum. Genet.*, **4(4)**, 231-236.

Visser EA, Moons SJ, Timmermans SB, de Jong H, Boltje TJ, Büll C (2021). Sialic acid O-acetylation: From biosynthesis to roles in health and disease. *J. Biol. Chem.*, **297(2)**, 100906.

Voelter-Mahlknecht S, Mahlknecht U (2006). Cloning, chromosomal characterization and mapping of the NAD-dependent histone deacetylases gene sirtuin 1. *Int J Mol Med.*, **17(1)**, 59-67.

Walle T, Otake Y, Brubaker JA, Walle UK, Halushka PV (2001). Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **51(2)**, 143-146.

Walle UK, Galijatovic A, Walle T (1999). Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochem. Pharmacol.*, **58(3)**, 431-438.

Wang D, Lindemann MD, Estienne MJ (2020). Effect of folic acid supplementation and dietary protein level on growth performance, serum chemistry and immune response in weanling piglets fed differing concentrations of aflatoxin. *Toxins.*, **12(10)**, 651.

Wang L, Lee IM, Zhang SM, Blumberg JB, Buring J.E, Sesso HD (2009). Dietary intake of selected flavonols, flavones, and flavonoid-rich foods and risk of cancer in middle-aged and older women. *Am. J. Clin. Nutr.*, **89(3)**, 905–912

Wang M, Carver JJ, Phelan VV, Sanchez LM, Garg N, Peng Y, Bandeira N (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat. Biotechnol.*, **34(8)**, 828-837.

Wang WJ, Xu ZL, Yu C, Xu XH (2017). Effects of aflatoxin B1 on mitochondrial respiration, ROS generation and apoptosis in broiler cardiomyocytes. *Anim. Sci. J.*, **88(10)**, 1561-1568.

Wang X, He Y, Tian J, Muhammad I, Liu M, Wu C, Zhang X (2021). Ferulic acid prevents aflatoxin B1-induced liver injury in rats via inhibiting cytochrome P450 enzyme, activating Nrf2/GST pathway and regulating mitochondrial pathway. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **224**, 112624.

Wang X, Muhammad I, Sun X, Han M, Hamid S, Zhang X (2018). Protective role of curcumin in ameliorating AFB1-induced apoptosis via mitochondrial pathway in liver cells. *Mol. Biol. Rep.*, **45(5)**, 881-891.

Wang Y, Liu F, Zhou X, Liu M, Zang H, Liu X, Feng X (2022). Alleviation of oral exposure to aflatoxin B1-induced renal dysfunction, oxidative stress, and cell apoptosis in mice kidney by curcumin. *Antioxidants.*, **11(6)**, 1082.

Weng MW, Lee HW, Choi B, Wang HT, Hu Y, Mehta M, Tang MS (2017). AFB1 hepatocarcinogenesis is via lipid peroxidation that inhibits DNA repair, sensitizes mutation susceptibility and induces aldehyde-DNA adducts at p53 mutational hotspot codon 249. *Oncotarget.*, **8(11)**, 18213.

Woo KJ, Jeong YJ, Park JW, Kwon TK (2004). Chrysin-induced apoptosis is mediated through caspase activation and Akt inactivation in U937 leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325(4)**, 1215-1222.

Xu F, Li Y, Cao Z, Zhang J, Huang W (2021). AFB1-induced mice liver injury involves mitochondrial dysfunction mediated by mitochondrial biogenesis inhibition. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **216**, 112213.

Yang CF, Liu J, Wasser S, Shen HM, Tan CEL, Ong CN (2000). Inhibition of ebselen on aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in Fischer 344 rats. *Carcinogenesis.*, **21(12)**, 2237-2243.

Yang M, Xiong J, Zou Q, Wang DD, Huang CX (2018). Chrysin attenuates interstitial fibrosis and improves cardiac function in a rat model of acute myocardial infarction. *J. Mol. Histol.*, **49**, 555-565.

Yang Z, Guan Y, Li J, Li L, Li Z (2018). Chrysin attenuates carrageenan-induced pleurisy and lung injury via activation of SIRT1/NRF2 pathway in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **836**, 83-88.

Yao J, Jiang M, Zhang Y, Liu X, Du Q, Feng G (2016). Chrysin alleviates allergic inflammation and airway remodeling in a murine model of chronic asthma. *Int. Immunopharmacol.*, **32**, 24-31.

Yao LH, Jiang YM, Shi J, TomasBarberan FA, Datta N, Singanusong R, Chen SS (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **59**, 113-122.

Yao W, Cheng J, Kandhare AD, Mukherjee-Kandhare AA, Bodhankar SL, Lu G (2021). Toxicological evaluation of a flavonoid, chrysin: morphological, behavioral, biochemical and histopathological assessments in rats. *Drug Chem. Toxicol.*, **44(6)**, 601-612.

Yao Y, Chen L, Xiao J, Wang C, Jiang W, Zhang R, Hao J (2014). Chrysin protects against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice through attenuation of oxidative stress and inflammation. *Int. J. Mol. Sci.*, **15(11)**, 20913-20926.

Yentür G, Er B (2011). Gıdalarda aflatoksin varlığının değerlendirilmesi. *Türk hij. ve deney.*, **69(1)**, 41-52.

Yoshinaga A, Kajiya N, Oishi K, Kamada Y, Ikeda A, Chigwechokha PK, Shiozaki K (2016). NEU3 inhibitory effect of naringin suppresses cancer cell growth by attenuation of EGFR signaling through GM3 ganglioside accumulation. *Eur. J. Pharmacol.*, **782**, 21-29.

Zand RSR, Jenkins DJ, Diamandis EP (2002). Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. *J. Chromatogr. B.*, **777(1-2)**, 219-232.

Zeinali M, Rezaee SA, Hosseinzadeh H (2017). An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. *Biomed. Pharmacother.*, **92**, 998-1009.

Zeraik ML, Pereira CA, Zuin VG, Yariwake JH (2010). Passion fruit: a functional food. *Rev. Bras. Farmacogn.*, **20(3)**, 459-471.

Zhang LY, Zhan DL, Chen YY, Wang WH, He CY, Lin Y, Lin ZN (2019). Aflatoxin B1 enhances pyroptosis of hepatocytes and activation of Kupffer cells to promote liver inflammatory injury via dephosphorylation of cyclooxygenase-2: an in vitro, ex vivo and in vivo study. *Arch. Toxicol.*, **93**, 3305-3320.

Zhang T, Chen X, Qu L, Wu J, Cui R, Zhao Y (2004). Chrysin and its phosphate ester inhibit cell proliferation and induce apoptosis in Hela cells. *Bioorg. Med.*, **12(23)**, 6097-6105.

Zhang J, Wang P, Xu F, Huang W, Ji Q, Han Y, Li Y (2020). Protective effects of lycopene against AFB1-induced erythrocyte dysfunction and oxidative stress in mice. *Res. J. Vet. Sci.*, **129**, 103-108.

Zhao H, Ruan H, Li H (2011). Progress in the research of GSH in cells. *Chin. Sci. Bull.*, **56**, 3057-3063.

Zheng Z, Humphrey CW, King RS, Richard JL (2005). Validation of an ELISA test kit for the detection of total aflatoxins in grain and grain products by comparison with HPLC. *Mycopathologia.*, **159 (2)**, 255-63.

