



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARELERDE MONOKROTALİN İLE İNDÜKLENEN HEPATİK
HASARDA APOPTOTİK BELİRTEÇLERİN EKSPRESYON
SEVİYELERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ**

ALİ ŞENOL

VETERİNERLİK BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Alparslan Kadir DEVRİM

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Miyase ÇINAR

KIRIKKALE-2024



**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARELERDE MONOKROTALİN İLE İNDÜKLENEN HEPATİK
HASARDA APOPTOTİK BELİRTEÇLERİN EKSPRESYON
SEVİYELERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ**

Ali ŞENOL

VETERİNERLİK BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Alparslan Kadir DEVRİM

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Miyase ÇINAR

**Bu tez, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)
tarafından 222O862 numaralı proje ile desteklenmiştir.**

KIRIKKALE-2024

KABUL VE ONAY

Ali ŞENOL tarafından hazırlanan “FARELERDE MONOKROTALİN İLE İNDÜKLENEN HEPATİK HASARDA APOPTOTİK BELİRTEÇLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Alparslan Kadir DEVRİM İmza.....
Veterinerlik Bölümü, Meslek Yüksekokulu, İzmir Bakırçay Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

II. Danışman: Prof. Dr. Miyase ÇINAR İmza.....
Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Başkan: Prof. Dr. Tevhide SEL İmza.....
Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Prof. Dr. Meryem EREN İmza.....
Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı, Erciyes Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Prof. Dr. Kader YILDIZ İmza.....
Parazitoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Doç. Dr. Özkan DURU İmza.....
Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum.

Tez Savunma Tarihi: 10/06/2024

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Zeynep TEZEL
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

o Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

o Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

o Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

o Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,

o Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ali ŞENOL

10/06/2024

ÖZET

FARELERDE MONOKROTALİN İLE İNDÜKLENEN HEPATİK HASARDA APOPTOTİK BELİRTEÇLERİN EKSPRESYON SEVİYELERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ

Kırıkkale Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Alparslan Kadir DEVRİM

II. Danışman: Prof. Dr. Miyase ÇINAR

Haziran 2024, 114 sayfa

Bu çalışmanın amacı, canlılarda hepatotoksisiteye neden olduğu bilinen pirolizidin alkaloidlerinden monokrotalin (MCT) kaynaklı hepatik hasarın biyokimyasal ve moleküler düzeyde meydana getirdiği değişikliklerin incelenmesidir. Bu amaçla 30 adet erkek BALB/c faresi; kontrol, akut toksisite ve subakut toksisite olmak üzere üç gruba ayrıldı. Kontrol grubuna %0,9 salin, akut toksisite grubuna 120 mg/kg tek doz MCT, subakut toksisite grubuna 5 gün arayla toplam 3 kez 120 mg/kg MCT uygulandı. Tüm uygulamalar intragastrik olarak gerçekleştirildi. Deneme sonunda plazma AST, ALT ve GGT aktiviteleri ile TBIL, TCHO ve TP düzeyleri belirlendi. Ayrıca deney sonlandırılmasında toplanan karaciğer dokuları, oksidatif stres belirteçlerinden TAK, TOK ve OSİ düzeylerinin belirlenmesi, histopatolojik incelemeler ve moleküler tekniklerde kullanılmak üzere total RNA'nın izole edilmesi amacıyla kullanıldı. Yapılan incelemelerde kontrol grubuna göre deneme gruplarında ALT ($P \leq 0,05$) ve GGT ($P < 0,001$) aktiviteleri ile TBIL ($P < 0,001$) düzeylerinin istatistiksel açıdan önemli düzeyde, AST aktiviteleri ve TCHO düzeylerinin sayısal olarak arttığı ($P > 0,05$), TP düzeylerinin ise önemli düzeyde azaldığı ($P < 0,001$) belirlendi. Karaciğer doku homojenatlarında oksidatif stres parametrelerinden TOK ($P < 0,001$) ve OSİ ($P > 0,05$) düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla deneme gruplarında artış gösterdiği tespit edildi. Total antioksidan kapasite düzeylerinin ise kontrol grubuna göre akut toksikasyon grubunda sayısal olarak azaldığı ($P > 0,05$), subakut toksikasyon grubunda ise önemli düzeyde arttığı ($P < 0,05$) belirlendi. Ayrıca doku homojenatlarında Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 protein düzeyleri ELISA tekniği ile belirlendi. Deneme gruplarında pro-apoptotik markır Bax ($P > 0,05$) ile Kaspaz-3 ($P < 0,05$) protein düzeylerinde artma, anti-apoptotik markır Bcl-2 ($P < 0,001$) düzeylerinde ise azalmaların olduğu görüldü. Aynı markırların qPCR ile gen ekspresyon düzeylerindeki değişikliklerin ELISA sonuçları ile uyumlu olduğu ancak istatistiksel açıdan önemli düzeyde olmadığı belirlendi ($P > 0,05$). Moleküler düzeyde yapılan qPCR analizinin yanında aynı prensibe dayanan PCR array analizi ile de

apoptotik belirteçler, JAK/STAT proteinleri, STAT etkileşimli transkripsiyon faktörler, hücre döngüsü, proliferasyonu, büyümesi ve/veya onarımı, akut faz tepkisi ile inflamatuvar yanıtta sorumlu çok sayıda gen ekspresyonu, eş zamanlı olarak taranarak kontrol grubuna göre artan ya da azalan genlerin ekspresyon profili tespit edildi. Monokrotalinin sebep olduğu karaciğer hasarının hücresel boyutta incelenmesi için yapılan mikroskobik incelemelerde, deneme gruplarında hasar belirteçlerinde değişikliklerin olduğu ve akut toksikasyon grubundaki değişikliklerin daha şiddetli düzeyde olduğu görüldü. Sonuç olarak MCT'nin sebep olduğu hepatik hasar sürecinde karaciğer enzim aktivitelerinin ve oksidatif stres mekanizmasının olumsuz yönde etkilendiği, ayrıca gerçekleştirilen ELISA ve qPCR analizleri ile de hem protein hem de gen düzeylerinde elde edilen Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 ekspresyonlarının önemli değişiklikler sergilediği anlaşıldı. Ayrıca, PCR array tekniği ile de incelenen hepatik hasar süreci ile ilişkili moleküler yollarda ekspresyon değişiklikleri gen panelleri seviyesinde belirlenerek potansiyel biyokimyasal ve patolojik belirteçler ortaya konuldu. Elde edilen verilerin yeni çalışmaların planlanması için önemli veriler sunduğu kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Karaciğer hasarı, monokrotalin, oksidatif stres, pirolizidin alkaloidleri, PCR array, qPCR

ABSTRACT

EXAMINATION OF CHANGES IN THE EXPRESSION LEVELS OF APOPTOTIC MARKERS IN MONOCROTALINE-INDUCED HEPATIC DAMAGE IN MICE

Kırıkkale University

Health Sciences Institute

Department of Veterinary Biochemistry, PhD thesis

Supervisor: Prof. Dr. Alparslan Kadir DEVRİM

Co-Supervisor: Prof. Dr. Miyase ÇINAR

June 2024, 114 pages

This study aims to examine the changes caused by hepatic damage at the biochemical and molecular levels caused by monocrotaline (MCT), one of the pyrrolizidine alkaloids known to cause hepatotoxicity in living things. For this purpose, 30 male BALB/c mice were divided into control, acute toxicity, and subacute toxicity groups. 0.9% saline was administered to the control group, a single dose of 120 mg/kg MCT was administered to the acute toxicity group, and 120 mg/kg MCT was administered to the subacute toxicity group for a total of 3 times with an interval of 5 days. All applications were performed intragastrically. At the end of the experiment, plasma AST, ALT and GGT activities and TBIL, TCHO and TP levels were determined. In addition, liver tissues collected at the end of the experiment were used to determine TAC, TOC and OSI levels, which are oxidative stress markers, and to isolate total RNA for use in histopathological examinations and molecular techniques. According to the examinations, ALT ($P \leq 0.05$) and GGT ($P < 0.001$) activities and TBIL ($P < 0.001$) levels increased at a statistically significant level in the experimental groups compared to the control group, while AST activities and TCHO levels increased numerically ($P > 0.05$).), and TP levels were found to decrease significantly ($P < 0.001$). It was determined that TOC ($P < 0.001$) and OSI ($P > 0.05$) levels, which are oxidative stress parameters in liver tissue homogenates, increased in the experimental groups compared to the control group. It was determined that total antioxidant capacity levels decreased numerically in the acute toxicity group compared to the control group ($P > 0.05$), and increased significantly in the subacute toxicity group ($P < 0.05$). Additionally, Bcl-2, Bax and Caspase-3 protein levels in tissue homogenates were determined by ELISA. In the experimental groups, there was an increase in the pro-apoptotic marker Bax ($P > 0.05$) and Caspase-3 ($P < 0.05$) protein levels, and a decrease in the anti-apoptotic marker Bcl-2 ($P < 0.001$) levels. It was determined that the changes in gene expression levels of the same markers by qPCR were compatible with the ELISA results, but were not statistically significant ($P > 0.05$). In addition to the qPCR analysis performed at the molecular level, PCR

array analysis based on the same principle reveals the expression of apoptotic markers, JAK/STAT proteins, STAT interacting transcription factors, cell cycle, proliferation, growth and/or repair, acute phase response and many genes responsible for the inflammatory response, The expression profile of genes that increased or decreased compared to the control group was determined by scanning simultaneously. Microscopic examinations performed to examine the liver damage caused by monocrotaline at the cellular level showed that there were changes in damage markers in the trial groups and that the changes were more severe in the acute toxicity group. As a result, liver enzyme activities and oxidative stress mechanism were negatively affected during the hepatic damage process caused by MCT, and Bcl-2, Bax and Caspase-3 expressions obtained at both protein and gene levels showed significant changes in ELISA and qPCR analyses. understood. In addition, expression changes in molecular pathways related to the hepatic damage process, which were examined with the PCR array technique, were determined at the level of gene panels and potential biochemical and pathological markers were revealed. It was concluded that the data obtained provided important data for planning new studies.

Keywords: Liver injury, monocrotaline, oxidative stress, pyrrolizidine alkaloids, PCR array, qPCR

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecimde ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, gerek bilimsel gerekse sosyal anlamda yaptıkları ince dokunuşlarla yol gösteren ve gerekli tüm laboratuvar imkanlarını sağlayan danışman hocalarım Prof. Dr. Alparslan Kadir DEVRİM ve Prof. Dr. Miyase ÇINAR'a, çalışmam sırasında öneri ve yardımlarını esirgemeyen tez izleme komite üyeleri Doç. Dr. Özkan DURU ve Prof. Dr. Kader YILDIZ'a, çalışmamın histopatolojik incelemelerinde büyük katkılar sunan Prof. Dr. Mahmut SÖZMEN ve Doktora öğrencisi Betül AKÇA'ya teşekkürü borç bilirim.

Bu zorlu ve sancılı sürece tanıklık eden, hayatımın her aşamasında yanımda olan ve her türlü kararına saygı duyan aileme, yoğun ve zorlu geçen dönemlerde beni motive eden, her zaman sabır ve hoşgörüyle yaklaşan canım eşim Hande ŞENOL'a sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca, çalışmamın gerçekleştirilebilmesi için verdiği desteklerden dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	IV
ABSTRACT	VI
TEŞEKKÜR	VIII
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1. Pirolizidin Alkaloidlerinin Kaynağı	2
1.2. Pirolizidin Alkaloidlerinin Kimyasal Yapısı	5
1.3. Pirolizidin Alkaloidlerinin Metabolizması	6
1.4. Pirolizidin Alkaloidlerinin Toksisitesi	6
1.5. Monokrotalin	9
1.5.1. Monokrotalin ve Oksidatif Stres	10
1.5.2. Monokrotalin ve Apoptozis	13
1.6. Tezin Amacı	18
2. MATERYAL VE YÖNTEM	19
2.1. Materyal	19
2.1.1. Demirbaş ve Sarf Malzemeler	19
2.1.2. Hayvan Materyali	21
2.1.3. Barınma ve Yetiştirme Koşulları	21
2.1.4. Deney Gruplarının Belirlenmesi	21
2.1.5. Örneklerin Toplanması	23
2.2. Yöntem	23
2.2.1. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi	23
2.2.2. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Belirlenmesi	23
2.2.3. Doku Protein Tayini	26
2.2.3.1. Reaktiflerin hazırlanması	26
2.2.3.2. Dokuda protein ölçümü	26
2.2.4. Karaciğer Doku Homojenatlarında Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 Düzeylerinin Belirlenmesi	27
2.2.5. Kantitatif PCR (qPCR) Analizi	29
2.2.5.1. Total RNA İzolasyonu	29
2.2.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	30
2.2.5.3. qPCR Analiz Detayları	31
2.2.6. PCR Array Analizi	33
2.2.7. Histopatolojik İncelemeler	38
2.2.8. Verilerin İstatiksel Analizleri	38

3. BULGULAR	39
3.1. Biyokimyasal Parametrelerin Düzeyleri	39
3.2. Oksidan-Antioksidan Parametrelerin Düzeyleri	42
3.3. Karaciğer Doku Homojenatlarında Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 Düzeyleri	44
3.4. Kantitatif PCR (qPCR) Analizi	46
3.5. PCR Array Analizi	48
3.6. Histopatolojik İncelemeler	53
3.6.1. Histopatolojik Skorelama	53
3.6.2. MCT'nin Sebep Olduğu Diğer Histopatolojik Bulgular	60
4. TARTIŞMA	61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
KAYNAKLAR	77
EKLER	87
ÖZGEÇMİŞ	87

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1.1. Toksik etkili PA içeren bazı bitkiler ve içerdiği alkaloid türleri	4
1.2. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri	11
2.1. Demirbaş listesi	19
2.2. Sarf malzeme listesi	20
2.3. Deney grupları ve gerçekleştirilen uygulamalar	22
2.4. cDNA sentez aşamasında her bir örnek için hazırlanan karışım	31
2.5. qPCR analizinde kullanılan referans ve hedef özgü primer dizileri	32
2.6. qPCR analizinde her bir örnek için hazırlanan karışım	32
2.7. qPCR cihazında yapılan programlamanın detayları	33
2.8. PCR array analizinde kullanılan gen paneli	34
2.9. PCR array analizlerinde hazırlanan karışım	37
2.10. PCR array analizinde yapılan programlamanın detayları	37
3.1. Kontrol ve deneme gruplarına ait plazmada bazı biyokimyasal parametre düzeyleri	39
3.2. Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusunda TAK, TOK ve OSI düzeyleri	42
3.3. Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusunda Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 markır protein düzeyleri	44
3.4. Kontrol ve deneme gruplarına ait Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 markır gen ekspresyon düzeyleri	46
3.5. Karaciğer örneklerinin NAFLD Skorum Sistemine göre değerlendirilme kriterleri	54
3.6. Deney gruplarının NAFLD skor sistemine göre skorları	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
1.1. Toksik etkili PA içeren bazı bitki türleri	3
1.2. (a) Nesin bazı ve nesik asit gösteren genel pirolizidin alkaloid yapıları, (b) esterlenmiş nesik asitlerin farklı formlarını gösteren pirolizidin alkaloid yapıları, (c) Nesin baz varyasyonlarına göre pirolizidin alkaloid yapıları	5
1.3. Pirolizidin alkaloidlerinin çeşitli maruziyet yolları ve primer toksik etkileri	7
1.4. (a) Monokrotalinin kimyasal yapısı (İsmail vd., 2023) ve (b) elde edildiği <i>Crotalaria spectabilis</i> bitkisinin görünümü	9
1.5. Ekstrinsik apoptotik yolak	14
1.6. İntrinsik apoptotik yolak.....	15
1.7. Apoptoza uğrayan hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler	17
3.1. Kontrol ve deneme gruplarına ait plazmada bazı biyokimyasal parametre düzeyleri	40
3.2. Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusunda TAK, TOK ve OSI düzeyleri	43
3.3. Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusunda Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 markır protein düzeyleri	45
3.4. Kontrol ve deneme gruplarına ait Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 markır gen ekspresyon düzeyleri	47
3.5. PCR array gen ekspresyon profili. Kontrol ve MCT uygulanan farelerdeki gen ekspresyonunun hiyerarşik kümeleme ve heat map ile gösterimi (Veriler GAPDH ile normalleştirildi)	49
3.6. PCR array gen ekspresyon profili. Kontrol ve MCT uygulanan farelerdeki gen ekspresyonunun hiyerarşik kümeleme ve heat map ile gösterimi (Veriler HRPT ile normalleştirildi)	50
3.7. PCR array gen ekspresyon profili. Kontrol ve MCT uygulanan farelerdeki gen ekspresyonunun hiyerarşik kümeleme ve heat map ile gösterimi (Veriler ACTB ile normalleştirildi)	51
3.8. PCR Array gen ekspresyon profili. Kontrol ve MCT uygulanan farelerdeki gen ekspresyonunun sütun grafik ile gösterimi (Veriler GAPDH (A), HPRT (B) ve ACTB (C) referans genler ile normalleştirildi)	52
3.9. Deney gruplarında santral ven çevresinde (perisantral bölge) hasar	57
3.10. Periportal inflamasyon	57
3.11. Akut gruba ait fokal mononükleer hücre infiltrasyonları (inflamasyon odakları) ve fokal nekroz alanı	58

3.12. Subakut gruba ait fokal mononükleer hücre infiltrasyonları	58
3.13. Peripoortal ve perisantral bölgeler	59
3.14. Akut grupta görülen hemoraji alanları	60
3.15. Akut grupta damarlarda hiperemi ve eritrositlerin ekstrasvazasyonu (A). Subakut grupta sinüzoidal dilatasyon (B)	60



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	Mikrogram
ALT	Alanin amino transferaz
APAF1	Apoptotik proteaz aktive edici faktör 1
AST	Aspartat amino transferaz
BSA	Bovine serum albümin
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CSF	Koloni uyarıcı faktörler
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır sülfat
DHP	6,7-dihidro-7-hidroksi-1-hidroksimetil-5H-pirolizin
EFSA	European Food Safety Authority (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi)
FADD	Fas associated death domain (Fas ilişkili ölüm alanı)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
GGT	Gamma glutamil transferaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
HSOS	Hepatik sinüzoidal obstrüksiyon sendromu
HxE	Hemotoksilen eosin boya
IARC	International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanseri Araştırmaları Ajansı)
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-2	İnterlökin-2
İP	Intra peritoneal
KNaC ₄ H ₄ O ₆	Sodyum potasyum tartarat
MCT	Monokrotalin
MDA	Malondialdehit
Na ₂ CO ₃	Sodyum bikarbonat
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NGF	Nöron büyüme faktörü
OSİ	Oksidatif stres indeksi
OSİ	Oksidatif stres indeksi
PA	Pirolizidin alkaloidleri
PBS	Fosfat tampon
qPCR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROT	Reaktif oksijen türleri

SOD	Süperoksit dismutaz
TAK	Total antioksidan kapasite
TBİL	Total bilirubin
TCHO	Total kolesterol
TNF	Tümör nekroz faktörü
TOK	Total oksidan düzeyleri
TP	Total protein
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
CYP	Sitokrom P450 monooksijenaz



1. GİRİŞ

Pirolizidin alkaloidleri (PA), yaklaşık olarak 6000 bitki türü tarafından üretilen, ester bağlarıyla bir veya iki nesik asit ile birleşmiş bir nesin bazından oluşan bitkisel kökenli toksinlerdir (Xu, Wang, Yang, Xiong, Yang ve Wang, 2019; WHO, 2020). Bitkilerin yapısında bulunan bu toksik PA'lar, otçullardan korunmak, hayatta kalmak ve zararlı etkenlere karşı savunma sistemi olarak kullanılan ikincil metabolitlerdir (Boppre, 2011; Stegemann, Kruse, Brütt ve Ober, 2019; Letsyo, Dzikunoo, Dzah, Adams ve Asante-Donyinah, 2023).

Pirolizidin alkoloidi içeren bitkiler; geniş coğrafi yayılımı, doğada yaygın olarak bulunması ve toksik etkileri nedeniyle insanlar ve hayvanlar için önemli bir bitkisel toksikasyon kaynağıdır (Boppre, 2011; Çiğnitaş ve Kitiş, 2023). İnsanlar çoğunlukla; PA içeren bitkiler, PA ile kontamine yiyecekler, bitkisel ilaçlar, çay ve bal tüketimi ile toksik PA'lara maruz kalmaktadırlar (Mulder, Lopez Sánchez, These, Preiss-Weigert ve Castellari, 2015; Zhu vd., 2018; He, Xia, Shi ve Fu, 2020). Çeşitli bitkisel ürünlerin mekanik hasat süreçlerinde, sıklıkla PA'larla kontamine olması, sadece insanlar için değil hayvanlar için de olası bir maruziyet kaynağıdır (Edgar, Colegate, Boppre ve Molyneux, 2011; Dusemund vd., 2018; He vd., 2020). Özellikle sığır, koyun ve keçi gibi çiftlik hayvanlarının PA'ya maruz kalması, elde edilecek et, süt veya süt ürünleri gibi hayvansal ürünlerde PA varlığına sebep olmakta ve insanların da PA maruziyetini artırmaktadır (EFSA, 2011; Mulder vd., 2016).

Gıda kimyası ve gıda güvenliği üzerine yapılan çeşitli çalışmalar (Bodi vd., 2014; Schulz vd., 2015; Murder vd., 2015), hâlihazırda tüketilen gıda maddelerinin çoğunun bu tür alkaloidleri taşıdığı sonucunu ortaya koymuştur. Mulder vd., (2015) yapmış oldukları bir çalışmada, insan tüketimine sunulan yumurta, süt/süt ürünleri, et/et ürünleri, bitkisel çaylar ve bitkisel gıda takviyeleri gibi ürünlerde PA varlığını değerlendirmişlerdir. Sıvı kromatografi-kütle spektrofotometri (LC-MS/MS) yönteminin kullanıldığı bu çalışmada toplamda 1105 örnek (268 süt/süt ürünleri, 205 yumurta, 273 et/et ürünleri, 168 bitkisel çay, 191 bitkisel gıda takviyesi) değerlendirilmiş ve yumurta ile et örneklerinde PA ile kontaminasyonun görülmediği, ancak süt/süt ürünleri örneklerinde çeşitli konsantrasyonlarda PA

kontaminasyonunun olduğu belirtilmiştir. Bitkisel kaynaklı örneklerde ise PA kontaminasyon düzeylerinin yüksek seviyelerde olduğu ve PA çeşitliliğinin daha fazla olduğu ifade edilmiştir (Murder vd., 2015). Benzer şekilde Bodi vd., (2014) ve Schulz vd., (2015) tarafından yapılan çalışmalarda da çay, bitkisel ilaçlar ve bal örneklerinde PA düzeyleri araştırılmış ve birçok örnekte çeşitli PA varlığı ve bunların N-oksitleri ile kontamine olduğu ortaya konulmuştur.

Genel olarak geleneksel bitkisel tıbbın uygulandığı gelişmekte olan ölkelerde daha fazla görölen PA toksikasyon vakaları, alternatif tıpa olan ilginin giderek artmasıyla beraber artık gelişmiş ölkelerde de önemli bir sorun haline gelmiştir. Bu sebeple günümüzde hızla devam eden çalışmalar, hastalık aşamalarını ve gelişimini tahmin etmek için güvenilir biyobelirteçler bulmaya odaklanmaktadır (Pirola ve Sookoian, 2018). Bu bakımdan sunulan çalışma kapsamında, ELISA, kantitatif qPCR ve PCR array teknikleri ile belirlenecek markır potansiyeline sahip biyobelirteçlerin, spektrofotometrik yöntem ile klinik biyokimyasal yansımaların ve histopatolojik inceleme ile hücresel boyuttaki değişimlerin ortaya konulmasının biyokimyacı, patolog ve hepatologlar için PA kaynaklı hepatik hasarın teşhis ve prognozunun belirlenmesinde önemli veriler sağlayacağı düşünölmektedir.

1.1. Pirolizidin Alkaloidlerinin Kaynağı

Temel olarak Asteraceae, Boraginaceae, Fabaceae ve Apocynaceae bitki aileleri başta olmak üzere dünya çapında yayılım gösteren çeşitli bitki türlerinde 660'dan fazla farklı PA ve bunların N-oksitlerinin üretildiği ve yaklaşık yarısının kanserojen ve hepatotoksik nitelikte olduğu bilinmektedir (Fu, Xia, Lin ve Chou, 2004; Edgar, Molyneux ve Colegate, 2015; Glück, Waizenegger, Braeuning ve Hessel-Pras, 2021; Letsyo vd., 2023).

Geniş coğrafi yayılımı sebebiyle ölkemizde de görölen bu bitki aileleri içerisinde yer alan, gerek insanlar için gerekse hayvanlar için risk teşkil eden bazı bitki türleri şekil 1.1 ve izelge 1.1'de gösterilmiştir.



Parsonsia heterophylla



Tussilago farfara



Crotalaria retusa



Heliotropium lasiocarpum



Echium vulgare



Panax notoginseng



Lithospermum officinale



Gynura japonica



Sedum aizoon

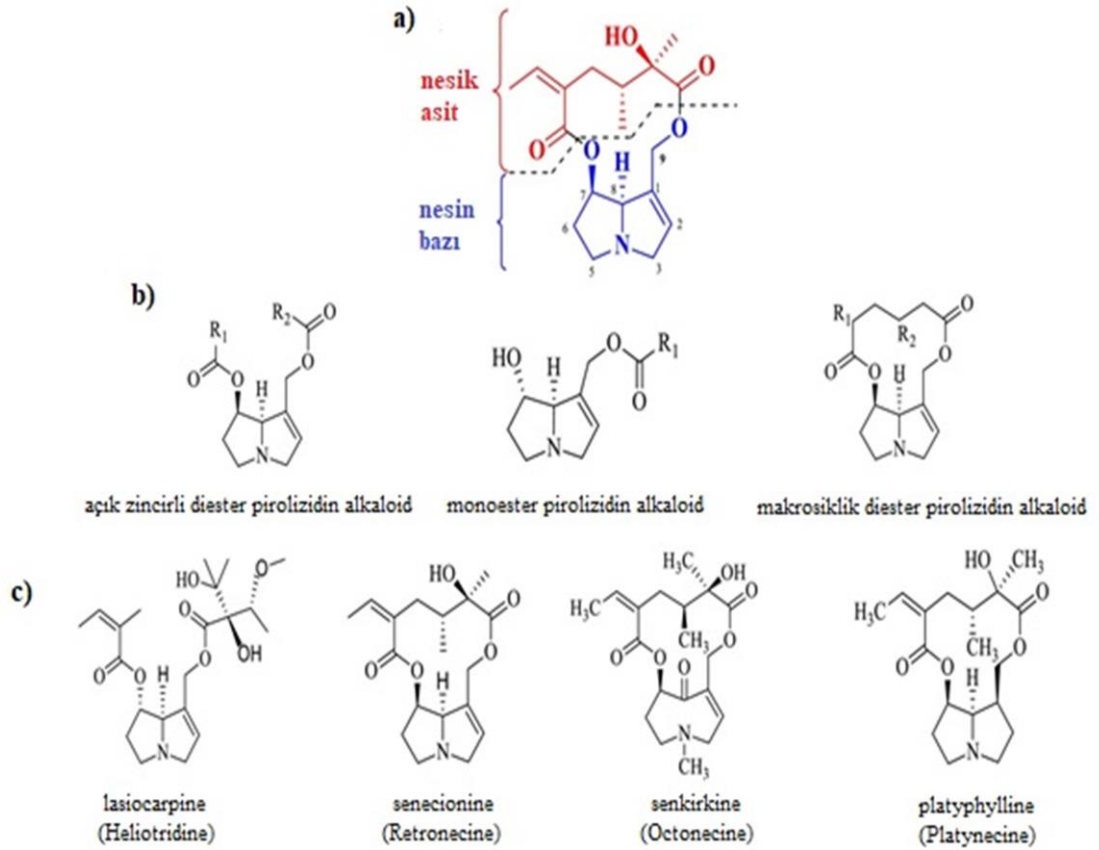
Şekil 1.1. Toksik etkili PA içeren bazı bitki türleri (Zhu vd., 2021 ve Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından 2020 yılında hazırlan zehirli bitki listesinden faydalanılmıştır, Erişim linki: <https://www.tarimorman.gov.tr/konu/956/zehirli-bitki-listesi>)

Çizelge 1.1. Toksik etkili PA içeren bazı bitkiler ve içerdiği alkaloid türleri (Stewart ve Steenkamp, 2001; Letsyo vd., 2023).

Bitki İsmi	İçerdiği Alkaloid Türü	Maruziyet Kaynağı
<i>Symphytum officinale</i>	Symphytine Lasiocarpine	Bitki çayları Gıda takviyesi (bitkisel ilaç)
<i>Tussilago farfara</i>	Senkirkine	Bitki çayları
<i>Adenostyles alliariae</i>	Seneciphylline	Bitki çayları
<i>Senecio longilobus</i>	Retrorsine Riddelliine	Bitki çayları
<i>Senecio ilicifolius</i>	Senecionine	Gıda kontaminasyonu (un)
<i>Senecio burchelli</i>	Senecionine	Gıda kontaminasyonu (un)
<i>Heliotropium lasiocarpum</i>	Lasiocarpine Heliotrine	Gıda kontaminasyonu (un)
<i>Heliotropium popovii</i>	Lasiocarpine Heliotrine	Bitki çayları Gıda kontaminasyonu (un)
<i>Heliotropium eichwaldi</i>	Heliotrine	Bitkisel ilaçlar
<i>Heliotropium indicum</i>	Ekinetin Likopzamin Lasiokarpin	Bitkisel ilaçlar Gıda kontaminasyonu
<i>Crotalaria retusa</i>	Monocrotaline	Bitki çayları
<i>Crotalaria nana</i>	Crotananine Senecionine	Gıda kontaminasyonu (un)
<i>Crotalaria juncea</i>	Senecionine Riddelliine	Bitkisel ilaçlar
<i>Echium vulgare</i>	Senecionine Riddelliine	Gıda kontaminasyonu (bal)
<i>Echium plantagineum</i>	Senecionine Riddelliine	Gıda kontaminasyonu (bal)
<i>Chromolaena odorata</i>	Rinderin Likopzamin	Bitkisel ilaçlar Bal
<i>Gynura spp.</i>	Retrorsin Senecionine Senkirkine	Bitkisel ilaçlar
<i>Eutorium spp.</i>	Ekinetin Likopzamin	Bitkisel ilaçlar

1.2. Pirolizidin Alkaloidlerinin Kimyasal yapısı

Pirolizidin alkaloidleri; renksiz, optik olarak aktif alkamin esterleridir. Kimyasal olarak kararlıdır ve suda değişken çözünürlüğe sahiptirler (Stewart ve Steenkamp, 2001). Tipik olarak C-7 ve C-9 karbonlarında mono- veya diesterlenmiş hidroksi gruplara sahip olmakla beraber karbon atomlarındaki pozisyonlarına göre makrosiklik diester, açık zincirli diester ve monoester ile dört farklı tipte nesin bazıları olmak üzere farklı PA varyasyonları (retronecine, heliotridine, platynecine, octonecine) vardır (Dusemund vd., 2018; Letsyo vd., 2023).



Şekil 1.2. (a) Nesin bazı ve nesik asit gösteren genel pirolizidin alkaloid yapıları, (b) esterlenmiş nesik asitlerin farklı formlarını gösteren pirolizidin alkaloid yapıları, (c) Nesin baz varyasyonlarına göre pirolizidin alkaloid yapıları (Letsyo vd., 2023).

1.3. Pirolizidin Alkaloidlerinin Metabolizması

Apocynaceae, Asteraceae, Boraginaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Graminae, Linaceae, Orchidaceae, Ranunculaceae, Santalaceae ve Sapotaceae gibi bazı kapalı tohumlu bitki ailelerinin karakteristik bileşiklerinden olan PA'lar, tüketildiğinde insan zehirlenmesine neden olma potansiyeline sahip, dünya çapında en yaygın olarak dağıtılan fitotoksinlerdir (Letsyo, Jerz, Winterhalter ve Beuerle, 2017; Steinhoff, 2019; Schrenk vd., 2020).

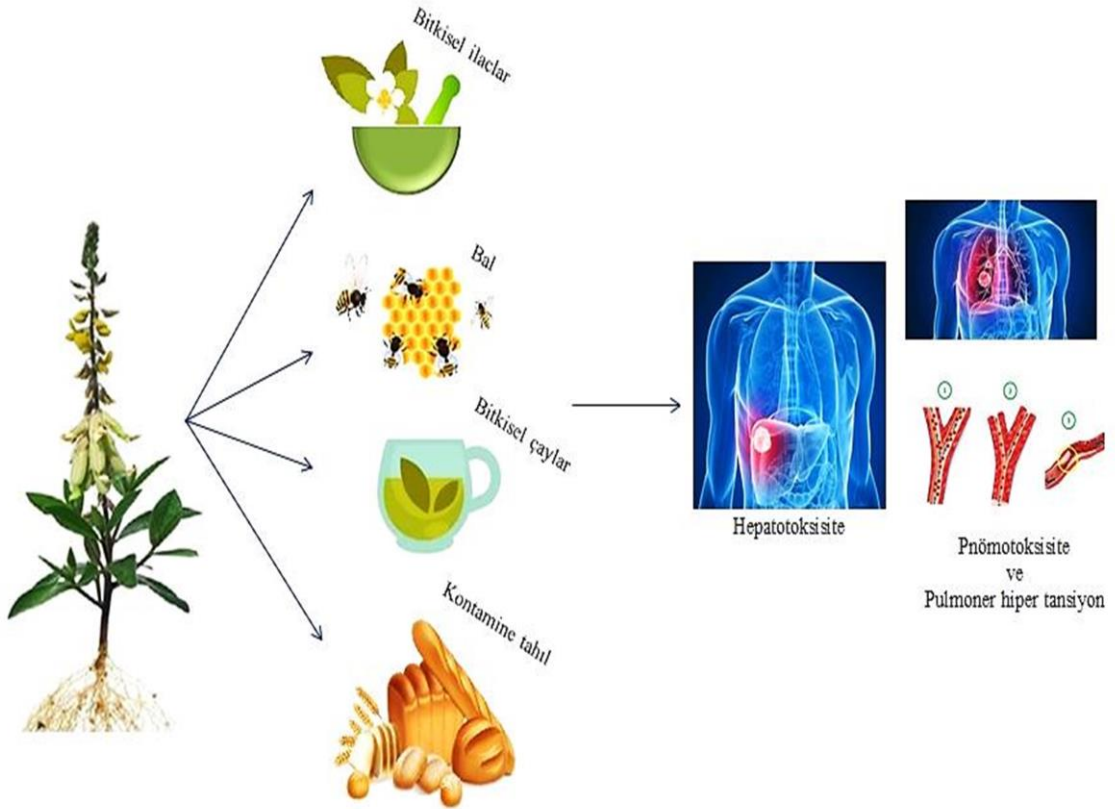
Halk sağlığı için risk teşkil eden PA'lar aslında protoksin özelliği taşımakta ve karaciğerde metabolik aktivasyondan sonra toksisite geliştirmektedir. Pirolizidin alkaloidleri gıdalar ile alındıktan sonra bağırsaklardan emilerek portal ven ile karaciğere ulaşırlar. Karaciğerde sitokrom P450 (CYP) tarafından metabolize edildikten sonra toksik olmayan metabolitler yaklaşık 24 saat içerisinde vücuttan idrar ve safra ile uzaklaştırılırken, toksik etkili olan dehidro-pirolizidin alkaloidleri (dehidro-PA'lar) olarak adlandırılan 6,7-dihidro-7-hidroksi-1-hidroksimetil-5H-pirolizin (DHP) esterleri ise 48-72 saat arasında idrar ile atılır (Baker, Pfister, Molyneux ve Kechele, 1991; Yan, Nichols, Yang, Fu ve Chou, 2002; Song, He, Ma, Fu ve Lin, 2020).

Dehidro-PA'lar elektrofilik olup, dokuların yapısal unsurları ile alkilleyici reaksiyon oluştururlar ve bu maddeler hidrojen iyonları yerine alkil radikallerini yerleştirme yeteneğindedirler (Milli ve Hazıroğlu, 1997). Ayrıca DNA, protein, aminoasit ve glutasyon gibi hücresel yapılara kovalent bağ ile bağlanarak (Mattocks, 1968), sitotoksik, genotoksik, hepatotosik ve kardiyopnömotoksik etkileri de gösterilmiştir (Mingatto vd., 2007; Mingatto, Maioli, Bracht ve Ishii-Iwamoto, 2008).

1.4. Pirolizidin Alkaloidlerinin Toksisitesi

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından oluşturulan ortak uzman komitesinin (JECFA) 2020'de gerçekleştirilen son toplantısında, çok sayıda bitkisel ve hayvansal gıda türü ile yoğun olarak maruz kalınabilen PA toksisitesinin insan ve hayvan sağlığı için kritik önemde olduğu, biyokimyasal verileri, analiz yöntemleri, çeşitli insan ve hayvan gıdalarındaki PA kontaminasyon düzeyleri, doz/zarar analizi ve toksik/kanserojen risk tahmini konularında 400 sayfalık bir rapor yayınlanmış ve konuya dikkat çekilmiştir (WHO, 2020).

Çeşitli sebeplere bağlı olarak PA'ya maruz kalındığında, hepatik sinüzoidal obstrüksiyon sendromu (HSOS), akut (yaygın nekroz ve kanama ile karakterize) ve kronik (fokal hepatosit nekrozu ve safra proliferasyonu ile karakterize) karaciğer hasarı, fibrozis, karaciğer sirozu, pnömotoksisite ve pulmoner hipertansiyonun olduğu bildirilmiştir (Ward vd., 2008; Rubbia-Brandt, 2010; EFSA, 2011; Agostini vd., 2012; Edgar vd., 2015; Hessel-pras vd., 2020) (Şekil 1.3). Hepatotoksisite ve pulmoner toksisitenin yanı sıra, MCT'nin deney hayvanlarında nefrotoksisiteye (Yao vd., 2014), genotoksisiteye (He vd., 2021) ve hepatik anjiyosarkomaya (Cao vd., 2022) sebep olduğu rapor edilmiştir. İnsanlarda kanserojenlik gözlemlenmemiş olsa da insan hücre hatlarının PA'ların neden olduğu hayvan kanser modelleriyle aynı mekanizmaları paylaştığı rapor edilmiştir (Chen, Mei ve Fu, 2010; He vd., 2021). Bu nedenle, PA'lar dünya çapındaki resmi kuruluşlarda bir tür kontrollü toksik madde olarak listelenmiştir (Ma vd., 2018).



Şekil 1.3. Pirolizidin alkaloidlerinin çeşitli maruziyet yolları ve primer toksik etkileri (Letsyo vd., 2023'den uyarlanmıştır).

Yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan hayvanlar incelendiğinde hepatosellüler nekrozun majör ve tutarlı bir bulgu olarak saptandığı, insanlarda da benzer bulguların, PA içeren tohumlarla kontamine olmuş yabani otların tüketiminden sonra gözlemlendiği belirtilmiştir (Stewart ve Steenkamp, 2001). Ayrıca, kronik PA maruziyetinde deney hayvanlarında karaciğer hücreli karsinom, hemanjiyo-endotelyal sarkoma ve ekstrahepatik dokularda (akciğer, pankreas, bağırsak) tümörlere neden olduğu gözlenmiştir (Nakai vd., 2019; Schrenk vd., 2020; He, Zhu, Ma ve Lin, 2021a).

İnsanlar için gıdalar ile istem dışı maruz kalınan PA'ların toksik etkileri sadece alınan miktar ve süre ile değil aynı zamanda yaş ve cinsiyete göre de değişmektedir. PA'ların toksik etkilerine karşı en yüksek hassasiyeti gösteren yaş grubunun fetüsler ve çocuklar (özellikle yeni doğan ve/veya bebekler) olduğu, cinsiyet açısından ise erkeklerin kadınlara göre daha dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Rasenack, Müller, Kleinschmidt, Rasenack ve Wiedenfeld, 2003; Luo vd., 2019).

Rasenack vd., (2003) tarafından bildirilen bir vaka raporunda hamilelik süresince günlük 7 µg PA (*Symphytum officinale* içeren bir baharattan) alımının anne karaciğerinde ciddi toksik etki göstermediği ancak plesanta bariyerini geçerek bebeğin karaciğerine zarar verdiği ve doğumdan iki gün sonra bebeğin öldüğü rapor edilmiştir. Benzer şekilde Luo vd., (2019) tarafından yapılan bir çalışmada gebe sıçanlara PA'lardan monokrotalin (MCT) verilmiş ve Rasenack vd., (2003) ile benzer olarak MCT'nin plesanta bariyerine geçerek fetus karaciğerinde harabiyete yol açtığı hatta dişi fetusların daha fazla etkilendiği ifade edilmiştir. Gerek maternal gerekse fetus karaciğerinde harabiyete sebep olan PA'ların karaciğere verdiği hasarın şiddetini süre, doz, yaş ve cinsiyet dışında bakteriyal/viral enfeksiyonlar, bakır gibi metaller içeren medikal ilaçlar ya da mikotoksinlerin varlığı da etkileyebilmektedir (Yee vd., 2000; Çiğnitaş ve Kitiş, 2023).

Geçmişten günümüze kadar birçok ülkede PA kaynaklı toksikasyon vakaları bildirilmiştir. Pirolizidin alkaloidleri ile kontamine tahıl tüketimi sebebiyle kuzeybatı Afganistan'da yaklaşık 3500 kişinin *Heliotropium spp.* tohumlarıyla kontamine olmuş ekmek tüketimi sonucunda etkilendiği, Hindistan'da ise *Crotalaria spp.* tohumları ile kontaminasyon sonucunda etkilenen 67 kişiden 28'inin hayatını

kaybettiği bilinmektedir (Kakar vd., 2010; Weldearegay, Gebrekidan ve Gezahegne, 2019; Letsyo vd., 2023). Benzer şekilde toksik PA maruziyetine bağlı olarak 1992 yılında Tacikistan'da 4000'den fazla kişinin hastaneye kaldırıldığı (Chauvin, Dillon, Moren, Talbak ve Barakaev, 1993; Mayer ve Lüthy, 1993; He vd., 2021a), Etiyopya da ise 2011 yılı itibariyle 314'ü ölüm olmak üzere toplam 1033 kişinin etkilendiği rapor edilmiştir (CDC, 2012; Chiu vd., 2016). Geleneksel bitkisel tıbbın yoğun olarak uygulandığı Çin'de, PA içeren bir bitkinin (*Gynura japonica*) tüketimi nedeniyle, 200'den fazla ölüm de dahil olmak üzere, toplam 2214 PA kaynaklı karaciğer hasarı bildirilmiştir (Zhu vd., 2021). Şimdiye kadar, Afganistan, İngiltere, Çin, Almanya, Hong Kong, Hindistan, Jamaika, Güney Afrika, İsviçre, Özbekistan ve ABD dahil olmak üzere dünya çapında birçok ülke ve bölgede 17.000'den fazla PA toksikasyon vakası belgelenmiştir (He vd., 2021a).

1.5. Monokrotalin

Monokrotalin, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından, insanlar için muhtemel kanserojen ajanlar (Grup 2B) sınıfında yer alan bir pirolizidin alkaloididir. (IARC, 2002; WHO, 2020). Temel olarak çalı türü bitki olarak tüm dünyada yaygın olarak bulunan *Crotalaria spectabilis* bitkisinin tohumlarından elde edilen 11 üyeli bir makrosiklik fitotoksindir (Yee vd., 2000).



Şekil 1.4. (a) Monokrotalinin kimyasal yapısı (İsmail vd., 2023) ve (b) elde edildiği *Crotalaria spectabilis* bitkisinin görünümü (Prada, Stashenko ve Martinez, 2020).

Klinik alışmalar için oldukça önemli olan randomize, tekrarlanabilir ve kontrollü hayvan modellerinin karakterizasyonu için yürütülen çalışmalar sonucunda pirolizidin alkaloidlerinden MCT'ye bağlı gelişen toksikasyonlarda; anoreksi, kilo kaybı ve sarılık da dahil olmak üzere karaciğer yetmezliği ile ilgili klinik bulgular ortaya çıkmaktadır. Bu bulgularla eş zamanlı olarak karaciğerde; fibrozis, megalositozis, yaygın hemoraji, santral venöz ve sinüzoidal hücre hasarı ve apoptozisle karakterize histopatolojik değişiklikler oluştuğu gösterilmiştir (Nobre, Dantas, Riet-Correa, Barbosa Filho, Tabosa ve Vasconcelos, 2005; Lam, Jones, Wilson ve Segall, 2005). Ayrıca, DNA, protein, amino asit ve glutasyon gibi biyokimyasal yapılara kovalent olarak bağlanarak, hepatotoksik etkinin yanı sıra; karsinogeneze, terotogeneze, mitozun ve bağışıklık sisteminin baskılanmasına da sebep olurlar (Cheeke, 1994; Stewart ve Steenkamp, 2001). Pirolizidin alkaloidleri, pirol-protein katkıları oluşturmak için hücresel proteinlerle bağlandıklarında protein disfonksiyonu suretiyle hücrelerde; sitotoksite, dejenerasyon ve nekroz oluşumuna sebep olurlar (Lu vd., 2018; Song vd., 2020; He vd., 2021a).

1.5.1. Monokrotalin ve Oksidatif Stres

Normal fizyolojik koşullarda bile hücrelerde devamlı olarak üretilen serbest radikaller, atomik bir yörüngede eşleşmemiş elektron içeren ve bağımsız olarak var olabilen moleküler türlerdir (Tetik ve ıracı, 2019). Kararsız yapıda ve dış orbitallerinde ortaklaşmamış en az bir elektron bulunduran serbest radikaller, başka moleküllere elektron verebilir veya başka moleküllerden elektron alabilirler. Bu sayede kararlı yapıya geçmeye çalışan radikaller, oksidan ya da redüktan olarak davranırlar (Lobo, Patil, Phatak ve Chandra, 2010).

Canlı hücrelerde oluşan serbest radikaller; elektron transport zinciri, endotelial ve fagositik hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar, redoks döngüleri, otooksidasyon reaksiyonları sırasında NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) oksidaz ile ksantin oksidaz gibi enzimlerinin etkisiyle endojen kaynaklı oluşabileceği gibi ilaçlar, endüstriyel kirleticiler, sigara dumanı, UV ışınlar, iyonize radyasyon ve ksenobiyotikler gibi eksojen kaynaklı olarak da oluşabilirler (aylak, 2011; Karabulut ve Gülay, 2016).

Çizelge 1.2. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri (Halliwell ve Gutteridge, 2015; Koçyiğit ve Karadağ, 2020)

Reaktif Oksijen Türleri (ROT)		Reaktif Nitrojen Türleri (RNT)	
Radikaller	Non-Radikaller	Radikaller	Non-Radikaller
Hidroksil (OH)	Peroksinitrit (ONOO)	Nitrik oksit (NO)	Peroksinitrit (ONOO)
Süperoksit (O ₂)	Hipokloröz asit (HOCl)	Nitrojen dioksit (NO ₂)	Peroksinitröz asit (ONOOH)
Nitrik oksit (NO)	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)		Nitrik asit (HNO ₃)
Peroksil (RO ₂)	Singlet oksijen (O ₂)		Nitril klorür (NO ₂ Cl)
Lipid peroksil (LOO)	Ozon (O ₃)		Nitrotil katyonu (NO ₄)
Alkoksil (RO)	Lipid peroksit (LOOH)		Dinitrojen trioksit (N ₂ O ₃)
Hidroperoksil (OOH)			Nitröz asit (HNO ₂)

Temel olarak Çizelge 1.2’de verildiği gibi oksijen ve nitrojen kaynaklı olarak farklılık gösterebilen radikaller düşük miktarlarda enfeksiyöz aktivitelerden korunma, fertilizasyon, fetal gelişim, hücre proliferasyonu/farklılaşması, transkripsiyon faktörlerinin ve bazı enzimatik aktivitelerin düzenlenmesi, endotelial homeostazis ve düz kas hücrelerinin kasılması gibi bazı faydalı etkilere sahiptirler (Wu ve Cederbaum, 2003; Halliwell ve Gutteridge, 2015; Aggarwal, Gross, Sharma, Fineman ve Black, 2013). Ancak yüksek konsantrasyonlarda mevcut olduklarında DNA hasarı, lipid peroksidasyonu ve proteinlerin spesifik olmayan translasyon sonrası modifikasyonları gibi çeşitli fizyopatolojik durumlara yol açabilirler (Pisoschi ve Pop, 2015; Karabulut ve Gülay, 2016). Aslında fizyolojik olarak gerçekleşen ve biyolojik devamlığın bir gereği olan bu olayların belirli bir denge içerisinde ilerlemesi ve oksidatif stres oluşturmaması gerekmektedir. Bu dengenin sağlanabilmesi için hücrelerde oksidatif stresi düzenleyen; A, C ve E vitaminleri, resveratrol, kuersetin ve kateşin gibi flavonoidler başta olmak üzere enzimatik olmayan antioksidanlar ile katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon (GSH), glutatyon redüktaz (GR), glutatyon-S-transferaz (GST) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimatik antioksidanlar bulunmaktadır (Ighodaro ve Akinloye, 2018; Aslankoç vd., 2019; Zimmer vd., 2021). Ancak antioksidan

savunma sistemlerinin yetersiz kalması ve/veya reaktif oksijen ya da nitrojen türlerinin (ROT ya da RNT) miktarındaki aşırı artışlar antioksidan ve oksidan sistem arasındaki deneyi bozmakta ve oksidatif stres ortaya çıkmaktadır (Celi, 2011; Tabakoğlu ve Durgut, 2013; Aslankoç vd., 2019). Serbest radikaller ile uyarılan oksidatif stres, hücrelerde hasara neden olduğundan dolayı çoğu hastalıkların patogenezinde önemli rol oynamaktadır (Özcan, Erdal, Çakırca ve Yönden, 2015).

Canlı vücudunun metabolik merkezinde yer alan karaciğer, toksik maddelerin zararsız hale getirilmesi ve vücuttan uzaklaştırılması için oldukça önemli bir organdır. Birçok çalışmada karaciğer bozukluklarının patofizyolojik temelinde reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı ekspresyonuna bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Cichoz-Lach ve Michalak, 2014; Liu, Chen, Wang, Ji ve Wang, 2010; Amin, Hashem, Al-muzafar ve Taha, 2014; Cuce, Canbaz, Sozen, Yerlikaya ve Kalkan, 2017; Alkadi, 2018; Gao vd., 2021). Liu vd., (2010) tarafından yapılan bir çalışmada PA'lardan izolin'in oksidatif hasar sürecindeki olası etkileri çeşitli fare dokuları üzerinde incelenmiş ve oksidatif stres belirteçlerinden total antioksidan kapasite (TAK) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri ile CAT, GPx ve glutatyon-S-transferaz (GST) aktiviteleri değerlendirilmiştir. Söz konusu çalışmada farelere intragastrik olarak 100 mg/kg dozunda PA'lardan izolin uygulamasının, karaciğer dokusunda MDA düzeyleri ve CAT aktivitelerini kontrol grubuna göre artırdığı, TAK düzeyleri ile GPx ve GST aktivitelerini ise kontrol grubuna göre azalttığı ifade edilmiştir. Çalışma kapsamında değerlendirilen diğer dokulardan akciğer ve kalp dokusunda da benzer şekilde izolin maruziyetinin MDA düzeyleri ve CAT aktivitelerini kontrole göre artırırken, TAK düzeyleri ve GPx aktivitelerini de azalttığı ifade edilmiştir. Araştırmacılar, diğer dokulardan farklı olarak beyin dokusunda TAK ve MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre azaldığını, GPx, GST ve CAT aktivitelerinin ise kontrol grubuna göre artış gösterdiğini belirlemiş ve izolin maruziyetine karşı beyin dokusunun vermiş olduğu farklı tepkinin sebebinin, metabolik aktivasyon sonrasında PA'ların in vivo organlardaki farklı dağılıma sahip olması ve beyin dokusunun entegre savunma mekanizmasının varlığından ileri gelebileceği şeklinde ifade etmişlerdir. Sonuç olarak PA uygulamasının karaciğer de dahil olmak üzere farklı dokularda antioksidan savunma mekanizmasını değiştirdiği (GSH, GST ve GPx gibi hücresel

antioksidan enzim aktivitelerinde azalma), lipid peroksidasyonu ve ROT üretime yönelik tepkisel artışların (MDA, CAT ve SOD aktivitelerinde artış) görüldüğü belirtilmiştir (Liu vd, 2010).

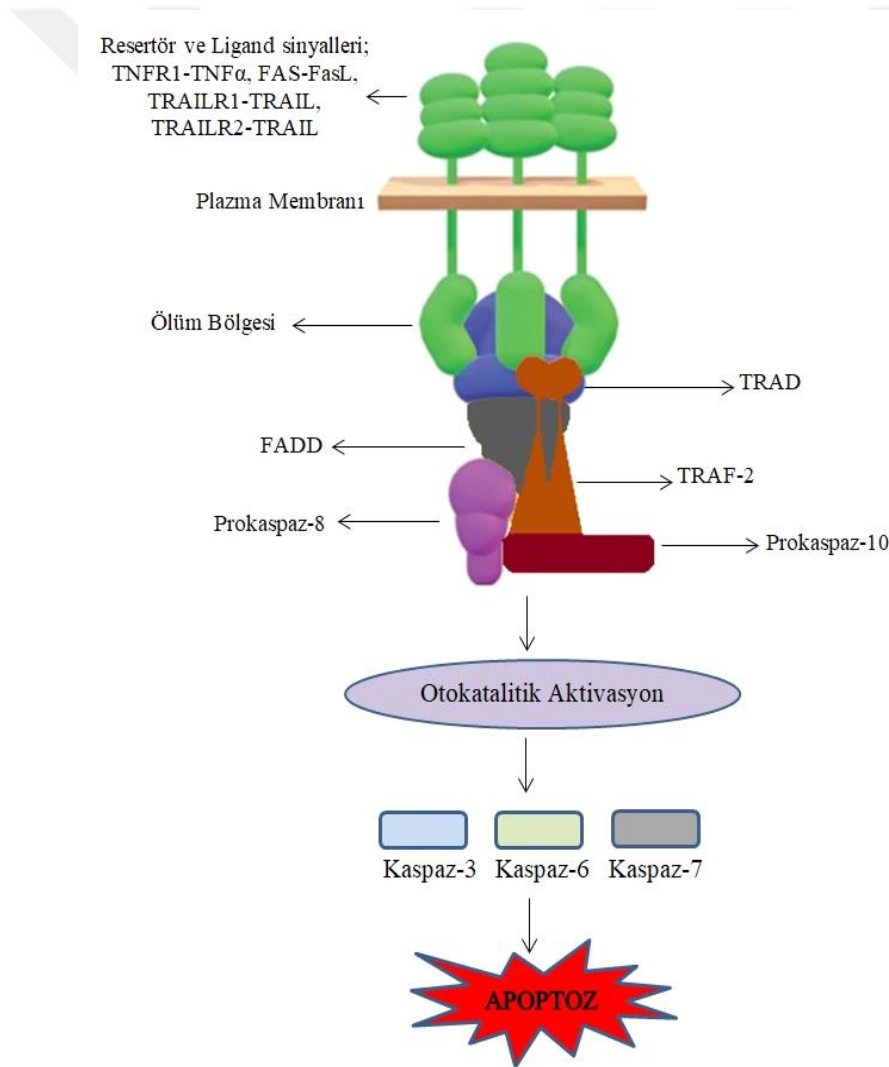
1.5.2. Monokrotalin ve Apoptozis

Apoptozis, canlıların normal gelişimi boyunca gereksinim duyulmayan/istenmeyen ve/veya fonksiyonları bozulan hücreleri, çevre hücrelere zarar vermeden uzaklaştırılması olarak tanımlanmaktadır (Akşit ve Bildik, 2008; Mis ve Çilingir Yeltekin, 2014; Okuyan, 2023). İlk kez 1972 yılında Avustralya'lı patalog J.F.K Kerr ve arkadaşları tarafından morfolojik olarak farklı formda bir hücre ölümünü tanımlamak amacıyla kullanılan apoptozis terimi, Yunanca kökenli apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) kelimelerinin birleşiminden köken almaktadır (Kerr, Wylie ve Currie, 1972; Coşkun ve Özgür, 2011). Genel olarak hücrelerin kendi kendini yok ettikleri, yüksek düzeyde düzenlenmiş, genler tarafından kontrol edilen ve enerjiye gereksinim duyan apoptozis; organizmadaki homeostazi sağlayan biyolojik bir işlemdir (Coşkun ve Özgür, 2011; Ark, 2017). Bu biyolojik işlem, embriyonik dönemde el ve ayak parmaklarının arasındaki ara dokunun ortadan kalkması ile başlayarak tüm yaşam boyunca devam etmektedir. Gelişim biyolojisinde önemli bir yeri olan apoptozis, normal doku yıkımlanmaları, immun sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları, organ büyüklüklerinin korunması, rejenerasyon ve tamir olayları gibi fizyolojik süreçlerde önemli olmakla beraber hücre yenilenmesi ile dengeli bir şekilde devam etmelidir (Elmore, 2007; Güleş ve Eren, 2008)

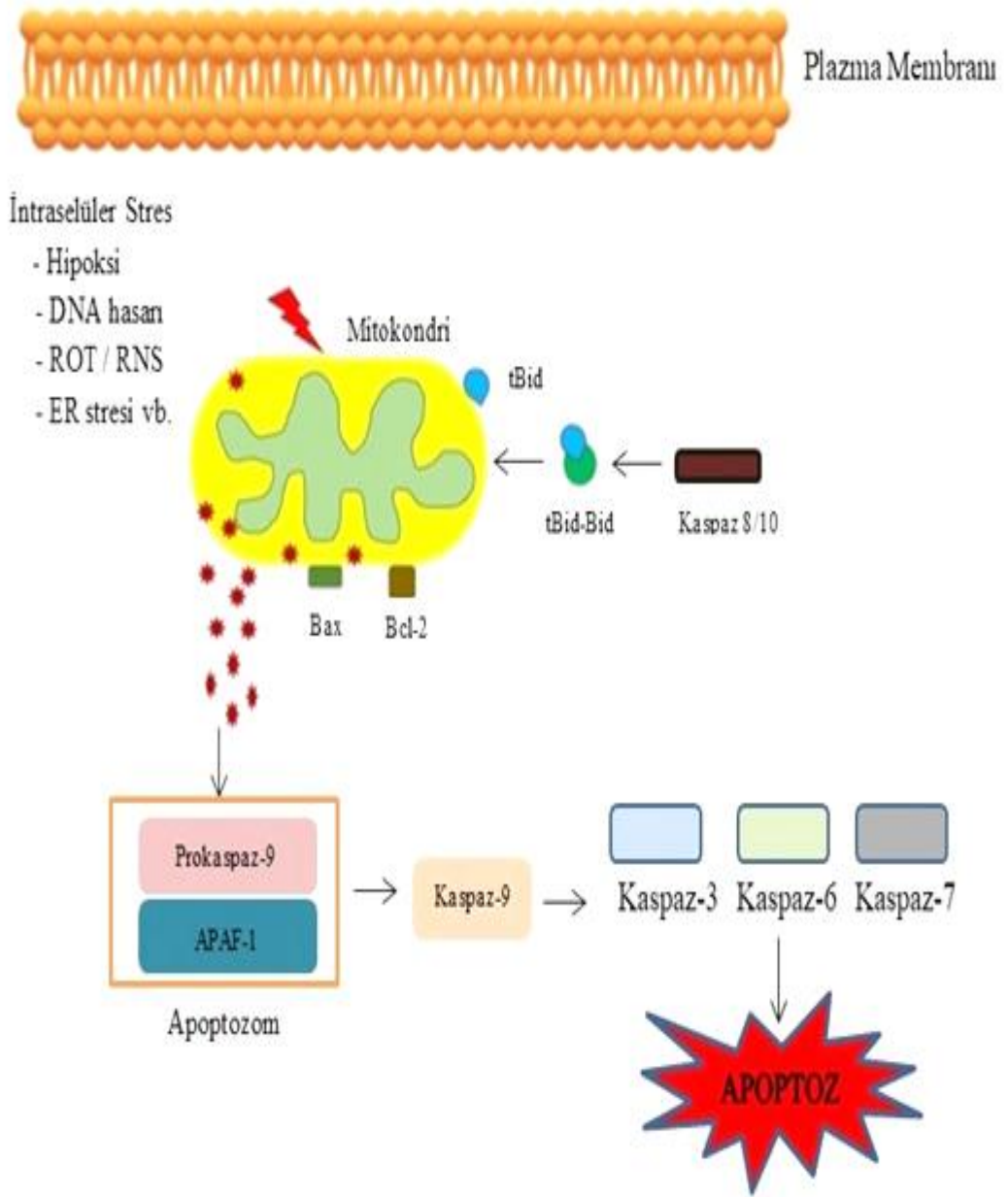
Hücre ölümünün düzenlenmesinde mitokondri, endoplazmik retikulum, lizozom, golgi aygıtı, çekirdek gibi kompleks farklı yapılar birlikte çalışarak bu süreci tamamlar (D'Arcy, 2019). Ancak, bu mekanizmada bir aksaklık meydana geldiğinde (eksik ya da fazla apoptoz) kanser, otoimmun hastalıklar, Alzheimer, Huntington, Parkinson ve spinal muskular atrofi gibi nörodejeneratif hastalıklar, hematolojik bozukluklar, iskemi ve reperfüzyon gibi çeşitli patolojik durumlar meydana gelebilmektedir (Akşit ve Bildik, 2008; Ark, 2017).

Hücrelerde apoptozun gerçekleşebilmesi için ilk olarak, hücre içinden ya da dışından gelebilecek ve genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalin gelmesi gerekmektedir (Mountz ve Zhou, 2001; Güleş ve Eren, 2008). Apoptozisi etkileyen

hücre içi uyarılar arasında sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpresör gen olan p53'ün aktive olması, viral/bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkojenlerin (myc gibi) yer aldığı bilinmektedir. Hücre dışı uyarılar arasında ise, tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), interlökin-2 (IL-2) gibi maddelerin ortamda azalması, ROT ve/veya RNT, ısı şoku, hipoksi, kemoterapötik ilaçlar, çevresel kirlenmeler ve radyasyon önemli yere sahiptir (Akşit ve Bildik, 2008). Hücre içi veya dışından gelen uyarıcılara cevaben uygun yolağın tetiklenmesi ile gerçekleşen apoptozis, intrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki temel yolak tarafından kontrol edilmektedir (Okuyan, 2023).



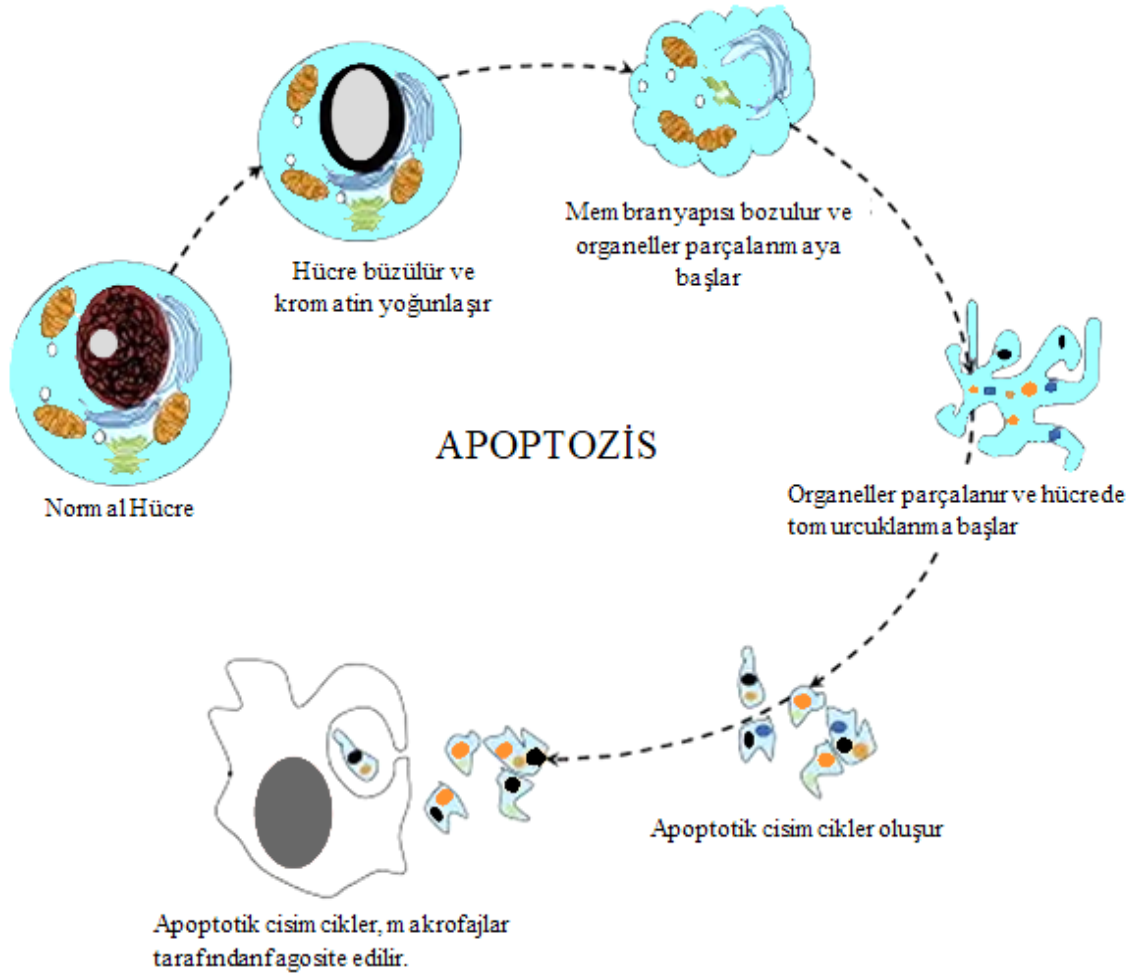
Şekil 1.5. Ekstrinsik apoptotik yolak (Celepli, Bigat, Celepli ve Karagin, 2020; Okuyan, 2023).



Şekil 1.6. İntrinsik apoptotik yolak (Celepli vd., 2020; Okuyan, 2023).

İntrinsik yolak, mitokondri membran permeabilizasyonunun bozulması ile sitokrom C salınmasını takiben apoptozom oluşumunu ve sonrasında sırasıyla kaspaz aktivasyonunu kapsar (Ark, 2017). Mitokondriyal yolakta rol oynayan ve intrinsik yolun ana düzenleyicileri olan protein ailesi Bcl-2 ailesidir. Bcl-2 aile üyeleri, aktiviteleri ile mitokondriyal membranın bozulmasına ve sitoplazmada sitokrom C'nin salınmasına neden olurlar. Serbest kalan sitokrom C, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (APAF1) ve prokaspaz-9 ile bir araya gelerek apoptozom adı verilen bir

kompleks oluşturur (Acehan vd., 2002; Cain, Bratton ve Cohen, 2002; Shiozaki, Chai ve Shi, 2002). Bu kompleks, prokaspaz-9'u kaspaz 9'a dönüştürür ve daha sonra kaspaz-3, -6 ve -7 öldürücü kaspazları aktive ederek hücre apoptozunu indükler (Danial ve Korsmeyer, 2004; Kuribayashi, Mayes ve El-Dery, 2006; Shiozaki ve Shi, 2004; Wang ve Youle, 2009) (Şekil 1.6). Esas olarak mitokondrinin dış zarında bulunan Bcl-2 ailesi, anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) ve pro-apoptotik proteinler (Bax, Bad, Bid, BclXs, Noxa) olarak üzere 2 zıt gruptan oluşur (Szegezdi, MacDonald, Chonghaile, Gupta ve Samali, 2009; Coşkun ve Özgür, 2011). Aynı aile içerisinde yer alan bir antiapoptotik protein olan Bcl-2 ve bir pro-apoptotik protein olan Bax, mitokondriyal membranı stabilize ederek, intrinsik apoptotik yolun kontrolünde önemli fonksiyonlara sahiptir (Scorrano ve Korsmeyer, 2003; Frenzel, Grespi, Chmielewski ve Villunger, 2009; Tessoulin vd., 2019; Sharma vd., 2020). Bu nedenle, bu iki protein arasındaki denge bozuklukları hücrelerin apoptozise gidip gitmeyeceğinin belirlenmesi ve apoptozun ilerlemesi üzerinde son derece etkilidir (Du Toit, 2013). Ekstrinsik yolda ise hücre membran yüzeyinde bulunan TNF- α , FasL veya TRAIL gibi ligantlara bağlanarak hücre içinde FADD'ın aktivasyonu ile prokaspaz-8 veya prokaspaz-10'un aktivasyonu gerçekleşir (Ark, 2017). Başlatıcı kaspazlar aktive edildikten sonra apoptotik hücre bölünmesiyle sonuçlanması için diğer kaspazlarında aktivasyonu sağlanır (Stennicke ve Salvesen, 2000; Okuyan, 2023). Hem intrinsik yola hem de ekstrinsik yolda proteolitik aktivite, kaspazlar tarafından başlatılır ve devamında morfolojik değişimleri indükleyen, DNA ve hücre yapısının degrades olmasına neden olan kaspaz-3, -6 ve -7 kompleksi oluşur (Degterev, Boyce ve Yuan, 2003; Brentnall, Rodriguez-Menocal ve Guevara, 2013; Okuyan, 2023). Kaspaz-3, DNA hasarı ile apoptoz indüksiyonunda önde gelen bir protein olarak rapor edilmekte ve apoptotik hücre ölümünde nihai yürütücü proteaz olarak nitelendirilmektedir (Mohamed ve Magdy, 2017; Owumi, Aliyu-Banjo ve Danso, 2019). Apoptotik mekanizma işlediğinde; hücre büzüşmeye başlamakta ve diğer sağlam hücrelerden koparak yaklaşık 1/3'lük kayba uğramaktadır (Öktem, Özhan ve Özol, 2001). Bu esnada Şekil 1.7'de da gösterildiği gibi nükleer kromatin yoğunlaşması, DNA parçalanması, endoplazmik retikulum dilatasyonu, mitokondri şişmesi, hücrede tomurcuklanma meydana gelmekte ve bunu takiben organeller parçalanarak apoptotik cisimcikler oluşmaktadır (Güleş ve Eren, 2008).



Şekil 1.7. Apoptoza uğrayan hedef hücrede görülen morfolojik değişiklikler (Gürel Küçükkırlı, 2020).

Pirolizidin alkaloidleri ile ilgili yapılan çalışmalarda uygulama yolu ve kullanılan doza göre değişkenlik gösteriyor olsa da PA sınıfı içerisinde yer alan birçok üyenin hepatotoksik olduğu, hepatik hücrelerde apoptoz, nekroz ve kanamaya sebep olduğu belirtilmiştir (Song vd., 2020; He vd., 2021a). Ek olarak karaciğer hücrelerinde sitokrom P450 tarafından üretilen metabolitlerin kan dolaşımıyla akciğer, kalp ve böbreklere taşınması sonucu patolojik değişikliklerin şekillendiği (Coople, Ganey ve Roth, 2003; Benavides-Cordoba, Silva-Media, Varela ve Gomez, 2020; Silva vd., 2023), özellikle sitoplazma ve çekirdeğin büyümesi olarak tanımlanan megalositozisin, birçok hayvan türünde PA toksikasyonuna spesifik bir bulgu olarak rapor edildiği bilinmektedir (Eröksüz vd., 2001; Fu, Xia, Lin ve Chou, 2004).

Soylu, Çevik ve Timurkaan (2022), tarafından yapılan bir çalışmada, ratlara intraperitoneal (IP) olarak 50-100-150 ve 200 mg/kg dozda monokrotalin enjeksiyonundan sonraki 18. saat ve 6. haftadaki apoptotik değişikliklerin histopatolojik, immunohistokimyasal ve TUNEL metodu ile incelendiğinde çeşitli dokularda megalositozis, dejenerasyon, nekroz, mononükleer hücre infiltrasyonu, şiddetli konjesyon ve fibrozisin görüldüğü, ancak 18.saatteki apoptotik değişimlerin, 6.haftaya göre daha şiddetli olduğu ifade edilmiştir. Başka bir çalışmada ise (Gao vd., 2020), MCT'ye bağlı gelişen pulmoner hipertansiyonun modelinde ursolik asit etkinliğini inceleyen araştırmacılar, sadece MCT'ye maruz kalan grupta apoptotik hücre sayısının kontrol grubuna göre yaklaşık 3 kat arttığı, pro-apoptotik faktör olan Bcl-2 ile ilişkili X proteininin (*Bax*) mRNA düzeyinin MCT grubunda kontrollere göre önemli ölçüde daha yüksek bulunduğunu, kardiyak hücrelerde hipertrofi, fibrosis, apoptosis ve metabolik anormalliklerin görüldüğünü, tedavi ajanı olarak kullanılan pentasiklik triterpenoid karboksilik asit olan ursolik asitin faydalı geldiği ve MCT'nin sebep olduğu apoptotik etkileri hafiflettiği belirtilmiştir.

1.6. Tezin Amacı

WHO ve FAO üyelerinin yer aldığı ortak uzman komitesi JECFA'nın toplantısında oluşturulan ve WHO tarafından yayınlanan raporda (WHO, 2020) pirolizidin alkaloidlerinin potansiyel tehlikesi detaylı olarak ifade edilmiş ve insan ve hayvanlarca birçok gıda maddesi ile maruz kalınabildiği bildirilmiştir. İnsanlar için muhtemel kanserojen ajanlar olarak nitelendirilen PA'lara maruz kalındığında hepatotoksisite, nefrotoksisite, pnömotoksisite ve pulmoner hiper tansiyon gibi çeşitli patolojik durumların ortaya çıktığı tespit edilmiş ve patofizyolojik süreçte oksidatif stresinde önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. Yapılan literatür taramalarında MCT'nin 48 saatlik akut toksikasyon modeli çoğunlukla ratlar üzerinde olmakla birlikte sıklıkla kullanılmış, ancak subakut toksikasyon modeline ilişkin verilerin sınırlı olduğu gözlenmiştir. Bu noktadan hareketle bu çalışma ile retronesin tipi PA'dan biri olan MCT'nin farelerde sebep olduğu akut ve subakut hepatik hasarın biyokimyasal, histopatolojik ve moleküler düzeyde meydana getirdiği değişiklikler araştırılmıştır.

2. MATERİYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Demirbaş ve Sarf Malzemeler

Çalışma süresince kullanılan demirbaş ve sarf malzeme listesi Çizelge 2.1 ve 2.2’de verildi.

Çizelge 2.1. Demirbaş listesi

Cihazlar	Marka & Menşei
Buzdolabı	Arçelik 5080F, Türkiye
Derin dondurucu (-20°C)	Bosch GSN24V22 A+, Almanya
Derin dondurucu (-80°C)	Nüve DF-490, Türkiye
Hassas terazi	Radwag, PS510.R1, Polonya
Distile su cihazı	Tetra Zeneer RO 180, Almanya
Santrifüj	Hettich Universal 32R, Almanya
Soğutmalı santrifüj	Nüve NF 800R, Türkiye
Vorteks	Velp Scientifico-ZX3, ABD
Ultrasonik homojenizatör	Bandelin, Sonopuls, ABD
Mikroplate okuyucu	Thermo Scientific, Multiskan GO, Finlandiya
Otoanalizör	Mindray BS-400, Çin
Real time PCR cihazı	Biorad CFX connect, ABD
Etüv	Memmert UN-110, Almanya
Kuru blok ısıtıcı	Benchmark BSH1001-E, ABD
Su banyosu	Julabo SW22, Almanya
Doku takip cihazı	Leica TP1020
Mikrotom	Leica, RM2125RT
Işık mikroskobu	Nikon, Eclipse E600

Çizelge 2.2. Sarf malzeme listesi

Sarf malzeme	Marka & Menşei
Anestezik madde - Ksilazin	Rompun %2, Bayer, Almanya
Anestezik madde - Ketamin	Ketasol %10, Richter pharma ag, Avusturya
Crotaline	C2401, Sigma, ABD
Alanin amino transferaz (ALT) test kiti	OttoScientific, Türkiye
Aspartat amino transferaz (AST) test kiti	OttoScientific, Türkiye
Gamm glutamil transferaz (GGT) test kiti	OttoScientific, Türkiye
Total bilirubin (TBIL) test kiti	OttoScientific, Türkiye
Total protein (TP) test kiti	OttoScientific, Türkiye
Total kolesterol (TCHO) test kiti	OttoScientific, Türkiye
Fosfat tampon (PBS)	MFCD00131855, Sigma, ABD
Total antioksidan kapasite (TAK) test kiti	RL0017, Rel Assay®, Türkiye
Total oksidan kapasite (TOK) test kiti	RL0024, Rel Assay®, Türkiye
Fare Bcl-2 ELISA test kiti	SRT-T-82170, Sunred, Çin
Fare Bax ELISA test kiti	E-EL-M0178, Elabscience, ABD
Fare Kaspaz-3 ELISA test kiti	201-02-0446, Sunred, Çin
Bovine serum albümin (BSA)	A2153, Sigma, ABD
Sodyum bikarbonat (Na_2CO_3)	K30661723, Merck, Almanya
Sodyum hidroksit (NaOH)	1310-73-2, Carlo Erba, Fransa
Sodyum potasyum tartarat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$)	A302485 Merck, Almanya
Bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	7768-888, Carlo Erba, Fransa
Folin Ciocalta Fenol Ayracı	1.09001, Merck, Almanya
RNA izolasyon kiti	Bio Basic, Kanada
cDNA sentez kiti	abm, G236, Kanada
SYBR Green I Master kiti	abm, G891, Kanada
Roche Custom Panel	05532949001, Roche Diagnostics, ABD
Probes Master Mix	04887301001, Roche Diagnostics, ABD
Hematoksilen	FN1106202, Merck, Almanya
Eozin	1.15935.0025, Merck, Almanya

2.1.2. Hayvan Materyali

Bu çalışma için, Kırıkkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Komitesi'nden gerekli izin ve onay (2023/01, Karar No: 01) alındı. Çalışmanın materyalini, 6-8 haftalık, 20-25 g ağırlığında, 30 adet, erkek, BALB/c ırkı fare oluşturdu.

2.1.3. Barınma ve Yetiştirme Koşulları

Deneme süresi boyunca hayvanlar Kırıkkale Üniversitesi Hüseyin Aytemiz Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde nem oranı %50-60 olan, ı ışık (12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık) ve ısı ($24\pm2^{\circ}\text{C}$) kontrollü odalarda barındırıldı. Hayvanlara yem ve su alabildikleri kadar yani *ad libitum* verildi.

Çalışmada kullanılan hayvanlar, üst kısmı ızgara kapaklı, şeffaf ve sert plastikten yapılmış kafeslerde barındırıldı ve ortam şartlarına alışması amacıyla deney başlangıcından önce 14 günlük adaptasyon süresi uygulandı.

2.1.4. Deney Gruplarının Belirlenmesi

Fareler 2 haftalık adaptasyon süresi sonunda, randomize bir şekilde her kafeste 5'er hayvan olacak şekilde toplamda 6 kafese ayrıldı. Her grupta 2 kafesin olduğu çalışmada, Çizelge 2.3'te de verildiği üzere 1 adet sağlıklı kontrol grubu, 1 adet akut toksikasyon grubu ve 1 adet subakut toksikasyon grubu olmak üzere toplam 3 grup oluşturuldu.

Çizelge 2.3. Deney grupları ve gerçekleştirilen uygulamalar

Grup adı	Grup tanımı ve gerçekleştirilen uygulamalar	Fare sayısı (n)
Kontrol Grubu (Grup 1)	Herhangi bir deneysel uygulama yapılmayan grup (sağlıklı kontrol grubu): Sadece intragastrik serum fizyolojik uygulandı. Uygulama deneyin 0. gününde başlayarak, 5 gün ara ile toplamda 3 kez yapıldı. Son uygulamayı takiben 48. saatte deney sonlandırıldı.	10
Akut Toksikasyon Grubu (Grup 2)	Farelere 120 mg/kg dozunda MCT intragastrik olarak uygulandı. Uygulama bir kez ve deneyin 0. gününde yapıldı. Uygulamayı takiben 48. saatte deney sonlandırıldı.	10
Subakut Toksikasyon Grubu (Grup 3)	Farelere 120 mg/kg dozunda MCT intragastrik olarak uygulandı. Uygulama deneyin 0. gününde başlayarak, 5 gün ara ile toplamda 3 kez yapıldı. Son uygulamayı takiben 48. saatte deney sonlandırıldı.	10

Bugüne kadar yapılan bazı çalışmalar incelendiğinde, MCT toksikasyon modeli için uygulama yolu olarak intragastrik ya da intraperitoneal yol tercih edilirken, uygulama dozunun farklılıklar gösterdiği görüldü. İnsanların PA'lara olan maruziyetinin çeşitli gıdaların oral yoldan alımı ile olması ve çeşitli literatürlerde de (Luo vd., 2019; Song vd., 2020; He vd., 2021a) yaygın olarak kullanılması sebebiyle söz konusu çalışmadaki uygulama yolu intragastrik olarak belirlendi. Uygulama dozu ise He vd., (2021b) tarafından yapılan çalışmaya göre planlanırken, akut ve subakut toksikasyon modellerinde beklenen hepatik hasarın oluşturulması amacıyla 120 mg/kg dozda MCT verilmesi tercih edildi. İntragastrik olarak verilen tek bir MCT uygulamasının 48 saat içerisinde hepatik hücrelerde hasar, nekroz ve kanamaya sebep olduğunu belirten çeşitli araştırmalar (Song vd., 2020; He vd., 2021a; Otaka vd., 2021), bu çalışmadaki akut toksikasyon grubunun oluşturulmasında temel teşkil etmiştir. Yapılan literatür incelemesinde deneysel olarak oluşturulan PA toksikasyon modellerinde subakut toksikasyon modeline ilişkin verilerin az olduğu dikkati çekmiş ve Otaka vd., (2021) yapmış olduğu çalışmadan hareketle, akut toksikasyon modelinin yanında 120 saat arayla 3 tekrarlı MCT'ye maruz kalan subakut toksikasyon grubu da oluşturulmuştur.

2.1.5. Örneklerin Toplanması

Çizelge 2.3'te belirtilen deney sürelerinin bitiminden 8 saat öncesinde aç bırakılan farelere preanestezik olarak ksilazin (Rompun®) 10 mg/kg dozda, derin anestezinin sağlanması için ise ketamin (Ketasol®) 90 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulandı. Ardından, tüm farelerin karın ve göğüs boşlukları açılarak, kalpten antikoagülan madde lityum heparin içeren yeşil kapaklı kan tüplerine kan alındı ve 3000 rpm'de 10 dakika boyunca soğutmalı (+4°C) santrifüj işleminden sonra plazmaları çıkartıldı. Kan plazmaları eppendorf tüplere alikotlanarak analiz yapılana kadar derin dondurucuda (-80 °C) saklandı. Ayrıca çalışma kapsamında incelenecek olan karaciğer dokularının bir kısmı, fizyolojik tuzlu su ile yıkanarak kan artıkları temizlendi ve sargı bezi ile kurutuldu. Yıkama işlemi tamamlanan karaciğer dokuları 2 ml'lik eppendorf tüplere alınarak, oksidatif stres parametrelerinin (TAK, TOK) ölçümü, ELISA (Bcl-2, Bax, Kaspaz-3), qPCR ve PCR array analizleri yapılincaya kadar derin dondurucuda (-80 °C) saklandı. Karaciğer dokularının kalan kısmı ise histopatolojik inceleme için eksize edilerek % 10'luk tamponlu formalin içerisinde konuldu.

2.2. Yöntem

2.2.1. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

Deney sonlandırmasının yapıldığı gün alınan kanlardan ayrılan ve analiz yapılincaya kadar derin dondurucuda (-80 °C) saklanan kan plazmalarından aspartat amino transferaz (AST), alanin amino transferaz (ALT) ve gamma glutamil transferaz (GGT) enzim aktiviteleri ile total bilirubin (TBİL), total protein (TP) ve total kolesterol (TCHO) düzeyleri ticari test kitleri (OttoScientific, Türkiye) kullanılarak otoanalizör (Mindray BS-400, Çin) cihazında ölçüldü.

2.2.2. Oksidan ve Antioksidan Parametrelerin Belirlenmesi

Deney sonlandırılması sırasında toplanan karaciğer örneklerindeki oksidan-antioksidan profilin değerlendirilmesi için doku homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Analiz öncesinde tartılan karaciğer örnekleri üzerine +4 °C'deki fosfat tamponu (pH: 7,4) eklenerek ilk olarak cam homojenizatör ile manuel olarak küçük parçalara ayrıldı, daha sonra buz üzerinde ultrasonik homojenizatör

kullanılarak 10 saniye boyunca homojenizasyon işlemi uygulandı ve ardından 30 saniye kadar bekletildi. Toplamda 5 kez olacak şekilde aynı işlem gerçekleştirildikten sonra homojenat içeren tüpler 10000 g'de 15 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar elde edildi (Şahin vd., 2023). Elde edilen süpernatantlarda total antioksidan kapasite (TAK) ve total oksidan kapasite (TOK) düzeyleri, ticari olarak satın alınan test kitleri (Rel Assay Kit Diagnostics, TR) kullanılarak spektrofotometrik olarak (Multiskan GO, Thermo, ABD) ölçüldü (Erel, 2004; Erel, 2005). Ölçüm esnasında test kitleri tarafından belirtilen ve aşağıda verilen protokoller takip edildi.

TAK Düzeylerinin Belirlenmesinde Takip Edilen Kit Protokolü:

- Ticari olarak satın alınan ve +4°C'de muhafaza edilen TAK kiti ile -80°C'de muhafaza edilen karaciğer doku homojenatları oda ısısına getirildi.
- Thermo Multiskan GO plate reader cihazı ile uyumlu 96 kuyucuklu plate üzerinde standart, numune ve blank kuyucukları belirlendi.
- Kuyucuklara 18'er µl standart, numune ve blank örneklerinden eklendi.
- Her kuyucuğa 300 µl reagent 1'den eklendi.
- Plate 30 saniye kadar yavaşça karıştırıldıktan sonra 660 nm dalga boyunda birinci absorbans (Abs1) okuması gerçekleştirildi.
- İlk okumadan sonra reagent 2'den her kuyucuğa 45 µl eklendi.
- Plate oda ısısında 10 dakika boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi sonunda 660 nm dalga boyunda ikinci absorbans (Abs2) okuması gerçekleştirildi.
- Elde edilen absorbans verileri aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve sonuçlar doku protein miktarıda dikkate alınarak µmol/mg protein olarak ifade edildi.

Standart, numune ve blank örnekleri için ΔAbs hesaplandı; $\Delta Abs = A2 - A1$

$$\text{Sonuç: } \frac{(\Delta Abs \text{ blank} - \Delta Abs \text{ numune})}{(\Delta Abs \text{ blank} - \Delta Abs \text{ standart})}$$

TOK Düzeylerinin Belirlenmesinde Takip Edilen Kit Protokolü:

- Ticari olarak satın alınan ve +4°C’de muhafaza edilen TOK kiti ile -80°C’de muhafaza edilen karaciğer doku homojenatları oda ısısına getirildi.
- Thermo Multiskan GO plate reader cihazı ile uyumlu 96 kuyucuklu plate üzerinde standart ve numune kuyucukları belirlendi.
- Kuyucuklara 45’er µl standart ve numune örneklerinden eklendi.
- Her kuyucuğa 300 µl reagent 1’den eklendi.
- Plate 30 saniye kadar yavaşça karıştırıldıktan sonra 530 nm dalga boyunda birinci absorbans (Abs1) okuması gerçekleştirildi.
- İlk okumadan sonra reagent 2’den her kuyucuğa 15 µl eklendi.
- Plate oda ısısında 10 dakika boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi sonunda 530 nm dalga boyunda ikinci absorbans (Abs2) okuması gerçekleştirildi.
- Elde edilen absorbans verileri aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve sonuçlar doku protein miktarıda dikkate alınarak nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Standart, numune ve blank örnekleri için Δ Abs hesaplandı; $\Delta\text{Abs} = \text{A2} - \text{A1}$

$$\text{Sonuç: } \frac{(\Delta\text{Abs numune})}{(\Delta\text{Abs standart})} \times 10^*$$

* : Standart konsantrasyonu

Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması:

- Total oksidan kapasitenin, total antioksidan kapasiteye oranının yüzdesi olarak bilinen OSİ hesaplanması için TAK düzeyleri ile TOK düzeylerinin birimleri eşitlendi. Sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edildi (Kösecik, Erel, Sevinç ve Selek, 2005).

$$\text{OSİ: } \frac{\text{TOK } (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv/L})}{\text{TAK } (\mu\text{mol Trolox Equiv/L})} \times 100$$

2.2.3. Doku Protein Tayini

Karaciğer dokularındaki protein konsantrasyonları, Lowry, Rosebrough, Farr ve Randall (1951), tarafından belirtilen yöntem ile sığır serum albümini (BSA) standartına karşı belirlendi. Ölçüm için sırasıyla aşağıdaki adımlar izlendi.

2.2.3.1. Reaktiflerin Hazırlanması

Lowry A ayracı: Hassas terazide tartılan 2 gr sodyum bikarbonat (Na_2CO_3), 100 ml'lik 0,1 N sodyum hidroksit (NaOH) içerisinde çözdürüldü.

Lowry B ayracı: Hassas terazide tartılan 1 gram sodyum potasyum tartarat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) ile 0,5 gr bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) karıştırılarak 100 ml'lik distile suda çözdürüldü.

Lowry C ayracı (çalışma reaktifi): 50 birim Lowry A solüsyonu ile 1 birim Lowry B solüsyonunun karıştırılmasından elde edildi.

Folin çözeltisi: 1 birim ticari olarak satın alınan Folin Ciocalta Fenol Ayracı ile 1 birim distile su karıştırılarak elde edildi.

Standart (Bovine Serum Albumin): Hassas terazide tartılan 1 mg BSA, 1 mL distile suda çözdürüldü ve 5 farklı konsantrasyona denk gelecek şekilde seri dilüsyon işlemi gerçekleştirildi.

2.2.3.2. Dokuda Protein Ölçümü

- İlk olarak analizde kullanılacak olan cam deney tüpleri asitten geçirildi ve uygun şekilde yıkama işlemleri yapıldıktan sonra etüvde kurutuldu.
- Hazırlanan cam deney tüplerinden numune, standart ve blank için kullanılacak olanlar belirlendi ve numaralandırma yapıldı.
- Numune tüplerine 10 µl karaciğer doku homojenatı, standart tüplerine 5 farklı konsantrasyonda hazırlanan BSA standart çözeltisinden 10'ar µl ve blank tüpüne ise 10 µl distile su pipetlendi.
- Tüplerin üzerine 2500 µl çalışma reaktifi eklendi.
- Hazırlanan tüpler vortekslendi ve karanlık ortamda, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrası tüm tüplere 250 µl Folin çözeltisinden eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. Ardından oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda 30 dakika boyunca inkübe edildi.

- İnkübasyon sonrası örnekler mikropate spektrofotometre cihazında (Multiskan GO, Thermo, ABD) 700 nm’de blank’a karşı okundu. Protein konsantrasyonu mg/mL olarak ifade edildi.

2.2.4. Karaciğer Doku Homojenatlarında Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 Düzeylerinin Belirlenmesi

Oksidan ve antioksidan parametre düzeylerinin belirlenmesi başlığı altında anlatılan karaciğer dokularının homojenizasyon işlemi sonrasında elde edilen karaciğer doku homojenatlarında, Bcl-2, Kaspaz-3 (Sunred, Çin) ve Bax (Elabscience, ABD) protein düzeyleri ELISA test kitleri ile belirlendi. Ölçüm esnasında ticari test kitleri tarafından belirtilen ve aşağıda verilen protokoller takip edildi. Söz konusu ölçümler mikropate spektrofotometre cihazı (Multiskan GO, Thermo, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi.

Bcl-2 ve Kaspaz-3 Düzeylerinin Belirlenmesinde Takip Edilen Kit Protokolü:

- Ticari olarak satın alınan ve +4°C’de muhafaza edilen ELISA kitleri (Sunred, Çin) ile -80°C’de muhafaza edilen karaciğer doku homojenatları oda ısısına getirildi.
- Kit içeriğinden çıkan ELISA plate üzerinde standart, numune ve blank kuyucukları belirlendi.
- Kit içeriğinde verilen 12,8 ng/ml’lik konsantrasyondaki standart, uygun dilüent ile 5 farklı konsantrasyona (6,4 ng/ml, 3,2 ng/ml, 1,6 ng/ml, 0,8 ng/ml, 0,4 ng/ml) denk gelecek şekilde dilüe edildi.
- Standart kuyucuklarına, hazırlanan her bir standarttan 50 µl eklendi.
- Numune kuyucuklarına karaciğer doku homojenatlarından 40 µl ve ilgili (Bcl-2 / Kaspaz-3) antikordan 10 µl eklendi.
- Hem standart hem de numune kuyucuklarına 50 µl Streptavidin-HRP enzim eklendi ve plate üzeri sealing foil ile kapatıldıktan sonra 37 °C’de 60 dakika boyunca etüvde inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra yıkama işlemi uygulandı ve beş kez tekrar edilen bu işlem için kuyucuklara 350 µl yıkama solüsyonu eklendi. Yıkama solüsyonu eklendikten sonra 1 dakika beklendi ve işlem tekrarlandı.

- Yıkama işlemi sonrası blank kuyucukları dahil her kuyucuğa 50 µl subsrat A ve 50 µl subsrat B solüsyonlarından eklendi.
- Plate üzeri sealing foil ile kapatılarak 37 °C'de 10 dakika etüvde inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kuyucuklara 50 µl durdurma (stop) solüsyonu eklendi.
- Thermo Multiskan GO plate reader cihazı ile 450 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirildi. Elde edilen veriler hesaplandıktan sonra sonuçlar ng/ml biriminden verildi.

Bax Düzeylerinin Belirlenmesinde Takip Edilen Kit Protokolü:

- Ticari olarak satın alınan ve +4°C'de muhafaza edilen ELISA kitleri (Elabscience, ABD) ile -80°C'de muhafaza edilen karaciğer doku homojenatları oda ısısına getirildi.
- Kit içeriğinden çıkan ELISA plate üzerinde standart, numune ve blank kuyucukları belirlendi.
- Kit içeriğinde verilen 10 ng/ml'lik konsantrasyondaki standart, uygun dilüent ile 7 farklı konsantrasyona (5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,63 ng/ml, 0,32 ng/ml, 0,16 ng/ml, 0 ng/ml) denk gelecek şekilde dilüe edildi.
- Standart, numune ve blank örneklerinden belirlenen kuyucuklara 100'er µl eklendi ve plate üzeri sealing foil ile kapatılarak 37 °C'de 90 dakika boyunca etüvde inkübe edildi.
- Tüm kuyucuklardaki sıvı boşaltıldıktan sonra her kuyucuğa 100'er µl biotinylated detection Ab çalışma solüsyonu eklendi ve plate üzeri sealing foil ile kapatılarak 37 °C'de 60 dakika boyunca etüvde inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra yıkama işlemi uygulandı ve üç kez tekrar edilen bu işlem için kuyucuklara 350 µl yıkama solüsyonu eklendi. Yıkama solüsyonu eklendikten sonra 1 dakika beklendi ve işlem tekrarlandı.
- Her kuyucuğa 100'er µl HRP konjugat çalışma solüsyonu eklendi ve plate üzeri sealing foil ile kapatılarak 37 °C'de 30 dakika boyunca etüvde inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra tekrar yıkama işlemi uygulandı ve beş kez tekrar edilen bu işlem için kuyucuklara 350 µl yıkama solüsyonu eklendi. Yıkama solüsyonu eklendikten sonra 1 dakika beklendi ve işlem tekrarlandı.

- Yıkama işlemi sonrasında her kuyucuğa 90 µl substrat reagent eklendi ve plate üzeri sealing foil ile kapatılarak 37 °C’de 15 dakika boyunca etüvde inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kuyucuklara 50 µl durdurma (stop) solüsyonu eklendi.
- Thermo Multiskan GO plate reader cihazı ile 450 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirildi. Elde edilen veriler hesaplandıktan sonra sonuçlar ng/ml biriminden verildi.

2.2.5. Kantitatif PCR (qPCR) Analizi

Pirolizidin alkaloidleri kaynaklı hepatik hasardaki rolü araştırılan Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 hedef genlerinin aşağıda detayları bildirilen şekilde qPCR analizleri gerçekleştirildi. Gen ekspresyon düzeylerinde meydana gelen değişiklikler $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri üzerinden hesaplanarak kontrol ile toksikasyon (akut+subakut) grupları arasında karşılaştırmalı değerlendirmesi yapıldı.

2.2.5.1. Total RNA İzolasyonu

qPCR analizlerinin gerçekleştirilmesi için yüksek kalitede RNA izolasyonunun önemli olmasından dolayı ticari olarak satılan farklı markalara ait RNA izolasyon kitleri ile ön deneme çalışmaları yapıldı. Yapılan ön deneme çalışmaları sonucunda en optimal izolasyon One step RNA Reagent (Bio Basic, Kanada) kiti ile gerçekleştirildi ve çalışma kapsamında kullanılacak RNA izolasyonu için tercih edildi. Deney sonlandırılması sırasında toplanan karaciğer örneklerinden RNA izolasyonu için ticari olarak satın alınan kitle belirtilen ve aşağıda verilen protokol takip edildi.

RNA İzolasyon Aşamaları:

- Moleküler teknikler için ayrılmış ve –80°C’de saklanan doku örnekleri kademeli olarak çözdürüldükten sonra soğuk %0,9 ‘luk izotonik içerisinde yıkanıp kurulandı.
- Her bir örnek 50-100 mg ağırlığına denk gelecek şekilde hassas terazide tartılarak steril eppendorf tüp içerisine alındı.
- Üzerine One step-RNA reagent solüsyonundan 1 ml eklendi ve homojenizasyon işlemi uygulandı.

- Sonrasında eppendorf tüpler 15-30°C'de 5 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde her tüpün üzerine 200 µl kloroform ilave edildi ve tüpler 15-20 saniye boyunca kuvvetlice çalkalandı.
- Tüpler tekrar 15-30°C'de 3 dakika boyunca inkübe edildikten sonra 12000 g'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Santrifüj sonunda tüplerde 3 farklı faz oluşumu gerçekleşti. Fenol-kloroform fazı olarak ifade edilen ve en üst kısımda yer alan süpernatanttan 600 µl başka bir eppendorf tüpe aktarıldı.
- Üzerine 500 µl isopropil alkol ilave edildi ve tüpler 15-30°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde tüpler 12000 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve süpernatant kısım atılarak sonraki işlemlere tüpün dip kısmında oluşan pelet ile devam edildi.
- Pelet üzerine %75'lik etil alkolden 1 ml ilave edildi ve tüpler eşit zamanda vortekslendi.
- Sonrasında tüpler 7500 g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant kısım atıldı ve dipte kalan pelet etil alkolün uçması için kurutuldu.
- Kurutma işlemi sonrasında pelet üzerine 50 µl RNase free su eklenerek 50-55 °C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında izole edilen RNA örneklerinin kantitasyonu Thermo Multiskan GO cihazının nanodrop özelliği yardımıyla gerçekleştirildi.

2.2.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Total RNA izolasyon basamağında olduğu gibi cDNA sentez aşamasında da ticari olarak satılan farklı markalara ait cDNA sentez kitleri ile ön deneme çalışmaları yapıldı. Yapılan ön deneme çalışmaları sonucunda en optimal izolasyon OneScript Plus cDNA Synthesis kiti (abm, G236, Kanada) ile gerçekleştirildi ve çalışma kapsamında kullanılacak cDNA örneklerinin sentezi için tercih edildi. Karaciğer dokusundan izole edilen total RNA örneklerinden cDNA sentezi için ticari olarak satın alınan kitte belirtilen ve Çizelge 2.4'te verilen karışım hazırlanarak protokol takip edildi.

Çizelge 2.4. cDNA sentez aşamasında her bir örnek için hazırlanan karışım

İlave Edilen Bileşen	Hacim
5X RT Buffer	4 µl
dNTP	1 µl
Primerler	1 µl
Total RNA	1 ng – 2 µg/rxn denk gelecek hacim
One Script Plus RTase	1 µl
PCR-grade su	Toplam hacim 20 µl olacak şekilde ilave edildi
Toplam Hacim	20 µl

Yukarıda özetlendiği gibi hazırlanan karışım, ilk olarak 55°C’de 15 dakika ve devamında da 85°C’de 5 dakika çalkalamalı kuru blok ısıtıcıda inkübe edildikten sonra tüm eppendorf tüpler buz içerisine alındı. Thermo Multiskan GO cihazının nanodrop özelliği yardımıyla cDNA örneklerinin kantitasyonu yapıldı ve sonraki aşamalarda kullanılmak üzere reaksiyon tüpleri -20°C’de muhafaza edildi.

2.2.5.3. qPCR Analiz Detayları

Çift iplikçikli bir DNA molekülündeki hedef dizilere, oligonükleotid primerinin bağlanması ve uzaması esasına dayanan qPCR analizinde elde edilen verilerin güvenilirliğinin sağlanması adına ön deneme çalışmaları yapıldı. İlk olarak yukarıda detaylandırıldığı şekilde elde edilen ve kantitasyonu yapılan cDNA’ların en uygun ekspresyon verdiği konsantrasyon miktarı belirlendi. Benzer şekilde çalışmada kullanılan referans ve hedef genlere özgü primer konsantrasyonları ile uygun yapışma sıcaklığı ve qPCR protokol optimizasyonu da ön denemeler ile kesinleştirildi. Ayrıca qPCR ile amplifiye olmuş ürünlerin bilgisayar ekranında görünür olmasına olanak tanıyan floresan boya için de farklı markalara ait master kit alternatifleri değerlendirildi ve sonraki aşamalar için BlasTaq 2x qPCR Master mix (abm, G891, Kanada) tercih edildi. Çalışmada kullanılan referans ve hedef genlere özgü primer dizileri ile her bir örnek için hazırlanan qPCR karışımı Çizelge 2.5 ve 2.6’da belirtildiği şekildedir.

Çizelge 2.5. qPCR analizinde kullanılan referans ve hedef özgü primer dizileri

Gen	Baz Dizilimi (5'→3')	Referans
Bcl-2	R: AGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG	Kint, Nylen ve Barber, 2020
	F: CCTGTGGATGACTGAGTACCTG	
Kaspaz-3	R: GCAGTAGTCGCCTCTGAAGA	Ganji, Aleboyeh, Shirazi ve Razi, 2019
	F: CCTCAGAGAGACATTCATGG	
Bax	R: AATTCGCCGGAGACACTCG	Ren vd., 2017 Li vd., 2022
	F: GAAGACAGGGGCCTTTTGTG	
GAPDH	R: TGGCCTCCAAGGAGTAAGAA	Devrim vd., 2020
	F: CTGGGATGGAAATTGTGAGG	

Çizelge 2.6. qPCR analizinde her bir örnek için hazırlanan karışım

İlave Edilen Bileşen	Hacim
BlasTaq 2x qPCR master	10 µl
Forward primer	0,5 µl
Reverse primer	0,5 µl
PCR-grade su	4 µl
Toplam Hacim	15 µl

Yukarıda hazırlanışı özetlenen qPCR karışımı (15 µl), 96 kuyucuklu, beyaz PCR plate kuyucuklarına pipetlenerek homojen hale getirildikten sonra üzerine 5 µl cDNA ilave edildi. Bu işlemler her bir örnek için gerçekleştirildikten sonra plate üzeri sealing foil ile kapatılarak 1500×g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi ve qPCR cihazına yerleştirilerek Çizelge 2.7'de verilen program başlatıldı.

Çizelge 2.7. qPCR cihazında yapılan programlamanın detayları

Program Adı	Döngü Sayısı	Analiz Modu
Ön İnkübasyon	1	Yok
Amplifikasyon	45	Kantifikasyon
Erime Eğrisi (Melting Curve)	1	Melting Curve
Soğutma	1	Yok
Isı Değerleri		
Hedeflenen Isı (°C)	Süre (saat:dakika:saniye)	Isınma Hızı (°C/saniye)
Ön İnkübasyon		
95	00:05:00	4.4
Amplifikasyon		
95	00:00:10	4.4
Kullanılacak primere özgü	00:00:05-00:00:20	1.5-2.2
72	00:00:05-00:00:30	4.4
Erime Eğrisi Analizi (Melting Curve)		
95	00:00:05	4.4
65	00:01:00	2.2
97	-	-
Soğutma		
<40	00:00:10	1.5

qPCR analizi sonucunda, incelenen genlere ait ekspresyon düzeylerini belirten Ct değerleri elde edildi ve sonrasında referans genden alınan Ct değerleri ile normalizasyonun sağlanması adına $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplandı.

2.2.6. PCR Array Analizi

Yukarıda detaylı olarak açıklanan karaciğer doku homojenatlarından RNA ve cDNA izolasyonları gerçekleştirildikten sonra PCR array analizi ile kontrol ve deneme (akut+subakut) gruplarına ait örneklerde, çeşitli genler aynı anda karşılaştırmalı ve sistematik bir şekilde taranıp, ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar belirlendi. Yapılan analizde, gruplara ait tüm örnekler miks edildi ve 3 farklı grubu temsilen cDNA havuzu oluşturuldu. Tüm grupları temsil eden örneklerin eşit konsantrasyonda olması amacıyla Thermo Multiskan GO cihazının nanodrop özelliği yardımıyla cDNA örneklerinin kantitasyonu yapıldı ve sonraki aşamalarda kullanılmak üzere gruplara ait cDNA örneklerinin konsantrasyonları 1000 ng/μl denk gelecek şekilde

ayarlandı. Array analizi için Roche Custom Panel (05532949001, Roche Diagnostics, ABD) kiti ile LightCycler-480 Probes Master Mix (04887301001, Roche Diagnostics, ABD) kullanıldı ve Çizelge 2.8’de verilen 93 farklı gen üzerinde değerlendirme yapıldı.

Çizelge 2.8. PCR array analizinde kullanılan gen paneli

Assay ID	Gen sembolü	Gen tanımı-açık ismi
300577	Egfr	epidermal growth factor receptor
300363	Casp6	caspase 6 Gene
300403	F2r	coagulation factor II (thrombin) receptor Gene
300430	Ikbkb	inhibitor of kappaB kinase beta Gene
301346	Ppp2r1a	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform Gene
301101	Tnfrsf9	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9 Gene
300351	Apc	adenomatosis polyposis coli Gene
300700	Smad4	MAD homolog 4 (Drosophila) Gene
300376	Cdk4	cyclin-dependent kinase 4 Gene
300362	Casp3	caspase 3 Gene
300591	Cflar	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator Gene
300898	Mapk3	mitogen-activated protein kinase 3 Gene
300564	Tnfrsf10b	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b Gene
300697	Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis Gene
300870	Bmpr1a	bone morphogenetic protein receptor, type 1A Gene
301332	Ror2	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 Gene
300144	Rps6kb1	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 1 Gene
300646	Casp2	caspase 2 Gene
300948	Foxo1	forkhead box O1 Gene
300656	Igf1r	insulin-like growth factor I receptor Gene
300860	Tnfaip3	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 Gene
300736	Fgfr3	fibroblast growth factor receptor 3
301327	Ddr2	discoidin domain receptor family, member 2 Gene
300516	Rock2	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2 Gene
300369	Ccne1	cyclin E1 Gene
310305	Bcl3	B-cell leukemia/lymphoma 3 Gene
310296	Pten	phosphatase and tensin homolog Gene
300567	Tnfrsf18	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 18 Gene
300508	Ptpnc	protein tyrosine phosphatase, receptor type, C Gene
300673	Cdh1	cadherin 1 Gene

300767	Taf1	TAF1 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor Gene
300046	Ccnd1	cyclin D1 Gene
300927	Angpt2	angiopoietin 2 Gene
300366	Casp9	caspase 9 Gene
300085	Nfkb1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells1, p105 Gene
300790	Spp1	secreted phosphoprotein 1 Gene
301333	Ror1	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 Gene
300617	Hif1a	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit Gene
307981	Gata4	GATA binding protein 4 Gene
300377	Cdk6	cyclin-dependent kinase 6 Gene
300350	Apaf1	apoptotic peptidase activating factor 1
300443	Lef1	lymphoid enhancer binding factor 1
300459	Ngfr	nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16) Gene
300541	Stat5b	signal transducer and activator of transcription 5B Gene
300578	Fn1	fibronectin 1 Gene
300381	Cdkn2a	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A Gene
307928	Nkx2-5	NK2 transcription factor related, locus5 (Drosophila) Gene
300696	Akt2	thymoma viral proto-oncogene 2 Gene
300647	Casp1	caspase 1 Gene
310322	Il1a	interleukin 1 alpha Gene
300387	Socs3	suppressor of cytokine signaling 3 Gene
300676	Timp3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3 Gene
300053	Ctnnb1	catenin (cadherin associated protein), beta 1 Gene
300620	Ptch1	patched homolog 1 Gene
300438	Jak1	Janus kinase 1 Gene
300455	Myc	myelocytomatosis oncogene Gene
310293	Ccl12	chemokine (C-C motif) ligand 12 Gene
300784	Htra2	HtrA serine peptidase 2 Gene
300461	Notch2	Notch gene homolog 2 (Drosophila) Gene
300572	Tnfrsf8	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8 Gene
300728	Pik3r1	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha) Gene
300726	Rock1	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1 Gene
300623	Nrp1	neuropilin 1 Gene
310347	Ar	androgen receptor Gene
300964	Cfl1	cofilin 1, non-muscle Gene
301115	Il18	interleukin 18 Gene
300458	Nfkbia	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in

		B-cells inhibitor, alpha Gene
301005	Tlr2	toll-like receptor 2 Gene
300758	Mmp2	matrix metalloproteinase 2 Gene
300615	Itgb3	integrin beta 3 Gene
301355	Nrp2	neuropilin 2 Gene
300575	Brca1	breast cancer 1 Gene
300940	Hdac1	histone deacetylase 1 Gene
300423	Hdac3	histone deacetylase 3 Gene
300128	Rela	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian) Gene
301359	Tnfrsf25	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25 Gene
300439	Jak2	Janus kinase 2 Gene
301288	Map3k2	mitogen-activated protein kinase 2 Gene
300236	Actb	actin, beta Gene
300355	Bak1	BCL2-antagonist/killer 1 Gene
300365	Casp8	caspase 8 Gene
300778	Mapk8	mitogen-activated protein kinase 8 Gene
300556	Socs2	suppressor of cytokine signaling 2 Gene
300538	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1 Gene
300384	Chek1	checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe) Gene
300688	Itgb2	integrin beta 2 Gene
307884	Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Gene
300356	Bcl2l1	BCL2-like 1 Gene
300364	Casp7	caspase 7 Gene
310318	Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance2 Gene
301354	Ppp2ca	protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, alpha isoform Gene
300982	Traf6	TNF receptor-associated factor 6 Gene
300612	Col1a1	collagen, type I, alpha 1 Gene
307943	Myh11	myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle Gene
307879	Hprt1	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase Gene

Analiz yapılırken ticari olarak satın alınan kitte (Roche Custom Panel, ABD) belirtilen ve Çizelge 2.9’da verilen PCR array karışımı hazırlandı.

Çizelge 2.9. PCR array analizlerinde hazırlanan karışım

İlave Edilen Bileşen	Hacim
Probes Master Mix	1050 µl
cDNA	1050 µl
Toplam Hacim	2070 µl

PCR array analizi için kullanılacak plate üzerinde bulunan her bir kuyucuğa yukarıda hazırlanışı gösterilen karışımdan 20'şer µl pipetlendi ve plate üzeri sealing foil ile kapatıldı. Oluşan hava baloncuklarının giderilmesi için hazırlanan array plate 1500×g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra plate, qPCR cihazına yerleştirildi ve kullanıcı talimatlarında belirtilen (Roche Diagnostic, Custom Panel 96, Version 7) ve Çizelge 2.10'da verilen protokol takip edilerek analiz gerçekleştirildi.

Çizelge 2.10. PCR array analizinde yapılan programlamanın detayları

Analiz Formatı	Blok Tipi	Reaksiyon Hacmi
Probes Master – FAM filtre	96	20 µl
Program Adı	Döngü Sayısı	Analiz Modu
Ön İnkübasyon	1	Yok
Amplifikasyon	45	Kantifikasyon
Soğutma	1	Yok
Isı Değerleri		
Hedeflenen Isı (°C)	Süre (saat:dakika:saniye)	Isınma Hızı (°C/saniye)
Ön İnkübasyon		
95°C	00:10:00	4.4
Amplifikasyon		
95°C	00:00:10	4.4
60°C	00:00:30	2.2
72°C	00:00:01	4.4
Soğutma		
40°C	00:00:30	2.2

PCR array analizi gerçekleştikten sonra incelenen genlere ait ekspresyon düzeylerinin belirten Ct değerleri elde edildi ve sonrasında referans genden alınan Ct değerleri ile normalizasyonun sağlanması adına $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplandı.

2.2.7. Histopatolojik İncelemeler

Histopatolojik analizlerde kullanılacak karaciğer dokuları %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat boyunca tespit edildi (Suvarna, Layton ve Bancroft, 2018). Tespit işlemi sonrasında örnekler akan su altında 12 saat sureyle yıkandı. Ardından, rnekler rutin doku takip prosedürü ile sırasıyla; %50, %70, %,96 ve abslt alkollerden, ksilen-parafin karışımlarından geçirildikten sonra parafine gömüldü. Parafine gömülen karaciğer örnekleri mikrotom (Leica, RM2125RT) ile 4 mikron kalınlığında kesilerek *hematoksilen eozin (HxE)* ve *Masson's Trichrome* boya ile boyandı. Daha sonra, boyanan kesitler Nikon Digital Sight DS-5M-L1 kamera ataçmanlı, Nikon Eclipse E600W ışık mikroskopunda incelendi.

2.2.8. Verilerin İstatistiksel Analizleri

Çalışma kapsamında elde edilen bulguların istatistiksel analizlerin gerçekleştirilmesi için SPSS 25.0 (SPSS Inc., Chicagai Illinois) paket programından yararlanıldı. Elde edilen veriler, ortalama değer±standart hata ($\bar{x}\pm SH$) şeklinde gösterildi. Analizlerde öncelikle verilerin normal dağılıp dağılmadığına bakıldı. Gruplar arasındaki farklılığı göstermek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. F değeri önemli olduğunda Duncan's Multiple Range testi yapıldı. P değerinin 0,05'ten düşük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. PCR array analizi sonucunda elde edilen verilerin sınıflandırılabilmesi için SPSS 25.0 (SPSS Inc., Chicagai Illinois) paket programında hiyerarşık cluster analizi gerçekleştirildi ve heat map grafikleri ile görselleştirildi.

3. BULGULAR

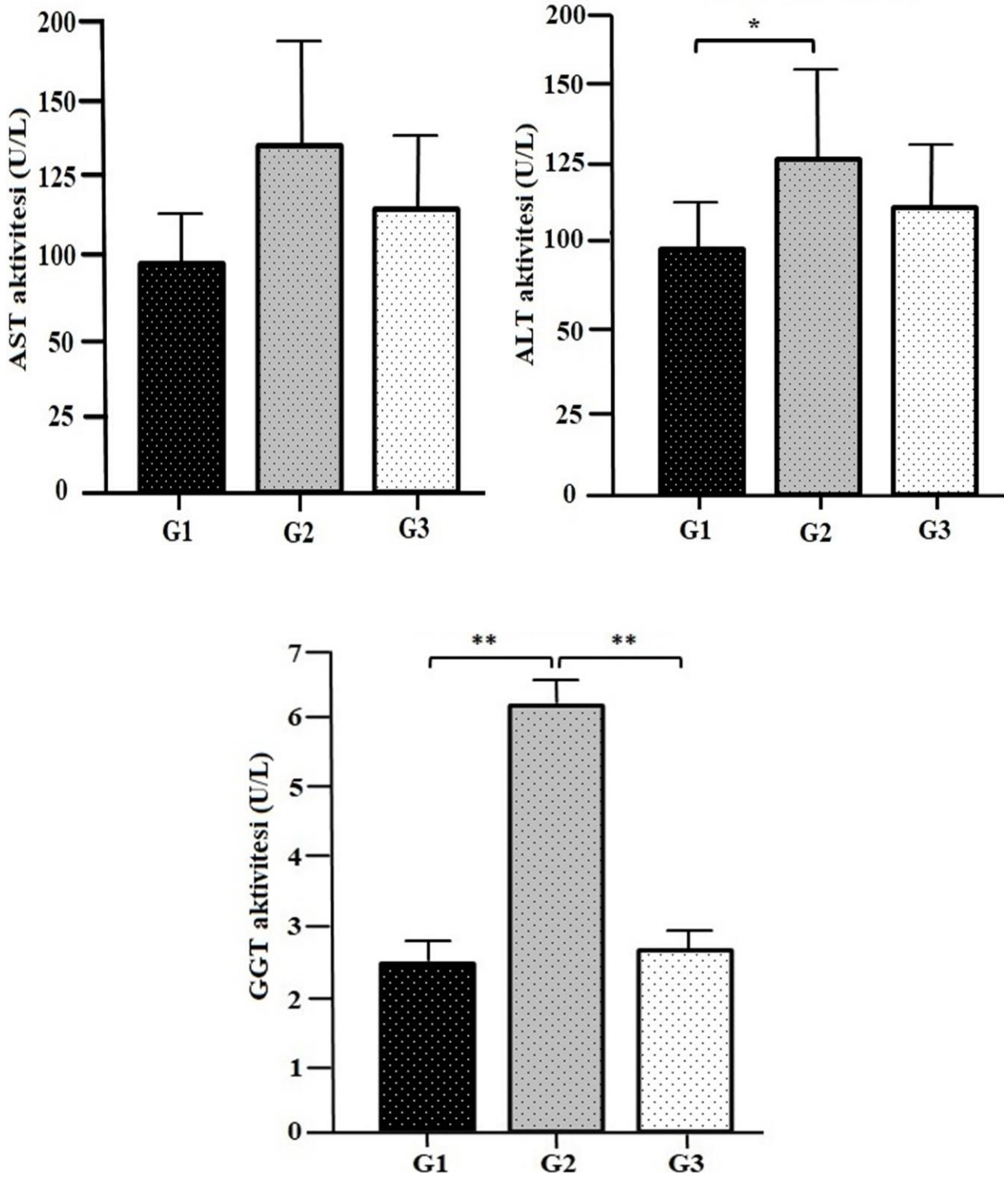
3.1. Biyokimyasal Parametrelerin Düzeyleri

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen biyokimyasal parametrelerden elde edilen veriler değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre AST, ALT ve GGT aktiviteleri ile TBİL ve TCHO düzeylerinin monokrotaline maruz bırakılan deneme gruplarında (akut ve subakut toksikasyon grubu) daha yüksek olduğu, TP düzeylerinin ise daha düşük olduğu görüldü. Hepatoselüler hasar belirteçlerinden biri olan AST aktivitesinde gruplar arasında istatistiksel fark bulunmazken, ALT aktivitesinin akut toksikasyon grubunda kontrol grubuna göre önemli derecede ($P \leq 0,05$) yüksek olduğu görüldü. Hepatobiliyer hasar belirteçlerinden GGT aktiviteleri ve TBİL düzeyleri incelendiğinde akut toksikasyon grubunda, kontrol ve subakut toksikasyon gruplarına göre daha yüksek ve istatistiksel açıdan önemli olduğu ($P < 0,001$) belirlendi. Benzer şekilde TCHO düzeylerinin MCT uygulaması yapılan deneme gruplarında, kontrol grubuna kıyasla artış görüldüğü, ancak önemli düzeyde olmadığı belirlendi ($P > 0,05$). Diğer parametrelerden farklı olarak TP düzeylerinde ise MCT uygulanan deneme gruplarında azalma olduğu ve bu azalmanın gruplar arasında önemli düzeyde olduğu belirlendi ($P < 0,001$).

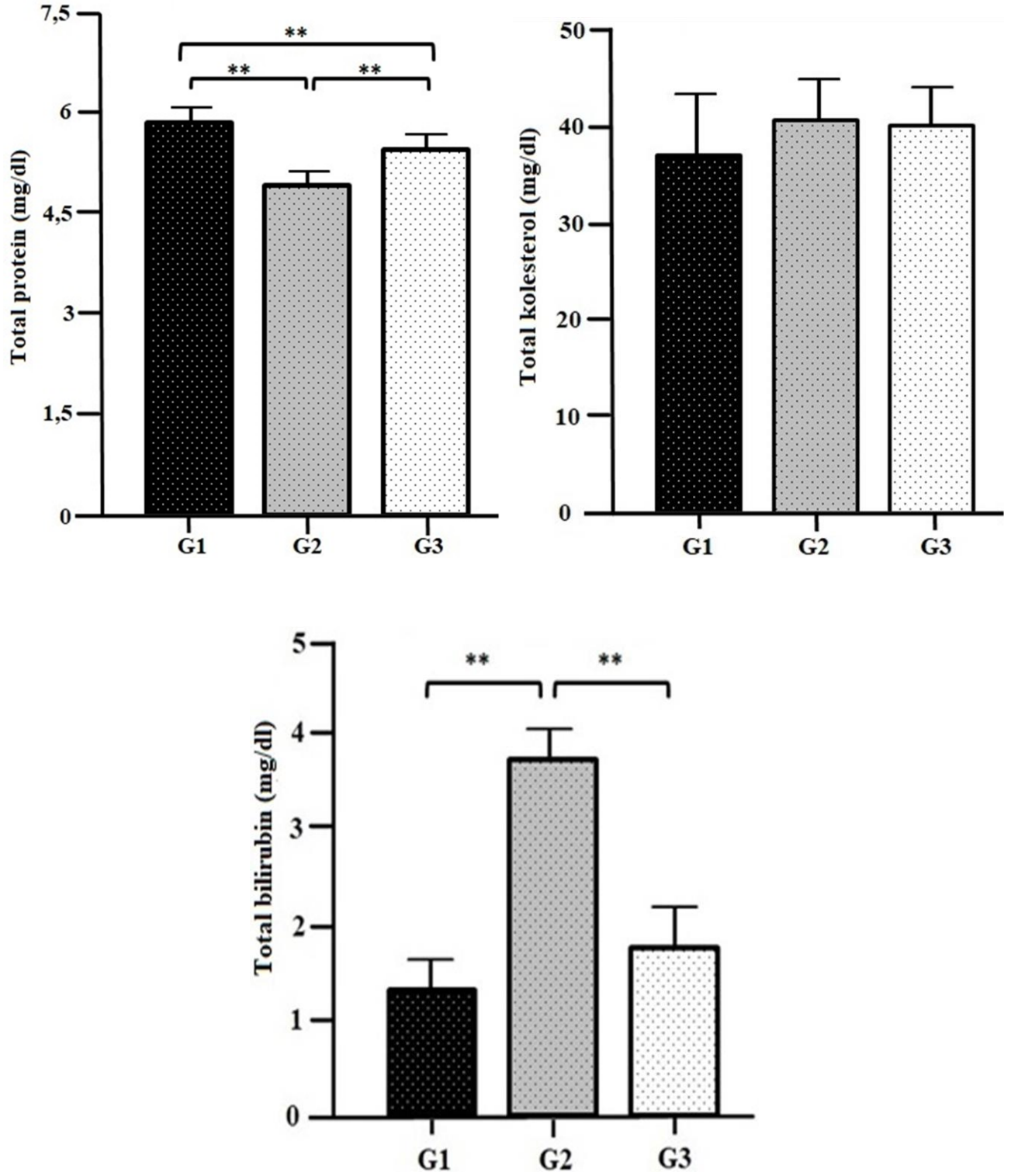
Çizelge 3.1. Kontrol ve deneme gruplarına ait plazmada bazı biyokimyasal parametre düzeyleri ($\bar{x} \pm SH$) (n=10)

Parametre	Kontrol grubu	Akut toksikasyon grubu	Subakut toksikasyon grubu	P
AST (U/L)	90,60 $\pm$ 7,36	137,72 $\pm$ 19,04	112,33 $\pm$ 9,76	>0,05
ALT (U/L)	90,96 $\pm$ 4,96 ^a	124,20 $\pm$ 12,60 ^b	106,08 $\pm$ 7,45 ^{ab}	$\leq$ 0,05
GGT (U/L)	2,46 $\pm$ 0,37 ^a	6,22 $\pm$ 0,70 ^b	2,65 $\pm$ 0,28 ^a	<0,001
TBİL (mg/dl)	1,31 $\pm$ 0,32 ^a	3,69 $\pm$ 0,27 ^b	1,75 $\pm$ 0,40 ^a	<0,001
TCHO (mg/dl)	36,80 $\pm$ 2,40	40,40 $\pm$ 1,57	39,90 $\pm$ 1,62	>0,05
TP (mg/dl)	5,87 $\pm$ 0,10 ^a	4,93 $\pm$ 0,14 ^b	5,48 $\pm$ 0,07 ^c	<0,001

^{a,b}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farklılık göstermektedir ($P \leq 0,05$; $P < 0,001$)



Şekil 3.1. Kontrol ve deneme gruplarına ait plazmada bazı biyokimyasal parametre düzeyleri ($\bar{x} \pm SH$) (n=10) (G1:Kontrol grubu, G2:Akut toksikasyon grubu, G3:Subakut toksikasyon grubu) (*:P≤0,05; **:P<0,001).



Şekil 3.1 Devamı. Kontrol ve deneme gruplarına ait plazmada bazı biyokimyasal parametre düzeyleri ($\bar{x} \pm SH$) (n=10) (G1:Kontrol grubu, G2:Akut toksikasyon grubu, G3:Subakut toksikasyon grubu) (*:P≤0,05; **:P<0,001).

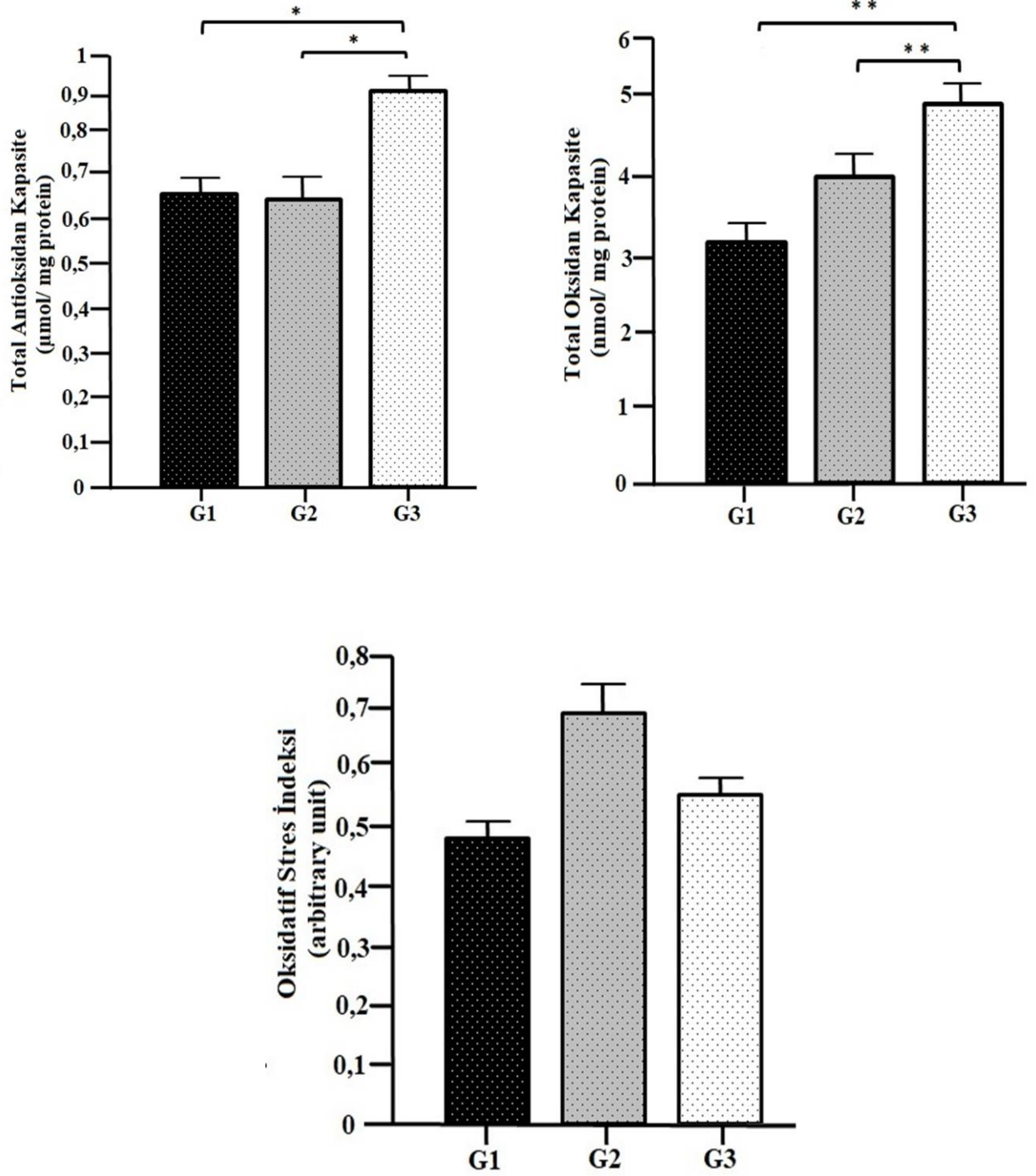
3.2. Oksidan-Antioksidan Parametrelerin Düzeyleri

Oksidan-antioksidan düzeylerinin belirlenmesi için çalışma kapsamında değerlendirilen TAK, TOK ve OSI düzeylerine bakıldığında TAK düzeylerinin subakut toksikasyon grubunda arttığı ve bu artışın kontrol ve akut toksikasyon grubuna göre istatistiksel açıdan önemli olduğu görüldü ($P<0,05$). Dokudaki reaktif oksijen türlerinin artmasıyla ilişkili olan ve oksidatif hasar belirteci olan TOK düzeylerine bakıldığında, TAK düzeyleri ile benzer olarak subakut toksikasyon grubunda arttığı ve bu artışın kontrol ve akut toksikasyon grubuna göre istatistiksel açıdan önemli olduğu görüldü ($P<0,001$). Oksidatif stres indeksinde istatistiksel açıdan gruplar arasında bir farklılık olmasa da monokrotaline maruz bırakılan deneme gruplarında kontrol grubuna göre sayısal artışların olduğu belirlendi ($P>0,05$).

Çizelge 3.2. Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusunda TAK, TOK ve OSI düzeyleri ($\bar{x}\pm SH$) (n=10)

Parametre	Kontrol grubu	Akut toksikasyon grubu	Subakut toksikasyon grubu	P
Total antioksidan kapasite (TAK) ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	0,653 $\pm$ 0,041 ^a	0,641 $\pm$ 0,063 ^a	0,883 $\pm$ 0,039 ^b	<0,05
Total oksidan kapasite (TOK) (nmol/ mg protein)	3,023 $\pm$ 0,319 ^a	3,862 $\pm$ 0,287 ^a	4,778 $\pm$ 0,259 ^b	<0,001
Oksidatif stress indeksi (OSI) (arbitrary unit)	0,475 $\pm$ 0,053	0,685 $\pm$ 0,111	0,548 $\pm$ 0,033	>0,05

^{a,b}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farklılık göstermektedir (*: $P<0,05$; **: $P<0,001$)



Şekil 3.2. Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusunda TAK, TOK ve OSI düzeyleri ($\bar{x} \pm SH$) (n=10) (G1:Kontrol grubu, G2:Akut toksikasyon grubu, G3:Subakut toksikasyon grubu) (*:P<0,05; **:P<0,001)

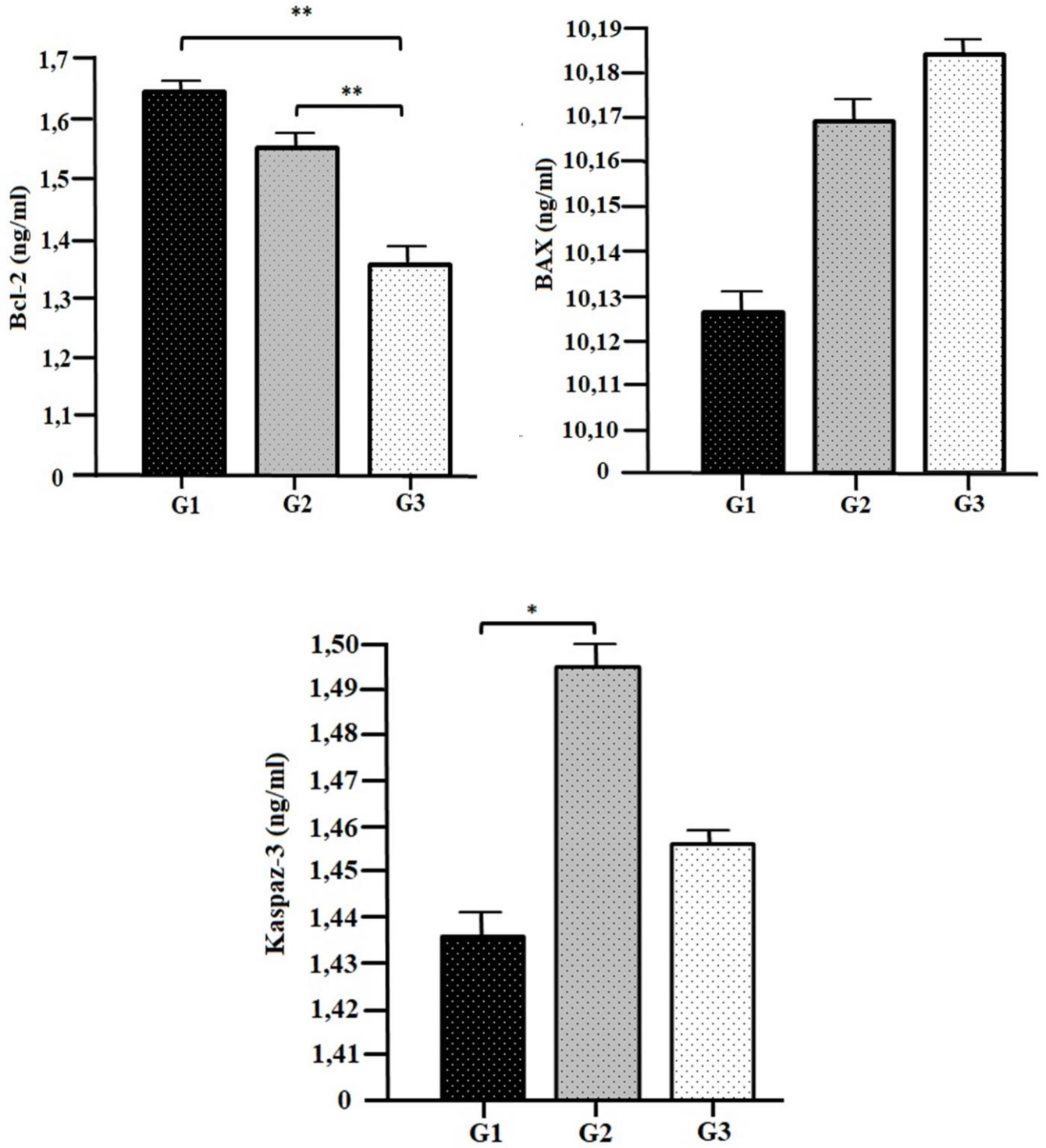
3.3. Karaciğer Doku Homojenatlarında Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 Düzeyleri

Çalışma kapsamında değerlendirilen apoptotik markır düzeylerine bakıldığında genel olarak kontrol ve deneme gruplarında gerek sayısal gerekse istatistiki açıdan farklılıkların olduğu görüldü. Hücrelerin apoptoza eğilimli olup olmadığının saptanmasında önemli bilgiler veren Bcl-2 ailesi genlerinden; anti-apoptotik bir hedef gen olan Bcl-2 düzeylerine bakıldığında kontrol grubuna göre deneme gruplarında sayısal azalmaların olduğu, subakut toksikasyon grubundaki azalmanın hem kontrol grubu hem de akut toksikasyon grubuna göre istatistiksel açıdan önemli olduğu görüldü ($P<0,001$). Aynı aile içerisinde yer alan fakat pro-apoptotik bir hedef gen olan Bax düzeylerine bakıldığında ise kontrol grubuna göre deneme gruplarında sayısal bir artış olduğu, ancak istatistiksel açıdan gruplar arasında fark olmadığı belirlendi ($P>0,05$). Aynı gen ailesi içerisinde yer alan farklı hedef genler arasındaki değişimin gruplar arasındaki durumu değerlendirildiğinde iki verinin birbiri ile uyum gösterdiği, yani kontrol grubuna göre deneme gruplarında anti-apoptotik gen düzeylerinde azalma varken pro-apoptotik gen düzeylerinde bir artış olduğu görüldü. Hücrelerdeki apoptozun düzenlenmesinden sorumlu olan kaspaz gen aile içerisinde yer alan ve efektör kaspazlar olarak nitelendirilen kaspaz-3 markır düzeylerine bakıldığında ise kontrol grubuna göre deneme gruplarında sayısal artışların olduğu, akut toksikasyon grubu ile kontrol grubu arasındaki farkın istatistiki açıdan önemli düzeyde olduğu belirlendi ($P<0,05$).

Çizelge 3.3. Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusunda Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 markır protein düzeyleri ($\bar{x}\pm SH$) (n=10)

Parametre	Kontrol grubu	Akut toksikasyon grubu	Subakut toksikasyon grubu	P
BCL-2 (ng/ml)	1,624 $\pm$ 0,09 ^a	1,577 $\pm$ 0,014 ^a	1,478 $\pm$ 0,023 ^b	<0,001
BAX (ng/ml)	10,126 $\pm$ 0,027	10,169 $\pm$ 0,028	10,184 $\pm$ 0,012	>0,05
KASPAZ-3 (ng/ml)	1,436 $\pm$ 0,017 ^a	1,495 $\pm$ 0,015 ^b	1,456 $\pm$ 0,09 ^{ab}	<0,05

^{a,b}: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel olarak farklılık göstermektedir (*: $P<0,05$; **: $P<0,001$)



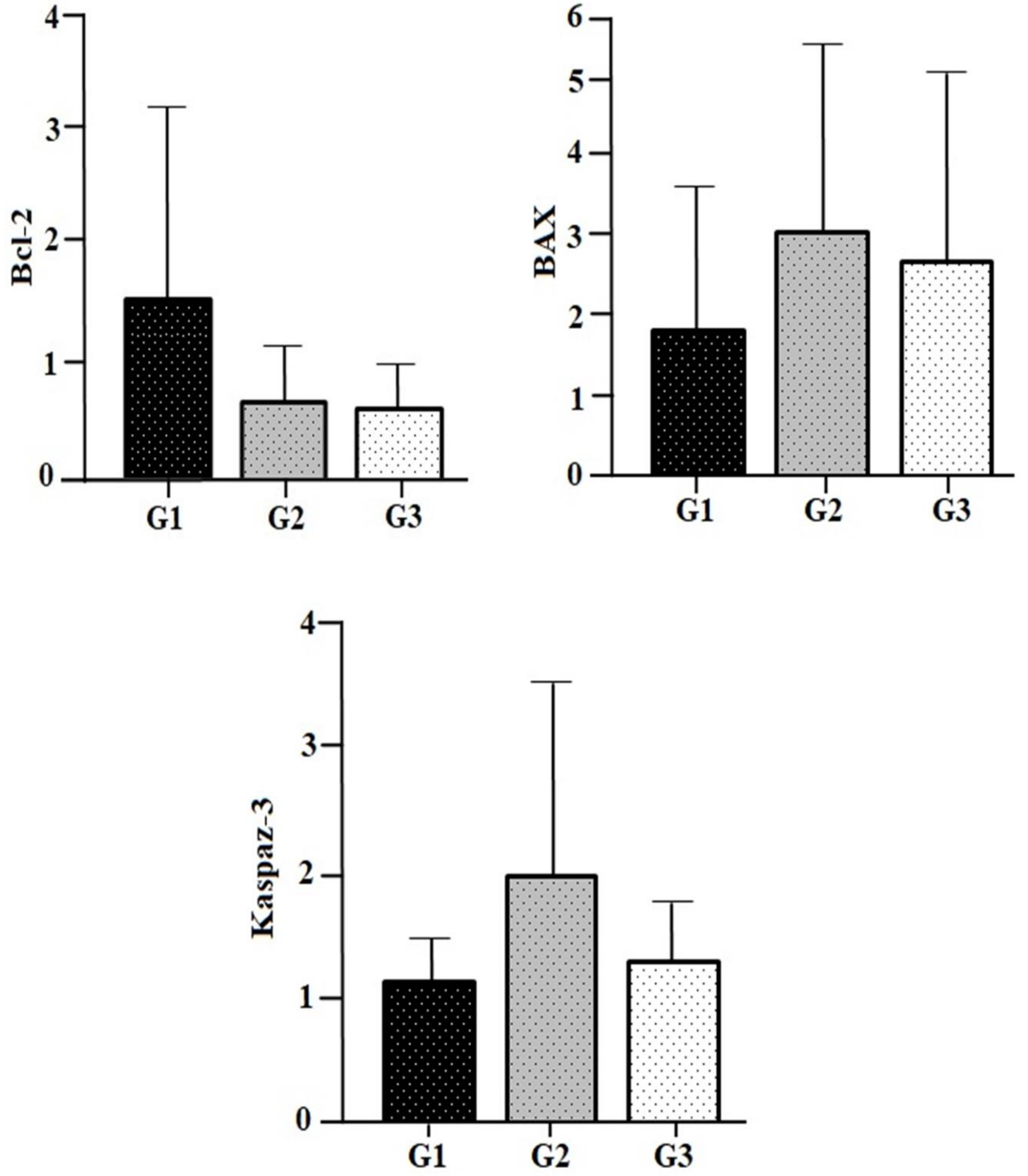
Şekil 3.3. Kontrol ve deneme gruplarına ait karaciğer dokusunda Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 markır protein düzeyleri ($\bar{x} \pm SH$) (n=10) (G1:Kontrol grubu, G2:Akut toksikasyon grubu, G3:Subakut toksikasyon grubu) (*:P<0,05; **:P<0,001)

3.4. Kantitatif PCR (qPCR) Analizi

Yapılan çalışmada, Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 genlerinin karaciğerdeki mRNA ekspresyon düzeyleri Çizelge 3.4'te verildi. Ekspresyon verilerini değerlendirmek için ilk anlamlı artışın olduğu noktadaki veriyi yansıtan Ct (Cycle of Threshold, eşik değer döngü) değerleri, hem hedef gen olan Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 için hem de referans gen GAPDH için belirlendi. Veriler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre normalize edildi. İstatistiksel açıdan bakıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık göstermediği belirlendi. Elde edilen mevcut verilerdeki sayısal artış ya da azalışların aynı markırların protein düzeyinde tespiti için yapılan ELISA tekniğinden alınan veriler ile uyumlu olduğu görüldü.

Çizelge 3.4. Kontrol ve deneme gruplarına ait Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 markır gen ekspresyon düzeyleri (Veriler GAPDH ile normalleştirildi) ($\bar{x} \pm SH$) (n=10)

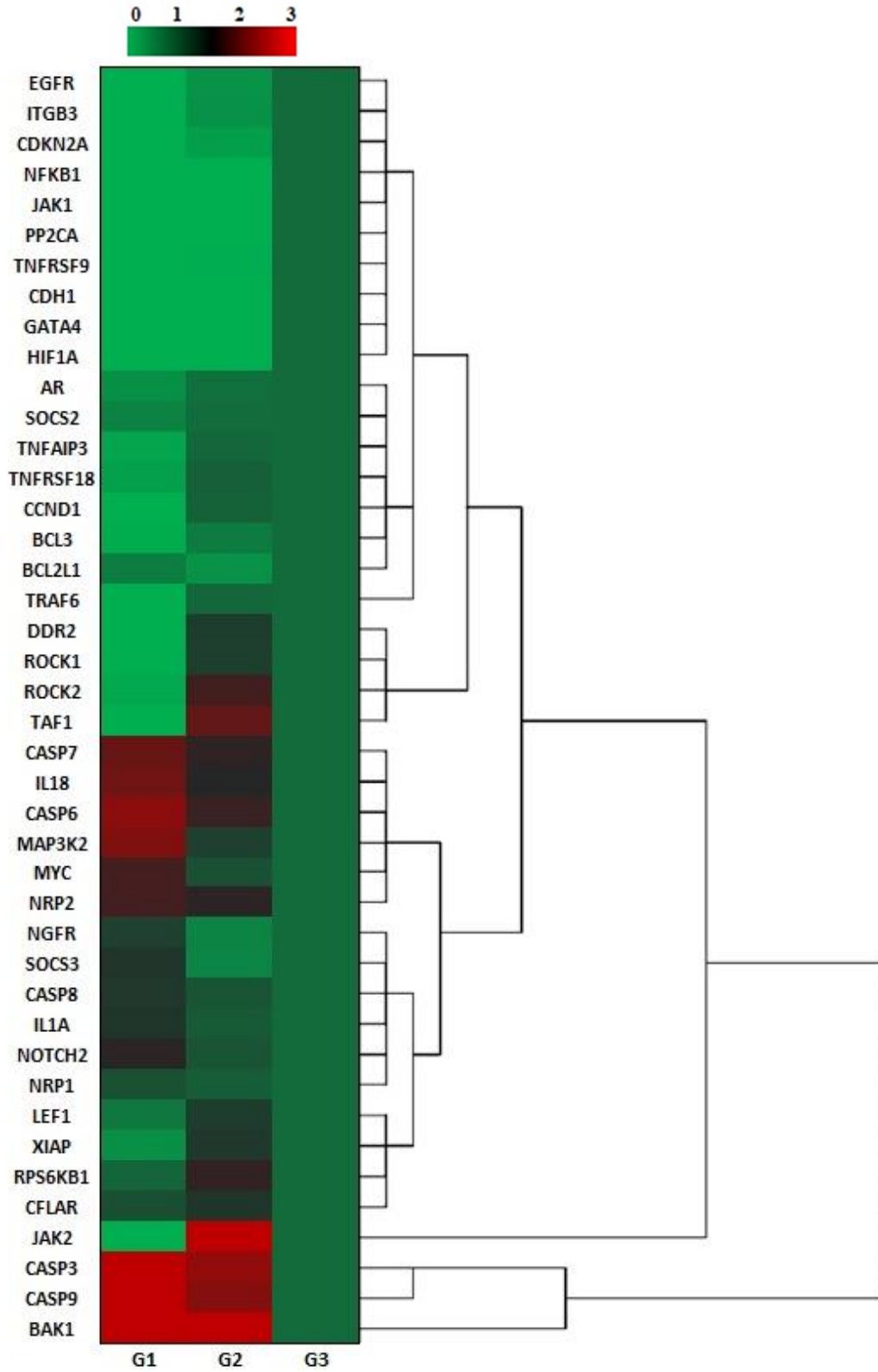
Parametre	Kontrol grubu	Akut toksikasyon grubu	Subakut toksikasyon grubu	P
BCL-2	1,439 $\pm$ 1,747	0,617 $\pm$ 0,433	0,562 $\pm$ 0,378	>0,05
BAX	1,790 $\pm$ 1,907	2,986 $\pm$ 2,265	2,640 $\pm$ 2,470	>0,05
KASPAZ-3	1,117 $\pm$ 0,571	1,964 $\pm$ 2,038	1,289 $\pm$ 0,705	>0,05



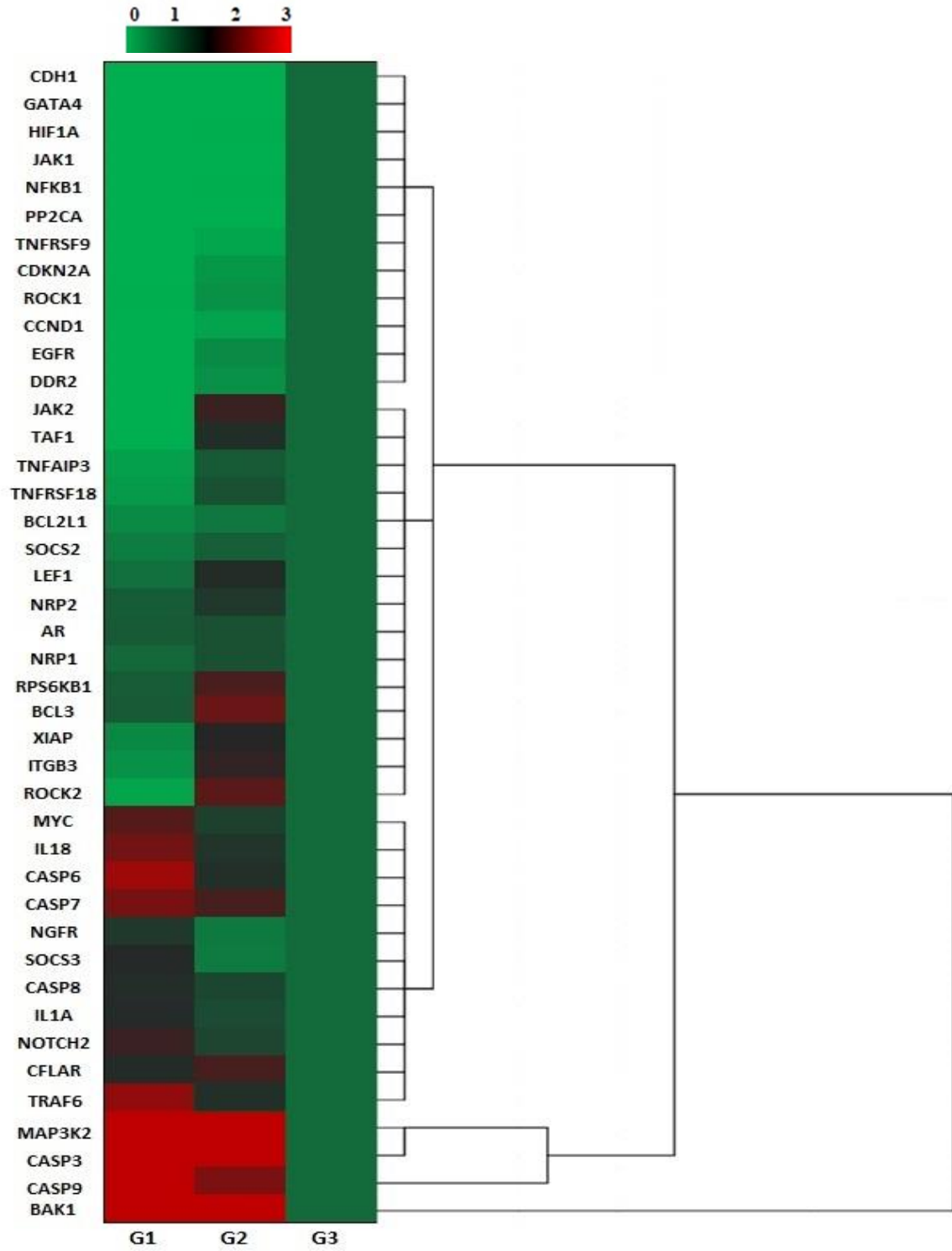
Şekil 3.4. Kontrol ve deneme gruplarına ait Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 markır gen ekspresyon düzeyleri ($\bar{x} \pm SH$) (n=10) (G1:Kontrol grubu, G2:Akut toksikasyon grubu, G3:Subakut toksikasyon grubu)

3.5. PCR Array Analizi

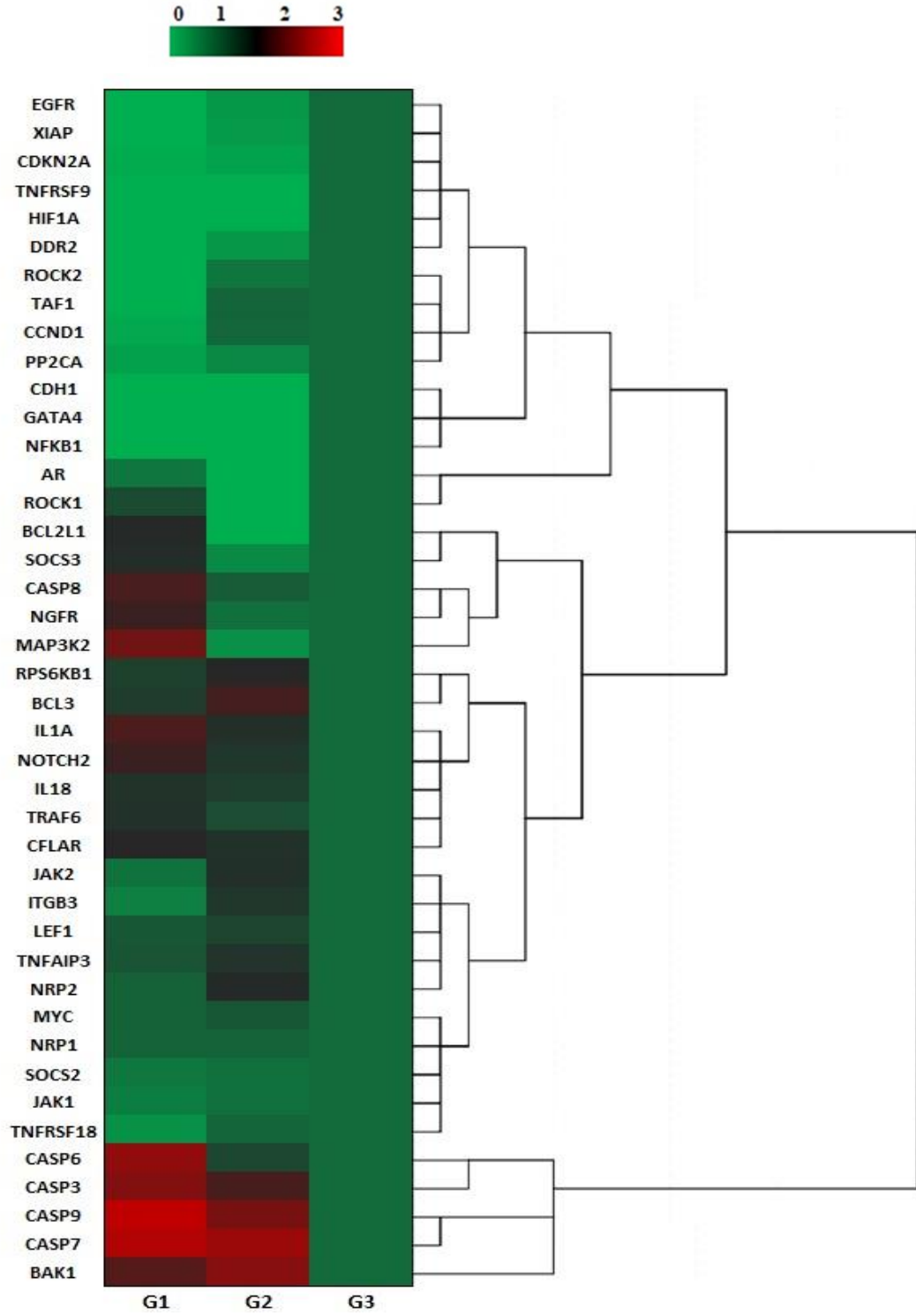
PCR array analizi, qPCR yöntemi ile aynı çalışma prensibine sahip olup aynı anda birden fazla gen düzeyinde ekspresyon seviyelerinin belirlenebildiği moleküler bir tekniktir. Çalışma kapsamında 3 referans gen (GAPDH, ACTB, HPRT1) ve apoptotik belirteçler, JAK/STAT proteinleri, JAK proteinlerini bağlayan ve etkinleştiren reseptörler, STAT etkileşimli transkripsiyon faktörler, JAK/STAT sinyal düzenleyici genler, hücre döngüsü, proliferasyonu, büyümesi ve/veya onarımı, akut faz tepkisi ile inflamatuvar yanıtta sorumlu genlerle ilişkilendirilen 93 farklı gen düzeyinde tarama yapıldı. Söz konusu panel içinde yer alan genlerden 42'sinde çalışma kapsamındaki her 3 grubu kapsayan Ct değerleri elde edilerek bu genlere ilişkin ekspresyon profilleri oluşturuldu. Array paneli içerisinde yer alan GAPDH, ACTB ve HPRT1 referans gen ifadelerinin her biri elde edilen verilerin normalizasyonu için kullanıldı. Hesaplanan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri ile kontrol grubuna göre artış ya da azalış gösteren gen ifadeleri Şekil 3.5, 3.6, 3.7 ve 3.8'de verildiği gibi hem heatmap hem de sütun grafikler ile görselleştirildi.



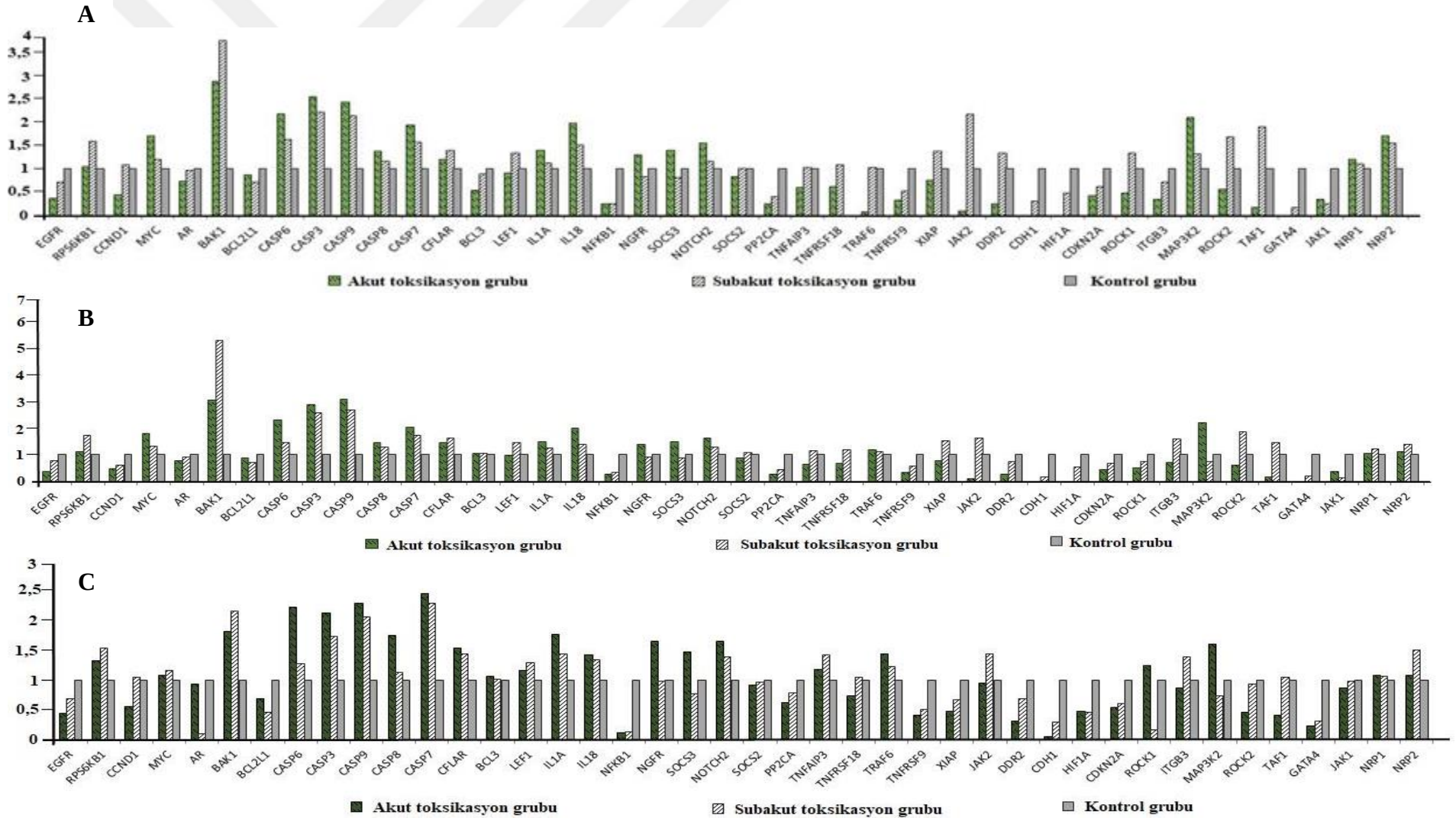
Şekil 3.5. PCR array gen ekspresyon profili. Kontrol ve MCT uygulanan farelerdeki gen ekspresyonunun hiyerarşik kümeleme ve heat map ile gösterimi (Veriler GAPDH ile normalleştirildi) (G1: Akut toksikasyon grubu, G2: Subakut toksikasyon grubu, G3: Kontrol grubu).



Şekil 3.6. PCR array gen ekspresyon profili. Kontrol ve MCT uygulanan farelerdeki gen ekspresyonunun hiyerarşik kümeleme ve heat map ile gösterimi (Veriler HRPT ile normalize edildi) (G1:Akut toksikasyon grubu, G2:Subakut toksikasyon grubu, G3:Kontrol grubu).



Şekil 3.7. PCR array gen ekspresyon profili. Kontrol ve MCT uygulanan farelerdeki gen ekspresyonunun hiyerarşik kümeleme ve heat map ile gösterimi (Veriler ACTB ile normalize edildi) (G1:Akut toksikasyon grubu, G2:Subakut toksikasyon grubu, G3:Kontrol grubu).



Şekil 3.8. PCR Array gen ekspresyon profili. Kontrol ve MCT uygulanan farelerdeki gen ekspresyonunun sütun grafik ile gösterimi (Veriler GAPDH (A), HPRT (B) ve ACTB (C) referans genler ile normalize edildi.

3.6. Histopatolojik İncelemeler

Parafine gömülen karaciğer doku örneklerinden alınan 4 mikron kalınlığındaki her kesit *hematoksilen eozin (HxE)* ve *Masson's Trichrome* boya ile boyandıktan sonra Nikon Digital Sight DS-5M-L1 kamera ataçmanlı, Nikon Eclipse E600W ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğraflama yapıldı.

3.6.1. Histopatolojik Skorlama

Her gruptaki hayvanlara ait karaciğer örnekleri tek tek değerlendirilerek NAFLD Skorlama Sistemine (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Scoring System) göre skorlandı (Mendler, Kanel ve Govindarajan, 2005). Karaciğer örneklerinin NAFLD Skorlama Sistemine göre skorlanmasında kullanılan kriterler Çizelge 3.5'te, değerlendirme sonunda verilen skorlar ise Çizelge 3.6'da verildi.

Çizelge 3.5. Karaciğer örneklerinin NAFLD Skorlama Sistemine (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Scoring System) göre değerlendirilme kriterleri (Mendler vd., 2005).

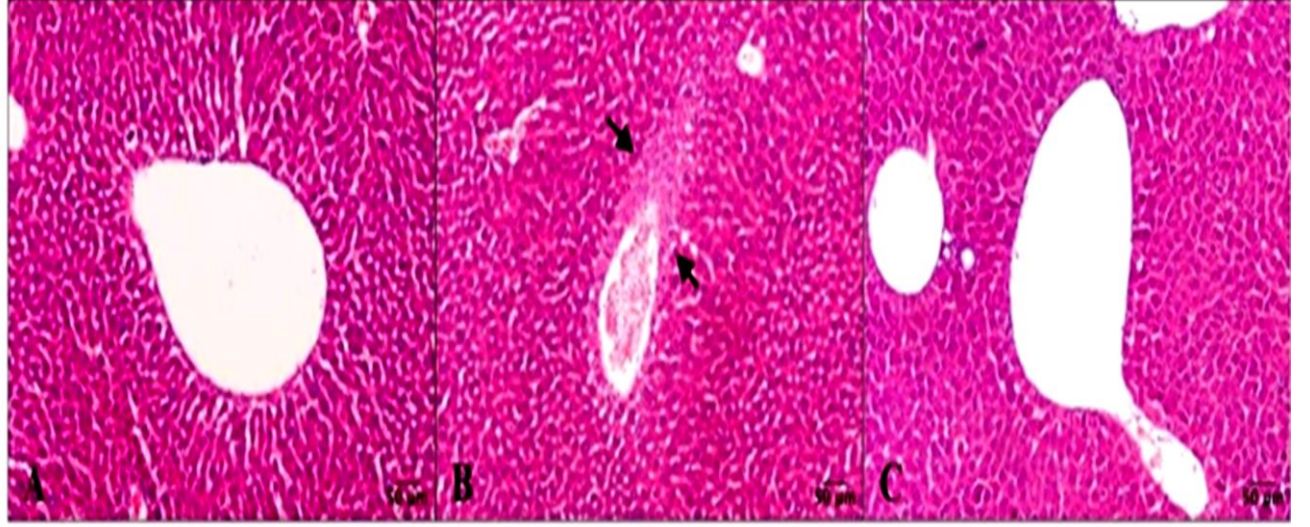
Portal Fibrosis	
0	Fibrosis yok
1	Bazı portal alanlarda, septasız veya kısa fibröz septalı, fibröz genişleme
2	Portal alanların büyük kısmında, kısa fibröz septalı veya septasız, fibröz genişleme
3	Portal alanların çoğunda, ara sıra portalden portale (P-P) ve/veya portalden merkeze (P-C), fibröz genişleme
4	Portal alanların belirgin köprüleşme ile fibröz genişlemesi (P-P'nin yanı sıra P-C)
5	Ara sıra nodüllerle birlikte belirgin köprüleşme (P-P ve/veya P-C) (tam olmayan siroz)
6	Siroz, muhtemel veya kesin
Perisinüzoidal Fibrosis	
0	Yok
1	Bazı lobüllerin perivenüler ve/veya periportal tutulumu
2	Çoğu lobülün, yaygın interstisyel sinüzoidal kollajen birikimi olmaksızın, perivenüler ve/veya periportal tutulumu
3	Lobüllerin bazılarını veya çoğunu içeren yaygın interstisyel fibrosis ile birliktetüm lobüllerde veya lobüllerin çoğunda perivenüler ve/veya periportal tutulum
Yağ Dejenerasyonu (Steatozis)	
1	<%5 karaciğer hücresi tutulumu
2	%5-33 karaciğer hücresi tutulumu
3	%34-66 karaciğer hücresi tutulumu
4	>%66 karaciğer hücresi tutulumu
Lobüler Yangı ve Hepatositlerde Balonlaşma	
0	Yok
1	Bazı lobüllerde fokal tutulum
2	Lobüllerin büyük bir kısmında fokal tutulum
3	Lobüllerin bazılarında veya çoğunda yaygın tutulum ile birlikte çoğu veya tüm lobüllerde fokal tutulum

Çizelge 3.6. Deney gruplarının NAFLD skor sistemine göre skorları

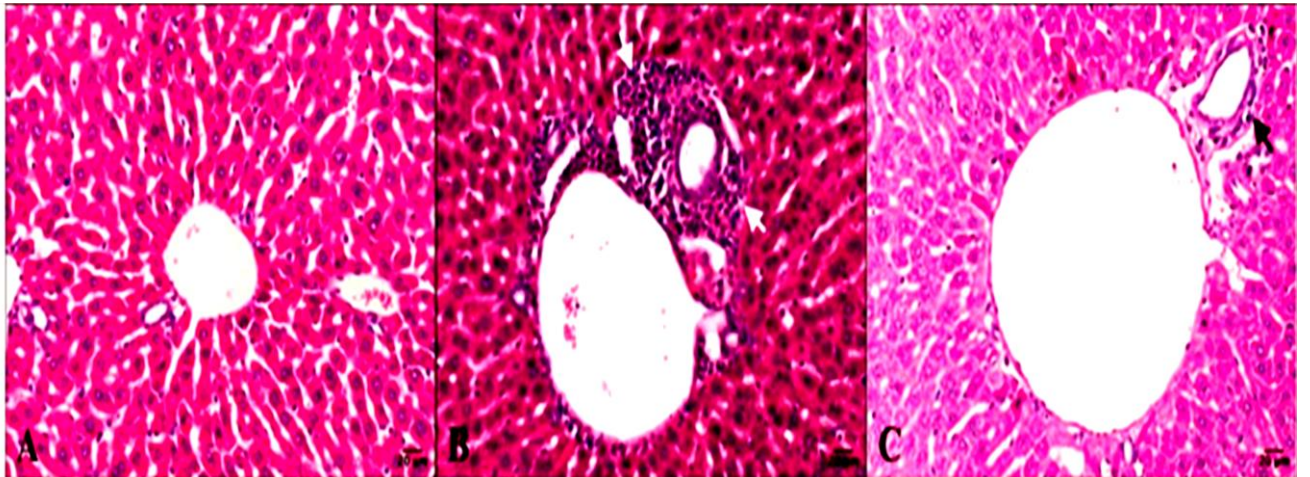
Gruplar/ Skor	Lobuler İnflamasyon	Balonumsu Dejenerasyon	Yağ Dejenerasyonu	Portal Fibrozis	Perisinuzoidal Fibrozis	Toplam
Kontrol Grubu	1	1	0	1	0	2
	2	0	0	1	0	1
	3	0	0	1	0	1
	4	0	0	1	0	1
	5	1	0	1	0	2
	6	0	0	1	0	1
	7	1	0	1	0	2
	8	0	0	1	0	1
	9	0	0	1	0	1
	10	1	0	1	0	2
Akut Toksikasyon Grubu	1	1	1	1	0	3
	2	1	1	1	0	3
	3	1	1	1	0	3
	4	1	1	1	0	3
	5	1	1	2	0	4
	6	1	1	1	0	3
	7	1	1	1	0	3
	8	1	1	2	0	4
	9	1	1	1	0	3
	10	1	1	2	0	4
Subakut Toksikasyon Grubu	1	1	1	1	0	3
	2	1	0	1	0	2
	3	1	1	1	0	3
	4	1	1	1	0	3
	5	1	1	1	0	3
	6	1	1	1	0	3
	7	1	1	1	0	3
	8	1	1	1	0	3
	9	1	1	1	0	3
	10	1	1	1	0	3

Deney gruplarında yapılan histopatolojik incelemeler yukarıda belirtilen NAFLD skor tablosuna göre yapıldı (Çizelge 3.5). Buna göre, yapılan mikroskopik incelemelerde akut toksikasyon grubunda lezyonların subakut toksikasyon grubuna göre daha şiddetli olduğu ve kontrol grubunun normal olduğu tespit edildi. NAFLD skor sistemi kriterlerinden olan; portal fibrozis ve perisinüzoidal fibrozise tüm deney gruplarında rastlanmadı. Ancak lobuler inflamasyon en şiddetli olarak akut toksikasyon grubunda görüldü. İntragastrik olarak 120 mg/kg dozda MCT'nin, 5 gün ara ile toplamda 3 kez uygulandığı subakut toksikasyon grubundaki BALB/c farelerin *HxE* ve *Masson's Trichrome* boyalı karaciğer kesitlerinde belirgin bir patolojik değişiklik bulunmadı. Ancak bazı lobüllerde hepatositlerde dejenerasyona ve lokal mononükleer hücre infiltrasyonlarına (inflamasyon odakları) rastlandı. Ayrıca kontrol grubundaki normal farelerle karşılaştırıldığında, MCT (120 mg/kg) uygulanan farelerde kanama, hepatositlerde dejenerasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu ile karakterize karaciğer hasarı görüldü.

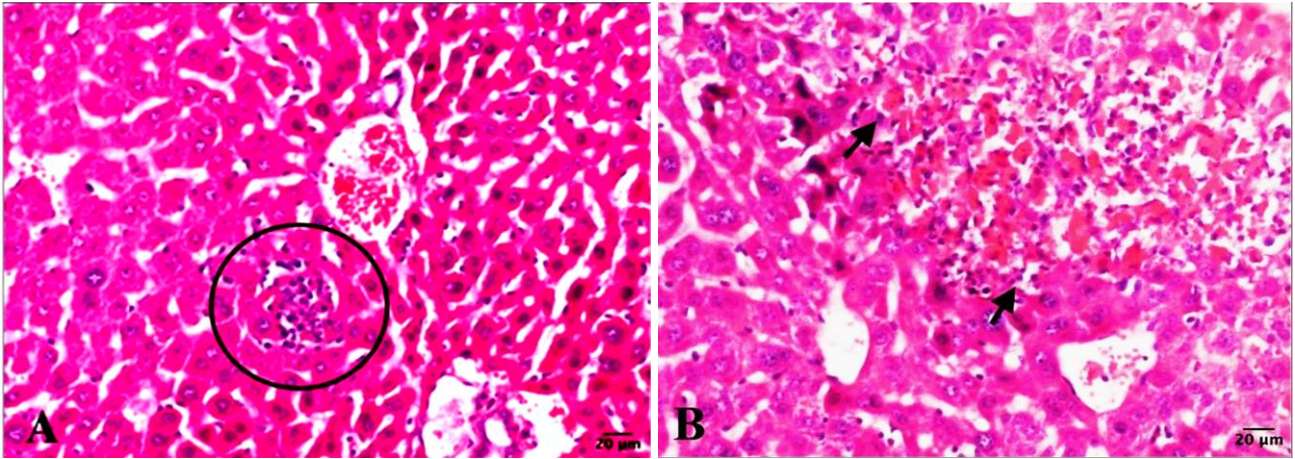
NAFLD skora kriterlerinden olan lobüler inflamasyon, balonumsu dejenerasyon ve steatozisi histopatolojik olarak ortaya koymak amacıyla, tüm kesitlere *HxE* boyama yapıldı. Yapılan inceleme sonrasında elde edilen görseller Şekil 3.9'de verildi.



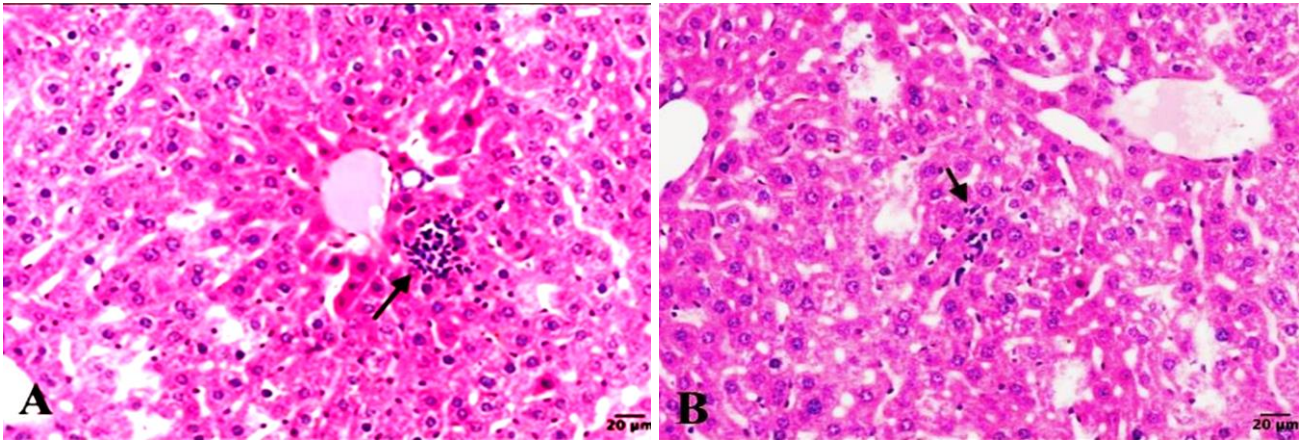
Şekil 3.9. Deney gruplarında santral ven çevresinde (perisantral bölge) hasar. Kontrol grubuna ait santral ven; lobüler inflamasyon: skor 0, balonumsu dejenerasyon: skor 0 ve steatozis: skor 0 (A). Akut gruba ait santral ven; lobüler inflamasyon: skor 0, balonumsu dejenerasyon: skor 1 (siyah oklar) ve steatozis (mikroveziküller): skor 1 (B). Subakut gruba ait santral ven; lobüler inflamasyon: skor 0, balonumsu dejenerasyon skor 0, steatozis: skor 0 (C), HxE



Şekil 3.10. Periportal inflamasyon. Kontrol grubundan alınan normal karaciğer kesiti (A). Akut gruba ait periportal inflamasyon (beyaz oklar) (B). Subakut gruba ait periportal inflamasyon (siyah ok) (C).

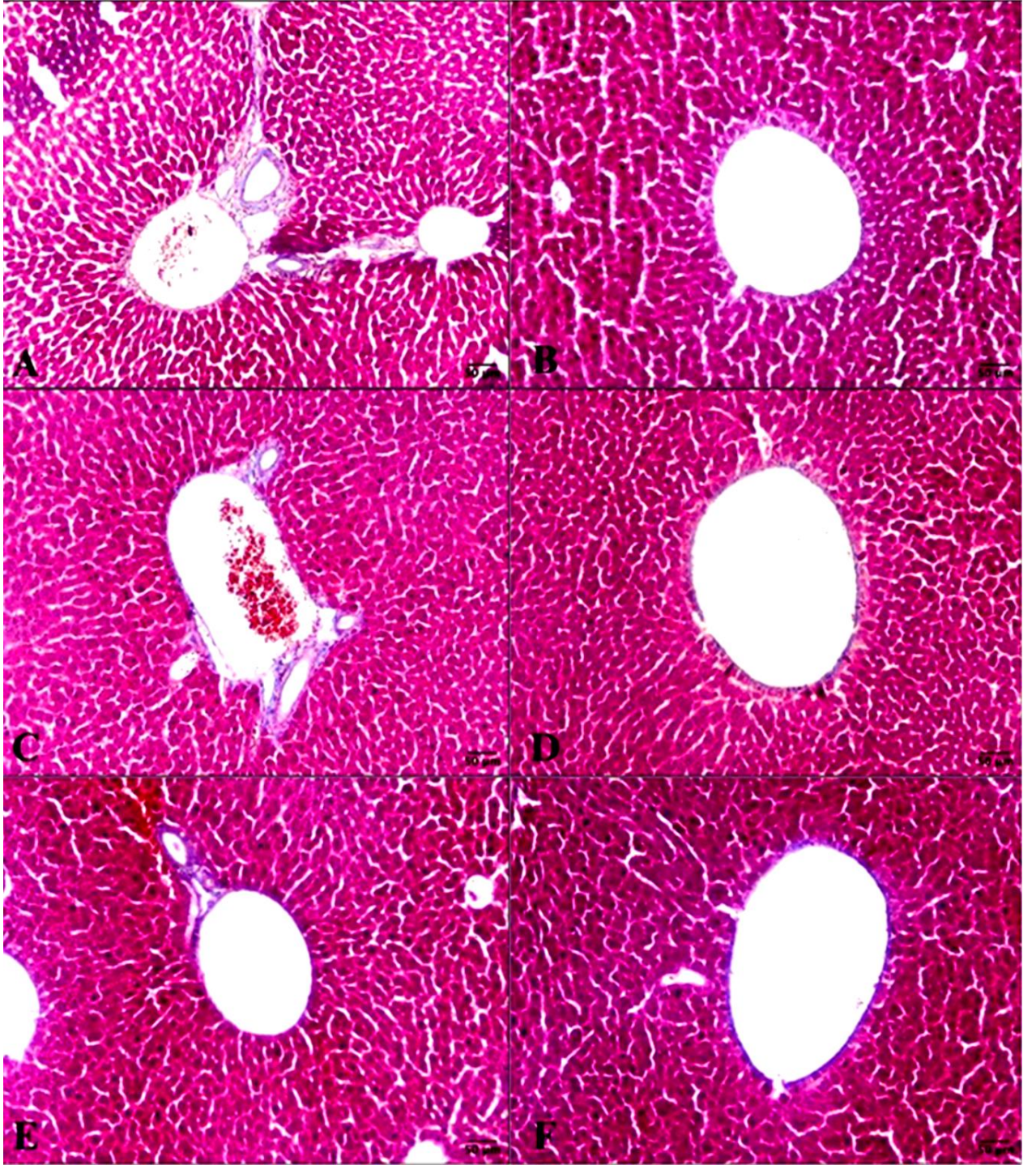


Şekil 3.11. Akut gruba ait fokal mononükleer hücre infiltrasyonları (inflamasyon odakları) (A,B) ve fokal nekroz alanı (siyah oklar) (B).



Şekil 3.12. Subakut gruba ait fokal mononükleer hücre infiltrasyonları (inflamasyon odakları) (siyah oklar), (A,B).

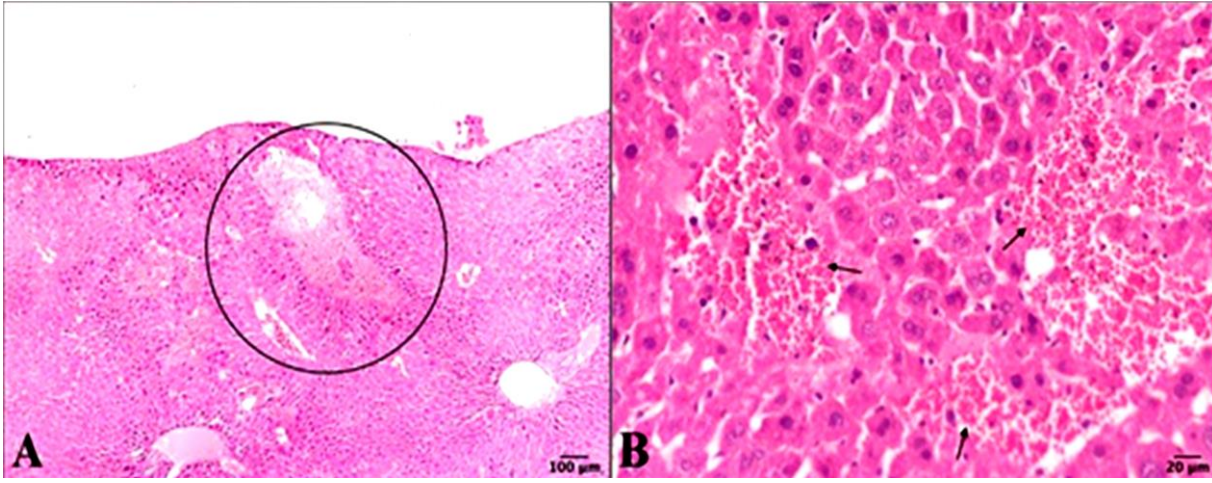
NAFLD skorum kriterlerinden olan portal fibrozis ve perisinüzoidal fibrozisi histopatolojik olarak ortaya koymak amacıyla, tüm kesitlere *Masson's Trichrome* Boyama yapıldı. Kesitler incelendiğinde fibrozis bulgusuna hiçbir grupta rastlanmadı.



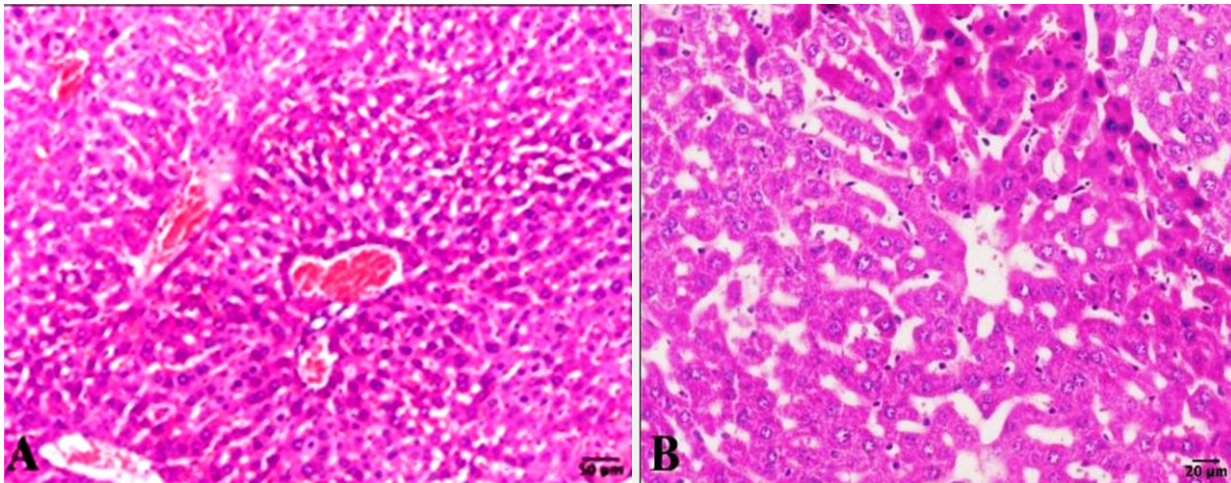
Şekil 3.13. Periportal ve perisantral bölgeler. Kontrol grubu (A,B), akut grup (C,D) ve subakut grup (E,F).

3.6.2. Monokrotalinin Sebep Olduğu Diğer Histopatolojik Bulgular

Deneme gruplarına intragastrik olarak verilen 120 mg/kg dozunda MCT'nin histopatolojik incelemelerinde rastlanan diğer bulguları arasında hemoraji, eritrositlerin ekstrasvazasyonu ve sinüzoidal dilatasyon yer almaktadır (Liu vd., 2020). Tüm kesitler incelendiğinde, kontrol grubu belirtilen bulgular yönünden tamamen normal iken akut toksikasyon grubunda hemorajik odaklara ve subakut toksikasyon grubunda bazı kesitlerde sinüzoidal dilatasyona ve eritrositlerin ekstrasvazasyonuna rastlandı.



Şekil 3.14. Akut grupta görülen hemoraji alanları (A,B).



Şekil 3.15. Akut grupta damarlarda hiperemi ve eritrositlerin ekstrasvazasyonu (A).

Subakut grupta sinüzoidal dilatasyon (B).

4. TARTIŞMA

Pirolizidin alkaloidleri, bir tür doğa toksinidir ve dünya çapında yaklaşık olarak 6000 bitki türünde bulunmaktadır. Bu bitki türlerinin ülkemizde de geniş bir dağılım gösteriyor olması hem insanlar için hem de hayvanlar için PA'lara olan maruziyet derecesini artırmaktadır. İnsanlar çoğunlukla; PA içeren bitkiler, PA ile kontamine yiyecekler, bitkisel ilaçlar, çay ve bal tüketimi ile toksik PA'lara maruz kalmaktadırlar (Mulder vd., 2015; Zhu vd., 2018; He vd., 2020). Çeşitli bitkisel ürünlerin mekanik hasat süreçlerinde, sıklıkla PA'larla kontamine olması, sadece insanlar için değil hayvanlar için de olası bir maruziyet kaynağıdır (Edgar vd., 2011; Dusemund vd., 2018; He vd., 2020). Özellikle çiftlik hayvanlarının ve/veya arıların PA'ya maruz kalması, elde edilecek hayvansal ürünlerde PA varlığına sebep olmakta ve insanların da PA maruziyetini artırmaktadır (EFSA, 2011; Mulder vd., 2016).

Pirolizidin alkaloidleri içeren bitkilerin hemen her yerde bulunması çapraz kontaminasyonun önlenmesini imkansız kılmakta ve istem dışı maruziyet oranını artırmaktadır. Bu sebeple PA içeren bitkiler ve bunların zararlı etkilerinin belirlenmesine yönelik ilgi artmış ve çeşitli makalelerde ayrıntılı olarak tartışılmıştır (Ma vd., 2018; Quan, Xuan ve Teschke, 2020; Schrenk vd., 2020; Letsyo vd., 2023). Ancak halen günümüzde devam eden birçok çalışma, PA'nın sebep olduğu zararlı etkilerin ortaya konulması, hastalık aşamalarının belirlenmesi ve gelişimini tahmin etmek için güvenilir biyobelirteçler bulmaya odaklanmaktadır (Pirola ve Sookoian, 2018).

Biyokimyasal parametrelerin belirlenmesi organların fonksiyonlarını ve metabolik olayları yansıtmaları açısından önemli bilgiler sağlar (Etim, Williams, Akpabio ve Offiong, 2014). Bu sayede klinik tanıların doğrulanması, hastalık seyrinin belirlenmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve uygun tedavinin uygulanması mümkün olmaktadır (Karagül, Altıntaş, Fidancı ve Sel, 2000). Sunulan çalışmada da birçok bitkisel ve hayvansal ürünler ile maruz kalınabilen ve halk sağlığı açısından risk teşkil eden PA'lardan MCT maruziyetinin bazı biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Özellikle de PA'ların protoksin özelliği taşıması ve karaciğerde

metabolik aktivasyon sonrası toksisite geliştirmesi nedeniyle AST, ALT ve GGT aktiviteleri ile TBIL, TCHO ve TP düzeylerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Pirolizidin alkaloidlerinden MCT'nin sebep olduğu hepatik hasara karşı hepatosit büyüme faktörünün (HGF) etkisinin incelendiği bir çalışmada (Yamashita, Fujise, Imai ve Masunaga, 2002), intragastrik olarak ratlara verilen 100 mg/kg dozunda MCT'nin, karaciğer hasarına sebep olduğu ve bunun biyokimyasal açıdan göstergesi olarak da kontrol grubuna göre daha yüksek düzeylerdeki serum AST, ALT aktiviteleri ve TBİL düzeylerinin olduğu belirtilmiştir. Ayrıca TP ve albümin (ALB) düzeylerini de inceleyen araştırıcılar MCT uygulanan grupta serum protein düzeylerinin azaldığı ve koagulopatinin görüldüğü ifade edilmiştir. Benzer şekilde Ren, Xu, Xu ve Mei (2023) tarafından yapılan bir çalışmada, 90 mg/kg dozda MCT intragastrik olarak ratlara verildiğinde kontrol grubuna göre, MCT uygulanan grupta istatistiksel olarak önemli düzeyde serum AST, ALT aktivitelerinin ve TBIL düzeylerinin daha yüksek, serum albumin düzeylerinin ise daha düşük olduğu saptanmıştır.

Monokrotalin kaynaklı akut karaciğer toksikasyonu üzerine çalışmalar yapan Srinivasan ve Liu (2012), ratlara intragastrik olarak 205,2 mg/kg dozda MCT uygulamış ve sırasıyla 0, 6, 12 ve 24. saatlerde deneysel aşamayı sonlandırmışlardır. Alınan kan örneklerinde hepatosellüler hasar belirteçlerinden AST ve ALT enzimatik aktiviteleri değerlendirmış ve enzim düzeylerinin yaklaşık olarak 6. saat itibariyle yükselmeye başladığı ve 24. saatte ise pik seviyelere ulaştığı belirtilmiştir. Copple, Banes, Ganey ve Roth (2002) tarafından yapılan bir çalışmada MCT maruziyetinin karaciğerin sentrilobüler bölgesinde yaygın endotel hücre hasarına ve fibrin birikimine sebep olduğu gösterilmiş ve hepatosellüler hasarın belirteçlerinden olan serum ALT aktivitelerinin doza ve zamana bağlı olarak artış gösterdiği ifade edilmiştir. Deneysel aşaması ratlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmada, intraperitoneal (IP) olarak 100 mg/kg, 200 mg/kg ve 300 mg/kg dozlarda uygulanan MCT'nin, özellikle 200 ve 300 mg/kg dozlarda karaciğer üzerinde daha etkin bir harabiyete sebep olduğu ve karaciğer hasarının teşhisinde önemli belirteç olan ALT enziminin 12. saatten sonra önemli düzeyde artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Huang, Chen, Zhang, Sheng ve Ji (2017), MCT'nin 48. saatteki toksikasyon durumunu değerlendirmek amacıyla C57BL/6 ırkı fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, intragastrik olarak 270 mg/kg ve 330 mg/kg dozda MCT maruziyetinin AST, ALT aktiviteleri ve TBİL düzeylerini önemli derecede artırdığı belirtilmiştir. Yine Huang, Zhao, Chen, Zhang ve Ji (2019), tarafından yapılan başka bir çalışmada intragastrik olarak 90 mg/kg dozunda MCT verilerek, karaciğer sinüzoidal endotel hücrelerinin (LSEC'ler) hasar görmesinden kaynaklanan ve hayatı tehdit eden bir karaciğer hastalığı olan hepatik sinüzoidal obstrüksiyon sendromu (HSOS) oluşturulmuştur. Yapılan çalışmada MCT uygulamasından sonraki 36. saate ötenazi uygulanmış ve alınan kan serumlarından hepatoselüler ve hepatobilier sistemi hedefleyen biyokimyasal parametrelerden AST, ALT aktiviteleri ve TBİL düzeylerinin MCT verilen grupta artmış olduğu ve bu artışların istatistiksel açıdan önemli düzeyde olduğu bildirilmiştir.

Çeşitli sebeplere bağlı olarak maruz kalınan PA'ların sebep olduğu biyokimyasal parametre düzeylerindeki değişiklikler sadece deney hayvanları ile gerçekleştirilen deneysel modellerde değil, insan ve çiftlik hayvanlarında görülen PA toksikasyon vaka raporlarında da incelenmiştir. Zhu vd., (2021) 2019 yılının sonuna kadar Çin'de görülen PA kaynaklı HSOS vakalarının sistematik bir incelemesini yaptıkları bir çalışmada 2156 hastanın serum AST, ALT, ALP ve GGT aktiviteleri ile TBİL düzeylerinin yükselmiş olduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde Wang, Qiao, Li ve Xu (2018), tarafından yapılan retrospektif bir çalışmada 2012 ve 2017 yılları arasında *Gynura segetum* bitkisini tüketen ve HSOS tanısı almış 117 hastada TBİL düzeylerindeki artış ve TP düzeylerindeki değişimin prognostik açıdan önemli olduğu ifade edilmiştir. Anjos vd., (2010) tarafından yapılan bir çalışmada yüksek oranda MCT'ye sahip olan *Crotalaria retusa* bitkisinin mide tüpü ile tek doz olarak koyunlara verildiğinde, 2 g/kg dozda AST ve GGT aktiviteleri ile TP düzeylerinin çok etkilenmediğini, ancak 3 g/kg ve 4 g/kg dozda maruziyetin AST ve GGT aktivitelerini artırdığı, TP düzeylerini ise azalttığını ifade edilmiştir. Aynı bitkinin (*Crotalaria retusa*) 2000-2003 yılları arasında Brezilya'nın Paraíba ve Ceará bölgelerinde bulunan çiftliklerdeki 8 atta doğal yollardan maruz kalma sonucu toksikasyona sebep olduğunu tanımlayan Nobre vd., (2004) 1 at ve 4 eşek üzerinde de deneysel toksikasyon modelini oluşturmuş ve her iki durumda da AST, GGT, CK

ve ALP aktivitelerinin yükseldiği ifade edilmiştir. Benzer şekilde Camara vd., (2022) tarafından yapılan çalışmada da *Crotalaria spectabilis* tohumlarıyla kontamine olmuş yulaflarla kendiliğinden zehirlenen 42 attan alınan kan örnekleri değerlendirildiğinde, AST ve GGT aktiviteleri ile kreatin kinaz (CK) ve TBIL düzeylerinin yükselmiş olduğu belirtilmiştir. On iki ay boyunca takip edilen atlardan 12'sinin öldüğü ve ölen hayvanlardaki GGT aktiviteleri ve TBIL düzeylerinin hayatta kalanlara göre daha fazla yükseldiği ifade edilmiştir. Ayrıca serum GGT aktivitesi 95 U/L'den yüksek olan atların, bu değere eşit veya daha düşük aktivite gösteren hayvanlarla karşılaştırıldığında 14 kat, TBIL düzeylerinin ise 0,6 mg/dl'den yüksek olan atların diğerlerine göre yaklaşık 6 kat daha fazla ölüm riskine sahip olduğu ifade edilerek söz konusu parametrelerin prognostik önemine dikkat çekmişlerdir.

Bu çalışmada da yukarıda belirtilen literatür verileriyle uyumlu olarak 120 mg/kg dozda MCT uygulanan farelerde kontrol grubuna göre AST, ALT ve GGT enzimatik aktiviteleri ile TBİL düzeylerinin artmış olduğu görülmüştür. Bu durumun, karaciğer parankim hücrelerinde meydana gelen hasardan kaynaklı olabileceği ve MCT uygulanan deneme gruplarında hem hepatosellüler hem de hepatobilier sistemin etkilenmesi ile ortaya çıkan infiltratif bozukluklardan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde 120 mg/kg dozda MCT uygulanan farelerde kontrol grubuna göre TCHO düzeylerinde önemli düzeyde olmasa da sayısal olarak bir artış olduğu tespit edilmiştir. Bu artışın MCT kaynaklı hepatik hasarın, karaciğerde serbest yağ asitlerinin β oksidasyonunun ve lipoprotein salgılanmasının inhibisyonuna ve kolesterol biyosentezinin artmasına sebep olmasından kaynaklı olabileceği (Letteron, Sutton, Mansouri, Fromenty ve Pessayre, 2003; Oda, Waheeb, El-Maddawy, 2018) düşünülmektedir. Monokrotalin uygulanan deneme gruplarında kontrol grubuna göre artış gösteren parametrelere (AST, ALT, GGT, TBIL, TCHO) zıt olarak TP düzeylerinin önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Total protein konsantrasyonlarındaki bu azalış, MCT'nin karaciğer hücrelerinde sebep olduğu hasar ile ilişkili olarak hepatositler tarafından protein sentezinin yapılamamasından ileri gelebileceğini (Oda vd., 2018) düşündürmektedir.

Vücudunun metabolik merkezinde yer alan karaciğer, toksik maddelerin zararsız hale getirilmesi ve vücuttan uzaklaştırılması için oldukça önemli bir organdır ve çeşitli çalışmalar ile karaciğer bozukluklarının temelinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Cichoz-Lach ve Michalak, 2014; Alkadi, 2018; Gao vd., 2021). Pirolizidin alkaloidlerinden MCT'nin sebep olduğu hepatotoksik etkiye karşı E vitamini (vit-E) ve selenyum (Se) uygulamasının olası yararlı etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada (Cuce vd., 2017), ratlara intraperitoneal (IP) olarak 300 mg/kg MCT uygulanmış ve devam eden 7 gün boyunca deneme gruplarından birine intragastrik olarak 200 mg/kg vit-E, diğerine ise 0,25 mg/kg Se uygulanmıştır. Deneme sonunda kan ve karaciğer doku homojenatlarında oksidatif hasar belirteçlerinden GSH düzeylerinin MCT uygulanan gruplarda belirgin bir şekilde azaldığı ve serum GSH düzeylerindeki bu azalışın kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde olduğu, tek doz MCT uygulamasıyla azalmış olan GSH düzeylerinin vit-E ve Se takviyesi yapılan gruplarda artış gösterdiği ve serum GSH düzeylerindeki bu artışın MCT+vit-E grubunda kontrol grubuna göre önemli düzeyde olduğu belirtilmiştir. Benzer şekilde GPx aktivitelerinin de tek doz MCT uygulamasıyla hem serum hem de karaciğer doku homojenatlarında önemli düzeyde azaldığı, ancak vit-E ve Se takviyesi yapılan gruplarda bu durumun tamponlanarak GPx aktivitelerinde artışın olduğu ifade edilmiştir. Çalışmada değerlendirilen CAT aktivitelerinin ise hem serum hem de karaciğer doku homojenatlarında kontrol grubuna göre tek doz MCT uygulanan grupta artış gösterdiği, MCT+vit-E ve MCT+Se gruplarında ise azalışların olduğu belirlenmiş, ancak bu artış ya da azalışların istatistiksel açıdan önemli düzeyde olmadığı ifade edilmiştir (Cuce vd., 2017). Benzer şekilde Amin vd., (2014) tarafından yapılan bir çalışmada da MCT kaynaklı hepatotoksisiteye karşı lipoik asit (LA), S-adenosil methionin (SAM) ve vit-E etkinliği değerlendirilmiş ve oksidatif hasar belirteçlerinden GSH düzeyleri, GR, GST, GPx, SOD ve CAT aktiviteleri ölçülmüştür. Karaciğer doku homojenatlarında yapılan ölçümlerde GSH düzeyleri, GR, GST ve GPx aktivitelerinin tek doz MCT uygulaması ile azaldığı ve bu azalmanın belirtilen tüm parametreler için önemli düzeyde olduğu belirtilmiştir. Hücresel antioksidan enzim aktivitelerindeki bu azalışların, MCT uygulaması ile karaciğerde artan ROT miktarı ve bunun sonucunda şekillenen oksidatif stres ile ilişkili olduğu, oksidatif hasara karşı koruyucu etkinliği araştırılan LA, SAM ve vit-E uygulamasının, MCT'nin sebep olduğu GSH düzeylerindeki, GR, GST ve GPx

aktivitelerindeki azalışları tamponize ederek artırdığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada diğer oksidatif hasar belirteçlerinden CAT ve SOD aktivitelerinin ise tek doz MCT uygulaması ile arttığı ve bu artışların kontrol grubuna göre önemli düzeyde olduğu ifade edilmiştir. Oksidatif stresin en sık meydana geldiği peroksizomlarda en bol bulunan protein olan CAT (Bocchetti ve Regoli, 2006) ile SOD aktivitelerindeki artışlar, artan ROT üretimine yönelik bir tepkiyi akla getirdiği şeklinde açıklanmıştır (Lee, Shih, Hsu ve Yen, 2007; Amin vd., 2014). Çalışmada LA, SAM ve vit-E uygulamasının artmış olan CAT ve SOD aktivitelerini azaltarak kontrole yakın değerlere düşürdüğü ve MCT kaynaklı karaciğer hasarına karşı LA, SAM ve vit-E uygulamasının koruyucu etkilerinin olabileceği ifade edilmiştir (Amin vd., 2014). Yapılan literatür incelemelerinde, PA'ların sebep olduğu hepatik hasar sürecinde oksidatif stres belirteçlerinden malondialdehit (MDA), GSH, SOD, CAT, GR, GPx vs. gibi hücrel oksidan/antioksidan enzimler değerlendirilmiş olsa da bu parametrelere alternatif olarak toplam oksidan ve antioksidan durumu özetleyen belirteçler de tercih edilmektedir.

Çeşitli sebeplere bağlı olarak vücutta ortaya çıkabilen oksidatif stres sonucunda, artmış oksidan radikaller ve azalmış antioksidan moleküller olduğundan, maddeler arası etkileşimi önlemek için vücuttaki genel durumu gösteren total oksidan ve antioksidan durumun belirlenmesinde TOK, TAK ve OSI düzeyleri kullanılmaktadır. Total oksidan kapasite düzeylerindeki aşırı artışlar, vücutta reaktif oksijen türlerinin artmış olduğunu ve oksidatif stresin geliştiğini gösterir. Total antioksidan kapasite ise, serbest radikalleri temizleyerek dokuları oksidatif hasara karşı korur. Ancak oksidan düzeylerindeki aşırı artışlarda dokuları oksidatif hasara karşı korumakta yetersiz kalır ve TAK düzeylerindeki azalışlar oksidatif stres için belirgin bir göstergedir. Oksidatif stres indeksi de oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin ne tarafa doğru kaydığını göstermektedir (Erel, 2005). Oksidanların artması ya da antioksidanların azalması sebebiyle artan OSI düzeyleri, protein oksidasyonu, lipid peroksidasyonu ve DNA hasarına yol açan kompanse edilmemiş serbest radikallerin üretimini tetikler (Tanyeli, Ekinci, Eraslan, Özbek ve Gülçin, 2020).

Sunulan bu çalışmada da, son yıllarda yapılan birçok çalışmada kullanılan oksidatif stres belirteçlerinden TAK, TOK ve OSI tercih edilmiş ve 120 mg/kg dozda MCT'nin bu parametre düzeylerini etkilediği görülmüştür. Deneme gruplarında TOS

ve OSİ düzeylerindeki artışın, MCT toksikasyonuna bağlı gelişen inflamasyon ve/veya artan ROT miktarıyla ilişkili şekillenen oksidatif stres kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan önemli düzeyde olmasa da akut toksikasyon grubunda TAK düzeylerinin azalması, oksidan parametrelerdeki ve ROT miktarındaki artışlar ile antioksidan enzimleri eksprese eden hücrelerin kaybı ve/veya ROT'un bu enzimler üzerindeki doğrudan inhibe edici etkilerinden (El-Demerdash, El-Sayed ve Abdel-Daim, 2021) ileri gelebileceğini düşündürmektedir. Ancak normalden farklı olarak subakut toksikasyon grubunda bu durumun tersi olarak hem kontrol hem de akut toksikasyon grubuna kıyasla TAK düzeylerinde önemli düzeyde artış belirlenmiş olması, MCT toksikasyonundan kaynaklanan oksidatif strese bağlı kompensatuar olarak yükselmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Çeşitli sebeplere bağlı olarak maruz kalınan PA'ların karaciğerde sitokrom P450 enzimleri tarafından hepatotoksik türlere metabolize edildiği ve bu toksik metabolitlerin karaciğer hücrelerinin ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Lin vd., 2011; Yang vd., 2017). Bu süreçte rol alan apoptotik markır düzeyleri çeşitli çalışmalarda farklı teknikler (Western blot, histopatolojik inceleme, immunohistokimyasal boyama, TUNEL, PCR) kullanılarak incelenmiş, ancak PA'ların sebep olduğu karaciğer hasarında protein düzeyinde apoptotik markır seviyelerinin belirlendiği çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu noktadan hareketle sunulan çalışma kapsamında birçok çalışmada ilgi odağı haline gelmiş olan Bcl-2, Bax ve Kaspaz-3 gibi apoptoz ile ilişkilendirilen markır seviyeleri, ELISA tekniği ile protein düzeyinde ölçüldü. İntrinsik apoptotik yolun kontrolünde önemli fonksiyonlara sahip olan Bcl-2 ve Bax proteinlerinin arasındaki denge oldukça önemlidir (Tsujimoto, 2002). Bu çalışmada elde edilen veriler sonucunda anti-apoptotik Bcl-2'nin azaldığı gruplarda Bax protein düzeylerinin artış göstermiş olması karaciğerde sitokrom C salınımına ve apoptozisin ilerlemesine sebep olabileceğini düşündürmektedir. Deneme gruplarında apoptotik markırlardan Bax ve Kaspaz-3 protein düzeylerinde görülen artışların, elde edilen biyokimyasal ve oksidatif stres parametreleriyle birbirini desteklediği ve MCT toksikasyonuna bağlı karaciğer hasarı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Apoptotik markır düzeylerinin protein düzeyinde tespitinin yapılmasının ardından aynı markırların qPCR analizi ile gen düzeyinde de

tayini yapıldı. qPCR analizinde, genel olarak apoptotik markır düzeylerinin protein düzeyindeki değişikliklere paralel sonuçlar elde edilmiş olsa da bazı farklılıklar olduğu belirlendi. Mitokondriyal membranda bulunan ve apoptoz mekanizmasında önemli rolü olan ve sitokrom C salınımını engelleyerek apoptoz mekanizmasında oluşabilecek olumsuz durumları engellemeye çalışan Bcl-2 düzeyleri, yapılan qPCR analizlerinde de ELISA sonuçlarında olduğu gibi 120 mg/kg dozda MCT alan deneme gruplarında azaldığı belirlendi. İstatistiksel açıdan önemli düzeyde olmasa da kontrol grubuna göre deneme gruplarında daha düşük ortalama ekspresyon seviyeleri alınmış olması hücrelerin apoptozise meyilli olabileceğini düşündürmektedir. Bcl-2 ile aynı aile içerisinde yer alan, ancak zıt etkili işlevlere sahip olan pro-apoptotik gen Bax ekspresyonuna bakıldığında, yine ELISA sonuçlarında olduğu gibi 120 mg/kg dozda MCT alan deneme gruplarında artış gösterdiği belirlendi. Kontrol grubuna göre deneme gruplarında yüksek Bax ekspresyonunun alınması ve MCT uygulaması sonrasında aşağı regüle olan Bcl-2 ile aralarındaki orantısal dengenin (Bax/Bcl-2) artması, hücrelerin apoptozise olan meyilinin arttığının göstergesi olabileceği düşünülmektedir. Hem intrinsik hem de ekstrinsik sinyal yolunda görev alan kaspazlardan efektör Kaspaz-3 gen ekspresyonunda ise pro-apoptotik gen Bax ile benzer şekilde 120 mg/kg dozda MCT alan deneme gruplarında kontrole göre artış görüldüğü belirlenmiştir. ELISA sonuçları ile protein düzeyinde yapılan Kaspaz-3 seviyelerinden farklı olarak akut toksikasyon grubunda, subakut toksikasyon grubuna göre daha yüksek gen ekspresyonu alınmıştır. Ancak deneme gruplarının ikisinde de kontrol grubuna göre daha yüksek düzeyde alınmış olan apoptotik markır düzeyleri MCT uygulamasının karaciğer hücrelerinde apoptozise sebep olduğunun açık göstergesi niteliğindedir.

Luo vd., (2019) tarafından yapılan bir çalışmada ise MCT'nin neden olduğu gelişimsel toksisite ile MCT metabolizmasındaki cinsiyet farklılığı incelenmiş ve Wistar albino ırkı gebe ratlara gebeliğin 9. gününden 20. gününe kadar 20 mg/kg dozda intragastrik olarak MCT uygulanmıştır. Çalışmanın 20. gününde intragastrik olarak uygulanan MCT'den 2 saat sonra deney sonlandırılmış ve toplanan maternal+fetal karaciğer örnekleri incelenmiş, fetal karaciğer örneklerinden ilk olarak RNA izolasyonu ve sonrasında da cDNA sentezi yapılarak qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmada gerçekleştirilen qPCR analizlerinde, aynı aile

içerisinde yer alan anti-apoptotik Bcl-2 ve pro-apoptotik Bax genleri incelenmiş ve gruplara göre oransal değişimleri (Bax/Bcl-2) belirlenmiştir. Gebelik döneminde maruz kalınan MCT'nin plesanta bariyerini geçebildiği ve fetus karaciğerinde harabiyete sebep olduğunu belirten araştırmacılar, özellikle dişi fetusların daha fazla etkilendiğini ifade etmişlerdir. Yapılan qPCR analizlerinde de pro-apoptotik gen Bax ekspresyon düzeylerinin plesanta yoluyla MCT'ye maruz kalmış dişi fetuslarda hem kontrol dişi fetus hem de erkek fetus örneklerinden alınan ekspresyon seviyelerinden daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada anti-apoptotik markır Bcl-2 gen ekspresyon düzeylerinin ise kontrol gruplarına göre daha düşük seviyelerde olduğu ve buna bağlı olarak da MCT'ye maruz kalmış fetuslarda Bax/Bcl-2 oranında yüksek olduğu gösterilmiştir.

Zarei, Farzan, Dehkordi, Lorigooini ve Moradi (2023), tarafından yapılan başka bir çalışmada İran'ın kuzey dağlık bölgelerinde yetişen ve yapısında toksik PA taşıdığı belirlenen (Mehrabani, Ghannadi, Sajjadi, Ghassemi ve Shams-Ardakani, 2006; Azadbakht, Nematzadeh, Hosseinpour Azad ve Shokri, 2011), ancak geleneksel bitkisel tıpta kullanılan *Echium amoenum* bitki özütünün insan hepatoselüler karsinom hücre hattı (HepG2) üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bitkisel ilaçların yanlış kullanımından etkilenebilecek en hayati organlardan birinin karaciğer olması sebebiyle, *in vitro* olarak planlanan bu çalışmada HepG2 hücre hattına bitki özütü uygulanmış ve 15 ila 30. dakikalardaki apoptotik markır olan kaspaz-3 aktivitesi ölçülmüştür. Bu çalışmada kaspaz-3 aktivitesi, kontrol grubuna göre hem 15. dakikada hem de 30. dakikada artış göstermiş, ancak sadece 30. dakika da ölçülen kaspaz-3 aktivitesinin kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan önemli düzeyde yüksek olduğu belirtilmiştir.

Bu noktaya kadar elde edilen veriler ile 120 mg/kg dozda intragastrik olarak MCT maruziyetinin biyokimyasal değerleri değiştirdiği, oksidatif hasara sebep olduğu, anti-apoptotik ve pro-apoptotik markır düzeylerinin (Bcl-2, Bax, Kaspaz-3) hem protein hem de gen düzeyindeki seviyelerinin etkilendiği belirlenmiştir. Elde edilen verilerin birbirini desteklediği ve MCT maruziyetinin karaciğerde hasara neden olduğu kanısını güçlendiren nitelikte olduğu görülmüştür. Karaciğer hasarının hücresel boyutta incelenmesi amacıyla da deney sonlandırılmasının yapıldığı gün %10'luk formalin içerisinde saklanan karaciğer dokuları HxE ve Masson's

Trichrome boya ile boyanarak histopatolojik olarak kapsamlı bir şekilde incelendi. Yapılan incelemeler sonrasında kontrol grubuna ait örneklerin normal olduğu, deneme gruplarında ise kanama, hepatosit dejenerasyonu, lobuler inflamasyon, hiperemi, eritrosit ekstrasvazasyonu, sinüzoidal dilatasyon gibi karaciğer hasar belirteçleri tespit edilmiştir. Deneme grupları arasında yapılan karşılaştırma da ise akut toksikasyon grubunda görülen lezyonların daha şiddetli düzeyde olduğu görüldü. Sunulan çalışmada histopatolojik açıdan elde edilen sonuçlar Huang vd., (2017) ve Ren vd., (2022) tarafından yapılan çalışma verileri ile uyum göstermektedir. Yine sunulan çalışma ile benzer sonuçların alındığı Otaka vd., (2021) tarafından yapılan bir çalışmada MCT maruziyetinin 48, 72 ve 120. saatlerdeki histopatolojik değişiklikler incelenmiş ve MCT uygulamasından 48 saat sonra, karaciğerin sentrilobüler bölgelerinde önemli hemorajik nekrozun gözlendiği, 72 saat sonra merkezi damarlar etrafındaki hepatik nekroz alanının lokalize olduğu ve nekrotik alanın azaldığı, MCT tedavisinden 120 saat sonra ise hepatik nekrozun azaldığı ve kontrole göre çok az değişikliklerin olduğu belirtilmiştir. Bu sonuçlar ile MCT'nin neden olduğu karaciğer hasarının 48. saatte zirve yaptığı, MCT tedavisinden 120 saat sonra ise hücre yenilenmesinin artışına bağlı olarak histopatolojik değişikliklerin normale yakın olduğu gösterilmiştir.

Ebmeyer vd., (2020) tarafından yapılan bir çalışmada PA'nın düşük doz aralığında ve 28 günlük tekrarlı maruziyet sonrasında gen ekspresyon düzeylerindeki olası değişikliklerin belirlenmesine odaklanılmıştır. Çalışmada, insanların kontamine gıdalar ile PA'lara maruz kalma durumlarını yansıtan ve akut olmayan en düşük toksik doz seçilmiş (3,3 mg/kg) ve yapısal olarak farklı PA'ların farklı yollar üzerinde etkisi veya benzer bir toksisite ile sonuçlanıp sonuçlanmadığı incelenmiştir. Bu amaçla PA'lardan ekimidin, heliotrin, lasiokarpin, senesiyonin, senkirkin ve platifilin tercih edilmiş ve ratlara intragastrik olarak 28 gün boyunca uygulanmıştır. Aynı çalışmada farklı PA'lara maruziyetin karaciğer gen ekspresyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi sonucunda, kontrol grubu ile platifilinin benzer, senkirkinin ise çok farklı seviyelerde gen ekspresyonu verdiği, çalışmaya dahil edilen diğer PA'lardan alınan gen ekspresyon profilinin ise platifilin ile senkirkin arasında ve kontrol grubuna göre orta derecede bir değişiklik gösterdiği ortaya konulmuştur.

Yapılan mikroarray analizinde farklı gen düzeylerinde tarama yapan araştırmacılar çalışmaya dahil edilen PA'lardan senesiyonin ve senkirkinin diğer PA'lara göre daha fazla gen düzeyinde upregüle (arttığı) olduğu, bunları heliotrine'nin takip ettiğini, tüm PA'ların gen ekspresyon profili incelendiğinde apoptoz, hücre döngüsü/bütünlüğü ve/veya DNA hasarı tepkisiyle ilişki Bax (Bcl-2 ilişkili apoptotik regülatör), Eda2r (ektodisplazin A2 reseptör), Ddias (DNA hasarına karşı apoptoz baskılayıcı), Fas (Fas hücre yüzeyi ölüm reseptörü), Aldh1a1(aldehid dehidrogenaz 1 ailesi A1 üyesi), Gsta1 (glutasyon S-tranferaz alfa-1), Rpl19 (ribozomal protein L19), Cdkn1a (siklin bağımlı kinaz inhibitör 1A), Ccng1 (siklin G1), Plk4 (polo benzeri kinaz 4) ve Mcm5 (minikromozom bakım kompleks bileşeni 5) genlerinin diğer genlere göre öne çıktığı ve alınan gen ekspresyonlarının çalışmaya dahil edilen tüm PA'larda upregüle şekilde olduğu belirtilmiştir.

Bu çalışmada pirolizidin alkaloidlerinden MCT'nin 120 mg/kg dozda intragastrik olarak uygulanmasının 48. saat akut toksikasyon ve 5 gün arayla 3 kez tekrarlı maruziyeti kapsayan subakut toksikasyon gruplarının hem kendi aralarında hem de kontrol grubuna göre gen ekspresyon düzeylerindeki olası değişikliklerin belirlenmesine odaklanılmıştır. Bu kapsamda yapılan PCR array analizinde apoptotik belirteçler, JAK/STAT proteinleri, JAK proteinlerini bağlayan ve etkinleştiren reseptörler, STAT etkileşimli transkripsiyon faktörler, JAK/STAT sinyal düzenleyici genler, hücre döngüsü, proliferasyonu, büyümesi ve/veya onarımı, akut faz tepkisi ile inflamatuvar yanıtta sorumlu genler çoğunluklu olmak üzere 93 farklı gen eş zamanlı olarak incelenmiş ve gen ekspresyon profili değerlendirilmiştir. Monokrotalin maruziyetinin karaciğer gen ekspresyonu üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde hem intrinsik hem de ekstrinsik yol ile aktive olarak apoptotik süreçte kritik bir belirleyici olan kaspaz ailesinde yer alan genlerde belirgin farklılıklar dikkat çekicidir. Kontrol grubuna göre yapılan kıyaslamada 120 mg/kg dozda MCT alan deneme gruplarında kaspaz-3, -6, -7, -8 ve -9 gen ekspresyon düzeylerinde artışların olduğu görüldü. Benzer şekilde Bcl-2 gen ailesi içerisinde yer alan ve intrinsik yol ile apoptotik süreçlerde rol oynayan apoptotik markır Bak (Bcl-2 antagonisti) gen ekspresyon düzeylerinde de artış olduğu, ancak aynı aile içerisinde yer alan anti-apoptotik markır Bcl-2L1 gen ekspresyon düzeylerinde ise azalmanın olduğu

belirlendi. Anti-apoptotik markır Bcl-2L1 gen ekspresyonunu destekler nitelikte ikappa B inhibitörü (IkB) ailesinin atipik bir üyesi olan ve hücre döngüsü ile hücrelerin hayatta kalmasını destekleyen Bcl-3 (B hücreli lösemi/lenfoma 3) (Liu, Zeng, Yang, Guo ve Wang, 2022) gen ekspresyon düzeylerinde de azalmaların olduğu belirlendi. Birbirine zıt etkili olan bu iki gruptan apoptotik markır düzeylerindeki artışın belirginliği MCT'nin toksik etkisinin açık göstergesi olabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca sitokin aktivitesinin etkinleştirilmesi, anjiyogenez ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) üretiminin pozitif düzenlenmesi, inflamatuvar yara iyileşmesi, hücre farklılaşması ve hücre yüzeyi reseptör sinyal yolu da dahil olmak üzere çeşitli süreçlerde rol alan IL1A ve IL18, hücre göçü ve istilası gibi onkogenik süreçlerde yer alan RPS6KB1, kaspaz 8 ve FADD benzeri apoptoz düzenleyici olarak bilinen CFLAR gen ekspresyon düzeylerinde de kontrol grubuna kıyasla artışlar olduğu belirlendi. Anjiyogenez ve nöronal aksonların yönlendirilmesinde önemli olan bir hücre yüzeyi reseptörü olan nöropilinler (NRP1 ve NRP2) hem vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ailesi hem de semaforin (Sema) ailesi üyeleri ile etkileşime girebilen transmembran glikoproteinlerdir (Sulpice vd., 2008). Yapılan çalışmalarda (Takashima vd., 2002; Yin vd., 2020; Borkowetz vd., 2020; Dumond ve Pages, 2020) kardiyovasküler gelişim sırasında arteriyel endotel hücrelerinde NRP1'in, venöz ve lenfatik endotel hücrelerinde ise NRP2'nin tespit edildiği ve nöropilinlerin hem aşırı ekspresyonunun hem de inaktivasyonunun nöronal kusurlara, vasküler ağda düzensizliğe, kalp gelişiminde kusurlara ve tümörlerin ilerlemesine neden olarak ölümcül olabildiği gösterilmiştir. Sunulan çalışmada da NRP1 ve NRP2 gen ekspresyon düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu belirlendi. Anjiyogenez mekanizmasında önemli role sahip olan nöropilin düzeylerindeki bu artışlar, MCT'nin kalp ve damar sistemi üzerinde de negatif bir etkiye sahip olabileceğini akla getirmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar (Concetti ve Wilson, 2018; Chen, Li, Li ve Wang, 2020; Kreuger, Sliker, Groningen ve Doorn, 2023) apoptotik süreçlerde yer alan hücresel efektör ve sinyal yollarının tümörlerin hem gelişimini hem de ilerlemesini tanımlamada önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bunlar arasında yer alan NFkB1 transkripsiyon faktörleri, immün yanıtların, apoptozun ve hücre

sağkalımının düzenlenmesinde temel bir rol oynar. NFKB1 aktivasyonu, enflamatuvar sitokinleri, hücre döngüsü modülatörlerini, hayatta kalma sinyallerini, büyüme ve anjiyojenik faktörleri kodlayan genlerin NFKB1'ye bağlı transkripsiyonuna yol açar ve tümörü teşvik eden bir ortamdaki itici gücü sağlarlar. Ancak kronik inflamasyon, toksikasyon ve enfeksiyon gibi patolojik durumlar sırasında NFKB1 aktivasyonu ile kontrolü arasındaki denge kaybolur ve NFKB1 inhibisyonu şekillenir. Bu durumda da karsinogenez ile ilişkili düzensiz hücre proliferasyonu ve apoptoz dahil olmak üzere anormal hedef gen regülasyonu görülür (Concetti ve Wilson, 2018). Sunulan çalışmada da 120 mg/kg dozda MCT uygulanan deneme gruplarında kontrol grubuna göre daha düşük düzeyde NFKB1 gen ekspresyonu alınmasının MCT'nin karaciğer karsinogenezi ile ilişkilendirilebileceğini düşündürmüştür. Benzer şekilde, normal koşullar altında hücrelerin çoğunda düşük düzeyde eksprese edilen, ancak hipoksik durumda sıklıkla belirgin şekilde artan ve hipoksiye karşı hücrel yanıtın düzenlenmesinde rol oynayan HIF1A (hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 alt birim alfa) (Cimmino vd., 2019; Chen vd., 2020) gen ekspresyon düzeylerinin de deneme gruplarında düşük düzeyde olduğu görülmüştür. Hücre döngüsü yollarının düzenlenmesi için kritik olan p16 ve p14 olmak üzere iki proteini kodlayan tümör baskılayıcı bir gen olan *CDKN2A* (sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A), gen ekspresyon düzeylerine bakıldığında deneme gruplarında daha düşük düzeyde olduğu belirlendi. Genellikle melanom ve pankreas kanserine yatkınlık ile ilişkilendirilen *CDKN2A*'nın düşük ekspresyonu savunmasız ve düzensiz hücre döngüsünün, devamında da hücre ölümünün habercisidir (Goldstein, Struwing, Fraser, Smith ve Tucker, 2004; Goldstein vd., 2007; Kreuger, Sliker, Van Groningen ve Van Doorn, 2023). Yapılan PCR array çalışmasında elde edilen verilere genel olarak açıklık getirilmeye çalışılmış olsa da yaklaşık 15 gen için MCT uygulanan gruplar arasında farklı yönde ekspresyon alınmıştır. Kontrol grubuna göre yapılan kıyaslamada 12 gen (*Lef1*, *Socs2*, *TnfAIP3*, *Xiap*, *Jak2*, *Ddr2*, *Rock1*, *Rock2*, *Taf1*, *Ccnd1*, *Tnfrsf18*, *Traf6*) 5 gün ara ile 3 tekrarlı MCT alan subakut toksikasyon grubunda artış gösterirken, 48 saatlik akut toksikasyon grubunda azalmıştır. Bu durumun tersi olarak da 2 gen (*Ngfr*, *Socs3*) ekspresyon düzeylerinde ise kontrol grubuna kıyasla, akut toksikasyon grubunda artış var iken subakut toksikasyon grubunda azalma olduğu belirlendi. Grup başına alınan gen ekspresyon profilindeki farklılıkların sebebi olarak, aynı dozda (120mg/kg) MCT uygulanmış

olsa da deneme süresinin farklı olmasından (akut toksikasyon grubu 48. saat ötenazi, subakut toksikasyon grubu 15. gün ötenazi) kaynaklı olabileceği düşünülse de bu genlerin apoptotik süreç, akut faz tepkisi, inflamatuvar yanıt, genotoksik yanıt, hücre döngüsü, proliferasyonu, büyümesi ve/veya onarımı ile ilişkili olduğu ve biyobelirteç olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, insanlar ve hayvanlar için hepatotoksik etkiye sahip olduğu bilinen PA'lardan, MCT kaynaklı hepatik hasarın biyokimyasal ve moleküler düzeyde meydana getirdiği değişiklikler incelendi. Deneme sonunda biyokimyasal açıdan yapılan değerlendirmede plazma AST, ALT ve GGT aktiviteleri ile TBIL ve TCHO düzeylerinin deneme gruplarında artış göstermesi ve TP düzeylerinin ise azalması, MCT maruziyetinin hepatobiliyer ve hepatoselüler sistemi etkileyerek karaciğer fonksiyon bozukluklarına sebep olduğunu düşündürmektedir. Karaciğer doku homojenatlarında yapılan ölçümlerde oksidatif stres parametrelerinden TOK ve OSI düzeylerinin deneme gruplarındaki gözle görülür artışı hepatik toksisite ile ilişkilendirildi. Çalışma kapsamında herhangi bir antioksidan ajan kullanılmamasına rağmen subakut toksikasyon grubunda, kontrol grubuna göre yükselmiş olan TAK düzeylerinin, tekrarlı MCT maruziyetinden kaynaklanan oksidatif strese bağlı kompensatuar olarak yükselmiş olabileceğini düşündürdü. Monokrotalin uygulanan gruplardaki karaciğer hasarının tüm yönleriyle belirlenebilmesi adına, hücrelerin apoptoza eğilimli olup olmadığının saptanmasında önemli bilgiler veren apoptotik markır Bax ve Kaspaz-3 düzeylerinin gerek protein düzeyinde gerekse gen ekspresyon grup ortalamaları düzeyinde deneme gruplarında artış gösterdiği belirlendi. Anti-apoptotik markır Bcl-2 düzeylerinin ise her iki yönden de deneme gruplarında azalmış olması, MCT'nin sebep olduğu hücresel hasarın kompanze edilemediğini düşündürmektedir. Hücresel hasar derecesinin belirlenmesi amacıyla yapılan histopatolojik incelemelerde de deneme gruplarında morfolojik farklılıklar belirlenmiş ve elde edilen verilerin birbirini desteklediği görülmüştür. Ancak elde ettiğimiz PCR array verileri değerlendirildiğinde; araştırılan gen panelleri bakımından MCT toksikasyonu kurgumuzda literatürde önemli eksikliği olan genlere ait ekspresyon verilerinin aday marker çıkarma potansiyelinde olduğu ve bu bulgularımızın yapılacak daha kapsamlı yeni çalışmalarla immünohistokimya, western blot ve qPCR düzeylerinde araştırılmaya değer olduğu sonucuna varıldı.

Planlanabilecek yeni çalışmalarda, MCT toksikasyonuna bağlı olarak yüksek ekspresyon gösteren apoptoz, hücre döngüsü/bütünlüğü ve DNA hasarı ile ilişkilendirilen genler (Bak, Cas3, Cas9, Cas7, Cas8, Bcl2L1, NFKB1, CDKN2A vs.), MCT'nin kalp ve damar sistemi üzerinde de negatif etkiye sahip olduğunu düşündüren nropilin genler (NRP1, NRP2) ve JAK proteinlerini bağlayan/etkinleştiren reseptörler, STAT etkileşimli transkripsiyon faktörler ve JAK/STAT sinyal düzenleyici genlerin (Jak2, Socs2, Socs3, Myc vb.) etkinliğinin değerlendirilmesinin faydalı olabileceği kanaatine varıldı. Ayrıca gıda yoluyla istem dışı maruz kalınan PA sınıfının önemli bir potansiyel taşıdığı, deney hayvanları üzerinde yapılacak çalışmalarda farklı doz ve uygulama yolu veya tekrarlı maruziyetlerin sebep olabileceği kronik biyokimyasal süreçlerin moleküler yolaklar üzerindeki sitokinler bakımından değerlendirilmesinin hedeflenebileceği dşnlmektedir. Ek olarak, PA maruziyetin azaltılabilmesi adına tarım ve mera alanı olarak kullanılacak arazilerdeki ya da arıcılık yapılacak bölgelerdeki bitki çeşitliliğinin dikkat edilmesi gereken bir nokta olduğu, onaylı/güvenilir olmayan ve içeriği tam olarak bilinmeyen bitkisel kökenli ilaç ve çay tüketimlerinin önlenmesinin istem dışı maruz kalınan PA'ların toksik etkilerinden korunmakta etkili olabileceği dşnlmektedir.

KAYNAKLAR

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X. ve Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular Cell*, 9, 423–32.
- Aggarwal, S., Gross, C. M., Sharma, S., Fineman, J. R. ve Black, S. M. (2013). Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling. *Comprehensive Physiology*, 3, 1011-1034
- Agostini, J., Benoist, S., Seman, M., Julié, C., Imbeaud, S., Letourneur, F., Cagnard, N., Rougier, P., Brouquet, A., Zucman-Rossi, J. ve Laurent-Puig, P. (2012). Identification of molecular pathways involved in oxaliplatin-associated sinusoidal dilatation. *Journal of Hepatology*, 56, 869-876.
- Akşit, H. ve Bildik, A. (2008). Apoptozis. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(1):55-63.
- Alkadi, H. (2018). A review on free radicals and antioxidants. *Infectious Disorders Drug Targets*, 4(2), 123-133.
- Amin, K. A., Hashem, K. S., Al-muzafar, H. M. ve Taha, E. M. (2014). Oxidative hepatotoxicity effects of monocrotaline and its amelioration by lipoic acid, S-adenosyl methionine and vitamin E. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 11(1), 35-41.
- Ark, M. (Edt.) 2017. Hücre kültürü ve temel moleküler biyoloji protokolleri, Bölüm 6: Hücre ölümü ve apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Ankara, Nobel Tıp Kitabevleri.
- Aslankoç, R., Demirci, D., İnan, Ü., Yıldız, M., Öztürk, A., Çetin, M., Savran, E. Ş. ve Yılmaz, B. (2019). Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü: Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 26(3), 362-369.
- Azadbakht, M., Nematzadeh, G. H., Hosseinpour Azad, N. ve Shokri, E. (2011). Quantitative and qualitative investigation on pyrrolizidine alkaloids in roots, leaves, petals and seeds of Iranian *Echium amoenum* fisch & Mey. *J. Mazand. Uni. Med. Sci.*, 20, 131-137.
- Baker, D. C., Pfister, J. A., Molyneux, R. J. ve Kechele, P. (1991). Cynoglossum officinale toxicity in calves. *Journal of Comparative Pathology*, 104: 403-410.

Benavides-Cordoba, V., Silva-Medina, M., Varela, M. X. ve Gomez, M.P. (2020). Subchronic toxicity of the pulmonary hypertension model due to lowdose monocrotaline in rats. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 8 (4), 308-315.

Bocchetti, R. ve Regoli, F. (2006). Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere*, 65, 913-21.

Bodi, D., Ronczha, S., Gottschalk, C., Behr, N., Skibba, A., Wagner, M., Lahrssen-Wiederholt, M., Preiss-Weigert, A. ve These, A. (2014). Determination of pyrrolizidine alkaloids in tea, herbal drugs and honey. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(11), 1886-1895.

Boppre, M. (2011). The ecological context of pyrrolizidine alkaloids in food, feed and forage: an overview. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(3):260-81.

Borkowetz, A., Froehner, M., Rauner, M., Conrad, S., Erdmann, K., Mayr, T., Datta, K., Hofbauer, L. C., Baretton, G. B., Wirth, M., Fuessel, S., Toma, M. ve Muders, M. H. (2020). Neuropilin-2 is an independent prognostic factor for shorter cancer-specific survival in patients with acinar adenocarcinoma of the prostate. *International Journal of Cancer*, 146, 2619-2627.

Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L. ve De Guevara, R. L. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology*, 14, 1-9.

Cain, K., Bratton, S. B. ve Cohen, G. M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie*, 84, 203–14 [PubMed: 12022951]

Camara, A. C. L., de Sousa Argenta, V. L., de Moraes, D. D. A., Finseca, E. F., Fino, T. C. M., Paludo, G. R. ve Soto-Blanco, B. (2022). Hematological and serum biochemical changes and their prognostic value in horses spontaneously poisoned by *Crotalaria spectabilis*. *Brief Research Report*, 8: 741530

Cao, Y., Liu, M., Wu, S., Xu, J., Wang, W., Qi, X., Ren, J., Sun, J., Chen, J. ve Gong, L. (2022). Kupffer cells play a crucial role in monocrotaline-induced liver injury by producing TNF- α . *Toxicology*, 468(2022): 153101.

Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P. ve Karagin, P. H. (2020). Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi. *Güncel gastroenteroloji*, 24(3): 103- 111

Celi, P. (2011). Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 33(2), 233-240.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2012). Investigating liver disease in Ethiopia. *CDC Web Archive*, <https://www.cdc.gov/nceh/stories/ethiopia.html>. Erişim tarihi: 12 Mart 2022.

Chauvin, P., Dillon, J. C., Moren, A., Talbak, S. ve Barakaev, S. (1993). Heliotrope poisoning in Tadjikistan. *Lancet*, 341, 1663.

Cheeke, P. R. (1994). A review of the functional and evolutionary roles of the liver in the detoxification of poisonous plants, with special reference to pyrrolizidine alkaloids. *Veterinary and human toxicology*, 36: 240-247.

Chen, T., Mei, N. ve Fu, P. P. (2010). Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Journal of applied toxicology*, 30(3):183-96.

Chen, B., Li, L., Li, M. ve Wang, X. (2020). HIF1A expression correlates with increased tumor immune and stromal signatures and aggressive phenotypes in human cancers. *Cellular Oncology*, 43: 877-888.

Chiu, C., Martin, C., Woldemichael, D., W/Selasie, G., Tareke, I., Luce, R., G/Libanos, G., Hunt, D., Bayleyegn, T., Addissie, A., Buttke, D., Bitew, A., Vagi, S., Murphy, M., Seboxa T., Jima, D. ve Debella, A. (2016). Surveillance of a chronic liver disease of unidentified cause in a rural setting of Ethiopia: a case study. *Ethiopian Medical Journal*, 54(1), 27-32.

Cichoz-Lach, H. ve Michalak, A. (2014). Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 20(25), 8082-8091.

Cimmino, F., Avitabile, M., Lasorsa, V. A., Montella, A., Pezone, L., Cantalupo, S., Visconte, F., Corrias, M. V., Iolascon, A. ve Capasso, M. (2019). HIF-1 transcription activity: HIF1A driven response in normoxia and in hypoxia. *BMC Medical Genetics*, 20, 37.

Concetti, J. ve Wilson, C. L. (2018). NFkB1 and cancer: Friend or foe?. *Cells*, 7,133.

Copple, B. L., Ganey, P. E. ve Roth, R. A. (2003). Liver inflammation during monocrotaline hepatotoxicity. *Toxicology*, 190 (3): 155- 169.

Copple, B. L., Banes, A., Ganey, P. E. ve Roth, R. A. (2002). Endothelial cell injury and fibrin deposition in rat liver after monocrotaline exposure. *Toxicological Sciences*, 65, 309-318.

Coşkun, G., ve Özgür, H. (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması, *Arşiv*, 20: 145-158.

Cuce, G., Canbaz, H. T., Sozen, M. E., Yerlikaya, F. H. ve Kalkan, S. (2017). Vitamin E and selenium treatment of monocrotaline induced hepatotoxicity in rats. *Biotechnic and Histochemistry*, 92(1), 59-67.

Çaylak, E. (2011). Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 9(1), 73-83.

Çiğnitaş, E. ve Kitiş, Y. E. (2023). Pyrrolizidine alkaloidleri içeren yabancı otlar ve etkileri. *International Conference on Scientific and Innovative Studies (ICSIS)*, 18-20 Nisan 2023. Konya, Türkiye.

D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell biology international*, 43:582-92.

Danial, N. N. ve Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116, 205–19.

Degterev, A., Boyce, M. ve Yuan, J. Y. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, 22, 8543-8567.

Devrim, T., Ekici, H., Devrim, A. K., Sozmen, M., Şenol, A., Bozkurt, K. M. ve Duru, O. (2020). Late effects of cutaneous 3-methylcholanthrene exposure on DNA damage-related pleiotropic growth factors and oxidative stress markers in mice. *Bratislava Medical Journal*, 121(5), 325-330.

Du Toit, A. (2013). Cell death: Balance through a bivalent regulator. *Nature reviews: Molecular cell biology*, 14:546.

Dumond, A. ve Pagès, G. (2020). Neuropilins, as relevant oncology target: their role in the tumoral microenvironment. *Frontiers in Cell Developmental Biology*, 8(662), 1-10.

Dusemund, B., Nowak, N., Sommerfeld, C., Lindtner, O., Shafer, B. ve Lampen, A. (2018). Risk assessment of pyrrolizidine alkaloids in food of plant and animal origin. *Food and Chemical Toxicology*, 115: 63-72.

Ebmeyer, J., Rasinger, J. D., Hengstler, J. G., Schaudien, D., Creutzenberg, O., Lampen, A., Braeuning, A. ve Hessel-Pras, S. (2020). Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids induce DNA damage response in rat liver in a 28-day feeding study. *Archives of Toxicology* 94, 1739-1751.

Edgar, J. A., Colegate, S. M., Boppré, M. ve Molyneux, R. J. (2011). Pyrrolizidine alkaloids in food: a spectrum of potential health consequences. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(3), 308-324.

Edgar, J. A., Molyneux, R. J. ve Colegate, S. M. (2015). Pyrrolizidine alkaloids: potential role in the etiology of cancers, pulmonary hypertension, congenital anomalies, and liver disease. *Chemical research in toxicology*, 28(1), 4-20.

El-Demerdash, F. M., El-Sayed, R. A., ve Abdel-Daim, M. M. (2021). Hepatoprotective potential of Rosmarinus officinalis essential oil against hexavalent chromium-induced hematotoxicity, biochemical, histological, and immunohistochemical changes in male rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(14), 17445-17456.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.

Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, 37(4), 277-285.

Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103-1111.

Eröksüz, Y., Eröksüz, H., Özer, H., Canatan, H., Yaman, I. ve Çevik, A. (2001). Toxicity of dietary *Heliotropium dosolum* seed to broiler chickens. *Veterinary and Human Toxicology*, 43 (6): 334- 338.

Etim, N. N., Williams, M. E., Akpabio, U. ve Offiong, E. E. (2014). Haematological parameters and factors affecting their values. *Agricultural Science*, 2(1), 37-47.

European Food Safety Authority (EFSA). (2011). Scientific opinion on pyrrolizidine alkaloids in food and feed. *EFSA Journal*, 9(11), 2406.

Frenzel, A., Grespi, F., Chmielewski, W. ve Villunger, A. (2009). Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer. *Apoptosis*, 14(4), 584-596.

Fu, P. P., Xia, Q., Lin, G. ve Chou, M. W. (2004). Pyrrolizidine alkaloids-genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. *Drug metabolism reviews*, 36(1), 1-55.

Ganji, L., Alebouyeh, M., Shirazi, M. H. ve Zali, M. R. (2019). Comparative transcriptional analysis for Toll-like receptors, inflammatory cytokines, and apoptotic genes in response to different cytolethal-encoding and noncoding isolates of Salmonella enterica and Campylobacter jejuni from food and human stool. *Microbial pathogenesis*, 133, 103550

Gao, X., Zhang, Z., Li, X., Wei, Q., Li, H., Li, C., Chen, H., Liu, C. ve He, K. (2020). Ursolic acid improves monocrotaline-induced right ventricular remodeling by regulating metabolism. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 75: 545-555.

Gao, X., Yanan, J., Santhanam, R. K., Wang, Y., Lu, Y., Zhang, M. ve Chen, H. (2021). Garlic flavonoids alleviate H₂O₂ induced oxidative damage in L02 cells and induced apoptosis in HepG2 cells by Bcl-2/Caspase pathway. *Journal of food science*, 86(2), 366-375.

Glück, J., Waizenegger, J., Braeuning, A. ve Hessel-Pras, S. (2021). Pyrrolizidine alkaloids induce cell death in human HepaRG cells in a structure-dependent manner. *International Journal of Molecular Sciences*, 2, 202.

Goldstein, A. M., Chan, M., Harland, M., Hayward, N. K., Demenais, F., Bishop, D. T., vd. (2007). Features associated with germline CDKN2A mutations: A genomel study of melanoma-prone families from three continents. *Journal of Medical Genetics*, 44(2), 99-106.

Goldstein, A. M., Struewing, J. P., Fraser, M. C., Smith, M. W. ve Tucker, M. A. (2004). Prospective risk of cancer in CDKN2A germline mutation carriers. *Journal of Medical Genetics*, 41, 421-424.

Güleş, Ö. ve Eren, Ü. (2008). Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2, 73-78.

Gürel Küçükkırlı, A. K. (2020). Ne zaman öleceğini Bilmek: Apoptoz Nedir?, BilimUP, Erişim linki: <https://www.bilimup.com/ne-zaman-olecegini-bilmek-apoptoz-nedir> , Erişim tarihi: 09/05/2024.

Halliwell, B. ve Gutteridge, J. M. (2015). Free radicals in biology and medicine. Oxford university press, USA.

He, X., Xia, Q., Shi, Q. ve Fu, P. P. (2020). Effects of glutathione and cysteine on pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity and DNA adduct formation in rat primary hepatocytes. *Journal of environmental science and health. Part C, Toxicology and carcinogenesis*, 38(2), 109-123.

He, Y., Lian, W., Ding, L., Fan, X., Ma, J., Zhang, Q. Y., Ding, X. ve Lin, G. (2021b). Lung injury induced by pyrrolizidine alkaloids depends on metabolism by hepatic cytochrome P450s and blood transport of reactive metabolites. *Archives of toxicology*, 95(1), 103-116.

He, Y., Shi, M., Wu, X., Ma, J., Ng, K. T. P., Xia, Q., Zhu, L., Fu, P. P. C., Man, K., Tsui, S. K. W. ve Lin, G. (2021). Mutational Signature Analysis Reveals Widespread Contribution of Pyrrolizidine Alkaloid Exposure to Human Liver Cancer. *Hepatology* 74, 264–280.

He, Y., Zhu, L., Ma, J. ve Lin, G. (2021a). Metabolism-mediated cytotoxicity and genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Archives of Toxicology*, 95(6), 1917-1942.

Hessel-Pras, S., Braeuning, A., Guenther, G., Adawy, A., Enge, A. M., Ebmeyer, J., Henderson, C. J., Henstler, J. G., Lampen, A. ve Reif, R. (2020). The pyrrolizidine alkaloid senecionine induces CYP-dependent destruction of sinusoidal endothelial cells and cholestasis in mice. *Archives of toxicology*, 94(1), 219-229.

Huang, Z., Chen, M., Zhang, J., Sheng, Y. ve Ji, L. (2017). Integrative analysis of hepatic microRNA and mRNA to identify potential biological pathways associated with monocrotaline-induced liver injury in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 333, 35-42.

Huang, Z., Zhao, Q., Chen, M., Zhang, J. ve Ji, L. (2019). Liquiritigenin and liquiritin alleviated monocrotaline-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome via inhibiting HSP60-induced inflammatory injury. *Toxicology*, 428, 152307.

IARC, (2002). Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon: International Agency for Research on Cancer. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 82).

Ighodaro, O. M. ve Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54, 287-293.

İsmail, M., Zhang, X., Taha, R., Elhafiz, M., Zhang, Q., Yoursef, B. A., Huang, X., Jiang, Z., Zhang, L. ve Sun, L. (2023). Expression profiles of lncRNAs and their possible regulatory role in monocrotaline-induced HSOS in rats. *Frontiers in Genetics*, 14: 1041266.

Kakar, F., Akbarian, Z., Leslie, T., Mustafa, M. L., Watson, J., van Egmond, H. P., Omar, M. F. ve Mofleh, J. (2010). An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in Western afghanistan associated with exposure to wheat flour contaminated with pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Toxicology*, 2010:2010:313280.

Karabulut, H. ve Gülay, M. Ş. (2016). Serbest Radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1), 50-59.

Karagül, H., Altıntaş, A., Fidancı, U. R. ve Sel, T. (2000). Klinik Biyokimya. (1. Baskı). Dışkapı-ANKARA, Medisan Yayınevi.

Kerr, J. F., Wylie, A. H. ve Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *The British journal of cancer*, 26:239-257.

Kintz, H., Nylen, E. ve Barber, A. (2020). Inclusion of Dap10 or 4-1BB costimulation domains in the chPD1 receptor enhances anti-tumor efficacy of T cells in murine models of lymphoma and melanoma. *Cellular Immunology*, 351, 104069.

Koçyiğit, E., ve Karadağ, M. G. (2020). Diyabette Hiperglisemi Kaynaklı Oksidatif Stresin Moleküler Mekanizması. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 48(3), 76-83.

Kösecik, M., Erel, Ö., Sevinç, E. ve Selek, S. (2005). Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. *International Journal of Cardiology*, 100(1), 61-64.

Kreuger, I. Z. M., Slieker, R. C., van Groningen, T. ve van Doorn, R. (2023). Therapeutic strategies for targeting CDKN2A loss in melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 143: 18-25.

Kuribayashi, K., Mayes, P. A. ve El-Dery, W. S. (2006). What are caspases 3 and 7 doing upstream of the mitochondria? *Cancer biology & therapy*, 5, 763-765.

Lamé, M. W., Jones, A. D., Wilson, D. W. ve Segall, H. J. (2005). Monocrotaline pyrrole targets proteins with and without cysteine residues in the cytosol and membranes of human pulmonary artery endothelial cells. *Proteomics*, 5, 4398-413.

Lee, C. P., Shih, P. H., Hsu, C. L. ve Yen, G. C. (2007). Hepatoprotection of tea seed oil (*Camellia oleifera* Abel.) against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 888-895.

Letsyo, E., Jerz, G., Winterhalter, P. ve Beuerle, T. (2017). Toxic pyrrolizidine alkaloids in herbal medicines commonly used in Ghana. *Journal of Ethnopharmacology*, 202: 154-161.

Letsyo, E., Dzikunoo, J., Dzah, C. S., Adams, Z. S. ve Asante-Donyinah, D. (2023). Hepatic phytotoxins in herbal medicines: A review of Africa's pyrrolizidine alkaloid-containing plants, their traditional uses, contamination pathways and associated health risks. *South African Journal of Botany*, 161, 78-89.

Lettéron, P., Sutton, A., Mansouri, A., Fromenty, B. ve Pessayre, D. (2003). Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology*, 38(1), 133-140.

Li, T., Wang, H., Dong, S., Liang, M., Ma, J., Jiang, X. W. ve Yu, W. (2022). Protective effects of maslinic acid on high fat diet-induced liver injury in mice. *Life Sciences*, 301, 120634.

Lin, G., Wang, J. Y., Li, N., Li, M., Gao, H., Ji, Y., Zhang, F., Wang, H., Zhou, Y., Ye, Y., Xu, H. X. ve Zheng, J. (2011). Hepatic sinusoidal obstruction syndrome associated with consumption of *Gynura segetum*. *Journal of Hepatology*, 54, 666–673

Liu, F., Rong, X., Guo, H., Xu, D., Liu, C., Meng, L., Yang X., Guo, T., Kan, X. ve Song, Y. (2020). Clinical characteristics, CT signs, and pathological findings of Pyrrolizidine alkaloids-induced sinusoidal obstructive syndrome: a retrospective study. *BMC gastroenterology*, 20(1),1-10.

Liu, H., Zeng, L., Yang, Y., Guo, C. ve Wang, H. (2022). Bcl-3: A double-edged sword in immune cells and inflammation. *Frontiers in Immunology*, 13: 847699.

Liu, T. Y., Chen, Y., Wang, Z. Y., Ji, L. L. ve Wang, Z. T. (2010). Pyrrolizidine alkaloid isoline-induced oxidative injury in various mouse tissues. *Experimental and Toxicology Pathology*, 62, 251-257.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. ve Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118-126.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. ve Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.

Lu, Y., Ma, J., Song, Z., Ye, Y., Fu, P. P. ve Lin, G. (2018). The role of formation of pyrrole–ATP synthase subunit beta adduct in pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity. *Archives of Toxicology*, 92(11), 3403-3414.

Luo, J., Yang, X., Qiu, S., Li, X., Xiang, E., Fang, Y., Wang, Y., Zhang, L., Wang, H., Zheng, J. ve Guo, Y. (2019). Sex difference in monocrotaline-induced developmental toxicity and fetal hepatotoxicity in rats. *Toxicology*, 418(2019), 32-40.

Ma, C., Liu, Y., Zhu, L., Ji, H., Song, X., Guo, H. ve Yi, T. (2018). Determination and regulation of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in food: a critical review of recent research. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 50-60.

Mattocks, A. R. (1968). Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Nature*, 217: 723-728.

Mayer, F. ve Lüthy, J. (1993). Heliotrope poisoning in Tadjikistan. *The Lancet*, 342(8865), 246-247.

Mehrabani, M., Ghannadi, A., Sajjadi, E., Ghassemi, N. ve Shams-Ardakani, M. (2006). Toxic pyrrolizidine alkaloids of *Echium amoenum* Fisch & Mey. *DARU Journal of Pharmaceutical Science*, 14, 122-127.

Mendler, M. H., Kanel, G. ve Govindarajan, S. (2005). Proposal for a histological scoring and grading system for non-alcoholic fatty liver disease. *Liver International*, 25(2), 294-304.

Milli, Ü. H. ve Hazıroğlu, R. (1997). Veteriner Patoloji. (1.Cilt). Ankara, Tamer Matbacılık.

Mingatto, F. E., Dorta, D. J., Santos, A. B., Carvalho, I., Silva, V. B. ve Silva, C. H. T. P. (2007). Dehydromonocrotaline inhibits mitochondrial complex I. A potential mechanism accounting for hepatotoxicity of monocrotaline. *Toxicon*, 50:724-30.

Mingatto, F. E., Maioli, M. A., Bracht, A. ve Ishii-Iwamoto, E. L. (2008). Effects of monocrotaline on energy metabolism in the rat liver. *Toxicology Letters*, 182:115-20.

Mis, L. Ve Çilingir Yeltekin, A. (2014). Apoptosis. *BEU Fen Bilimleri Dergisi*, 3(1):102-112.

Mohamed, A. K. ve Magdy, M. (2017). Caspase 3 role and immunohistochemical expression in assessment of apoptosis as a feature of H1N1 vaccine-caused drug-induced liver injury (DILI). *Electronic Physician*, 9(5), 4261-4273.

Mountz, J. D. ve Zhou, T. (2001). Apoptosis and autoimmunity (in) A Textbook of Rheumatology: Arthritis and allied conditions. WJ Kopman (Editör), Lippincott-Williams&Wilkins.

Mulder, P. P. J., Lopez Sánchez, P., These, A., Preiss-Weigert, A. ve Castellari, M. (2015). Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in food. *EFSA Supporting Publications*, 12(8), 859E.

Mulder, P. P. J., de Witte, S. L., Stoop, G. M., van der Meulen, J., van Wikkelaar, P. G., Gruys, E., Groot, M. J. ve Hoogenboom, R. L. (2016). Transfer of pyrrolizidine alkaloids from various herbs to eggs and meat in laying hens. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 33(12), 1826-1839.

Nakai, G., Shimura, D., Uesugi, K., Kajimura, I., Jiao, Q., Kusakari, Y., Soga T, Goda, N. ve Minamisawa, S. (2019). Pyruvate dehydrogenase activation precedes the down-regulation of fatty acid oxidation in monocrotaline-induced myocardial toxicity in mice. *Heart and vessels*, 34(3), 545-555.

Nobre, V. M. T., Riet-Correa, F., Filho, J. M. B., Dantas, A. F. M., Tabosa, I. M. ve Vasconcelos, J. S. (2004). Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em Equideos no semi-árido da Paraíba. *Pesq. Vet. Bras.*, 24(3):132-143.

Nobre, V. M. T., Dantas, A. F. M., Riet-Correa, F., Barbosa Filho, J. M., Tabosa, I. M., Vasconcelos, J. S. (2005). Acute intoxication by *Crotalaria retusa* in sheep. *Toxicon*, 45, 347-52.

Oda, S. S., Waheeb, R. S. ve El-Maddawy, Z. K. (2018). Potential efficacy of Coenzyme Q10 against oxytetracycline-induced hepatorenal and reproductive toxicity in male rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(1), 098-107.

Okuyan, D. (2023). Apoptozis. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi* 49 (1): 1-10.

Otaka, F., Ito, Y., Nakamoto, S., Nishizawa, N., Hyodo, T., Hosono, K., Majima, M., Koizumi, W. ve Amano, H. (2021). Macrophages contribute to liver repair after monocrotaline-induced liver injury via SDF-1/CXCR4. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 22(668), 1-11.

Owumi, S. E., Aliyu-Banjo, N. O. ve Danso, O. F. (2019). Fluoride and diethylnitrosamine coexposure enhances oxido-inflammatory responses and caspase-3 activation in liver and kidney of adult rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 33(7): e22327.

Öktem, S., Özhan, M.H. ve Özol, D. (2001). Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2, 91-5.

Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G. ve Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331-336.

Pirola, C. J. ve Sookoian, S. (2018). Multiomics biomarkers for the prediction of nonalcoholic fatty liver disease severity. *World journal of gastroenterology*, 24(15), 1601-1615.

Pisoschi, A. M. ve Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.

Prada, F., Stashenko, E. E. ve Martinez, J. R. (2020). LC/MS study of the diversity and distribution of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* species growing in Colombia. *Journal of Separation Science*, 43: 4322-4337.

Quan, N. V., Xuan, T. D. ve Teschke, R. (2020). Potential hepatotoxins found in herbal medicinal products: a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 5011.

Rasenack, R., Müller, C., Kleinschmidt, M., Rasenack, J. ve Wiedenfeld, H. (2003). Veno-occlusive disease in a foetus caused by pyrrolizidine alkaloids of food origin. *Fetal diagnosis and therapy*, 18: 223-25.

Ren, X., Xu, K., Xu, J. ve Mei, Q. (2023). Melatonin attenuates monocrotaline-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome in rats via activation of Sirtuin-3. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 37(9), e23422.

Ren, Y., Li, Y., Yan, J., Ma, M., Zhou, D., Xue, Z., Zhang, Z., Liu, H., Yang, H., Jia, L., Zhang, L., Zhang, Q., Mu, S., Zhang, R. ve Da, Y. (2017). Adiponectin modulates oxidative stress-induced mitophagy and protects C2C12 myoblasts against apoptosis. *Scientific Reports*, 7,3209.

Rubbia-Brandt, L., Lauwers, G. Y., Wang, H., Majno, P. E., Tanabe, K., X Zhu, A., Brezault, C., Soubrane, O., K Abdalla, E., Vauthey, J. N., Mentha, G. ve Terris, B. (2010). Sinusoidal obstruction syndrome and nodular regenerative hyperplasia are frequent oxaliplatin-associated liver lesions and partially prevented by bevacizumab in patients with hepatic colorectal metastasis. *Histopathology*, 56(4), 430-439.

Schoental, R., (1968). Toxicology and carcinogenic action of pyrrolizidine alkaloids. *Cancer Research*, 28, 2237–2246.

Schrenk, D., Gao, L., Lin, G., Mahony, C., Mulder. P. P. J., Peijnenburg, A., Pfuhler, S., Rietjens, I. M. C. M., Rutz, L., Steinhoff, B. ve These, A. (2020). Pyrrolizidine alkaloids in food and phytomedicine: Occurrence, exposure, toxicity, mechanisms, and risk assessment - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 136: 111107.

Schulz, M., Meins J, Diemert, S., Zagermann-Muncke, P., Goebel, R., Schrenk, D., Schubert-Zsilavec, M. ve Abdel-Tawab M. (2015). Detection of pyrrolizidine alkaloids in German licensed herbal medicinal teas. *Phytomedicine*, 22, 648-656.

Scorrano, L. ve Korsmeyer, S. J. (2003). Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(3), 437-444.

Sharma, S., Varsha, K. K., Kumari, S., Gopalakrishnan, V., Jose, A. E., Choudhary, B., Mantelingu, K. ve Raghavan, S. C. (2020). Acute toxicity analysis of Disarib, an inhibitor of BCL2. *Scientific reports*, 10(1), 1-9.

Shiozaki, E. N., Chai, J. ve Shi, Y. (2002). Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 4197-202 [PubMed: 11904389]

Shiozaki, E. N. ve Shi, Y. (2004). Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology. *Trends in biochemical sciences*, 29, 486–94 [PubMed: 15337122].

Siddiqui, W. A., Ahad, A. ve Ahsan, H. (2015). The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: An update. *Archives of toxicology*, 89(3), 289-317.

Silva, A. L., Oliveira, J. L., do Nascimento, R. P., Santos, L. O., de Araujo, F. M., dos Santos, B. L., Santana, R. C., Moreira, E. L. T., Batatinha, M. J. M., Alves, I. M., Velozo, E. S., Victor, M. M., Assis, A. M., Almeida, R. F., de Souza, D. O. G., Silva, V. D. A. ve Costa, S. L. (2023). Monocrotaline induces acutely cerebrovascular lesions, astrogliosis and neuronal degeneration associated with behavior changes in rats: A model of vascular damage in perspective, *Neurotoxicology*, 94; 59-70.

Song, Z., He, Y., Ma, J., Fu, P. P. ve Lin, G. (2020). Pulmonary toxicity is a common phenomenon of toxic pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 38(2), 124-140.

Soylu, Ş., Çevik, A. ve Timurkaan, N. (2022). Pathological and immunohistochemical changes in the liver of monocrotaline-treated rats. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 46: 795-802.

Srinivasan, P. ve Liu. M. Y. (2012). Comparative Potential therapeutic effect of sesame oil and peanut oil against acute monocrotaline (Crotalaria) poisoning in a rat model. *Journal Veterinary Internal Medicine*, 26, 491-499.

Stegemann, T., Kruse, L.H., Brütt, M. ve Ober, D. (2019). Specific Distribution of Pyrrolizidine Alkaloids in Floral Parts of Comfrey (*Symphytum officinale*) and its Implications for Flower Ecology. *Journal of Chemical Ecology*, 45(2):128-135.

Steinhoff, B. (2019). Pyrrolizidine alkaloid contamination in herbal medicinal products: Limits and occurrence. *Food and Chemical Toxicology*, 130: 262-266.

Stennicke, H. R. ve Salvesen, G. S. (2000). Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta-Port Struct Mol Enzimol.*, 1477, 299-306.

Stewart, M. J. ve Steenkamp, V. (2001). Pyrrolizidine Poisoning: A Neglected Area in Human Toxicology, *Therapeutic Drug Monitoring*, 23(6): 698-708.

Sulpice, E., Plouet, J., Berge, M., Allanic, D., Tobelem, G. ve Merkulova-Rainon, T. (2008). Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity. *Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 111(4), 2036-2045.

Suvarna, K. S., Layton, C. ve Bancroft, J. D. (2018). Bancroft's theory and practice of histological techniques. (8th Edition). Elsevier health sciences, eBook ISBN: 9780702068867.

Szegezdi, E., MacDonald, D. C., Chonghaile, T. N., Gupta, S. ve Samali, A. (2009). Bcl-2 family on guard at the ER. *American journal of physiology. Cell physiology*, 296, C941–C953.

Şahin, Y., Devrim, A. K., Alçıgır, M. E., Şenol, A., Ekici, H., Devrim, T., Sudağıdan, M., Yıldırım, E., Çınar, M., Bişkin Türkmen, M. ve Peker, S. A. (2023). The effect of krill oil on Wnt/ β -catenin signaling pathway in acetaminophen-induced acute liver injury in mice. *Turkish Journal of Biochemistry*, 48(3), 1-8.

T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Zehirli bitki listesi. (2024). Erişim adresi: <https://www.tarimorman.gov.tr/konu/956/zehirli-bitki-listesi>.

Tabakoğlu, E. ve Durgut, R. (2013). Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *Avkae Dergisi*, 3(1), 69-75.

Takashima, S., Kitakaze, M., Asakura, M., Asanuma, H., Sanada, S., Tashiro, F., Niwa, H., Miyazaki, J., Hirota, S., Kitamura, Y., Kitsukawa, T., Fujisawa, H., Klagsbrun, M. ve Hori, M. (2002). Targeting of both mouse neuropilin-1 and neuropilin-2 genes severely impairs developmental yolk sac and embryonic angiogenesis. *Proceeding National Academy of Science U.S.A*, 99, 3657-3662.

Tanyeli, A., Ekinci Akdemir, F. N., Eraslan, E., Özbek Sebin, S. ve Gulcin, İ. (2020). İntestinal iskemi/reperfüzyon hasarının hafifletilmesinde p-kumarik asit'in rolü. *Kocaeli Tıp Dergisi*, 9(1), 166-173.

Tessoulin, B., Papin, A., Gomez-Bougie, P., Bellanger, C., Amiot, M., Pellat-Deceunynck, C. ve Chiron, D. (2019). BCL2-family dysregulation in B-cell malignancies: from gene expression regulation to a targeted therapy biomarker. *Frontiers in Oncology*, 8, 645.

Tetik, Ş. ve Çıracı, E. (2019). Serbest radikaller, çeşitleri, kaynakları ve hedefleri. Yarat A, Akbay TT, Alturfan EI (Edt.), *Biyokimya Temel ve Özel Konular* (ss. 703-708). Ankara: Akademisyen Kitapevi A.Ş.

Tsujimoto, Y. (2002). Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Bioscience reports*, 22(1), 47-58.

Wang, Y., Qiao, D., Li, Y. ve Xu, F. (2018). Risk factors for hepatic veno-occlusive disease caused by Gynura segetum: a retrospective study. *BMC Gastroenterology*, 18:156.

Wang, C. ve Youle, R. J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis. *Annual review of Genetics*, 43, 95–118.

Ward, J., Guthrie, J. A., Sheridan, M. B., Boyes, S., Smith, J. T., Wilson, D., Wyatt, J. I., Treanor, D. ve Robinson, P. J. (2008). Sinusoidal obstructive syndrome diagnosed with superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging in patients with chemotherapy-treated colorectal liver metastases. *Journal of clinical oncology*, 26(26), 4304-4310.

Weldearegay, K. T., Gebrekidan, M. G. Ve Gezahegne, A. A. (2019). Health impact of hepatic-venous-occlusive disease in a small town in Ethiopia—Case study from Tahtay koraro district in Tigray region, 2017. *PLOS ONE*, 14, Article e0224659,

World Health Organization (WHO). (2020). Safety evaluation of certain food additives and contaminants; Pyrrolizidine alkaloids. *FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*, Geneva, Volume 71-S2.

Wu, D. ve Cederbaum, A. I. (2003). Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol research & health*, 27(4), 277.

Xu, J., Wang, W., Yang, X., Xiong, A., Yang, L. ve Wang, Z. (2019). Pyrrolizidine alkaloids: An update on their metabolism and hepatotoxicity mechanism. *Liver Research*, 3(3-4), 176-184.

Yamashita, Y., Fujise, N., Imai, E. ve Masunaga, H. (2002). Reduction of monovrotaline-induced hepatic injury by deleted variant of hepatocyte growth factor (dHGF) in rats. *Liver*, 22, 302-307.

Yan, J., Nichols, J., Yang, Y. C., Fu, P. P., Chou, M. W. (2002). Detection of Riddelliine-Derived DNA Adducts in Blood of Rats Fed Riddelliine. *International Journal of Molecular Sciences*, 3, 1019-1026.

Yang, M., Ruan, J., Gao, H., Li, N., Ma, J., Xue, J., Ye, Y., Chenf-Fu, P. P., Wan J. ve Lin. G. (2017). First evidence of pyrrolizidine alkaloid N-oxide-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome in humans. *Organ Toxicity and Mechanisms*, 91, 3913-3925.

Yao, J., Li, C. G., Gong, L. K., Feng, C. C., Li, C. Z., Gao, M., Luan, Y., Qi, X. M. ve Ren, J. (2014). Hepatic cytochrome P450s play a major role in monocrotaline-induced renal toxicity in mice. *Acta pharmacologica Sinica*, 35, 292-300.

Yee, S. B., Kinser, S., Hill, D. A., Barton, C. C., Hotchkiss, J. A., Harkema, J. R., Ganey, P. E. ve Roth, R. A. (2000). Synergistic hepatotoxicity from coexposure to bacterial endotoxin and the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 166:173-85.

Yin, D., Guo, L., Li, S., Tuerdi, A., Yang, X., Tang, Q., Wang, S., Liu, J., Huang, P. ve Li, M. (2020). Clinical significance of neuropilin-2 expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *American Journal of Otolaryngology*, 41, 102540.

Zarei, M. H., Farzan, M., Dehkordi, E. S., Lorigooini, Z. ve Moradi, M. T. (2023). The effect of infusion time on Echium amoenum extract -induced hepatotoxicity in vitro. *Toxicon*, 229, 107133.

Zhu, L., Zhang, C. Y., Li, D. P., Chen, H. B., Ma, J., Gao, H., Ye, Y., Wang, J. Y., Fu, P. P. ve Lin, G. (2021). Tu-San-Qi (*Gynura japonica*): the culprit behind pyrrolizidine alkaloid-induced liver injury in China. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(8):1212-1222.

Zhu, L., Wang, Z., Wong, L., He, Y., Zhao, Z., Ye, Y., Fu, P. P. ve Lin, G. (2018). Contamination of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in retail honey in China. *Food Control*, 85, 484-494.

Zimmer, A., Teixeira, R. B., Constantin, R. L., Campos-Carraro, C., Cordero, E. A. A., Ortiz, V. D., Donatti, L., Gonzales, E., Bahr, A. C., Visioli, F., Baldo, G., Luz de Catro, A., Araujo, A. S. ve Bello-Klein, A. (2021). The progression of pulmonary arterial hypertension induced by monocrotaline is characterized by lung nitrosative and oxidative stress, and impaired pulmonary artery reactivity. *European Journal of Pharmacology*, 891(2021): 173699.

