

Ratlarda Kurşun Asetat Kaynaklı Karaciğer Hasarı Üzerine Chrysin' in Etkilerinin Araştırılması[&]

Pınar COŞKUN^{1*}, Fulya BENZER², Fatih Mehmet KANDEMİR³, Serkan YILDIRIM⁴, Sefa KÜÇÜKLER⁵

¹Bingöl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bingöl, Türkiye

²Munzur Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Ebelik Bölümü, Tunceli, Türkiye

³Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Bölümü, Erzurum, Türkiye

⁴Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Patoloji Bölümü, Erzurum, Türkiye

⁵Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Bölümü, Erzurum, Türkiye

*Sorumlu Yazar: pincoskun55@gmail.com

Geliş Tarihi: 08.02.2021 Düzeltme Geliş Tarihi: 12.03.2021 Kabul Tarihi: 06.04.2021

Öz

Bu çalışma ratlarda kurşun asetat (PbA) kaynaklı karaciğer hasarı üzerine chrysin'in (CH) etkilerinin araştırılması amacıyla yapıldı. Çalışmada 35 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat, her grupta 7 rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. 1. Grup (Kontrol): Oral yolla serum fizyolojik verildi. 2. Grup (CH grubu): CH (50 mg kg⁻¹ ağırlık gün⁻¹) 7 gün boyunca oral olarak ratlara verildi. 3. Grup (PbA grubu): PbA (30 mg kg⁻¹) 7 gün boyunca 30 mg kg⁻¹ PbA oral yolla ratlara verildi. 4. Grup (PbA+CH 25 grubu): 7 gün boyunca 25 mg/kg CH uygulamasından 30 dakika sonra 30 mg kg⁻¹ PbA ratlara oral yoldan verildi. 5. Grup (PbA +CH 50 grubu): 7 gün süreyle 50 mg/kg CH uygulamasından 30 dakika sonra 30 mg kg⁻¹ PbA ratlara oral yoldan verildi. Son uygulamadan 24 saat sonra (8.günde) ratlar hafif sevofloran anestezisi altında ötenazileri yapılarak, doku ve kan örnekleri alındı. Serumda AST, ALT ve ALP ile karaciğer dokusunda MDA, GSH ve NO düzeyleri ile SOD, KAT, GPx ve arginaz enzim aktivitelerine bakıldı. Kontrol ile kıyaslandığı zaman serum ALT, AST ve ALP düzeyleri PbA verilen grupta arttı, bu artış CH ile önemli ölçüde düzeltildi. Karaciğer MDA ve NO düzeyleri PbA verilen gruplarda artarken, antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, KAT ve GPx) ile GSH düzeyi azaldı. CH uygulaması artan MDA ve NO düzeylerini azaltırken, antioksidan enzim aktiviteleri ile GSH düzeylerini anlamlı olarak artırdı. Histolojik olarak, PbA uygulanan ratların karaciğerlerinde görülen nekroz, hidropik dejenerasyonlar ve mononükleer hücre infiltrasyonlarını CH'in azalttığı belirlendi. Sonuç olarak PbA kaynaklı karaciğer hasarlarını azaltmada CH etkili olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Antioksidanlar, Chrysin, Kurşun Asetat, Karaciğer, Serbest Radikal Hasar

Investigation of Chrysin Effects on Lead Asetat-Induced Liver Damage in Rats

Abstract

This study was conducted to investigate the effects of chrysin (CH) on lead acetate (PbA) inducing liver injury. In this study, 35 male Sprague Dawley rats were divided into 5 groups as 7 rats in each group. Group 1 (Control): Saline was given orally. Group 2 (CH group): CH (50 mg kg⁻¹ weight day⁻¹) were orally given rats for 7 days. Group 3 (PbA group): PbA (30 mg kg⁻¹) was orally given to rats at 30 mg kg⁻¹ PbA for 7 days. Group 4 (PbA +CH 25 group): 25 mg/kg CH was orally given to rats for 7 days. In addition, 30 mg kg⁻¹ PbA was given orally to rats for 7 days after 30 minutes of the application of the CH. Group 5 (PbA+CH 50 group): 50 mg kg⁻¹ CH was orally given to rats for 7 days. Furthermore, 30 mg kg⁻¹ PbA was given orally to rats for 7 days after 30 minutes of the application of the CH. The rats were euthanized under mild sevoflurane anesthesia and tissue and blood samples were taken 24 hours after the last application (8th day). AST, ALT and ALP in serum, MDA, GSH and NO levels and SOD, CAT, GPx and arginase enzyme activities in liver tissue were measured. Serum ALT, AST and ALP levels increased in

the PbA group when compared with the control, and this increase was partially corrected with CH. Liver MDA and NO levels increased in the PbA administered groups while antioxidant enzyme activities and GSH levels decreased. Although, CH administration decreased the increased MDA and NO levels, it increased the decreased antioxidant enzyme activities and GSH levels. Histologically, it was determined that CH decreased the necrosis, hydropic degenerations and mononuclear cell infiltrations seen in the livers of rats treated with PbA. As a result, CH is effective in the reducing PbA damages in the liver.

Key Words: Antioxidants, Chrysin, Lead Acetate, Liver, Free Radical Damage

Giriş

İnsanların çevre yoluyla ağır metallere maruz kalmaları fizyolojik, biyokimyasal ve histolojik bozukluklara neden olabilir. Bu metaller kirli hava, su, toprak ve gıda da dahil olmak üzere çok farklı şekillerde bulunabilir. Özellikle geçiş metal iyonları canlıdaki serbest radikallerin neden olduğu hasarı hızlandırır. Bu metallerin yüksek dozlarına maruz kalmak nadiren meydana gelse de, kronik olarak düşük dozda maruz kalma önemli bir sağlık sorunu ve küresel bir sorun olarak görülebilir (Wang ve Fowler, 2008). Kurşun (Pb) doğada bol miktarda bulunması ve işlenmesi kolay olması nedeniyle çok uzun zamandır sanayide yaygın bir şekilde kullanılan, endüstrinin ilerlemesiyle kullanımı daha da artarak insan sağlığı üzerine tehdit oluşturan en önemli ağır metallere dendir (Karrari ve ark., 2012). Toksikitesi tamamiyle hücre ve moleküler düzeyde oluşur. Pb'un proteinlerin sülfidril (SH) grubuna bağlanarak veya diğer metal iyonlarıyla yer değiştirerek bazı enzimlerin aktivitelerini azalttığı bildirilmiştir (WHO, 1995; Macsi ve ark., 1998).

Karaciğer birçok fizyolojik süreç için kritik bir merkezdir. Bu fizyolojik süreçlere makro besin metabolizması, kan hacminin düzenlenmesi, bağışıklık sistemi desteği, büyüme sinyal yollarının endokrin kontrolü, lipid ve kolesterol homeostazı ve mevcut birçok ilaç dahil olmak üzere ksenobiyotik bileşiklerin parçalanması dahildir (Trefts ve ark., 2017). Kurşun asetatın (PbA) neden olduğu toksik etkiler, oksidatif stres ve serbest radikal üretimi ile meydana gelmektedir. Endüstriyel kullanımdaki yaygınlığı ile çevresel ögelerdeki yaygınlığı, PbA'ı, çevresel ve mesleki yönden önemli bir maruz kalma etkeni haline getirmektedir (Escuredo ve ark., 2012; Pionelli, 2002).

Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulundurmaları nedeniyle kararsız yapıda bulunan ve kararlı hale geçebilmek için elektronunu başka bir elektron ile eşleştirme ihtiyacı duyan moleküllerdir (Phaniendra ve ark., 2015). Antioksidanlar,

serbest radikalleri temizleyerek ve engelleyerek hayati bir rol oynar, böylece hem hayvanları hem de insanları enfeksiyonlara ve dejeneratif hastalıklara karşı korur (Tan ve ark., 2018; Yeung ve ark., 2019). Bitkilerden elde edilen doğal antioksidanlar, içerdikleri flavonoid ve fenolik bileşikler sayesinde yan etkileri olmaksızın güvenli bir şekilde birçok çalışmada tedavi amaçlı kullanılmıştır (Kucukler ve ark., 2021). Antioksidan uygulamasının, dokularda Pb birikimi ile ratların kanında, böbreklerinde ve karaciğerinde Pb'un yol açtığı biyokimyasal bozulmaları azalttığı bildirilmiştir (Albasher ve ark., 2020; Khalil ve ark., 2018a, 2018b).

Doğal bir flavonoid olan Chrysin (5,7-dihidroksi flavon, CH), çeşitli çiçeklerin bitki özütlerinde, balda, propoliste ve uçucu yağlarda bol miktarda bulunur (Escuredo ve ark., 2012). Antioksidan, anti-enflamatuar, anti-apoptotik ve anti-kanserojenik özellikleri nedeniyle, CH son zamanlarda sıkça kullanılmaktadır (Temel ve ark., 2020). Antioksidan savunma sistemini güçlendirdiği saptanan CH'in karaciğer hasarına karşı özellikle etkili olduğu ve oksidatif stres azalttığı bildirilmiştir (Pushpavalli ve ark., 2010).

Bu çalışma ratlarda PbA kaynaklı karaciğer hasarına karşı oral yoldan verilen CH'in etkileri araştırmak amacıyla yapıldı.

Materyal ve Metot

Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan PbA ve CH Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO) şirketinden temin edildi. CH ve Pb analitik saflikta kullanıldı ve doz ayarlamaları sırasıyla Eldutar ve ark., 2017; Ozkaya ve ark., 2018 çalışmalarına göre yapıldı.

Deney Hayvanları ve deneysel uygulama

Çalışmada Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde (ATADEM) yetiştirilen 250-270 g ağırlığındaki 35 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Deneysel süreçte ratlara standart rat yemi ve su *ad libitum* olarak verildi

Çalışma, Atatürk Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurul Başkanlığının tarihli (09.11.2017) ve karar No: 13/155 izni ile belgelendirildi.

Çalışmada 35 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat, her grupta 7 rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. 1. Grup (Kontrol): Oral yolla serum fizyolojik verildi. 2. Grup (CH grubu): CH (50 mg kg⁻¹ ağırlık-gün) 7 gün boyunca oral olarak ratlara verildi. 3. Grup (PbA grubu): PbA (30 mg kg⁻¹) 7 gün boyunca 30 mg/kg PbA oral yolla ratlara verildi. 4. Grup (PbA+CH 25 grubu): 7 gün boyunca 25 mg/kg CH uygulamasından 30 dakika sonra 30 mg/kg PbA ratlara oral yoldan verildi. 5. Grup (PbA+CH 50 grubu): 7 gün süreyle 50 mg/kg CH uygulamasından 30 dakika sonra 30 mg/kg PbA ratlara oral yoldan verildi.

Biyokimyasal Analizler

Deneyisel uygulamalardan 24 saat sonra ratlar hafif sevofloran anestezisi altında ötenazileri yapılarak, doku ve kan örnekleri alındı. Serum aktiviteleri, AST, ALP ve ALT ticari kitler ile ölçüldü.

TissueLyser II kullanılarak toz haline getirilmiş olan karaciğer dokuları MDA, GSH, GPx ve protein analizleri için %1.15'lik KCl ile sulandırılarak homojenize edildi. Elde edilen homojenatlar MDA ve protein için 3500 rpm'de 15 dakika GSH ve GPx için 11000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım analizlerde kullanıldı. SOD aktivite tayini için karaciğer ve böbrek dokuları için Tris-HCl Tamponu (pH 7.4) ile sulandırılarak homojenize edilmiş ve 7000 rpm'de 60 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım analizde kullanıldı. KAT aktivite tayininde ise dokular Triton-x-100 ile sulandırılarak homojenize edildi ve 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım analiz için hazır hale getirildi.

Hazırlanan karaciğer dokusu homojenatındaki MDA seviyeleri Placer ve ark. yöntemine, KAT aktivitesi Aebi yöntemine, GPx aktivitesi Lawrence ve Burk yöntemine, SOD aktivitesi Sun ve ark. yöntemine, GSH seviyesi Sedlak ve Lindsay yöntemine, protein konsantrasyonu ise Lowry ve ark. yöntemine göre ölçüldü. Arginaz aktivitesi; Tiyosemikarbazid-Diasetil Monoksim Üre (TDMU) yöntemi (Geyer ve Dabich, 1971), NO düzeyleri ise ticari kit (Enzo Life Sciences, (ELS) AG, Industriestrasse 17 CH-4415 Lausen-İsviçre) kullanılarak ölçüldü.

Histopatolojik Analizler

Histopatolojik değerlendirme amacıyla alınan doku örnekleri %10'luk formalin solüsyonunda 48 saat tespit edildi. Rutin doku takip işlemleri sonucu parafin bloklara gömüldü. Her bloktan 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar hematoksilin-eozin (HE) ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi (Leica DM 1000, Germany). Kesitler immun pozitifliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel farklılıklar ve anlamlılık düzeyleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile belirlenirken, gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için Tukey testi kullanıldı. Tüm değerler ortalama ± standart hata (±SEM) olarak verilirken, p < 0.05'deki sonuçlar anlamlı kabul edildi. Histopatolojik incelemede semikantitatif olarak elde edilen verilerin gruplar arasındaki farklılıkların analizi için nonparametrik testlerden Kruskal-Wallis testi, ikili grupların mukayesesi için Mann Whitney U testi kullanıldı (p<0.05). Bu istatistik analizleri için SPSS 13.0 paket programı kullanıldı.

Bulgular ve Tartışma

Doğal olarak meydana gelen antioksidan maddelerin ağır metal toksisitesine karşı koruyucu etkileri birçok araştırmacıya çalışma konusu olmuş ve araştırmacılar bu çalışmalara ışık tutabilecek sonuçlar elde etmişlerdir (Khalil ve ark., 2018; Moustafa ve ark., 2012; Abdel-Moneim ve ark., 2015). Bu çalışma oral yoldan PbA 'ye maruz bırakılan ratların karaciğer hasarına karşı CH' nin koruyucu etkilerini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

Pb esas olarak karaciğerde metabolize edilir, burada konjuge olur ve daha sonra böbreğe geçer (Casas ve Sordo 2011). Pb' a maruz kalan insanlar üzerinde yapılan otopsi çalışmaları, karaciğer dokusunun en büyük Pb rezervuarı (% 33) olduğunu göstermektedir (Mudipalli, 2007). Pb' a maruz kalma, oksidatif stresi tetikleyerek reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artırır (Lopes ve ark., 2016; Aladaileh ve ark., 2020). Vücutta biriken Pb sadece ROS üretimini artırmakla kalmaz, aynı zamanda antioksidan savunma sistemini de engeller (Adikwu ve ark., 2013; Ahamed ve Siddiqui, 2007). Pb antioksidan enzimlerden

SOD, GPx, KAT ve G6PD'a bağlanma yeteneğine sahiptir (Patra ve ark., 2011).

Karaciğerdeki Pb' un neden olduğu oksidatif stresin en önemli sonucu, membran bütünlüğünün ve yağ asidi bileşiminin değişmesine neden olan MDA seviyesindeki artıştır (Omobowale ve ark., 2014; Valverde ve ark, 2001). Hepatosit hücre zarlarının Pb'a belirgin hassasiyeti, Pb'un araşidonik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri üzerindeki etkisiyle açıklanabilir (Lawton ve Donaldson, 1991). Ratlarda 9 hafta boyunca içme suyuna 2000 ppm Pb katılarak yapılan bir çalışmada, eritrosit, lenfosit ve kan KAT aktivitelerinin belirgin derecede arttığı gözlenmiştir. Bu subkronik maruz kalma aynı zamanda kan MDA seviyesini artırırken, GSH seviyesinde ise azalmaya sebep olmuştur (Tandon ve ark., 2002). Emiliminden sonra kana geçen Pb, eritrositlerde birikir (Matović ve ark., 2015). Pb' un kandaki antioksidan SOD ve KAT

enzimlerinin düzeylerini bu toksik metale maruz kalma süre ve seviyesine bağlı olarak artırdığı ya da azalttığı gösterilmiştir. Yüksek seviyede Pb'a maruz kalma, artan ROS üretiminin bir sonucu olarak bu enzimlerin aktivitesinde artışlara neden olabilirken, bu enzim aktivitelerinin baskılanması ise Pb'un, bu enzimlerin önemli kofaktörleri olarak görev yapan biyolojik elementler ile yer değiştirme kabiliyetleriyle açıklanmaktadır (Flora ve ark., 2012). Bununla birlikte, ratların daha düşük seviyelerde (içme suyunda % 0.1 Pb) daha uzun süreyle (3 ay) Pb'a maruz kalmaları, karaciğer GSH seviyesi ile KAT aktivitesinde belirgin bir şekilde azalış, GPx aktivitesinde ise artışa neden olmuştur. GPx aktivitesindeki bu artışın GPx reaksiyonu yoluyla lipid peroksidlerin uzaklaştırılmasıyla ilgili olabileceği düşünülmüştür (Flora ve ark, 2003).

Çizelge 1. Ratlarda PbA Kaynaklı Karaciğer Hasarında Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve MDA Seviyesi Üzerine Chrysin'in Etkisi

Parametreler	Kontrol	Chrysin	PbA	Chrysin-25	Chrysin-50
MDA (nmol g ⁻¹ doku)	43,04±0,72 ^a	42,92±0,86 ^a	73,80±0,75 ^d	65,81±0,63 ^c	56,57±1,32 ^b
GSH (nmol g ⁻¹ doku)	6,75±0,14 ^d	6,86±0,08 ^d	4,15±0,08 ^a	4,85±0,10 ^b	5,37±0,17 ^c
SOD (U g ⁻¹ protein)	43,52±0,70 ^d	43,06±0,65 ^d	29,91±0,60 ^a	32,89±0,51 ^b	36,60±0,48 ^c
KAT (k g ⁻¹ protein)	66,14±1,06 ^d	64,45±0,94 ^d	45,15±0,79 ^a	51,54±0,75 ^b	54,39±0,68 ^c
GPx (U g ⁻¹ protein)	35,92±0,66 ^d	36,36±0,70 ^d	24,61±0,56 ^a	27,94±0,47 ^b	30,94±0,93 ^c

Enzimatik (SOD, KAT ve GPx) ve enzimatik olmayan (GSH) antioksidanlar, oksidatif hasara maruz kalan hücrelerin korunmasında hayati bir role sahiptir (Anitha ve Rajadurai, 2014).

Reaktif oksijen türlerinin üretimi ile antioksidan sistem arasındaki dengenin bozulması vücutta oksidatif stres oluşmasına yol açar (Köksal ve ark., 2017; Taslimi ve ark., 2019). Pb toksisitesinin olası mekanizmasının

oksidatif stres olduğu düşünülmektedir (Alcaraz-Contreras ve ark., 2016). Lipid peroksidasyonu, renal hücre hasarının belirlenmesinde önemli katkılar sağlar. MDA, lipid peroksidasyonunun bozunma ürünüdür. Öte yandan, SOD, KAT ve GPx vücutta antioksidan savunmayı sağlayan önemli enzimlerdir (Zheng ve ark., 2020).

Çizelge 1' de görüldüğü üzere, karaciğer MDA düzeyleri PbA verilen gruplarda artarken, antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, KAT, GPx) ile GSH düzeyi azalmıştır. Chrysin-25 ve Chrysin-50 uygulanması; artan MDA düzeylerini azaltırken, azalan antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, KAT, GPx) ile GSH düzeylerini ise arttırarak bu artış üzerine anlamlı bir şekilde etkili olmuştur. GPx, SOD ve KAT gibi enzimler çinko, bakır ve selenyum gibi eser metallerin toksik etkilerine karşı oldukça hassastır.

Pb uygulanan ratlarda her üç parametrede de kontrole ve CH grubuna kıyasla bir artış meydana geldiği gözlenmiştir. Karaciğer doku hasarına bağlı olarak meydana gelen bu serum enzim aktivitelerindeki artışlar üzerine CH'in önleyici etkisi olduğu görülmüştür. Serum AST, ALT ve ALP değerleri üzerine üç grupta da CH 50 daha etkili olmuştur. Ancak her üç şekilde de CH uygulanmasının PbA hasarına bağlı olarak meydana gelen enzim aktivitelerini kontrol düzeyine getirmede yeterli olmadığı görülmüştür. Arginaz enzimi L-arginini üre ve L-ornitin çevirir. Arginaz enzimi hepatoselüler hasarın mükemmel bir göstergesidir ve aynı zamanda, karaciğer fonksiyon testlerinden daha iyi bir şekilde prognostik tanı göstergesidir (Ikemoto ve ark., 1989). Birçok önemli biyokimyasal yola dahil olduğundan, arginaz çeşitli patolojik süreçlerin gelişiminde anahtar rol oynayabilir (Chrzanowska ve ark., 2008). Arginaz enziminin kinetik özellikleri üzerine yapılan araştırmalarda Pb'un enzim aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Demir ve ark., 2015; Kandemir ve Ozdemir, 2008). Mevcut çalışmada arginaz enzim aktivitesinin düşmesi kinetik çalışmalar ile açıklanabilir. PbA ile birlikte uygulanan CH'in her iki dozunun da arginaz aktivitesini artırdığı görülmüştür. Ancak bu artış kontrol seviyesine getirmeye yeterli olamamıştır. Nitrik oksit sentaz (NOS) ise, L-arginini L-sitrülin ve NO'e dönüştürür. Renksiz ve son derece zehirli bir gaz olan NO serbest radikal olmasından dolayı yarı ömrü çok kısa olup lipofilik özellik göstermektedir. Oksijensiz

ortamda oldukça stabildir ve suda erir (Palmer ve Moncada, 1989). Düşük konsantrasyonlarda bile, ortamda oksijen varlığında stabilitesini koruyabilen NO bilinen en düşük molekül ağırlıklı, reaktif (biyoaktif) memeli hücresi sekresyon ürünüdür (Grisham, 1997). Düşük konsantrasyonlarda iken NO toksik değildir ve çok önemli fizyolojik işlevlerin gerçekleşmesinde rol oynar. Endotel gevşetici faktör olarak da bilinen NO, ROS tarafından etkili bir şekilde inaktive edilir (Vaziri ve ark., 1998). ROS'un, vasküler endotel hücrelerinde nitrik oksidi oksitlediği, bir nitrik oksit eksikliği yarattığı, lipitlere ve DNA'ya zarar verebilecek oldukça aktif bir ROS olan peroksinitriti ürettiği gösterilmiştir (Halliwell, 1997). Glutasyon tükenmesi ve Pb maruziyetinin bağımsız olarak nitrik oksidi baskıladığı ve hayvan modellerinde hipertansiyona neden olduğu gösterilmiştir (Vaziri ve ark., 2000; Vaziri ve ark., 1997). Hsu ve Guo (2002) tarafından, Pb'un bu enzimlerin sülfhidril grubuna geri dönüşümsüz olarak bağlanabildiği ve bu durumun enzim fonksiyonlarında aktivite kaybına sebep olduğu bildirilmiştir. KAT hem grubu içeren tetramerik yapıya sahip bir enzim olup, Pb'dan olumsuz etkilenmektedir. Pb hem sentezinin bir inhibitörü olduğu için KAT aktivitesini ve üretimini düşürmektedir (Patil ve ark., 2006). Pb'un kronik olarak alınması, karaciğer GSH seviyelerinde önemli bir azalmaya neden olur (Wang ve Fowler., 2008). Ratların Pb'a maruz kalması karaciğer ve eritrosit GPx, GST, KAT, SOD ve GSH içeriğinde belirgin bir şekilde düşüşe yol açarken, MDA ve H₂O₂ konsantrasyonlarında ise belirgin bir şekilde artışa sebep olmuştur. Ayrıca, daha önce yapılan diğer bir çalışmada KAT ve SOD aktivitelerinin Pb verilen ratlarda belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2010). Zn ve Pb üretim tesislerinde Pb'a maruz kalan popülasyonlar üzerine yapılan bir çalışmada, Pb seviyesi ile eritrosit ve lökosit MDA düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu görülmüştür (Kasperczyk ve ark., 2014). Yapmış olduğumuz çalışmada, antioksidan savunma sistemlerinden GSH düzeyleri ile SOD, KAT, GPx aktivitelerinde PbA uygulaması sonucu meydana gelen düşüşler ile MDA düzeyindeki artışlar mevcut çalışmalar (Patil ve ark., 2006; Liu ve ark., 2010; Wang ve Fowler., 2008) ile uyumlu olup, PbA'nın antioksidan sistemi zayıflattığı şeklinde yorumlanabilir.

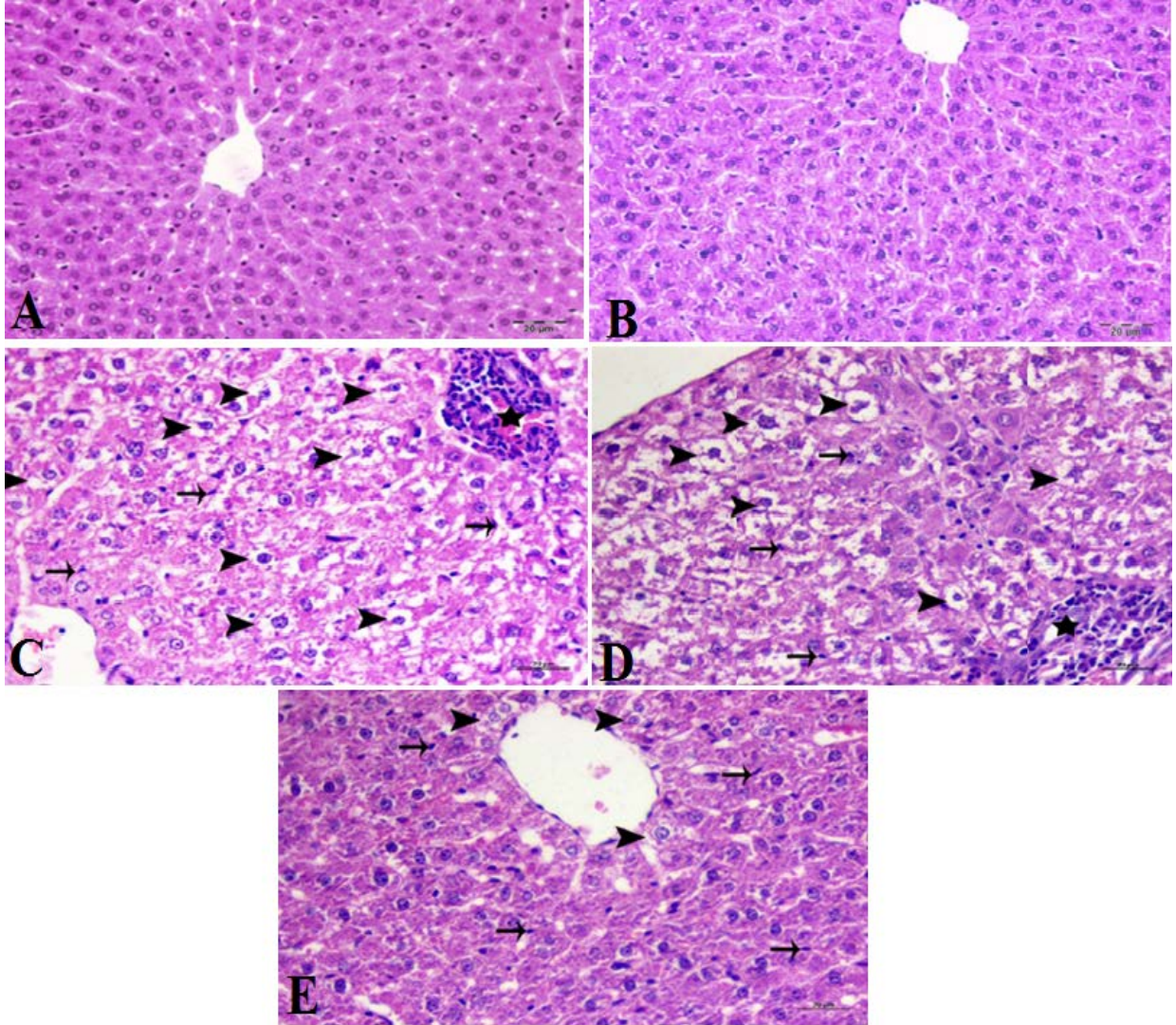
Çizelge 2. Ratlarda PbA Kaynaklı Karaciğer Hasarında Serum Karaciğer Fonksiyon Enzim Aktiviteleri ile Arginaz ve NO Aktiveleri Üzerine Chrysin'in Etkileri

Parametreler	Kontrol	Chrysin	PbA	Chrysin-25	Chrysin-50
ALT (U L ⁻¹)	43,34±0,75 ^a	44,81±0,80 ^a	86,68±1,86 ^d	73,82±2,28 ^c	63,03±2,08 ^b
AST (U L ⁻¹)	52,96±1,07 ^a	55,08±0,89 ^a	103,25±2,56 ^d	81,51±1,98 ^c	68,15±1,45 ^b
ALP (U L ⁻¹)	64,67±0,93 ^a	63,73±1,21 ^a	106,31±3,29 ^d	90,06±1,18 ^c	8,51±1,66 ^b
Arginaz (U g ⁻¹ protein)	17,11±0,47 ^c	17,22±0,39 ^c	10,11±0,89 ^a	12,50±0,27 ^b	13,94±0,41 ^b
NO (nmol g ⁻¹ doku)	7,86±0,28 ^a	7,64±0,21 ^a	14,60±0,53 ^d	11,69±0,38 ^c	10,49±0,27 ^b

PbA'ya bağlı olarak meydana gelen bu düşüşler ile MDA düzeyindeki artışlar üzerine CH 50'nin daha etkili olduğu görülmüştür. Hücresel hasar, enzim kaçağı ile ilişkilendirilmektedir (Sehrawat ve Sultana, 2006). Serum AST, ALT, LDH (laktat Dehidrogenaz), BUN (Blood Urea Nitrogen) ve kreatinin karaciğer ve böbrek hasarının tanısında kullanılan en hassas belirteçlerdendir (Sallie ve ark. 1991). Karaciğer, Pb toksisitesi için ana hedef organ olarak kabul edilir. ALT ve AST aktivitesi, akut hepatik nekrozun hassas göstergeleridir (Modesto ve ark., 2013). Lombardi ve ark. (2008), plazmadaki AST ve ALT aktivitelerinin, hücre sızıntısının ve karaciğerdeki hücre zararının işlevsel

bütünlüğünün kaybına işaret ettiğini bildirmiştir. Sunulan çalışmada serum AST, ALT ve ALP aktiviteleri incelendiğinde her üç grupta da kontrol ve CH gruplarının en düşük düzeylerde olduğu ve bu iki grup arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür.

Çizelge 2' de görüldüğü üzere, serum ALT, AST, ALP ve karaciğer NO düzeyleri PbA uygulanan gruplarda artarken arginaz seviyesinde azalma olmuştur. Chrysin-25 ve Chrysin-50 uygulaması; artan serum ALT, AST, ALP ve karaciğer NO düzeylerini azaltırken, azalan arginaz düzeyini önemli ölçüde arttırmıştır.



Şekil 1.A; Kontrol Grup, Karaciğer dokusu, normal histolojik görünümü, **1.B; CH 50 Grup**, Karaciğer dokusu, normal histolojik görünümü, **1.C; PbA Grup**, Karaciğer dokusu, hepatositlerde şiddetli hidropik dejenerasyon (okbaşları), kupfer hücrelerinde proliferasyon (oklar), şiddetli düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldız), damarlarda hiperemi, **1.D; PbA+CH 25 Grup**, Karaciğer dokusu, hepatositlerde hidropik dejenerasyon (okbaşları), kupfer hücrelerinde proliferasyon (oklar), orta düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu (yıldız), **1.E; PbA+CH 50 Grup**, Karaciğer dokusu, hepatositlerde hafif düzeyde hidropik dejenerasyon (okbaşları), kupfer hücrelerinde proliferasyon (oklar), H&E, Bar:20μm.

Çizelge 3. Histopatolojik Bulgular

	Kontrol	CH 50	PbA	PbA+CH 25	PbA+CH 50
Hepatositlerde hidropik dejenerasyon	-	-	+++	++	+
Mononükleer hücre infiltrasyonu	-	-	+++	++	+
Damarlarda hiperemi	-	-	+++	+++	++
Kupfer hücrelerinde proliferasyon	-	-	+++	++	+

Hermenean ve ark., (2017) tarafından karbon tetraklorür (CCl₄) ile indüklenen akut karaciğer hasarındaki CH'nin koruyucu etkilerini araştırmak amacıyla yapılan çalışmada intraperitoneal CCl₄ (1 ml/kg) enjeksiyonundan önce chrysin (50 mg / kg / 7 gün) farelere oral yoldan uygulanmıştır. CCl₄ maruziyetinden önce CH ile tedavi edilmeyen gruba kıyasla CCl₄ maruziyetinden önce CH ile tedavi edilen grupta karaciğer enzimlerin aktivitesinin önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir. Ayrıca CH uygulamasının histopatolojik olarak CCl₄'ün etkilerini azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışma sonucunda, CCl₄'ün neden olduğu akut hepatik hasarın patogenezinde enflamasyon sinyal yollarının aktive edildiğini ve bunun yedi günlük CH ön tedavisi ile dengelenebileceği düşünülmüştür. Ayrıca, CH'nin güçlü bir hepatoprotektif ajan olduğu, sağlıklı karaciğeri korumak ve karaciğer hasarını önlemek için hedeflenen bir ilaç olarak araştırılması gerektiği, ayrıca geleneksel hepatoprotektif tedavilere uygun bir alternatif olma potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir. Khezri ve ark. (2020)'nin alüminyum fosfit (AIP) kaynaklı sitotoksosite ve mitokondriyal toksisitelere karşı CH'nin koruyucu etkilerini araştırdıkları çalışmalarında CH' nin antioksidan özellikleri sayesinde geniş koruyucu özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir. AIP' nin neden olduğu ROS oluşumu, lizozomal hasar, mitokondriyal hasar ve lipid peroksidasyonunun CH tarafından azaltıldığı, CH' nin kardiyomiyositler ve mitokondriyal AIP tarafından oluşturulan hasarı önlemede etkili olduğu bildirilmiştir. Kucukler ve ark. (2021) çalışmalarında PbA' nin oksidatif stres ile ilişkili inflamasyon ve apoptoz nedeniyle böbreklerde toksisiteye yol açtığını, CH' nin antioksidan, anti-enflamatuvar ve antiapoptotik özelliklerinin PbA ile indüklenen nefrotoksosite için de geçerli olduğunu ve CH' nin renal toksisitenin tedavisinde umut verici bir bileşik olduğunu bildirmişlerdir. Kandemir ve ark. (2017) tarafından akut parasetamol kaynaklı hepatotoksitedeki Chrysin ön tedavisinin oksidan antioksidan durum, inflamatuvar sitokin üretimi ve apoptotik ve otofajik belirteçler üzerine restoratif etkilerinin araştırıldığı bir çalışmanın sonucunda PC'ye bağlı karaciğer hasarının CH' nin antioksidan, anti-inflamatuvar, anti-apoptotik ve antiototik etkileri ile azaltıldığı bildirilmiştir.

Sonuç ve Öneriler

Bulgularımız, daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olup PbA' nin oksidatif stres ile ilişkili olarak karaciğerde toksisiteye yol açtığını doğrulamıştır. Sonuç olarak, bu çalışma bulguları dahilinde, PbA kaynaklı karaciğer hasarları üzerine CH' nin antioksidan etki gösterdiği ve bu çalışmanın CH kullanımı ile ilgili gelecek çalışmalar açısından faydalı olabileceği düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması Beyanı: Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Teşekkür: Bu çalışma, Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından YLMUB017-24 nolu proje ile desteklenmiştir.

&: Bu çalışma Pınar COŞKUN'un yüksek lisans tezinden türetilmiştir.

Kaynaklar

- Abdel-Moneim A.M., El-Toweissy M.Y., Ali A.M., Allah A.A.M.A., Darwish H.S., Sadek, I.A. 2015. Curcumin ameliorates lead (Pb²⁺)- induced hemato-biochemical alterations and renal oxidative damage in a rat model. *Biol Trace Elem Res* 168 (1): 206–220.
- Adikwu, E., Deo, O., Geoffrey, O-B.P., Enimeya, D.A., 2013. Lead organ and tissue toxicity: roles of mitigating agents (part 1). *Br J Pharmacol Toxicol* 4 (6): 232–240.
- Aebi. H. 1983. Catalase. In: H.U. Bergmeyer, editor. *Methods in enzymatic analysis*. New York: Academic Press, , pp 276–286.
- Ahamed, M. ve Siddiqui, M.K.J. 2007. Environmental Lead toxicity and nutritional factors. *Clin Nutr* 26 (4): 400–408.
- Albasher, G., Al Kahtani, S., Alwahibi, M.S., Almeer, R. 2020. Effect of Moringa oleifera Lam. methanolic extract on lead-induced oxidative stress-mediated hepatic damage and inflammation in rats. *Environ Sci Pollut Res*:1–11.
- Alcaraz-Contreras, Y., Mendoza-Lozano, R.P., Martinez-Alcaraz, E.R., Martinez-Alfaro, M., Gallegos-Corona, M.A., Ramirez-Morales, M.A., Vazquez-Guevara, M.A. 2016. Silymarin and

- dimercaptosuccinic acid ameliorate lead-induced nephrotoxicity and genotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 35(4):398–403.
- Anitha, T.A., Rajadurai, M. 2014. *Biomed. Prev. Nutr.* (4)4, 511–517.
- Casas, J.S. ve Sordo, J. 2011. Lead: chemistry, analytical aspects, environmental impact and health effects. Elsevier, p 366.
- Chrzanowska, A. Krawczyk, M., Barańczyk-Kuźma, A. 2008. Changes in arginase isoenzymes pattern in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*; 377: 337-40.
- Demir, F., Ozan, G., Temizer Ozan, P. S. 2015. Ratlara Uygulanan Kurşun Asetatin Karaciğer Arginazına Etkisi ve Enzimin Bazı Kinetik Özellikleri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 29, (1): 37-43.
- Eldutar, E., Kandemir, F.M., Kucukler, S., Caglayan, C. 2017. Restorative effects of Chrysin pretreatment on oxidant–antioxidant status, inflammatory cytokine production, and apoptotic and autophagic markers in acute paracetamol-induced hepatotoxicity in rats: An experimental and biochemical study. *J Biochem Mol Toxicol*, e21960.
- Escuredo, O., Silva, L.R., Valentão, P., Seijo, M.C., Andrade, P.B. 2012. Assessing *Rubus* honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. *Food Chem.* 130, 671–678.
- Flora, G., Gupta, D., Tiwar, A. 2012. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdiscip Toxicol.* Vol. 5(2): 47–58.
- Flora, S.J., Pande, M., Mehta, A. 2003. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. *Chem Biol Interact.* 145: 267–280.
- Geyer, J.W., Dabich, D. 1971. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem.* 39:412-7.
- Grisham, M.B. 1997. Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 169: 70-75.
- Halliwell, B. 1997. What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrate formation *in vivo*. *FEBS U'tt*, 411:157-160.
- Hermenean, A.T., Mariasiu, I., Navarro-Gonzalez, J., Vegara-Meseguer, E., Miutescu, S., Pérez-Sánchez, H. 2017. Hepatoprotective activity of chrysin is mediated through TNF- α in chemically-induced acute liver damage: an *in vivo* study and molecular modeling. *Exp. Therap. Med.* 13:1671–1680.
- Hsu, P.C. ve Guo, Y.L. 2002. Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*, 180: 33–44.
- Ikemoto, M., Tabata, M., Murachi, T., Totani, M., 1989. Purification and properties of human erythrocyte arginase. *Ann Clin Biochem.*, 26 (6): 547-553.
- Kandemir, F.M., Kucukler, S., Caglayan, C., Gur, C., Batil, A.A., Gülçin, İ. 2017. Therapeutic effects of silymarin and naringin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: biochemical evaluation of anti-inflammatory, antiapoptotic, and antiautophagic properties. *J Food Biochem* 41(5):e12398.
- Kandemir, F.M., Özdemir, N. 2008. Sığır Dalak Doku Arginazının Bazı Kinetik Özellikleri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 22 (3):153-158.
- Karrari, P., Mehrpour, O., Abdollahi, M. 2012. A systematic review on status of lead pollution and toxicity in Iran; guidance for preventive measures. *DARU J Pharm Sci* 20(1):2.
- Kasperczyk, S., Dobrakowski, M., Kasperczyk, A., Machnik, G., Birkner, E. 2014. Effect of N-acetylcysteine administration on the expression and activities of antioxidant enzymes and the malondialdehyde level in the blood of lead-exposed workers. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 37:638-647.
- Khalil, S.R., Elhady, W.M., Elewa, Y.H.A., Abd El-Hameed, N.E., Ali, S.A. 2018a. Possible role of *Arthrospira platensis* in reversing oxidative stress-mediated liver damage in rats exposed to lead. *Biomed Pharmacother = Biomed Pharmacother* 97:1259–1268.

- Khalil, S.R., Elhady, W.M., Elewa, Y.H.A., Abd El-Hameed, N.E., Ali, S.A. 2018. Possible role of *Arthrospira platensis* in reversing oxidative stress-mediated liver damage in rats exposed to lead. *Biomed Pharmacother* 97:1259–1268.
- Khalil, S.R., Khalifa, H.A., Abdel-Motal, S.M., Mohammed, H.H., Elewa, Y.H.A., Mahmoud, H.A. 2018b. *Spirulina platensis* attenuates the associated neurobehavioral and inflammatory response impairments in rats exposed to lead acetate. *Ecotoxicol Environ Saf* 157:255–265.
- Khezri, S., Sabzalipour, T., Jahedsani, A., Azizian, S., Atashbar, S., Salimi, A. 2020. Chrysin ameliorates aluminum phosphide-induced oxidative stress and mitochondrial damages in rat cardiomyocytes and isolated mitochondria. *Environ. Toxicol.*
- Köksal, E., Bursal, E., Gülçin, İ., Korkmaz, M., Çağlayan, C., Gören, A.C., Alwasel, S.H. 2017. Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Int J Food Prop* 20(3):514–525.
- Kucukler, S., Benzer, F., Yildirim, S., Gur, C., Kandemir, F.M., Bengu, A.S., Ayna, A., Çağlayan, C., Dortbudak M.B. 2021. Protective Effects of Chrysin Against Oxidative Stress and Inflammation Induced by Lead Acetate in Rat Kidneys: a Biochemical and Histopathological Approach. *Biological Trace Element Research* (2021) 199:1501–1514.
- Lawrence, R. A., Burk, R. F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 71:4, 952–958.
- Lawton, L.J., Donaldson, W.E. 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol. Trace Elem. Res.*, 28:83-97.
- Liu, Z., Chen, Y., Wang, D., Wang, S., Zhang, Y.Q. 2010. Distinct Presynaptic and Postsynaptic Dismantling Processes of *Drosophila* Neuromuscular Junctions during Metamorphosis. *J. Neurosci.* 30(35): 11624–11634.
- Lombardi, M.E., Ladman, B.S., Alphin, R.L., Benson, E.R. 2008. Inactivation of avian influenza virus using common detergents and chemicals. *Avian Dis.*, 52:118–123.
- Lopes, A.C., Peixe, T.S., Mesas, A.E., Paoliello, M.M. 2016. Lead exposure and oxidative stress: a systematic review. *Rev Environ Contam Toxicol* 236:193–238.
- Macsi, O., Carelli, G., Vinci, F., Castellino, N. 1998. “Blood lead concentration on biological effects in workers exposed to very low lead levels”, *J. Occup. Environ. Med.*, 40: 886-894.
- Matović, V., Buha, A., Đukić-Čosić, D., Bulat, Z. 2015. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys, *Food and Chemical Toxicology*, 78:130-140.
- Modesto Dos Santos, V., Da Costa Arruda Jr., Z., De Farias Polcheira, M., Da Silva De Souza, D.W., Rodrigues Oliveira Santos, A.M., Santos Corrêa Da Costa, M., 2013. Acute hepatitis due to infectious mononucleosis in a 21-year-old-man. *Rev. Méd. Chil.*, 141:917–921.
- Mudipalli, A. 2007. Lead hepatotoxicity and potential health effects. *IJMR* 126(6):518.
- Omobowale, T.O., Oyagbemi, A.A., Akinrinde, A.S., Saba, A.B., Daramola, O.T., Ogunpolu, B.S., Olopade, J.O. 2014. Failure of recovery from lead induced hepatotoxicity and disruption of erythrocyte antioxidant defence system in Wistar rats. *environmental toxicology and pharmacology* 37:1202–1211.
- Ozkaya, A., Şahin, Z., Kuzu, M., Sağlam, Y.S., Ozkaraca, M., Uckun, M., Yologlu, E., Comakli, V., Demirdag, R., Yologlu, S. 2018. Role of geraniol against lead acetate-mediated hepatic damage and their interaction with liver carboxylesterase activity in rats. *Arch Physiol Biochem.*, 124(1):80-87.
- Palmer, R.M.J., Moncada, S. 1989. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 158:348-352.

- Patil, A.J. Bhagwat, V.R., Jyotsna, Dongre, N.N., Ambekar, J.G., Das, K.K. 2006. Biochemical aspects of lead exposure in silver jewelry workers in western Maharashtra (India). *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 17(4):213-29.
- Patra, R.C., Rautray, A.K., Swarup, D. 2011. Oxidative Stress in Lead and Cadmium Toxicity and Its Amelioration. *Vet Med Int*. 457327. doi: 10.4061/2011/457327.
- Phaniendra, A., Jestadi, D.B., Periyasamy, L. 2015. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem*. 30(1):11–26.
- Pionelli, S. 2002. Childhood lead poisoning. *Pediatr Clin North Am*, 49:1285-304.
- Placer, Z. A., Cushman, L. L., Johnson, B. C. 1966. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16(2), 359–364.
- Pushpavalli, G., Kalaiarasi, P., Veeramani, C., Pugalendi, K.V. 2010. *Eur. J. Pharmacol.*, 631:36–41.
- Sallie, R., Tredger, J.M., Willam, R. 1991. Drugs and the liver. *Biopharm Drug Dispos*, 12:251–259.
- Sedlak, J., Lindsay, R. H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25:1, 192–205.
- Sehrawat, A. ve Sultana, S. 2006. Evaluation of possible mechanisms of protective role of *Tamarix gallica* against DEN initiated and 2-AAF promoted hepatocarcinogenesis in male Wistar rats. *Life Sci*, 79:1456–65.
- Sun, Y., Oberley, L. W., Li, Y. 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34:3, 497–500.
- Tan, B.L., Norhaizan, M.E., Liew, W.P.P., Sulaiman Rahman, H. 2018. Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. *Front Pharmacol* 9 :1162.
- Tandon, S.K., Prasad, S., Singh, S., Shukla, M., Chatterjee, M. 2002. Influence of age on lead-induced oxidative stress. *Biol. Trace Element Res.*, 88: 59-68.
- Taslimi, P., Kandemir, F.M., Demir, Y., Ileriturk, M., Temel, Y., Caglayan, C., Gulcin, I. 2019. The antidiabetic and anticholinergic effects of chrysin on cyclophosphamide-induced multiple organ toxicity in rats: pharmacological evaluation of some metabolic enzyme activities. *J Biochem Mol Toxicol*:e22313. doi:<https://doi.org/10.1002/jbt.22313>.
- Temel, Y., Kucukler, S., Yıldırım, S., Caglayan, C., Kandemir, F. M. 2020. Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 393(3), 325-337.
- Trefts, E., Gannon, M., Wasserman D.H. 2017. The liver. *Current Biology*, 27:1141–1155.
- Valverde, M., Trejo, C., Rojas, E. 2001. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis*, 16(3):265-270.
- Vaziri, N.D., Ding, Y., Ni, Z., Gonick, H.C. 1997. Altered nitric oxide metabolism and increased oxygen free radical activity in Lcad-induced hypertension: effect of lazaroid therapy. *Kidney Int.*, 52:1042-1046.
- Vaziri, N.D., Oveisi, F., Ding, Y. 1998. Role of increased oxygen free radical activity in the pathogenesis of uremic hypertension. *Kidney Int.*, 53:1748-1754.
- Vaziri, N.D., Wang, X.Q., Oveisi, F., Rad, B. 2000. Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension*, 36:142-146.
- Wang, G. ve Fowler, B.A. 2008. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 233:92-99.
- World Health Organization 1995. "Inorganic Lead. WHO", *Geneva Environmental Health Criteria* 165.

Yeung, A.W.K., Tzvetkov, N.T., El-Tawil, O.S., Bungău, S.G., Abdel-Daim, M.M., Atanasov, A.G. 2019. Antioxidants: scientific literature landscape analysis. *Oxidative Med Cell Longev* 2019:8278454– 8278411.

Zheng, H.X., Qi, S.S., He, J., Hu, C.Y., Han, H., Jiang, H., Li, X.S. 2020. Cyanidin-3-

glucoside from black rice ameliorates diabetic nephropathy via reducing blood glucose, suppressing oxidative stress and inflammation, and regulating transforming growth factor beta1/ Smad expression. *J Agric Food Chem* 68(15):4399–4410.