

Effects of Chrysin Against Isoniazid-Induced Lung Injury in Rats

Sefa KÜÇÜKLER^{1*}, Selçuk ÖZDEMİR², Selim ÇOMAKLI³, Fatih Mehmet KANDEMİR¹

¹Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Atatürk University, Erzurum, Turkey

²Department of Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Atatürk University, Erzurum, Turkey

³Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Atatürk University, Erzurum, Turkey

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the effects of chrysin (CH), one of the natural flavonoids, against isoniazid lung damage caused by isoniazid (INH), which was widely used in the treatment of tuberculosis. Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: a control group, INH-treated group, CH alone treated group 50 mg / kg, INH + CH 25 mg / kg treated group, and INH+ CH 50 mg / kg treated group. It was determined that INH caused oxidative damage by decreasing antioxidant enzyme activities such as glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) and increasing lipid peroxidation (LPO). In addition, it was found that the administration of CH to INH-treated rats increased GSH level and antioxidant enzyme activities, and decreased lipid peroxidation. It was observed that the nuclear factor erythroid 2 related factor 2 (Nrf-2) and oxygenase-1 (HO-1) expression levels were up-regulated in the INH-treated group, and the expression of NF- κ B increased in the INH-treated group in the immunohistochemical examination, and the CH administration, on the other hand, decreased the levels of these markers. Taken together, these results suggested that CH had beneficial effects in INH-induced lung toxicity by maintaining the oxidant-antioxidant balance and decreasing NF- κ B, Nrf-2, and HO-1 expressions.

Keywords: Chrysin, Isoniazid, Lung, Oxidative Stress.

Ratlarda İsoniazid Kaynaklı Akciğer Hasarına Karşı Krisinin Etkileri

ÖZ

Bu çalışmanın amacı; tüberküloz tedavisinde yaygın olarak kullanılan izoniazid (İZN) kaynaklı akciğer hasarına karşı doğal flavonoidlerden olan krisin (KRS)'in etkilerinin araştırılmasıdır. Çalışmada Spraque Dawley cinsi 35 adet erkek rat rastgele 5 gruba ayrıldı: Kontrol grubu, İZN uygulanan grup, KRS 50 mg/kg uygulanan grup, İZN+ KRS 25 mg/kg uygulanan grup ve İZN+ KRS 50 mg/kg uygulanan grup. İZN'nin glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) gibi antioksidan enzim aktivitelerini ve glutatyon (GSH) düzeylerini azaltıp, lipid peroksidasyonunu (LPO) artırarak oksidatif hasara neden olduğu belirlendi. Ayrıca İZN ile kombine uygulanan KRS uygulamasının GSH seviyesini ve antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı, lipid peroksidasyonunu ise azalttığı ettiği tespit edildi. Çalışmada incelenen nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf-2) ve hem oksijenaz-1 (HO-1) seviyelerinin İZN grubunda gen ekspresyonu düzeyinde, nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ekspresyonunu ise immunhistokimyasal incelemede arttığı tespit edilmiş, buna karşın KRS uygulamasının bu belirteçlerin düzeylerinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar KRS'in oksidan-antioksidan dengesini koruyarak ve NF- κ B, Nrf-2 ve HO-1 ekspresyonlarını azaltarak İZN'nin neden olduğu akciğer toksitesinde faydalı etkilere sahip olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer, İsoniazid, Krisin, Oksidatif Stres.

To cite this article: Küçükler S, Özdemir S, Çomaklı S, Kandemir F.M. Effects of Chrysin Against Isoniazid-Induced Lung Injury in Rats. Kocatepe Vet J. (2020) 13(2):161-171

Submission: 26.03.2020 Accepted: 08.05.2020 Published Online: 14.05.2020

ORCID ID; SK: 0000-0002-8222-5515, SÖ: 0000-0001-7539-0523, SÇ: 0000-0002-8744-7686, FMK: 0000-0002-8490-2479

*Corresponding author e-mail: sefa.kucukler@atauni.edu.tr

GİRİŞ

Mycobacterium tuberculosis'in neden olduğu bir hastalık olan tüberküloz (TB), insanlık tarafından bilinen en eski ve en ölümcül hastalıklardan biridir (Organization 2013). Anti-tüberküloz kemoterapisinin ortaya çıkmasıyla, hastalığın tedavisinde ciddi bir iyileşme olmuştur. Anti-tüberküloz ilaçlar arasında bulunan izoniazid (İZN), aktif tüberkülozun tedavisi ve profilaksisi için kullanılan ilaçtır (Basheer ve ark. 2017, Chowdhury ve ark. 2006, Eftekhari ve ark. 2018). Aktif tüberkülozun tedavisinde yaygın olarak kullanılan İZN'nin, gastrointestinal bozukluk, hepatotoksisite, periferik nörotoksisite, merkezi sinir sisteminde başta olmak üzere çeşitli yan etkileri olduğu için kullanımı sınırlanmaktadır (Ahadpour ve ark. 2016). Yapılan araştırmalar, oksidatif stresin İZN kaynaklı sitotoksiteden sorumlu mekanizmalardan biri olduğunu ileri sürmektedir (Cicek ve ark. 2005). Başarılı bir anti-tüberküloz ilacı ile tedaviden sonra klinik olarak iyileşme gözlenmesine rağmen, anti-tüberküloz ilaçların yüksek düzeyde oksidatif stresin devamına neden oldukları belirtilmiştir (Plit ve ark. 1998).

Yeterli düzeyde reaktif oksijen türü (ROS) normal hücre fonksiyonunu korumak için sinyal molekülleri olarak işlev görürken, pro-oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki denge bozuklukları nedeniyle aşırı ROS üretimi çoğu dokuda oksidatif hasara neden olur (Choi 2019). Oksidatif hasar sonucu artan ROS, DNA oksidasyonu, lipid peroksidasyonu ve endotelial hücre hasarına neden olur ve bu işleyiş çoğu dokuda görülen hasarın ana mekanizması olarak bilinmektedir (Zhang ve ark. 2018).

Nükleer faktör kappa B (NF- κ B), inflamasyon ve çeşitli otoimmün hastalıklarda yer alan genlerin indüklenebilir ekspresyonunun önemli bir düzenleyicisi olarak hizmet eden bir redoks transkripsiyon faktörüdür (Cağlayan ve ark. 2019). Bilinen bir transkripsiyon faktörü olarak nükleer faktör eritroid-2 ile ilişkili faktör 2 (Nrf-2), antioksidan ve detoksifikasyon enzimlerinin ekspresyonunu uyarabilen ve oksidatif stresin hücresel yanıtını sağlayan önemli bir transkripsiyon faktörüdür (Çelik ve ark. 2020).

Nrf-2, oksidatif stresin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan ana redoks algılama transkripsiyon faktörü olduğu iyi bilinmektedir. Normal olarak, oksidatif stres uyarımı altında, Nrf-2 aktive edilir, Keap1- Nrf-2 kompleksinden salınır ve sitoplazmadan çekirdeğe aktarılır. Ayrıca Heme oksijenaz-1 (HO-1) dahil olmak üzere çeşitli anti-oksidatif genlerin transkripsiyonunu başlatır. Bununla birlikte, birçok çalışma, HO-1 indüksiyonunun, Nrf-2 sinyallemesinin in vitro ve in vivo aktivasyonu ile LPS kaynaklı enflamasyon tepkilerini bloke ettiğini

göstermiştir (Chepelev ve ark. 2013, Park ve ark. 2013, Zhang ve ark. 2017).

Flavonoidler, anti-inflamatuar, antibakteriyel, anti-alerjik, antiapoptotik, antitrombotik ve vazodilatör dahil biyolojik ve farmakolojik özellikler sergileyen bitki kaynaklı doğal fenolik bileşiklerdir (Kandemir ve ark. 2020). Krisin (5,7 - dihidroksiflavon) doğal bir flavonoiddir. Birçok bitki özünde, balda, propoliste ve çeşitli çiçeklerin uçucu yağlarında bol miktarda bulunan KRS'nin varolan birçok yararlı etkileri bilinmektedir. KRS yararlı etkilerinden dolayı son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Eldutar ve ark. 2017, Kandemir ve ark. 2017, Mehri ve ark. 2014, Temel ve ark. 2020).

Sunulan çalışmada, İZN'nin ratların akciğerleri üzerindeki etkisini ve bu etkilerin KRS ile birlikte tedavi edilerek düzeltilip düzeltilmeyeceğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaca ulaşmak için, ratlara oral olarak gavaj yoluyla 7 gün boyunca İZN ve / veya KRS verildi, ardından akciğer dokularında antioksidan aktivite, patolojik değişiklikler ile farklı parametreler biyokimyasal, histopatolojik ve gen ekspresyonu yöntemleri ile incelenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmada ağırlıkları 220-250 gr, yaşları 10-12 haftalık olan erkek Sprague Dawley cinsi rat kullanıldı. Kafeslerde bulunan hayvanlar, 24±1°C sabit sıcaklıkta ve on ikişer (12 h) saatlik karanlık/aydınlık siklusü sağlanarak kontrollü bir odada tutuldu. Çalışmaya başlamadan önce ratların 7 gün süreyle ortama adaptasyon sağlamaları için herhangi bir uygulama yapılmadan beklendi. Sprague Dawley ratlara yem (pelet) ve su *ad libitum* olarak verildi. Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylandı (Karar No: 118/2019).

Çalışmada Kullanılan İlaçlar

İzoniazid (İZN): Çalışmada kullanılan İZN'nin (I.N.H. 300 mg Tablet, Koçak Farma) doz seçiminde literatür verisinden yararlanıldı (Ruan ve ark. 2018).

Krisin (KRS): Çalışmada kullanılan antioksidan KRS Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz doz literatürde belirtildiği şekilde uygulandı (Eldutar ve ark. 2017).

Deney Uygulamalar

Deneyde kullanılacak ratlar, her bir grupta yedi hayvan olacak şekilde beş gruba ayrıldı. Deney tasarımı aşağıdaki gibi bir kontrol ve dört deney grubunu içermiştir;

- 1- **Kontrol Grubu:** 7 gün oral serum fizyolojik verildi.
- 2- **İZN Grubu:** 7 gün 400 mg/kg/gün İZN oral olarak verildi.
- 3- **KRS 50:** 7 gün 50 mg/kg vücut ağırlığı/gün KRS oral olarak verildi.
- 4- **İZN + KRS 25 Grubu:** 25 mg/kg/gün KRS (oral) uygulamasından 30 dk. sonra İZN 400 mg/kg dozunda oral verildi ve uygulama 7 gün yapıldı.
- 5- **İZN + KRS 50 Grubu:** 50 mg/kg/gün KRS (oral) uygulamasından 30 dk sonra İZN 400 mg/kg dozunda oral verildi ve uygulama 7 gün yapıldı.

Numunelerin alınması

Yapılan son uygulamadan 24 saat sonra (8.gün) ratlar hafif sevofloran anestezisi altında dekapite edildi. Ratlardan akciğer dokuları alınarak bir kısmı gen ekspresyonu ve biyokimyasal analizler yapıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edilirken, diğer bir kısım ise patolojik incelemeler amacıyla 10 %'luk tamponlu formaldehit solüsyonda tespit edildi. Biyokimyasal olarak ve gen ekspresyonu için analizlere başlamadan önce akciğer dokularından gerekli olan miktarlarda tartıldı. Yapılacak analizlerin metodların da belirtilen tamponlarla belirtilen oranda sulandırılarak TissueLyser II (Qiagen) ile homojenizasyon işlemi yapıldı.

Biyokimyasal Analizler

Akciğer dokuları homojenatlarında LPO (Lipid peroksidasyon) ürünü olan MDA ölçümü Placer ve ark.'nın (Placer ve ark. 1966), GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay'ın (Sedlak and Lindsay 1968), GPx aktivitesinin ölçümü Matkovics'in (Matkovics 1988), SOD aktivitesinin ölçümü Sun ve ark.'nın (Sun ve ark. 1988), KAT aktivitesi Aebi'nin metoduna göre spektrofotometrik olarak ölçüldü (Aebi 1974). Homojenattaki protein konsantrasyonu, Lowry ve ark.'nın metoduna göre belirlendi (Lowry ve ark. 1951).

Histopatolojik İnceleme

Akciğerlere ait histopatolojik incelemeler için önceki çalışmalarımızdaki prosedürler izlendi (Cengiz ve ark. 2017, Comakli ve ark. 2019, Comakli ve ark. 2020). Tespit edilen akciğer dokuları formaldehitin uzaklaştırılması amacıyla akan su ile muamele edildi. Dereceli alkol ve ksilol solüsyonlarında dehidrasyon ve şeffaflandırma işlemi gerçekleştirilen akciğer doku örnekleri parafin bloklara gömüldü, daha sonra 5 µ kalınlıkta kesitler normal ve polilizinli lamlara alındı. Normal lam üzerine alınan dokular hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı. Akciğerlerde gözlenen histopatolojik değişiklikler ışık mikroskobu altında fotoğraflandı (Zeiss, AX10 Scope A1, Almanya).

İmmunhistokimyasal boyama

Polilizinli lamlara alınan kesitler ksilol içinde iki kez (5 dk.) parafinden arındırıldı, ardından dereceli alkol içinde dehidre edildi ve son olarak distile suda 10 dk.

bekletilerek rehidre edildi. Kesitler spesifik olmayan boyamayı en aza indirmek amacıyla 10 dk. 3%'lük hidrojen peroksit solüsyonunda bekletildi ve fosfat tamponlu salin (PBS) ile 2 kez yıkandı. Antijen retrieval için kesitler, 10 mM sitrat tamponu (pH 6.0) içerisinde 10 dakika kaynatıldı ve PBS ile yıkandı. 10 dakika boyunca protein blok solüsyonu uygulandıktan sonra kesitler, anti- NF-κB (p50) (1: 200, Santa Cruz Biotechnology, Katalog No: sc-8414) ile 30 dk. inkübe edildi. Kesitler üç ayrı PBS yıkaması ile durulandı ve daha sonra biyotinlenmiş sekonder antikor (Ultra Vision Large Volume Detection System; TP-125-HL; Lab Vision, Thermo) kullanılarak 10 dakika süreyle inkübe edildi. Son olarak, kesitler belli bir süre DAB ile muamele edildi ve Mayer hematoksilin ile zıt boyandı. Dehidrasyondan sonra, kesitler ksilen içine alındı ve entellan ile kaplandı. Işık mikroskobu altında immunpozitiflikler yoğunluğa göre yok: 0, zayıf: 1, orta: 2, yoğun boyanma: 3 şeklinde incelendi (Zeiss, AX10 Scope A1, Almanya).

Total RNA İzolasyonu

Deneyisel gruplardaki ratlardan elde edilen akciğer dokularından Trizol kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. Bu işlem kitin prosedürüne uygun olarak yapıldı. Total RNA izolasyonunda sonra RNA konsantrasyonu NanoDrop ile ölçüldü. Total RNA kalitesini kontrol etmek amacıyla RNA'lar %1.5'lik agaroz jel de 1XTBE solüsyonu içerisinde 80 voltta bir saat yürütüldü ve jel görüntüleme sistemi ile görüntülenerek RNA kalitesi belirlendi.

Primer Dizayn

Apoptozis ile ilişkili olan Nrf-2 ve HO-1 genlerine ait ekspresyon seviyelerinin Real Time PCR ile ölçülebilmesi için gerekli primer dizileri <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> ilgili linkindeki Primer Design-3 programı kullanılarak tasarlandı.

DNaz I uygulaması ve cDNA çevrimi

İzole edilen RNA örneklerinde DNA kontaminasyonuna karşı DNaz I (Thermo Scientific) kullanıldı. Dnaz I uygulaması kitle verilen protokole uygun olarak yapıldı. Daha sonra bu RNA'lardan 2-5 µg alındı ve miScript Reverse Transcription Kiti (Qiagen) verilen protokole uygun şekilde kullanılarak cDNA sentezlendi. Elde edilen cDNA'nın saflığı ve miktarı spektrofotometrede yapılan 260-280 nm absorpsiyon ölçümleri ile belirlendi ve cDNA'lar aynı oranlarda sulandırıldı. Daha sonra Real Time PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C de muhafaza edildi.

Real time PCR

Nrf-2 ve HO-1 genlerinin mRNA transkript seviyelerini ölçmek amacıyla Qiagen Rotor Gene HRM marka cihaz kullanılarak qRT-PCR yapıldı. İnternal kontrol olarak GAPDH geni kullanıldı. Real

time PCR deneylerinde oluşturulan master mix içeriği; Syber Green 2X Rox Dye Master mix (Qiagen), genler için tasarlanmış forward ve reverse primerler, template olarak cDNA'lar ve nükleaz free su içermektedir. Master mixler hazırlandıktan sonra örnekler Real Time cihazında analiz edildi ve elde edilen Ct değerleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna uygun olarak hesaplanarak ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri belirlendi (Livak and Schmittgen 2001). Genlerin reaksiyon koşulları ve primer dizileri Çizelge 1'de gösterilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizi SPSS 20.0 yazılımı kullanılarak yapıldı. Biyokimyasal veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi ile belirlenmiş olup çoklu karşılaştırmalar için Tukey's HSD testi uygulandı. $p < 0.05$ seviyesindeki sonuçlar anlamlı kabul edildi. İmmunhistokimyasal verilerin analizi için parametrik olmayan Kruskal Wallis testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. Ayrıca genlere ait ekspresyon seviyeleri analiz etmede GrapPad 7.2 (California, USA) programı kullanıldı.

BULGULAR

Biyokimyasal Değerlendirme

Ratlara uygulanan İZN, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında akciğer dokusundaki MDA seviyesinde artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 1A). Kontrol grubu ile KRS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p > 0.05$) tespit edildi. İZN ile uygulanan KRS'nin kombine dozlarının uygulaması ile artan bu MDA düzeylerinde önemli derecede azalmayı sağladığı belirlendi ($p < 0.05$). Benzer şekilde İZN uygulaması, kontrol ve sadece KRS uygulanan gruba kıyasla anlamlı şekilde akciğer dokusundaki GSH düzeylerini azalttığı ($p < 0.05$) gözlenirken İZN + KRS 50 (50 mg/kg doz) uygulamasının, GSH düzeyini İZN uygulanan gruba kıyasla anlamlı şekilde artırdığı ($p < 0.05$) tespit edildi (Şekil 1B).

Akciğer dokusunda SOD aktiviteleri incelendiğinde; (Şekil 2A) Kontrol ve KRS gruplarına göre İZN grubunda aktivitenin azaldığı ($p < 0.05$), İZN ile birlikte uygulanan KRS ile azalan SOD aktivitesinin arttığı ($p < 0.05$) tespit edildi. Akciğer dokuları KAT aktiviteleri incelendiğinde (Şekil 2B) kontrol ve KRS gruplarında KAT aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p > 0.05$), İZN uygulanan grupta ise kontrol ve KRS gruplarına göre aktivitede önemli derecede azalma ($p < 0.05$) olduğu gözlemlendi. İZN grubu ile İZN + KRS 25 grubu arasında istatistiksel fark bulunamazken ($p > 0.05$), KRS'nin 50 mg/kg'lık dozunun İZN grubundaki aktiviteyi yükselttiği tespit edildi ($p < 0.05$).

Şekil 2C'de verilen GPx enzim aktiviteleri incelendiğinde; Kontrol ile KRS gruplarına göre antioksidan enzim aktivitesinde önemli derecede azalma ($p < 0.05$) olduğu, İZN ile kombine olarak verilen KRS'in 25 ve 50 mg/kg'lık dozlarının GPx aktivitesini artırdığı ($p < 0.05$) İZN ile birlikte verilen KRS'in 25 mg/kg ve 50 mg/kg'lık doz uygulanan grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p > 0.05$) gözlemlendi.

Histopatolojik değerlendirme

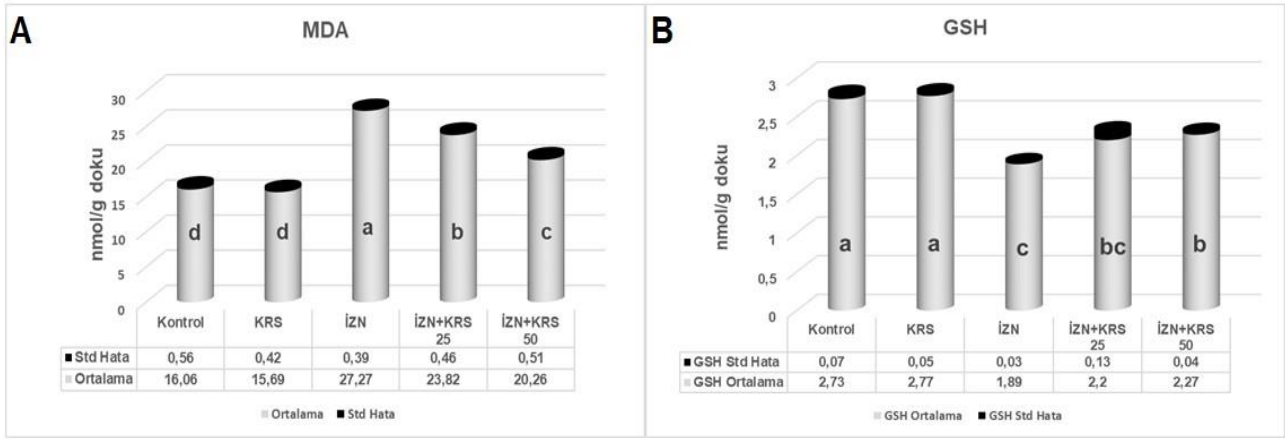
Kontrol grubundaki ratların akciğerleri, histopatolojik olarak hafif alveoler hiperemi dışında normal histolojik yapıya sahipti (Şekil 3A). KRS uygulanan ratların akciğerlerinde de kontrol grubuna benzer bulgular gözlemlendi (Şekil 3B). İZN uygulanan gruptaki ratların akciğerlerinde alveoller arası dokunun hücrel infiltrasyona bağlı artış, peribronşiyal lenfoid dokunun hiperplazi, alveollerde hafif düzeyde hiperemi ve amfizem bulguları gözlemlendi (Şekil 3C). İZN ile birlikte KRS uygulamalarının akciğerdeki histopatolojik bulguları hafiflettiği özellikle KRS 50 mg/kg uygulanan dozunun etkili olduğu saptanmıştır. İZN ile KRS 25 mg/kg doz uygulanan ratların akciğerlerinde alveoller arası hücrel infiltrasyona bağlı kalınlaşmanın ve peribronşiyal lenfoid dokudaki hiperplazinin İZN uygulanan gruba göre nispeten hafiflediği gözlemlendi (Şekil 3D). İZN ile KRS 50 mg/kg doz uygulanan ratların akciğerlerinde ise alveollerin normal histolojik yapısını çoğunlukla koruduğu bazı bölgelerde alveoller arası hücrel infiltrasyonun arttığı belirlendi (Şekil 3E).

İmmunhistokimyasal inceleme

NF- κ B için pozitif hücreler immünhistokimyasal boyamada kahverengi şeklinde gözlenmektedir. Kontrol ve sadece krisin uygulanan gruptaki ratların akciğerlerinde NF- κ B immunpozitifliğine rastlanmadı (Şekil 4A, 4B). İZN uygulanan gruptaki ratların akciğer kesitlerinde yoğun NF- κ B immunpozitifliği gözlemlendi ($p < 0.05$, Çizelge 2, Şekil 4C). İZN ile birlikte uygulanan KRS 25 mg/kg (Şekil 4D) ve 50 mg/kg (Şekil 4E) dozlarının, artan NF- κ B seviyelerini önemli düzeyde azalttığı belirlenmiştir ($p < 0.05$, Çizelge 2).

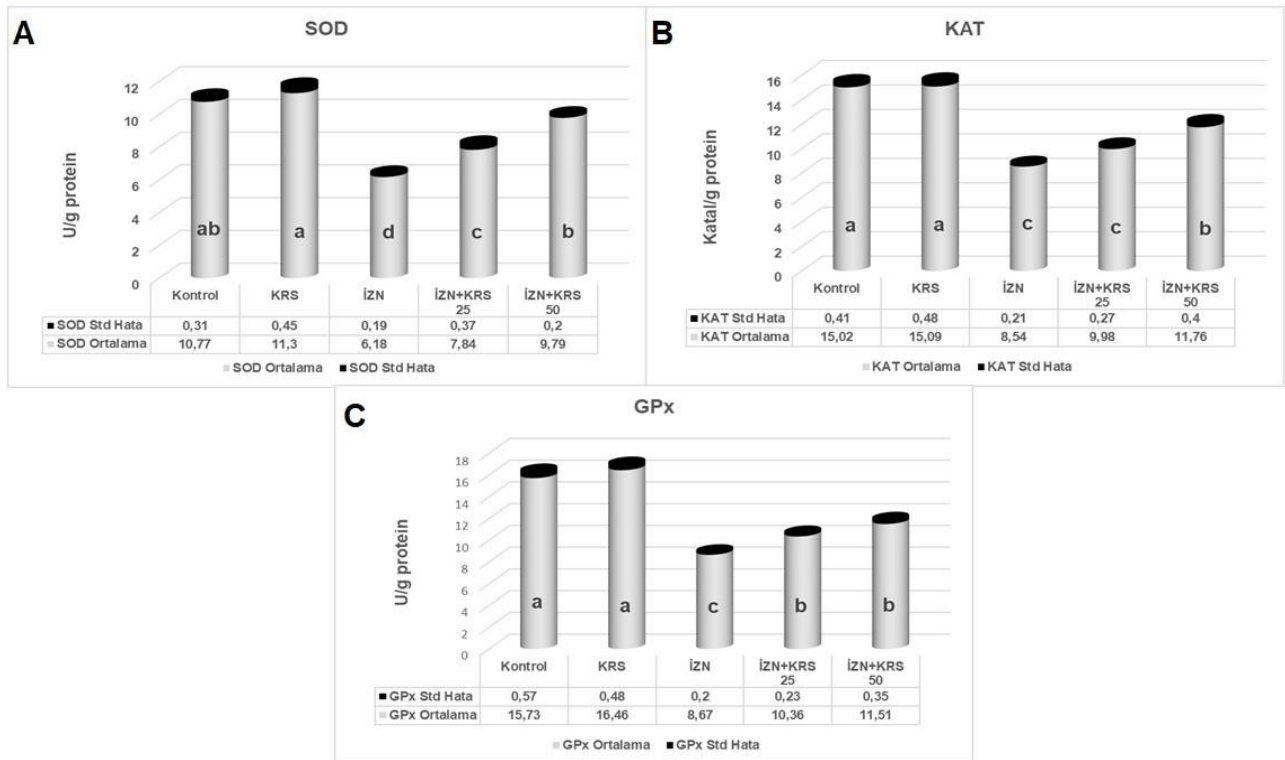
Nrf-2 ve HO-1 genlerine ait mRNA transkript seviyeleri

Çalışma sonucunda elde edilen qRT-PCR verileri incelendiğinde, kontrol ve KRS gruplarında Nrf-2 ve HO-1'in ekspresyon profilinde herhangi bir değişimin olmadığı ($p > 0.05$) ancak sadece İZN uygulanan ratların akciğer dokularında Nrf-2 ve HO-1'in mRNA transkript seviyesinin arttığı gözlemlendi ($p < 0.01$). Bunun yanında özellikle İZN + KRS 50 grubunda bu genlere ait ekspresyon seviyesinin sadece İZN uygulanan gruba göre önemli derecede azaldığı belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 5A ve Şekil 5B).



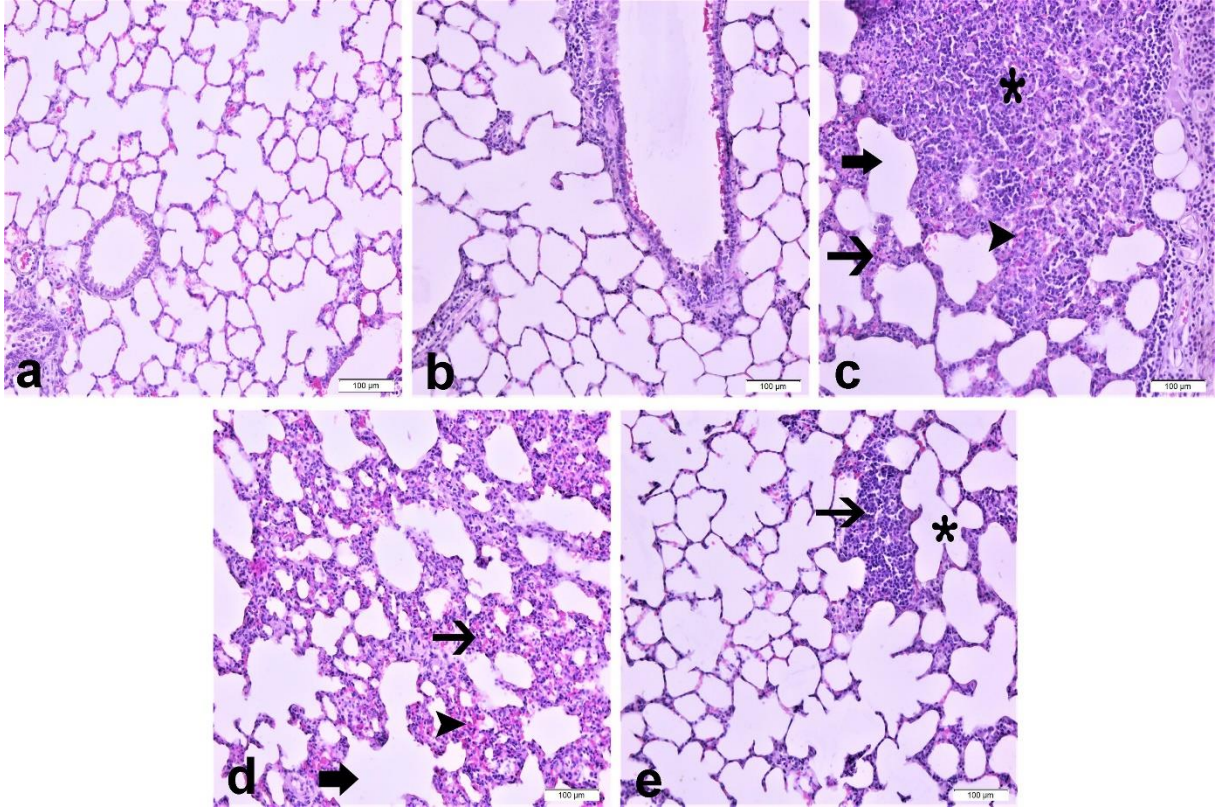
Şekil 1. Akciğer dokusu MDA (A) ve GSH (B) düzeyleri. Farklı harfler (a, b, c, d), gruplar arası farklılığı ifade eder ($p < 0.05$).

Figure 1. Lung tissue MDA (A) and GSH (B) levels. Different letters (a, b, c, d) express the difference between the groups ($p < 0.05$).



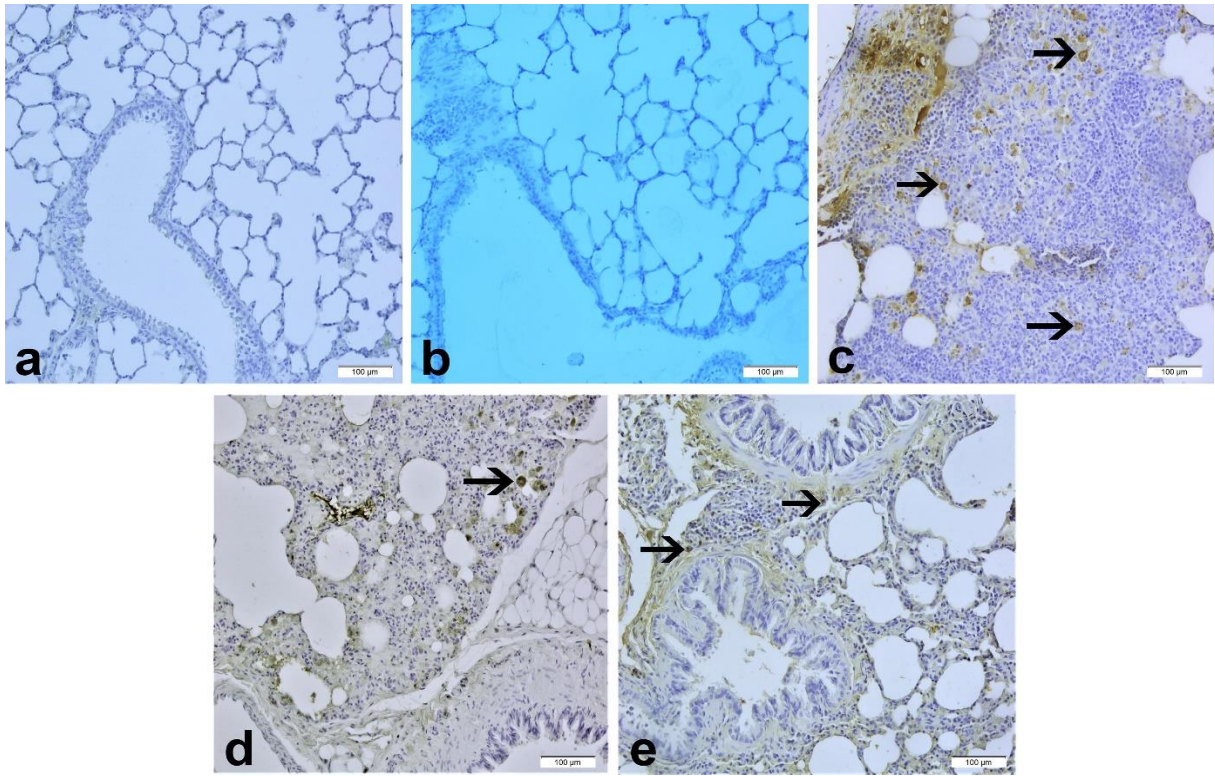
Şekil 2. Akciğer dokusu SOD (A), KAT (B) ve GPx (C) aktiviteleri. Farklı harfler (a, b, c, d), gruplar arası farklılığı ifade eder ($p < 0.05$).

Figure 2. Lung tissue SOD (A), CAT (B) and GPx (C) activities. Different letters (a, b, c, d) express the difference between the groups ($p < 0.05$).



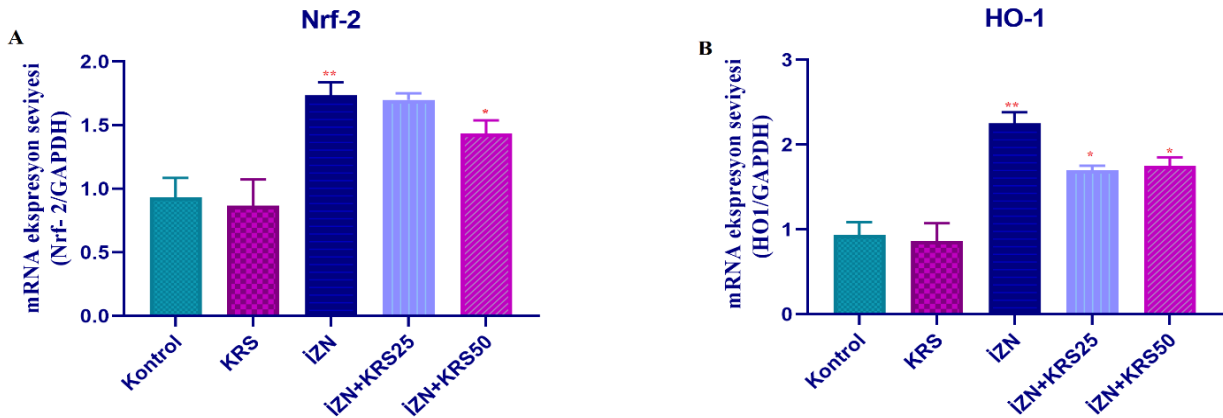
Şekil 3: İZN ve KRS uygulamalarından sonra rat akciğerlerinde histopatolojik değişiklikler. Hematoksilen ve eozin ile boyanmış akciğer kesitlerinin temsili görüntüleri. Farklı deney gruplarındaki yetişkin sıçanların akciğerlerinde histopatoloji tablosunu gösteren Hematoksilen ve eozin boyama (H&E, 20X). **(a-b)** Normal alveol yapıları ve hafif hiperemi ile gözlenen kontrol ve KRS grupları; **(c)** İZN uygulanan grup, Peribronşiyoler lenfoid dokuda hiperplazi (yıldız), alveol duvarlarında hafif hiperemi (okbaşı), alveoller arası septumda yangısal hücre infiltrasyonuna bağlı kalınlaşma (ince ok) ve amfizem (kalın ok); **(d)** İZN+KRS (25 mg/kg) uygulanan grup, alveoller arası septumda yangısal hücre infiltrasyonuna bağlı kalınlaşma (ince ok), alveol duvarlarında hafif hiperemi (okbaşı) ve amfizem (kalın ok); **(e)** İZN+KRS (50 mg/kg) uygulanan grup, amfizemli (yıldız) ve normal alveol yapıları, alveoller arası septumda yangısal hücre infiltrasyonuna bağlı kalınlaşma (ince ok).

Figure 3: Histopathological changes in rat lungs after isoniazid and chrysin administrations. Representative images of lung sections stained with hematoxylin and eosin. Hematoxylin and eosin staining (H&E, 20X) showing the histopathology table in the lungs of adult rats in different experimental groups. **a-b)** Control and CH groups observed with normal alveolar structures and mild hyperemia; **(c)** INH-treated group, hyperplasia in the peribronchiolar lymphoid tissue (star), mild hyperemia in the alveolar walls (arrowhead), thickening due to inflammatory cell infiltration in the septum between the alveoli (thin arrow) and emphysema (thick arrow); **(d)** INH+CH (25 mg/kg) treated group, thickening (thin arrow) due to inflammatory cell infiltration in the septum between the alveoli, mild hyperemia (arrowhead) and emphysema (thick arrow); **(e)** INH+CH (50 mg/kg) group, emphysema (star) and normal alveolar structures, thickening due to inflammatory cell infiltration in the septum between the alveoli (thin arrow).



Şekil 4: Akciğer dokusunda NF- κ B'nin ekspresyonu gösteren immunohistokimyasal boyama (IHC, 20 X). (a) Kontrol grubunu gösteren fotomikrograf; (b) KRS ile muamele edilmiş grup; (c) İZN uygulanan grup, şiddetli yangı şekillenen akciğer dokusunda histiyositlerin sitoplazmasında yoğun NF- κ B immunopozitifliği (oklar); (d) İZN+KRS (25 mg/kg) uygulanan grup, alveoller arasındaki septumda histiyositlerin sitoplazmasında hafif ve orta düzeyde NF- κ B immunopozitifliği (ok); (e) İZN+KRS (50 mg/kg) uygulanan grup, bronşiyolün çevresindeki yangı hücrelerinin sitoplazmasında hafif NF- κ B immunopozitifliği (oklar).

Figure 4: Immunohistochemical staining showing the expression of NF- κ B in lung tissue (IHC, 20 X). (a) Photomicrograph showing the control group; (b) CH-treated group; (c) INH-treated group, intense NF- κ B immunopositivity in the cytoplasm of histiocytes in the lung tissue with severe inflammation (arrows); (d) INH+CH (25 mg/kg) group, mild and moderate NF- κ B immunopositivity in the cytoplasm of histiocytes in the septum between the alveoli (arrow); (e) INH+CH (50 mg/kg) treated group, mild NF- κ B immunopositivity (arrows) in the cytoplasm of inflammatory cells around the bronchiole.



Şekil 5. Deneysel gruplardaki ratların akciğer dokularında Nrf-2 ve HO-1 genlerine ait mRNA transkript seviyeleri. Değerler 3 bağımsız örneklemin ortalama \pm SD' sini temsil eder; Hata çubukları standart sapmayı gösterir. İstatistiksel anlamlılık (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ve *** $p < 0.001$), tek yönlü ANOVA ile analiz edildi. A) Nrf-2 geninin göreceli mRNA ekspresyon seviyelerini temsil eder. B) HO-1 geninin göreceli mRNA ekspresyon seviyelerini temsil eder.

Figure 5. The mRNA transcript levels of Nrf-2 and HO-1 genes in the lung tissues of the rats in the experimental groups. Values represent the mean \pm SD of 3 independent samples; Error bars indicate standard deviation. Statistical significance (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$) were analyzed by one-way ANOVA. A) Represents relative mRNA expression levels of the Nrf-2 gene. B) Represents the relative mRNA expression levels of the HO-1 gene.

Tablo 1. *GAPDH*, *Nrf-2* ve *HO-1* genlerine ait qRT-PCR Primer Dizileri
Table 1. qRT-PCR Primer Sequences of *GAPDH*, *Nrf-2* and *HO-1* genes

Primer Adı	(5'-3')	Bağlanma (°C)	Reaksiyon koşulları
<i>GAPDH</i>	F: AGTGCCAGCCTCGTCTCATA R: GATGGTGATGGGTTTCCCGT	56	94°C 15 s / 56°C 30 s / 72°C 30 s (40 cycles)
<i>Nrf-2</i>	F: TTTGTAGATGACCATGAGTCGC R: TCCTGCCAAACTTGCTCCAT	56	94°C 15 s / 56°C 30 s / 72°C 30 s (40 cycles)
<i>HO-1</i>	F: CGACAGCATGTCCAGGATT R: TCACCAGCTTAAAGCCTTCCC	56	94°C 15 s / 56°C 30 s / 72°C 30 s (40 cycles)

Tablo 2. İZN uygulamasına bağlı değişen NF- κ B immunpozitifliği üzerine KRS antioksidanının etkisi
Table 2. Effect of CH antioxidant on NF- κ B immunopositivity varying due to INH treatment

Gruplar	Ortalama \pm Std. Hata
Kontrol	0,28 \pm 0,18 ^a
KRS	0,14 \pm 0,14 ^a
İZN	2,85 \pm 0,14 ^b
İZN+KRS 25 mg/kg	1,85 \pm 0,26 ^c
İZN+KRS 50 mg/kg	1,57 \pm 0,20 ^c

Değerler ortalama \pm Standart hata, $p < 0.05$, farklı harfler (^{abc}) gruplar arası farklılık olarak ifade edilir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, KRS'nin Sprague Dawley cinsi ratlarda İZN kaynaklı akciğer hasarına karşı koruyucu etkilerini inceledik. Anti-tüberküloz tedavisi, hepatotoksisite, nefrotoksisite ve deri döküntüsü dahil olmak üzere çeşitli ilaca bağlı yan etkilere neden olabilir (Ohta ve Nagase 2012, Suzuki ve ark. 1992). Bu ilaçlardan İZN'nin neden olduğu pnömonitis gibi interstisyel akciğer hastalığı hakkında bazı vaka raporları bildirilmiştir (Kunichika ve ark. 2002, Nishizawa ve ark. 2004). Yapılan birçok çalışmada yine İZN'nin ilaç kaynaklı akciğerlerde pnömonitis oluşmasının en yaygın nedeni olduğu öne sürülmüştür (Suzuki ve ark. 1992, Nishizawa ve ark. 2004, Endo ve ark. 1998). İZN ile indüklenen interstisyel pnömoni tanısı esas olarak ilaç kaynaklı interstisyel pnömoni ile uyumlu ilaç öyküsü ve akciğer patolojisine dayanır (Migita ve ark. 2012). Sunulan çalışmada İZN uygulanan gruptaki ratların akciğer patolojisinde akciğerlerin alveol lümenlerinin boş olması, alveoller arası dokuda hücrel infiltrasyona bağlı artış ve peribronşiyal lenfoid dokudaki hiperplazi gibi bulguların gözlenmesi İZN'nin interstisyel pnömoni oluşturduğu ve literatür verisiyle uyumlu olduğunu göstermiştir. Yine çalışmamızda antioksidan olarak kullandığımız KRS'nin farklı maddelerle oluşturulan akciğer hasarlarına karşı koruyucu özellik gösterdiği bildirilmiştir (Kilic ve ark. 2014, Yang ve ark. 2018). Sunulan çalışmada İZN kaynaklı akciğer hasarına karşı KRS uygulamasının oksidatif hasarı ve enflamatuvar etkiyi azaltarak etkili olduğu gözlenmiş ve literatür verisiyle uyumluluğu belirlenmiştir.

Sunulan çalışmada, İZN'nin ratlarda ROS üretimi, oksidasyon ve antioksidatif sistem üzerindeki etkileri araştırıldı. ROS, oksidatif stres için önemli bir başlangıç faktörüdür ve vücuttaki artan ROS üretimi, oksidatif stresi tetikler (Combrink ve du Preez 2020, Jia ve ark. 2019, Schieber ve Chandel 2014). Enzimatik (SOD, KAT ve GPx) ve enzimatik olmayan (GSH) antioksidanlar, oksidatif hasara maruz kalan hücrelerin korunmasında önemli bir rol oynarlar (Eldutar ve ark. 2017). Çoklu doymamış yağ asitlerinin son ürünü olan MDA, bir lipit peroksidasyon ürünüdür Serbest radikallerin aşırı üretimi lipit peroksidasyonuna yol açar, çünkü lipitler hücre zarının en önemli bileşenidir (Aksu ve ark. 2017, Jia ve ark. 2019). GSH düzeylerinin azalması, SOD, GPx ve KAT aktivitesinin azalması ile vücuttaki artan MDA, serbest radikaller ve reaktif oksijen türleri (ROS) gibi lipit peroksidasyon toksik yan ürünlerini artırarak oksidatif stres, lipit peroksidasyon hasarına neden olur (Cho ve ark. 2015, Jia ve ark. 2019, Xiang ve ark. 2017, You ve ark. 2014). Çalışmada enzimatik ve non-enzimatik enzim aktivitelerinde meydana gelen azalma ve artan MDA düzeyleri, İZN uygulamasından sonra ciddi bir oksidatif stresin oluştuğunu göstermektedir. Bununla birlikte, İZN ile birlikte KRS uygulaması akciğer dokularındaki SOD, KAT ve GPx enzim aktivitelerinde önemli bir artış sağladığı gözlenmiştir. İZN'nin bu antioksidan enzim aktiviteleri üzerine azaltıcı etkisi önceki çalışmalarda gösterilmiş ve bunun muhtemelen İZN'nin oksidan-antioksidan dengeyi bozarak bakteriyi etkisiz hale getirme çabasından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır (Ahadpour ve ark. 2016, Karakurt ve ark. 2019, Raghu ve Karthikeyan 2016). Ayrıca farklı

çalışmalarda farklı flavonoid türevi antioksidanların MDA düzeyini azalttığı, GSH düzeyi ile GPx, SOD ve KAT enzim aktivitelerini artırdığı bildirilmiştir (Aksu ve ark. 2019, Benzer ve ark. 2018, Çelik ve ark. 2020, Kandemir ve ark. 2020). Sunulan çalışmada da benzer şekilde İZN ile birlikte KRS uygulanması MDA düzeylerini azaltıp, GSH düzeyleri ile GPx, SOD ve KAT enzim aktivitelerini ise artırmıştır.

Bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B, hücrel stres arttığında, ROS üretildiğinde ve DNA hasarı oluştuğunda hücre döngüsü değişikliklerinin yanı sıra birçok işlev görür ve yangı belirteçlerini tetikleyerek yangısal süreci hızlandırır (Agca ve ark. 2014). NF- κ B'nin düzensizliği, çeşitli enflamatuar hastalıklar ve kanseri içeren çeşitli patolojik durumlarla ilişkilendirilmiştir (Benzer ve ark. 2018). Sunulan çalışmada İZN uygulamasının rat akciğerlerinde NF- κ B seviyelerinin immunhistokimyasal değerlendirilmesinde yükseldiği ve yangısal sürecin hızlandığı görülmektedir. Yapılan farklı çalışmalarda da İZN'nin benzer şekilde NF- κ B seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Çelik ve ark. 2020, Wali ve ark. 2019, Zhang ve ark. 2019).

Nrf-2, antioksidan ve sitoprotektif proteinlerin ekspresyonunu düzenleyerek ROS kaynaklı oksidatif hasara karşı hücreleri koruyan bir transkripsiyon faktörüdür (Mahmoud ve ark. 2020). Nrf-2 aktivasyonu oksidatif hasarı azaltmak için, hücreleri apoptozise karşı koruyan hem faz II ve HO-1 gibi antioksidatif enzimlerin ekspresyonunu artırır (Abass ve ark. 2016, Dai ve ark. 2016).

HO, hem molekülünü parçalayarak enzimatik olarak bilirubine dönüştürür ve serbest demir, karbon monoksit ve biliverdin oluşumunu sağlar. HO-1 izozimi, substrat hem, oksidatif stres ve fenolik bileşikler dahil olmak üzere çok çeşitli uyarımlarla transkripsiyonel olarak düzenlenir (Guzmán-Beltrán ve ark. 2008). Nrf-2/HO-1 sinyalleme yolu, çok çeşitli uyarımlara yanıt olarak bir dizi antioksidan genin ekspresyonunu düzenler ve hücreyi oksidatif strese karşı korur (Surh ve ark. 2008). Yapılan çalışmada, İZN uygulaması Nrf-2 ve HO-1 mRNA transkript seviyesini artırmıştır. Literatür taraması yapıldığında bazı çalışmalarda İZN uygulamasının Nrf-2 ekspresyonunu azalttığı öne sürülmüştür. Ancak bu sonucun tam tersini ortaya koyan çalışmalarda mevcuttur. Yani İZN'nin Nrf-2 yolağı üzerine olan etkisi hakkında farklı sonuçlar bulunmaktadır. İZN uygulaması sonucu mRNA transkript seviyesinin azalma sebeplerinden biri İZN'nin ilgili gende post transkripsiyonel modifikasyona uğratması olabilir. Aynı zamanda epigenetik modifikasyonlarda ve post transkripsiyonel düzenlemede rol alan kodlanmayan RNA'lar (miRNA gibi) bu sonucun sebepleri arasında sayılabilir (Jin et al. 2017, Verma ve ark. 2018, Wang ve ark. 2018, Zhang ve ark. 2019).

Sonuç olarak İZN'nin akciğer dokusunda oksidan-antioksidan dengesini bozarak hasara neden olduğu, inflamasyonu artırdığı gözlenmiş, KRS'nin ise antioksidan ve anti-inflamatuar etki göstererek İZN kaynaklı bu hasarı azalttığı tespit edilmiştir. Konu ile ilgili yapılacak ileri düzey çalışmalar ile İZN kaynaklı akciğer hasarını azaltmada ya da engellemede KRS'nin alternatif tedavi yöntemi olarak yerini alacağı ve konuyla ilgili farklı çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abass MA, Elkhateeb SA, El-baset SAA, Kattaia AA, Mohamed EM, Atteia HH. Lycopene ameliorates atrazine-induced oxidative damage in adrenal cortex of male rats by activation of the Nrf2/HO-1 pathway Environ Sci Pollut. 2016; 23:15262-15274.
- Aebi H. Catalase. In: Methods of enzymatic analysis. Elsevier, pp 1974; 2:673-684.
- Agca CA, Tuzcu M, Hayirli A, Sahin K. Taurine ameliorates neuropathy via regulating NF- κ B and Nrf2/HO-1 signaling cascades in diabetic rats Food Chem Toxicol. 2014; 71:116-121.
- Ahadpour M, Eskandari MR, Mashayekhi V, Haj Mohammad Ebrahim Tehrani K, Jafarian I, Naserzadeh P, Hosseini M-J. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction induced by isoniazid: study on isolated rat liver and brain mitochondria Drug Chem Toxicol. 2016; 39:224-232.
- Aksu E, Kandemir F, Özkaraca M, Ömür A, Küçükler S, Çomaklı S. Rutin ameliorates cisplatin-induced reproductive damage via suppression of oxidative stress and apoptosis in adult male rats Andrologia 2017; 49:12593-12601.
- Aksu EH, Kandemir FM, Yıldırım S, Küçükler S, Dörtbudak MB, Çağlayan C, Benzer F. Palliative effect of curcumin on doxorubicin-induced testicular damage in male rats J Biochem Mol Toxic. 2019; 33:22384-22392.
- Basheer AS, Siddiqui A, Paudel YN, Hassan MQ, Imran M, Najmi AK, Akhtar M. Hepatoprotective and antioxidant effects of fish oil on isoniazid-rifampin induced hepatotoxicity in rats Pharma Nutrition 2017; 5:29-33.
- Benzer F, Kandemir FM, Kucukler S, Comaklı S, Caglayan C. Chemoprotective effects of curcumin on doxorubicin-induced nephrotoxicity in wistar rats: by modulating inflammatory cytokines, apoptosis, oxidative stress and oxidative DNA damage Arch Physiol Biochem. 2018; 124:448-457.
- Benzer F, Kandemir FM, Ozkaraca M, Kucukler S, Caglayan C. Curcumin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by abrogation of inflammation, apoptosis, oxidative DNA damage, and protein oxidation in rats J Biochem Mol Toxic. 2018; 32:22030-22037.
- Caglayan C, Kandemir FM, Darendelioglu E, Yıldırım S, Kucukler S, Dörtbudak MB. Rutin ameliorates mercuric chloride-induced hepatotoxicity in rats via interfering with oxidative stress, inflammation and apoptosis J Trace Elem Med Bio. 2019; 56:60-68.
- Chepelev NL, Zhang H, Liu H, McBride S, Seal AJ, Morgan TE, Finch CE, Willmore WG, Davies KJ, Forman

- HJ.** Competition of nuclear factor-erythroid 2 factors related transcription factor isoforms, Nrf1 and Nrf2, in antioxidant enzyme induction *Redox Biol.* 2013; 1:183-189.
- Cho YJ, Park SB, Han M.** Di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces oxidative stress in human endometrial stromal cells in vitro *Mol Cell Endocrinol.* 2015; 407:9-17.
- Choi YH.** Activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway contributes to the protective effects of coptisine against oxidative stress-induced DNA damage and apoptosis in HaCaT keratinocytes *Gen Physiol Biophys.* 2019; 38:281.
- Chowdhury A, Santra A, Bhattacharjee K, Ghatak S, Saha DR, Dhali GK.** Mitochondrial oxidative stress and permeability transition in isoniazid and rifampicin induced liver injury in mice *J Hepatol.* 2006; 45:117-126.
- Cicek E, Sutcu R, Gokalp O, Yilmaz HR, Ozer MK, Uz E, Ozcelik N, Delibas N.** The effects of isoniazid on hippocampal NMDA receptors: protective role of erdoesteine *Mol Cell Biochem.* 2005; 277:131-135.
- Comakli S, Sağlam YS, Timurkan MÖ.** Comparative detection of bovine herpesvirus-1 using antigen ELISA, immunohistochemistry and immunofluorescence methods in cattle with pneumonia *Turk J Vet Anim Sci* 2019; 43: 306-313.
- Combrink M, du Preez I.** Metabolomics describes previously unknown toxicity mechanisms of isoniazid and rifampicin *Toxicol Lett.* 2020; 332:104-110.
- Cunha L, Rodrigues S, Rosa da Costa AM, Faleiro L, Buttini F, Grenha A.** Inhalable chitosan microparticles for simultaneous delivery of isoniazid and rifabutin in lung tuberculosis treatment *Drug Dev Ind Pharm.* 2019; 45:1313-1320.
- Çelik H, Kandemir FM, Caglayan C, Özdemir S, Çomaklı S, Kucukler S, Yardım A.** Neuroprotective effect of rutin against colistin-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat brain associated with the CREB/BDNF expressions *Mol Biol Rep.* 2020; 47:2023-2034.
- Çelik H, Kucukler S, Çomaklı S, Özdemir S, Caglayan C, Yardım A, Kandemir FM.** Morin attenuates ifosfamide-induced neurotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, neuroinflammation and neuronal apoptosis *NeuroToxicology* 2020; 76:126-137.
- Çomaklı S, Özdemir S, Değirmençay Ş.** Canine distemper virus induces downregulation of GABA A, GABA B, and GAT1 expression in brain tissue of dogs. *Arch Virol* 2020; 1-11.
- Dai C, Li B, Zhou Y, Li D, Zhang S, Li H, Xiao X, Tang S.** Curcumin attenuates quinine-induced apoptosis and inflammation via the opposite modulation of Nrf2/HO-1 and NF-κB pathway in human hepatocyte L02 cells *Food Chem Toxicol.* 2016; 95:52-63.
- Eftekhari A, Heidari R, Ahmadian E, Eghbal MA.** Cytoprotective Properties of Carnosine against Isoniazid-Induced Toxicity in Primary Cultured Rat Hepatocytes *Pharm Sci.* 2018; 24:257.
- Eldutar E, Kandemir FM, Kucukler S, Caglayan C.** 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 Toxic.* 2017; 31:21960-21966.
- Endo T, Saito T, Nakayama M, Ohse H, Watanabe S, Tamai S, Hasegawa S.** A case of isoniazid-induced pneumonitis. *Nihon Kokyuki Gakkai zasshi= the journal of the Japanese Respiratory Society.* 1998; 36:100-105.
- Guzmán-Beltrán S, Espada S, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J, Cuadrado A.** Nordihydroguaiaretic acid activates the antioxidant pathway Nrf2/HO-1 and protects cerebellar granule neurons against oxidative stress *Neurosci Lett.* 2008; 447:167-171.
- Han Mc, Durmuş As, Sağliyan A, Günay C, Özkaraca M, Kandemir FM, Çomaklı S, Öztöpalan DF.** Effects of *Nigella sativa* and *Hypericum perforatum* on wound healing *Turk J Vet Anim Sci.* 2017; 41: 99-105.
- Jia Z-l, Cen J, Wang J-b, Zhang F, Xia Q, Wang X, Chen X-q, Wang R-c, Liu K-c, Zhang Y.** Mechanism of isoniazid-induced hepatotoxicity in zebrafish larvae: Activation of ROS-mediated ERS, apoptosis and the Nrf2 pathway *Chemo.* 2019; 227:541-550.
- Jin SW, Hwang YP, Choi CY, Kim HG, Kim SJ, Kim Y, Chung YC, Lee KJ, Jeong TC, Jeong HG.** Protective effect of rutacarpine against t-BHP-induced hepatotoxicity by upregulating antioxidant enzymes via the CaMKII-Akt and Nrf2/ARE pathways *Food Chem Toxicol.* 2017; 100:138-148.
- Kandemir FM, Yıldırım S, Kucukler S, Caglayan C, Darendelioglu E, Dortbudak MB.** (b) Protective effects of morin against acrylamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity: A multi-biomarker approach *Food Chem Toxicol.* 2020; 138:111190-111201.
- Kandemir FM, Kucukler S, Eldutar E, Caglayan C, Gülçin İ.** Chrysin protects rat kidney from paracetamol-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy: a multi-biomarker approach. *Sci Pharm.* 2017; 85(1): 4.
- Karakurt Y, Süleyman H, Keskin Cimen F, Tasli G, Ucak T, Icel E, Kurt N.** The effects of lutein on optic nerve injury induced by ethambutol and isoniazid: an experimental study *Cutan Ocul Toxicol.* 2019; 38:136-140.
- Kilic T, Ciftci O, Cetin A, Kahraman H.** Preventive effect of chrysin on bleomycin-induced lung fibrosis in rats *Inflammation.* 2014; 37:2116-2124.
- Kunichika N, Miyahara N, Kotani K, Takeyama H, Harada M, Tanimoto M.** Pneumonitis induced by rifampicin *Thorax.* 2002; 57: 1000-1001.
- Liang Z, Ni R, Zhou J, Mao S.** Recent advances in controlled pulmonary drug delivery *Drug Discov. Today.* 2015; 20:380-389.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method *Methods* 2001; 25:402-408.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.
- Mahmoud AM, Hussein OE, Hozayen WG, Bin-Jumah M, Abd El-Twab SM.** Ferulic acid prevents oxidative stress, inflammation, and liver injury via upregulation of Nrf2/HO-1 signaling in methotrexate-induced rats *Environ Sci Pollut Res Int.* 2020; 27:7910-7921.
- Matkovics B.** Determination of enzyme activity in lipid peroxidation and glutathione pathways *Lab Diag.* 1988; 15:248-250.
- Mehri S, Karami HV, Hassani FV, Hosseinzadeh H.** Chrysin reduced acrylamide-induced neurotoxicity in both in vitro and in vivo assessments *Iran Biomed J.* 2014; 18:101.
- Migita K, Umeno T, Miyagawa K, Izumi Y, Sasaki E, Kakugawa T, Ito M, Kinoshita A, Miyashita T.**

Development of interstitial pneumonia in a patient with rheumatoid arthritis induced by isoniazid for tuberculosis chemoprophylaxis *Rheumatol Int.* 2012; 32:1375-1377.

- Nishizawa Y, Yasui M, Yamamori C, Tagami A, Fujimura M, Nakao S.** A case of successful desensitization therapy for isoniazid-induced pneumonitis *Nihon Kokyuki Gakkai zasshi= the journal of the Japanese Respiratory Society.* 2004; 42:649-654.
- Ohta K, Nagase H.** Drug-induced interstitial lung disease *Nihon Rinsho.* 2012; 70:517-520.
- Organization WH.** Global tuberculosis report 2013. WHO,
- Park EJ, Kim YM, Park SW, Kim HJ, Lee JH, Lee D-U, Chang KC.** Induction of HO-1 through p38 MAPK/Nrf2 signaling pathway by ethanol extract of *Inula helenium* L. reduces inflammation in LPS-activated RAW 264.7 cells and CLP-induced septic mice *Food Chem Toxicol.* 2013; 55:386-395.
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC.** Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems *Anal Biochem.* 1966; 16:359-364.
- Plit ML, Theron AJ, Fickl H, Van Rensburg CEJ, Pendel S, Anderson R.** Influence of antimicrobial chemotherapy and smoking status on the plasma concentrations of vitamin C, vitamin E, β -carotene, acute phase reactants, iron and lipid peroxides in patients with pulmonary tuberculosis *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998; 2: 590-596.
- Raghu R, Karthikeyan S.** Zidovudine and isoniazid induced liver toxicity and oxidative stress: Evaluation of mitigating properties of silibinin *Environ Toxicol Pharmacol.* 2016; 46:217-226.
- Ruan L-Y, Fan J-T, Hong W, Zhao H, Li M-H, Jiang L, Fu Y-H, Xing Y-X, Chen C, Wang J-S.** Isoniazid-induced hepatotoxicity and neurotoxicity in rats investigated by ¹H NMR based metabolomics approach *Toxicol Lett.* 2018; 295:256-269.
- Schieber M, Chandel NS.** ROS function in redox signaling and oxidative stress *Curr Biol.* 2014; 24:453-462.
- Sedlak J, Lindsay RH.** Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent *Anal Biochem.* 1968; 25:192-205.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y.** A simple method for clinical assay of superoxide dismutase *Clin Chem.* 1988; 34:497-500.
- Surh Y-J, Kundu JK, Na H-K.** Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals *Planta Med.* 2008; 74:1526-1539.
- Suzuki N, Ohno S, Takeuchi Y, Yamanaka K, Sugiyama Y, Kitamura S.** A case of isoniazid (INH)-induced pneumonitis *The Japanese journal of thoracic diseases* 1992; 30:1563-1568.
- Temel Y, Kucukler S, Yildirim S, Caglayan C, Kandemir FM.** Protective effect of chrysin on cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity via the inhibition of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2020; 393(3):325-337.
- Verma AK, Yadav A, Singh SV, Mishra P, Rath SK.** Isoniazid induces apoptosis: Role of oxidative stress and inhibition of nuclear translocation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) *Life Sci.* 2018; 199:23-33.
- Wali AF, Mushtaq A, Rehman MU, Akbar S, Masoodi MH.** Amelioration of Rifampicin and Isoniazid Induced Liver Oxidative Damage and Inflammation Response by Propolis Extracts in Rodent Model *Jou of Biolo Acti Prod from Nat* 2019; 9:57-66.
- Wang J, Luo W, Li B, Lv J, Ke X, Ge D, Dong R, Wang C, Han Y, Zhang C.** 2018. *Sagittaria sagittifolia* polysaccharide protects against isoniazid-and rifampicin-induced hepatic injury via activation of nuclear factor E2-related factor 2 signaling in mice *J Ethnopharmacol.* 2018; 227:237-245.
- Xiang N, Zhao C, Diao X, Han Q, Zhou H.** Dynamic responses of antioxidant enzymes in pearl oyster *Pinctada martensii* exposed to di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) *Environ Toxicol Pharmacol.* 2017; 54:184-190.
- Yang Z, Guan Y, Li J, Li L, Li Z.** Chrysin attenuates carrageenan-induced pleurisy and lung injury via activation of SIRT1/NRF2 pathway in rats *Eur J Pharmacol.* 2018; 836:83-88.
- You H, Chen S, Mao L, Li B, Yuan Y, Li R, Yang X.** The adjuvant effect induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is mediated through oxidative stress in a mouse model of asthma *Food Chem Toxicol.* 2014; 71:272-281.
- Zhang D, Xiao Y, Lv P, Teng Z, Dong Y, Qi Q, Liu Z.** Edaravone attenuates oxidative stress induced by chronic cerebral hypoperfusion injury: role of ERK/Nrf2/HO-1 signaling pathway *Neurol Res.* 2018; 40:1-10.
- Zhang Q, Zhao Y, Talukder M, Han Y, Zhang C, Li X-N, Li J-L.** Di (2-ethylhexyl) phthalate induced hepatotoxicity in quail (*Coturnix japonica*) via modulating the mitochondrial unfolded protein response and NRF2 mediated antioxidant defense *Sci. Total Environ.* 2019; 651:885-894.
- Zhang Y, Li Y, Li J, Li B, Chong Y, Zheng G, Sun S, Feng F.** SIRT1 alleviates isoniazid- induced hepatocyte injury by reducing histone acetylation in the IL-6 promoter region *Int Immunopharmacol.* 2019; 67:348-355.
- Zhang Z, Guo Z, Zhan Y, Li H, Wu S.** Role of histone acetylation in activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase 1 pathway by manganese chloride *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017; 336:94-100.