



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI

**SİSPLATİNLE İNDÜKLENEN *İN VİTRO* BÖBREK HÜCRE
HASARINA HESPERİDİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Altan ERSÖZ

**Samsun
Kasım – 2018**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI

**SİSPLATİNLE İNDÜKLENEN *İN VİTRO* BÖBREK HÜCRE
HASARINA HESPERİDİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Altan ERSÖZ

Danışman

Prof. Dr. Gül Fatma YARIM

Samsun

Kasım – 2018

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Altan ERSÖZ tarafından Prof. Dr. Gül Fatma YARIM danışmanlığında hazırlanan “Sisplatinle indüklenen *in vitro* böbrek hücre hasarına hesperidinin koruyucu etkisinin araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 21/11/2018 tarihinde yapılan sınav ile Biyokimya (Veteriner) Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ali ERTEKİN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Gül Fatma YARIM
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Semra OKUR GÜMÜŞOVA
Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ayşegül ÇEBİ
Giresun Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Miyase ÇINAR
Kırıkkale Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / /.....

Prof. Dr. Ahmet UZUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Sahip olduğu engin mesleki bilgi, birikim ve tecrübeleri ile beni yönlendiren ve anlayışlı tavırları ve güler yüzüyle bana her zaman destek olan, minnet ve şükran duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Gül Fatma YARIM'a,

Biyokimya eğitiminin boyunca bana emeği geçen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Ali ERTEKİN, Prof. Dr. Sena ÇENESİZ, Prof. Dr. Cevat NİSBET ve Prof. Dr. Gülay ÇİFTCİ'ye,

Doktora Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen ve kıymetli zamanını ayıran sayın Prof. Dr. Semra GÜMÜŞOVA'ya,

Laboratuvar çalışmalarında özverili katkılarda bulunan Araş. Gör. Ayris GÖKÇEOĞLU'na ve Araş. Gör. Bahadır MÜFTÜOĞLU'na,

Bu vesile ile varlıkları ile bana güç veren ve bu günlere gelmem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan anneme ve babama, sevgisiyle ve desteğiyle hep yanımda olan sevgili eşime ve çocuklarım Arda'ya ve Bilgehan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, PYO. VET.1904.17.011 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

SİSPLATİNLE İNDÜKLENEN *İN VİTRO* BÖBREK HÜCRE HASARINA HESPERİDİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Sunulan tez projesinin amacı, sisplatinle oluşturulan *in vitro* böbrek hücre hasarı modelinde hesperidin uygulamasının antienflamatuar etkisinin belirlenmesidir.

Materyal ve Metot: Hesperidin uygulamasının olası antienflamatuar etkisi, Vero hücre mediumlarında IL-1 β ve TNF- α konsantrasyonlarının ölçülmesi ile değerlendirildi. Bu amaçla, negatif kontrol hücre grubu (n=4), 50 μ mol/l sisplatin eklenmiş hücre grubu (n=4), 40 μ mol/l hesperidin eklenmiş hücre grubu (n=4) ve 50 μ mol/l sisplatin+40 μ mol/l hesperidin eklenmiş hücre grubu (n=4) olmak üzere dört grup oluşturuldu. Hücre canlılığı hücre sayım testi ile değerlendirildi. Uygulamalar sonunda hücre mediumlarında IL-1 β ve TNF- α düzeyleri enzim bağılı immünosorbent analiz kitleri kullanılarak ölçüldü.

Bulgular: Sisplatin uygulanan hücre mediumlarındaki IL-1 β ve TNF- α düzeylerinin, negatif kontrol, hesperidin ve hesperidin+sisplatin hücre mediumlarındaki IL-1 β ve TNF- α düzeylerine göre önemli oranda yükselmiş olduğu belirlendi ($p<0,05$). Hesperidin, Vero hücrelerinde sisplatinin neden olduğu enflamasyonu IL-1 β ve TNF- α düzeylerini azaltarak baskıladığı anlaşıldı.

Sonuç: Tez çalışmasından elde edilen bulguların, kemoterapötik olarak kullanılan sisplatinin böbrek hücrelerinde oluşturduğu hasarın engellenmesinde ve/veya hafifletilmesinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine önemli katkılar sağlayacağı öngörülmektedir. Bununla birlikte, bu sonuçların *in vivo* çalışmalar ve klinik araştırmalar ile desteklenmesine ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Böbrek hücre hasarı; Hesperidin; *İN vitro*; Sisplatin.

Altan ERSÖZ, Doktora
Ondokuz Mayıs Üniversitesi- Samsun, Kasım -2018

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF HESPERIDIN ON CISPLATIN-INDUCED RENAL CELL INJURY *IN VITRO*

Aim: The purpose of this thesis project is to determine the anti-inflammatory effect of hesperidin administration in a cisplatin-induced renal cell injury model *in vitro*.

Material and Method: The possible anti-inflammatory effect of hesperidin administration was assessed by measuring IL-1 β and TNF- α concentrations in Vero cell mediums. For this purpose, a negative control cell group (n = 4), a cell group with 50 μ mol/l cisplatin (n = 4), a cell group with 40 μ mol/l hesperidin (n = 4) and a cell group with 50 μ mol/l cisplatin plus 40 μ mol/l hesperidin (n = 4) were formed. Cell viability was assessed by cell count test. At the end of the experiments, IL-1 β and TNF- α levels in cell mediums were measured using enzyme-linked immunosorbent assay kits.

Results: IL-1 β and TNF- α levels in cell media treated with cisplatin were determined significantly higher (p<0.05) than in control cells, hesperidine treated cells and cisplatin + hesperidin treated cells. Hesperidin was found to suppress the inflammatory IL-1 β and TNF- α levels caused by cisplatin in Vero cells.

Conclusion: Findings from the thesis study are expected to provide significant contributions to the development of novel approaches in the prevention and/or alleviation of the damage caused by chemotherapeutic cisplatin in renal cells. However, these results need to be supported by *in vivo* studies and clinical trials.

Keywords: Cisplatin; Hesperidin; *In vitro*; Renal cell injury.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Akt	: Protein kinaz B yolağı
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
CTR1	: Bakır transport proteini 1
ERK	: Ekstraselüler-regüle edici kinaz
GFR	: Glomerüler filtrasyon hızı
GGT	: Gama glutamil transferaz
COX-1	: Siklooksijenaz 1
COX-2	: Siklooksijenaz 2
DMHP	: 7,3'-dimetoksi Hesperetin
FADD	: Fas ilişkili ölüm bölgesi
FLICE	: Fas ile ilişkili ICE benzeri proteaz
GS-X	: Glutasyon taşıyıcı ailesi
GSH	: Glutasyon
GSSG	: Oksitlenmiş glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HIF-1a	: Hipoksi ile indüklenen faktör-1a
HMC	: Hesperidin metil kalkan
Hsd	: Hesperidin
HsT	: Hesperetin
ICAM-1	: Hücre içi adhezyon molekülü
IL-10	: İnterlökin-10
IL-1α	: İnterlökin-1 alfa
IL-1β	: İnterlökin-1 beta
IL-6	: İnterlökin-6
IL-8	: İnterlökin-8
IL-12	: İnterlökin-12
IL-18	: İnterlökin-18
IκB	: İnhibitör kapa B
IRAK1	: IL-1 reseptör ile ilişkili kinaz
INOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

JNK/SAPK	: Jun N-terminal kinaz/stres aktive protein kinaz
LPS	: Lipopolisakkarit
MAPK	: Mitojen aktif protein kinaz
MCP-1	: Monosit kemotaktik Proteini-1
MIP-2	: Makrofaj inflamatuvar proteini 2
MKK4	: Mitojen aktif protein kinaz kinaz 4
MKK7	: Mitojen aktif protein kinaz kinaz 7
NF-κB	: Nükleer faktör kapa B
NK	: Doğal öldürücü
NO₂	: Azot dioksit
OCT	: Organik katyon transport proteini
OCT-1	: Organik katyon transport proteini 1
OCT-2	: Organik katyon transport proteini 2
OCT-3	: Organik katyon transport proteini 3
pg/ml	: Pikogram/mililitre
PKC	: Protein kinaz C yolağı
PMA	: Phorbolmyristateacetate
Pt-GSH	: Platin - glutatyon-S-transferaz konjugatı
μM	: Mikrometre
RANTES	: Aktivasyonu düzenlenmiş normal T lenfosit ekspresyonu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SH	: Sülfidril (tiol) grubu
TMB	: Tetrametilbenzidin
TCA 3	: T hücre aktivasyonu-3
TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
Th2	: Yardımcı T hücreleri 2
TLR4	: Toll benzeri reseptör
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptör
TNF-RI	: Tümör nekroz faktör reseptör 1
TNF-RII	: Tümör nekroz faktör reseptör 2
TRADD	: TNRF' ye bağlı ölüm bölgesi

TRAF2 : TNF reseptörü 2 ile ilişkili faktör

VCAM-1 : Vasküler adezyon molekülü



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sisplatin	3
2.1.1. Sisplatinin Moleküler Yapısı	3
2.1.2. Sisplatinin Hücresel Alımı	4
2.1.3. Sisplatin Aktivitesinin Biyokimyasal Mekanizmaları	6
2.1.4. Sisplatin Sitotoksitesi	8
2.1.5. Renal Hasar Oluşumunda Enflamasyon	13
2.2. Hesperidin	16
2.2.1. Hesperidinin Kimyasal Yapısı	16
2.2.2. Hesperidinin Metabolizması	18
2.2.3. Hesperidinin Antienflamatuar Etkileri	19
2.3. IL-1 β	22
2.4. TNF- α	23
3. MATERYAL VE METOT	26
3.1. Materyal	26
3.1.1. Vero Hücre Kültürünün Hazırlanması	26
3.1.2. Deneme Grupları	26
3.2. Metot	26
3.2.1. Sisplatinin Nefrotoksik Dozunun Belirlenmesi	26
3.2.2. Hesperidinin Nonsitotoksik Dozunun Belirlenmesi	27
3.2.3. Hücre Sayım Testi	27
3.2.4. ELISA Analizleri	27
3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme	29
4. BULGULAR	30
4.1. Hesperidinin Farklı Sulandırmalarına Ait Sitotoksite Testi Sonuçları	30
4.2. 1 β Düzeylerine İlişkin Bulgular	31

4.3. TNF- α düzeylerine ilişkin bulgular	32
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR	37
ÖZGEÇMİŞ	48



1. GİRİŞ

Sisplatin (cis diamminedichloroplatinum (II), cis- [PtCl₂(NH₃)₂], inorganik bir platin bileşiği olup akciğer, beyin, yumurtalık, serviks ve testis kanserlerinin tedavisinde kemoterapötik olarak kullanılmaktadır (Rose ve ark., 1999; Turrisi ve ark., 1999; Cooper ve ark., 2004). Sisplatin tedavisinin en sık rapor edilen yan etkileri nefrotoksisitedir (Gonzales-Vitale ve ark., 1977; Laurent ve ark., 1988; MacLeod ve ark., 1988; Gomez ve ark., 1986; Hamilton ve ark., 1989; Arany ve Safirstein, 2003; Gao ve ark., 2013). Sisplatin maruziyetinin en önemli renal etkisi proksimal tübül hasardır (Lieberthal ve ark., 1996). Proksimal tübül hücrelerinde metabolize olan sisplatinin nefrotoksiteye neden olduğu gösterilmiştir (Townsend ve ark., 2003). Sisplatin kaynaklı nefrotoksisitenin oluşumunda enflamasyon, tübül hücre toksisitesi, reaktif ara maddeler ve apoptoz ile ilişkili mekanizmaların rol oynadığı öne sürülmüştür (Lieberthal ve ark., 1996; Kaushal ve ark., 2001; Ramesh ve Reeves, 2002; Tsuruya ve ark., 2003; Faubel ve ark., 2007).

Hesperidin (5,7,3'-trihidroksi-4'-metoksiflavonon 7-ramno glikozid), narenciyelerde bulunan polimetoksi flavonondur (Emim ve ark., 1994; Mouly ve ark., 1998; Kawaii ve ark., 1999; Erlund ve ark., 2001; Garg ve ark., 2001; Ernavita ve ark., 2017). Araştırmalar, hesperidin güçlü antiinflamatuvar etki gösterdiğini ortaya koymaktadır (Galati ve ark., 1994; Yeh ve ark., 2007; Nizamutdinova ve ark., 2008; Jain ve Parmar, 2011; Milenkovic ve ark., 2011; Yamamoto ve ark., 2013; Parhiz ve ark., 2015). İki hafta boyunca oral hesperidin uygulanan farelerden elde edilen makrofaj kültürüne lipopolisakkarit uygulamasıyla oluşturulan enflamasyon modelinde, hesperidin'in IL-10, IL-12 ve TNF- α düzeylerini düşürerek lipopolisakkaritle oluşturulan enflamasyon üzerinde baskılayıcı etki gösterdiği ileri sürülmüştür (Zanotti Simoes Dourado ve ark., 2013). Hesperidin fare makrofaj hücre hattında lipopolisakkaritle uyarılan siklooksijenaz artışını baskılayarak antiinflamatuvar etki gösterdiği anlaşılmıştır (Sakata ve ark., 2003). Farelerde ovalbumin ile oluşturulan alerjik astım modelinde hesperidin uygulamasının bronkoalveolar sıvıdaki enflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve Th2 sitokin düzeyini önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (Wei ve ark., 2012). Bu bilimsel araştırmaların ışığında, hesperidin uygulamasının, sisplatinden kaynaklanan nefrotoksisitenin önlenmesinde ve/veya hafifletilmesinde yararlı olabileceği düşünülmek

tedir. Sunulan tez projesinin amacı, hesperidinin *in vitro* böbrek hücre hasarı modelinde enflamasyon üzerindeki olası koruyucu etkisini değerlendirmektir.

Hesperidinin sitokin salınımını baskılayarak antienflamatuar etki gösterdiği bilinmekle birlikte, böbrek hücre hasarı modelinde, antienflamatuar ve proenflamatuar sitokin protein düzeyleri üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Bu proje ile hesperidinin sisplatinle oluşturulan böbrek hücre hasarının *in vitro* modelinde enflamasyon üzerindeki etkisi belirlendi. Bu kapsamda, başlıca proenflamatuar sitokinler olan IL-1 β ve TNF- α düzeylerinin hücre mediumlarında analizi gerçekleştirildi. Hesperidinin, Vero hücrelerinde sisplatinin neden olduğu enflamasyonu IL-1 β ve TNF- α düzeylerini azaltarak baskıladığı belirlendi. Projeden elde edilen bulguların, kemoterapötik olarak kullanılan sisplatinle bağlı gelişen böbrek hücre hasarının önlenmesinde ve/veya hafifletilmesinde hesperidin gibi antienflamatuar flavonoidlerin kullanımı konusunda yapılacak bilimsel çalışmalara katkı sağlayabileceği öngörülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

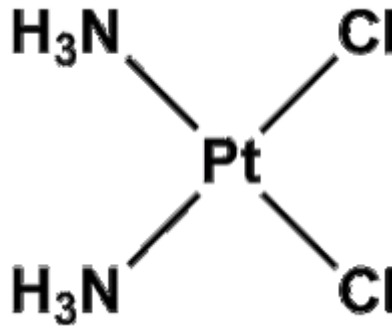
2.1. Sisplatin

Günümüzde kanser ilaçları içinde yer alan sisplatin, baş-boyun (Oosting ve ark., 2016; Chen ve ark., 2017; Szturz ve ark., 2018), testis (Amidi ve ark., 2017), ovaryum (Lee ve ark., 2018) ve akciğer (Li ve ark., 2017) gibi birçok organda meydana gelen kanser türlerinin tedavisinde kullanılan etkili bir ajandır.

Rossenber ve çalışma ark. (1965), 1960'lı yıllarda elektromanyetik radyasyon uygulamasının *Escherichia Coli* ve memeli hücrelerinin bölünmesi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, platin elektrotlarının bulunduğu büyüme alanında bakterinin normalden 300 kat daha uzun olan filamanlara sahip olduğunu gözlemlemişler ve bu etkinin elektromanyetik alandan değil platin elektrotlarından ortaya çıkan elektroliz ürünlerinden kaynaklandığını saptamışlardır. Detaylı kimyasal analiz sonucunda bu biyolojik etkiye yol açan bileşenin ilk olarak 1845 yılında Peyron tarafından sentezlenip tanımlanan ve Peyron kloridi olarak da bilinen ve sonradan sisplatin adını alan platinin nötral bir *sis* izomeri olduğu anlaşılmıştır (Rossenber ve ark., 1967). Rosenberg ve ark. (1969), sarkomlu bir farede intraperitoneal sisplatin uygulaması ile tümör boyutunda belirgin gerileme olduğunu rapor etmişlerdir. Tümöral büyümenin baskılanmasında kullanılan sisplatin 1978 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu'ndan onay almıştır (Kelland, 2007).

2.1.1. Sisplatinin Moleküler Yapısı

Sisplatin, divalen, inorganik, suda çözünen platinum içeren bir komplekstir. Moleküler yapısı, *sis* yapılandırmanın içinde, merkezde iki klor iyonu ile çevrili platin atomu ve iki amonyak grubundan oluşmaktadır (Şekil 1) (Tablo 1) (Page ve ark., 1985).



Şekil 1. Sisplatinin moleküler yapısı (Bertram'dan, 2001)

Tablo 1. Sisplatinin kimyasal özellikleri

Kimyasal İsim	Cis-diaminodikloroplatinum
Moleküler Formül	$C_{12}H_6N_2Pt$
Moleküler ağırlık	301.1 g/mol
Renk	Koyu sarı kristal toz/berrak çözelti
Suda çözünürlük	2.53 g/L (25°C 'de)
Erime Noktası	270 °C

2.1.2. Sisplatinin Hücresel Alımı

İntravenöz enjeksiyondan bir saat sonra sisplatin, karaciğer, böbrek, deri ve kaslarda birikmektedir. Yüksek dozlarda verildiğinde sisplatin birikimi karaciğer ve böbreklerde bir haftadan daha uzun süre kalabilmektedir. Sisplatin konsantrasyonu, uterus ve yumurtalıklar gibi anti neoplastik aktivitelerini uygulayabileceği dokularda daha yüksek olma eğilimindedir (Litterst ve ark., 1976).

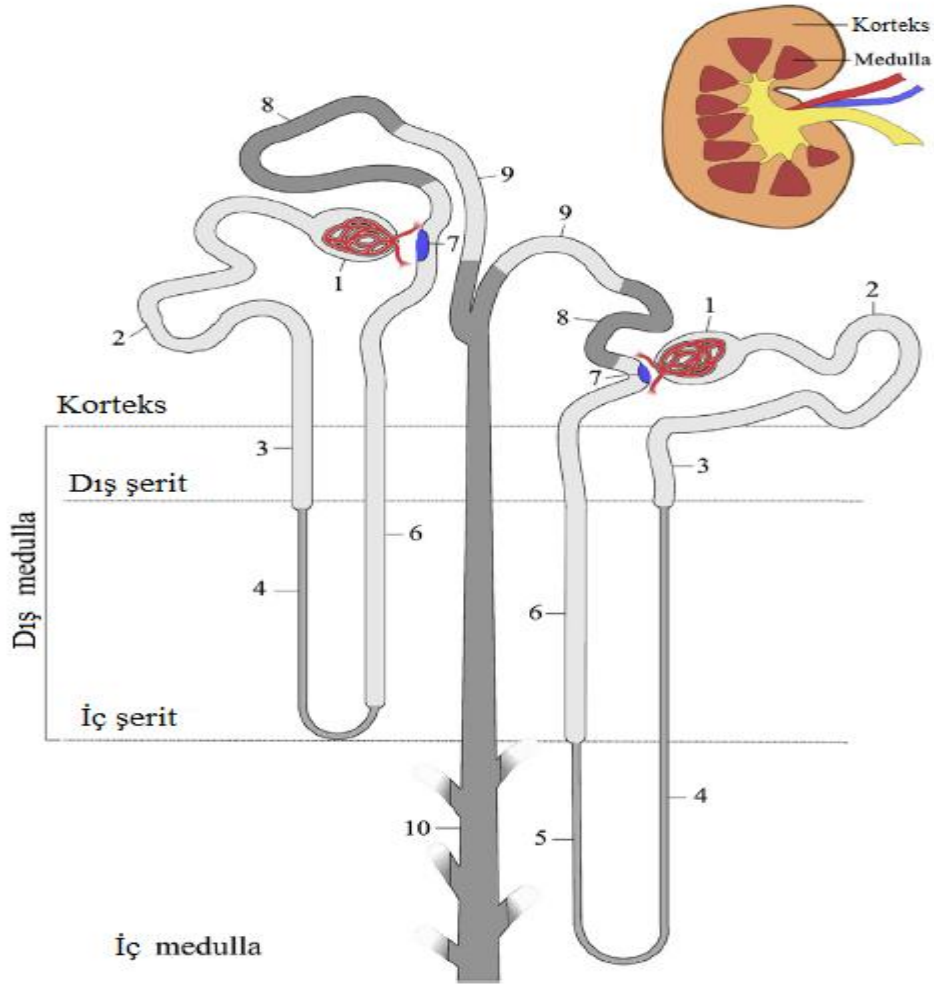
Sisplatin damar içi uygulamasından sonra %90 oranında plazma proteinlerine bağlanmaktadır. Dolaşımdan sisplatinin uzaklaşması ise iki fazlı bir seyir göstermektedir. İlk fazda, sisplatinin damar içi uygulanmasını takiben başlangıç yarı ömrü 25-49 dakika, ikinci fazda ise yarı ömrü 58-73 saattir. Uygulamadan sonraki ilk beş günde ise ürünün sadece %27-45'lik kısmı değişmeden atılmaktadır (DeConti ve ark., 1973).

Sisplatinin hücre içine girişi çeşitli yollar ile gerçekleşmektedir. Bunlardan ilki pasif difüzyon olarak belirlenmiş fakat günümüzde aktif transport sistemi tümör direnciyle ilişkili bulunmuştur. Sisplatin nefrotoksitesisi ile ilişkili olan kolaylaştırılmış transport sisteminin, organik katyon taşıyıcısı (OCT2) ve son zamanlarda da bakır taşıyıcısı (CTR1) aracılığı ile olduğu çalışmalar ile gösterilmiştir (Gately ve Howell, 1993; Ishida ve ark., 2002; Holzer ve ark., 2004; Ludwig ve ark., 2004; Pabla ve ark., 2009).

Bu transport mekanizması elektriksel, voltaj bağımlı, çift yönlü, pH ve sodyumdan bağımsız bir mekanizmadır. OCT'nin 3 tipi bulunmaktadır. OCT-1 karaciğerde, OCT-2 böbrekte ve OCT-3 plasentada bulunmaktadır. OCT-1 sisplatin

transportu yapmamakta ve bu durum sisplatinin organa spesifik toksisitesini göstermektedir. Diğer sisplatin analogları karboplatin ve oksaliplatin OCT-2 ile taşınmamakta ve bu durum da bu ajanların daha az nefrotoksik olmasını açıklamaktadır (Gorboulev ve ark., 1997; Ciarimboli ve ark., 2005).

Böbrek dokusunda biriken aşırı sisplatin nefrotoksositeye neden olmaktadır. Sisplatin en fazla oranda proksimal tübülün S3 segmentinde birikmektedir. Bunu sırasıyla distal toplayıcı tübül ve proksimal tübülün S1 segmenti izlemektedir (Şekil 2) (Kröning ve ark., 2000).



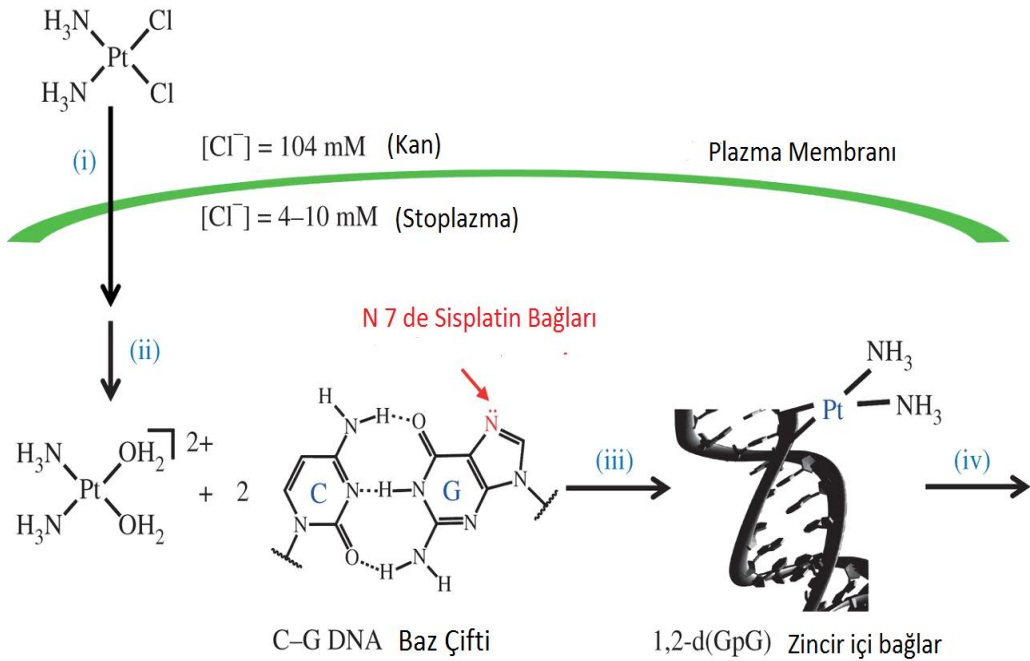
Şekil 2. Nefronların şematik gösterimi, böbreğin fonksiyonel birimleri. Korteks, dış medullada iç ve dış şerit ve iç medulla kesik çizgilerle ayrılmıştır. Sayılar farklı tübüler segmentleri göstermektedir: (1) renal korpus, (2) proksimal kıvrık tübül, (3) proksimal düz tübül, (4) ince inen kol, (5) ince çıkan kol (6) kalın çıkan kol, (7) makula densa, (8) distal kıvrımlı tübül, (9) bağlantı tübülü ve (10) toplama kanalı. İsimlendirme böbrek oluşumu için standart terminolojiye dayanmaktadır (Kırız ve Bankır, 1988)

Erdemli ve ark. (1999), cisplatinin, hücre siklusuna özgü olmaksızın DNA sentezini baskılayarak sitotoksik etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada aynı zamanda tedavi dozunda cisplatinin histopatolojik olarak böbreklerde başlıca korteks - dış medulla bölgesindeki proksimal tüp epitelini, daha az oranda distal tüpleri etkilediği de anlaşılmıştır.

2.1.3. Cisplatin Aktivitesinin Biyokimyasal Mekanizmaları

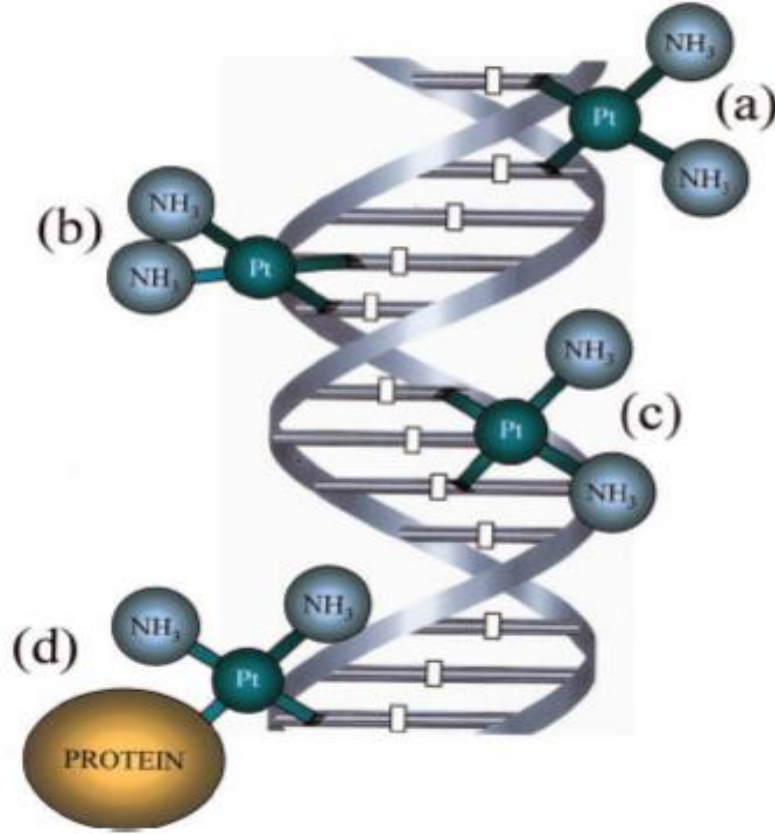
Hücre içinde %10 kadarı genomik DNA'ya bağlanan cisplatinin geri kalanı proteinlere ve diğer hücre yapısına bağlanmaktadır (Akaboshi ve ark., 1994).

Cisplatin reaktivitesi bulunduğu ortamdaki Cl konsantrasyonuna göre değişmektedir. Ekstrasellüler ortam ve kandaki Cl konsantrasyonu yaklaşık 100 mM'dür ve cisplatin bu ortamlarda göreceli daha az aktiftir. Cisplatinin reaktivitesi hücre içinde bu oran daha düşük olduğu için artmaktadır. Bu ortamda cisplatin Cl iyonları ayrılmakta ve yerine su molekülleri bağlanmaktadır. Su molekülleri Cl iyonundan daha kolay ayrılabilirdiği için bunların yerine nükleofilik gruplar bağlanmaktadır (Şekil 3) (Jamieson ve Lippard, 1999).



Şekil 3. Cisplatin'in etki mekanizması (i) Hüresel alım, (ii) Hidratlama / aktivasyon, (iii) DNA platenasyonu ve (iv) apoptozaya yol açan hüresel süreç (Johnstone ve ark.'dan, 2015)

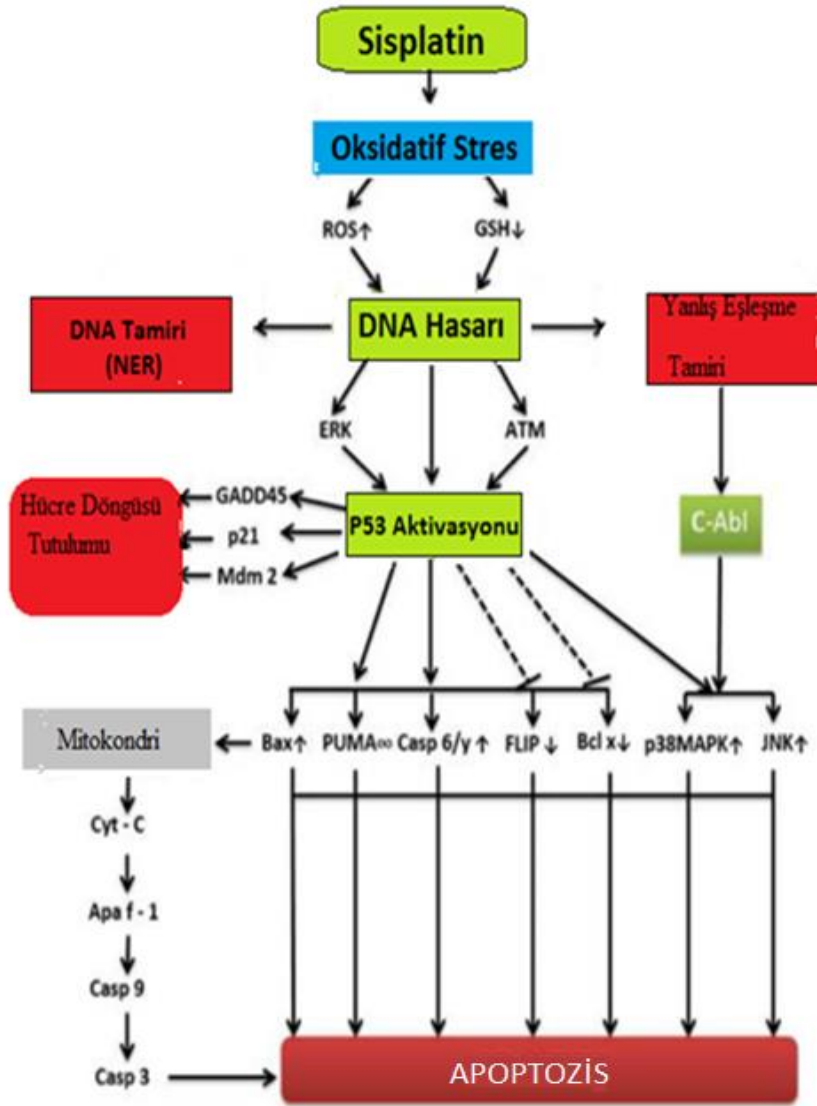
Sisplatin, DNA ile etkileşerek, zincir içi ile zincirler arasında ve en fazla da aynı DNA zincirindeki komşu guaninler arasında çapraz bağ oluşturmaktadır. Bu bağlar, DNA'nın transkripsiyon ve replikasyonunu inhibe etmektedir (Şekil 4). Ortaya çıkan DNA hasarı apoptozisi başlatmakta ve daha az bir oranda protein ve RNA sentezini de inhibe etmektedir. Sisplatin ayrıca, hücre mitokondirisine zarar vermekte, ATPaz aktivitesini inhibe etmekte, hücreyi G2 fazında hapsetmekte ve hücrel transport sistemini baskılamaktadır (Parker ve ark., 1991; Pabla ve Dong, 2008).



Şekil 4. DNA-sisplatin zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar (a) zincirler arası çapraz bağ (b) , 1,2-zincir içi çapraz bağ (c), 1,3-zincir içi çapraz bağlanma (d), protein-DNA çapraz bağ (Gonzalez ve ark.'dan, 2001)

Sisplatin nefrotoksisitesinde diğer bir yolda intraselüler “mitojen-aktive protein kinaz” (MAPK) sinyal yolağı olup bu yolak hücre proliferasyonunu, diferansiasyonunu ve sağ kalım süresini belirlemektedir. Başlıca 3 MAPK yolağı bulunmakta ve bu yolaklar 1; “ekstraselüler regulated kinase” (ERK), 2; p38 ve 3; “Jun N-terminal kinase/stres-activated protein kinaz” (JNK/SAPK) enzimlerinde sonlanır. Sisplatinin böbrekte her üç yolağı da aktive ettiği invivo ve invitro çalışmalar olarak gösterilmiştir. ERK ve p38

“tümör nekroz faktör- α ” (TNF- α)’yı aktive eder. ERK ise kaspaz 3’ü aktive ederek tübüler apoptozu tetiklemektedir (Şekil 5) (Arany ve ark., 2004; Jo ve ark., 2005; Ramesh ve Reeves, 2005).

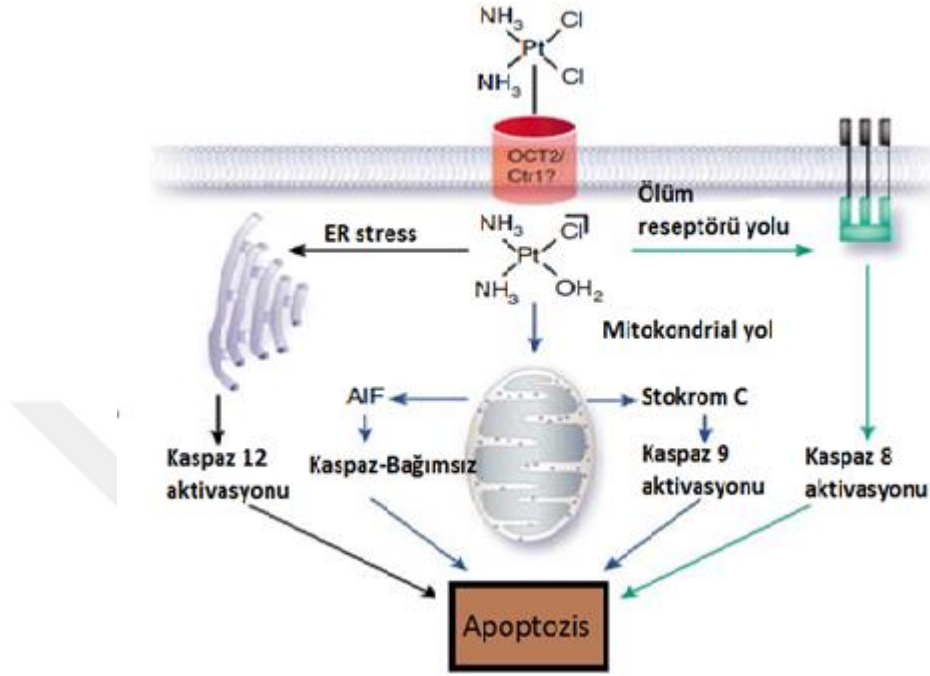


Şekil 5. Kanser tedavisinde moleküler mekanizmalara genel bakış (Dasari ve Tchounwou'dan, 2014)

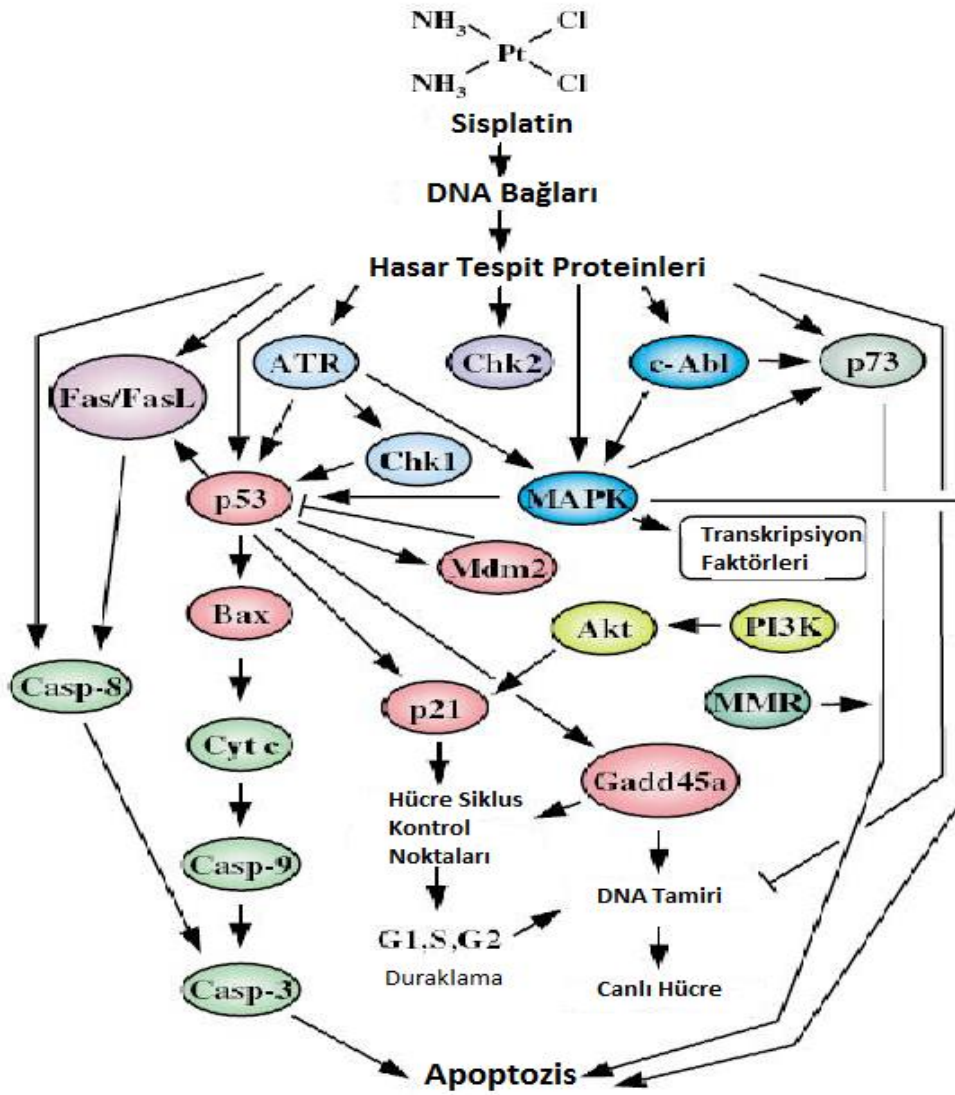
2.1.4. Sisplatin Sitotoksitesi

Sisplatinin sitotoksik etkilerini, nükleer DNA'ya bağlanıp transkripsiyon ve DNA replikasyonunu bozarak ve çeşitli sinyal iletim yollarını aktive ederek sağladığı ifade edilmektedir. Sisplatin hücre mitokondrisine zarar vermekte, hücre siklusunu duraklatmakta, ATPaz aktivitesini engellemekte, hücresel transport sistemlerini

değiştirmekte ve sonuç olarak apoptoz, enflamasyon, nekroz ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Şekil 6) (Şekil 7) (Kelland, 2007).



Şekil 6. Renaltübüler hücrelerde sisplatine bağı gelişen apoptotik yollar (Boulikas ve Vougiouka, 2003)

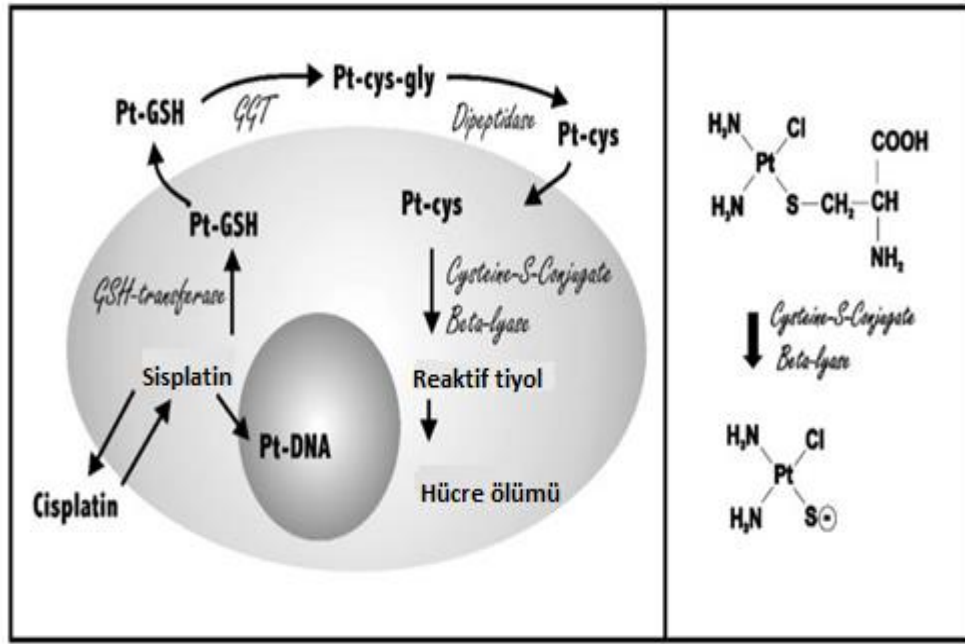


Şekil 7. Hücrede sisplatine bağlı gelişen apoptoz ve apoptotik yolların tümü (Siddik'dan , 2003)

Kanser hücreleri sisplatine maruz kaldığında, sisplatin içindeki platin atomu glutatyon (GSH) tarafından şelatlanmakta ve glutatyon-Pt kompleksi, GSH-X pompaları olarak adlandırılan glutatyon taşıyıcı ailesi tarafından ATP'ye bağlı bir şekilde hücreden dışarı aktılmaktadır (Ishikawa ve Ali Osman, 1993).

Sisplatin toksisitesinde gama glutamin transpeptidaz (GGTP) enziminin önemli rolü bulunmaktadır. GGTP ekstrasellüler GSH'ü glutamik asit ve sistein-glisin'e ayırmaktadır. Diaminopeptidaz sistein-glisini, sistein ve glisin olarak parçalamaktadır. Bu şekilde, hücre dışı GSH kendini oluşturan aminoasitlere ayrılmakta ve GGTP hücreye sistein kaynağı sunmuş olmaktadır. Ayrılan bu aminoasitlerin bir kısmı tekrar hücre içine

alınmakta ve hücreye alınan aminoasitler ile GSH hücre içinde yeniden sentezlenmektedir. Sisplatin, glutatyon-S-transferaz (GST) varlığında GSH ile birleşmekte Pt-GSH konjugatı oluşmaktadır. Oluşan Pt-GSH konjugatları oldukça kararsız yapıda olup, GGTP tarafından hücre dışında Pt-sistein-glisin konjugatlarına metabolize olmaktadır. Hücre içine alınan Pt-Sistein konjugatı, beta liyazlar aracılığı ile reaktif tiyollere dönüşmektedir. Oluşan reaktif tiyoller, hücre ölümüne yol açabilmektedir (Şekil 8) (Hanigan ve Devarajan, 2003; Sabuncuoglu ve Ozgunes, 2010).



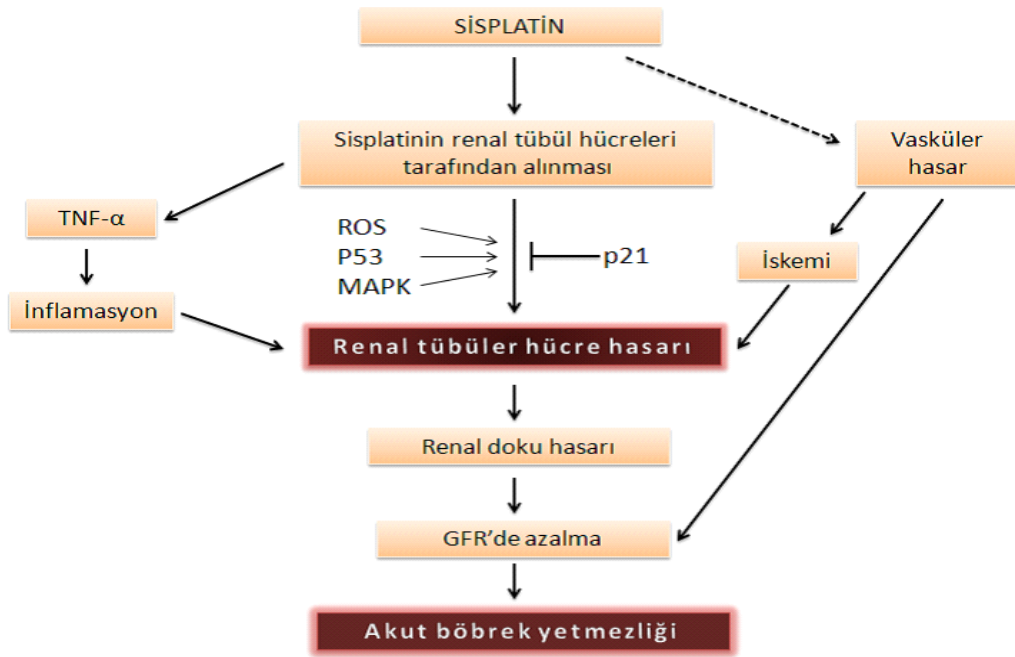
Şekil 8. Sisplatinin nefrotoksine dönüşüm metabolizması (Zhang ve ark.'dan, 2003)

Sisplatin, sitokrom P-450, GSH, GSH S-transferaz, GSH redüktaz ve GSH peroksidaz aktivitelerinde azalma ve böbrek kortikal mikrozomlarında ve sitozolik fraksiyonlarda N-glukuronil transferaz, lipid peroksidasyon ve oksitlenmiş glutatyonda (GSSG) artışa neden olmaktadır. Sisplatin nefrotoksitesinin, birkaç enzim ve SH içeren bileşiklerin SH grupları için afinitesi ile açıklanabileceği belirtilmiştir. Bunlar arasında GSH ve bununla ilgili enzimatik sistemi birincil rol oynamaktadır. Dahası, sisplatin, sisplatin nefrotoksitesine katılabilecek lipid peroksidasyonunu artırmakta, sitoplazmada önemli enzim sistemlerinin aktivitelerinin azalmasına neden olmaktadır (Bompart, 1989).

Hücrel hasarın büyüklüğü, hücrel reaktif SH grubuna bağlı olup hücrel GSH'nin bozulması sisplatin toksitesini artırmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda SH

grubu veya SH indirgeyici ajan uygulamasının, sispaltine bağılı hasarı (*in vivo* ve *in vitro*) önleyebileceği ileri sürülmüştür (Kuhlmann ve ark., 1997).

Sisplatin pasif ve / veya kolaylaştırılmış mekanizmalarla böbrek hücrelerine girmektedir. Tübül hücrelerinin sispaltin'e maruz kalması, hücre ölümünü teşvik (MAPK, p53, ROS ve benzeri) veya sitoprotektif (p21) sinyal yollarını aktive etmektedir. Bu arada, sispaltin, tübüler hücrelerde TNF- α üretimini tetiklemekte ve bu da güçlü bir enflamatuvar yanıtı neden olmaktadır. Bunun sonucunda da tübül şeklinde hücre hasarına ve ölüme katkıda bulunmaktadır. Sisplatin aynı zamanda renal vaskülatürde yaralanmaya yol açmakta, böylelikle iskemik tübüler hücre ölümüne ve glomerüler filtrasyon hızında azalmaya (GFR) neden olmaktadır. Tüm bu patolojik süreç akut böbrek yetmezliği ile sonuçlanmaktadır (Şekil 9) (Pabla ve Dong, 2008).



Şekil 9. Sisplatin nefrotoksisitesinde patofizyolojik olaylar (Pabla ve Dong'dan, 2008)

Böbrek tutulumunun erken safhalarında histolojik olarak özellikle distal ve toplayıcı tübülleri etkileyen, tübüllerde dilatasyon ve tortu oluşumu ile giden fokal akut tübüler nekroz oluşmaktadır (Dentino ve ark., 1978). Proksimal tübüllerde ise özellikle S3 segmentinde doza bağımlı nefrotoksisite görülmektedir (Tablo 2). Sisplatin kullanımı sırasında gelişen akut böbrek yetmezliği idrar konsantrasyon yeteneğinin erkenden bozulmasına bağılı non-oligüriktir ve özellikle proksimal tübül hasarına bağılı elektrolit

bozuklukları sık görülmektedir. En sık görülen elektrolit bozuklukları ise hipomagnezemi, hipokalsemi ve hipokalemi olmaktadır (Dentino ve ark., 1978; Weatherall ve ark., 1996).

Tablo 2. Sisplatin kullanımına bağlı gelişebilen nefrotoksisite tipleri (Eren ve ark.'dan, 2012)

Sisplatin kullanımına bağlı gelişebilen nefrotoksisite tipleri	Akut böbrek yetmezliği Hipomagnezemi Fanconi benzeri sendrom Distalrenal tübüler asidoz Hipokalsemi Hiperürisemi Renal konsantrasyon defektleri Geçici proteinüri Eritropoetin eksikliği Trombotik mikroanjyopati Kronik böbrek yetmezliği
--	--

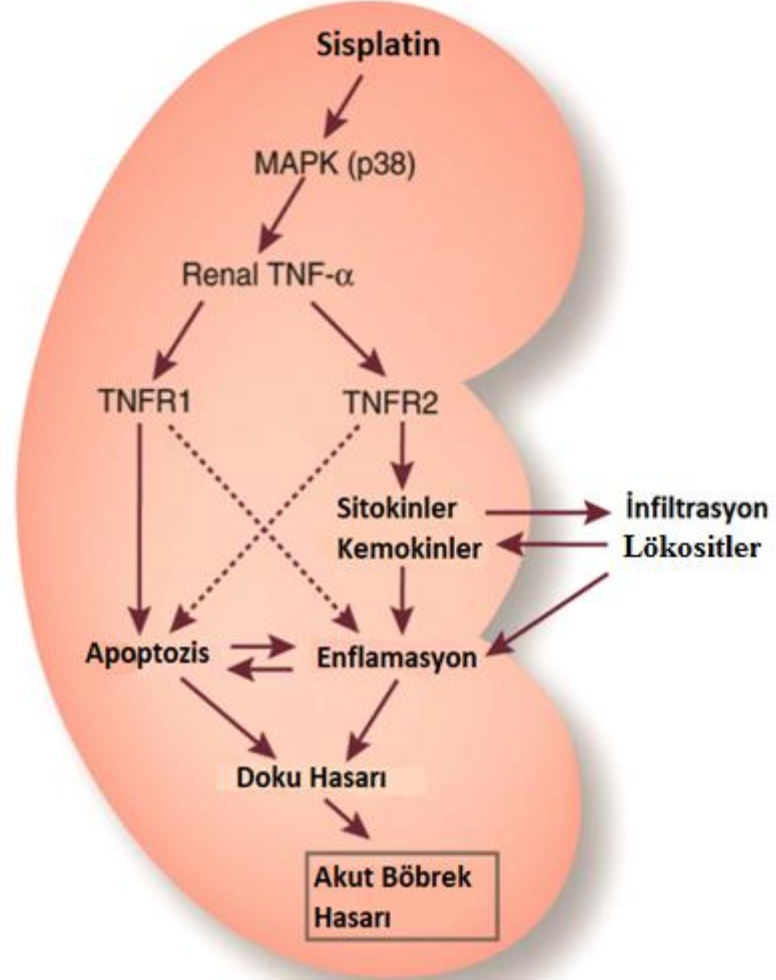
Sisplatinin böbrek ve karaciğer dokuları üzerinde güçlü bir toksik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Basol ve ark., 2018). Nörotoksisite ise başlıca periferik sinirlerde meydana gelen semptomlar, parestezi ve ciddi nevralji olarak ortaya çıkar (Ozols ve Young, 1985).

Genomik DNA genel olarak sisplatin ile indüklenen sitotoksisitenin kritik farmakolojik hedefi olarak kabul edilmesine rağmen, diğer hücrel hedeflerin ilacın sitotoksisitesine de dahil olabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Böylece, sisplatin mitokondriyal DNA'ya bağlanmakta, membranlardaki fosfolipitler ve fosfatidilserin ile etkileşmekte, sitoskeletonu bozmakta ve aktinin polimerizasyonunu etkilemektedir (Jamieson ve Lippard, 1999).

2.1.5. Renal Hasar Oluşumunda Enflamasyon

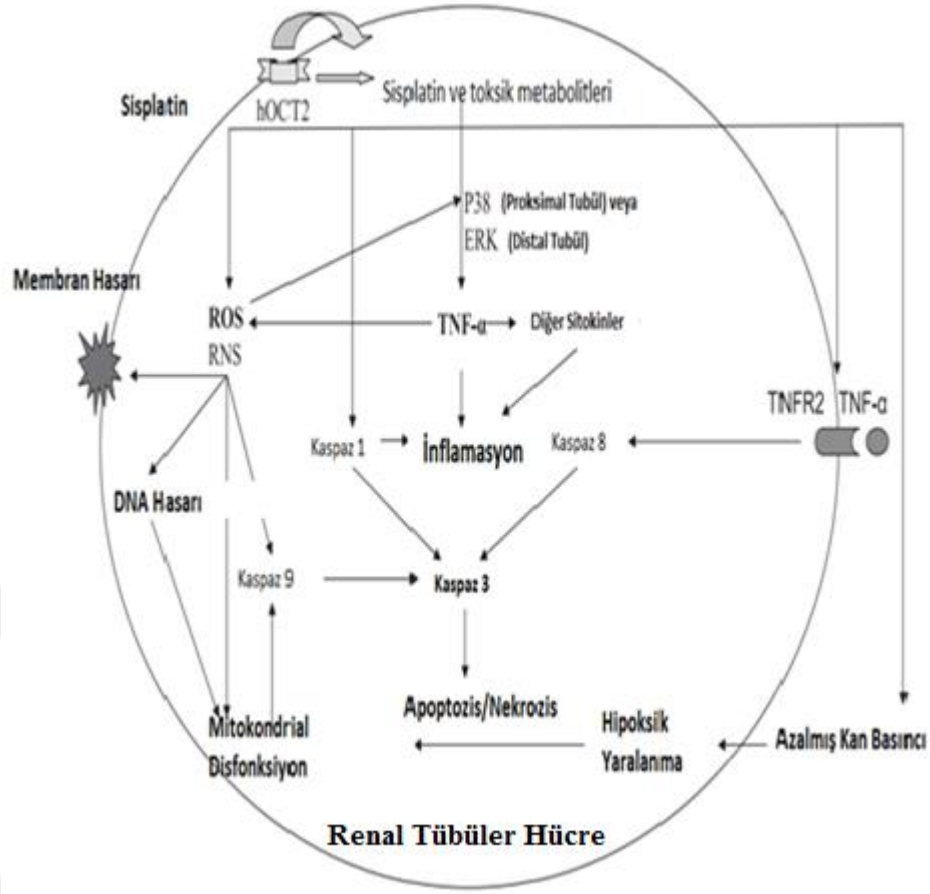
Sisplatinin indüklediği böbrek hasarı oluşumunda enflamasyonun önemli bir rolü bulunmaktadır. Sisplatin, zaman bağımlı bir etki ile inhibitör κ B (I κ B) yıkımını ve nükleer faktör- κ B (NF- κ B) nin bağlanma aktivitesini artırmaktadır. Bu olaylar renal TNF- α aktivitesini artırmaktadır (Şekil 11). TNF- α renal hasar oluşumunda merkezi bir role sahiptir. Apoptozu indüklemekte, reaktif oksijen metabolitlerinin oluşumuna neden

olmakta, kemokin ve sitokinler arasındaki yolları koordineli bir şekilde aktive etmektedir (Şekil 10) (Ramesh ve Reeves, 2004).



Şekil 10. Siplatin ile indüklenmiş akut böbrek hasarında TNF-α ilişkisini ve üretimini gösteren şematik diyagram (MAPK, mitojen aktif protein kinaz; TNFR, TNF-α reseptörü) (Dong ve Atherton'dan, 2007)

Siplatine maruz bırakılmış farelerin böbreklerindeki TNF-α, TGF-β, RANTES, MIP-2, MCP-1, TCA3, IL-1β ve ICAM-1' ekspresyonunun önemli oranda yükseldiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte, serum, böbrek ve idrarda TNF-α düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın bulguları, siplatin nefrotoksitesinin proenflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin aktivasyonu ile karakterize olduğunu göstermektedir. TNF-α, bu sitokin cevabının aktivasyonunda ve aynı zamanda siplatin böbrek hasarının patogenezinde merkezi bir rol oynamaktadır (Şekil 11) (Ramesh ve Reeves, 2002).



Şekil 11. Sisplatin'e bağlı akut tübüler hücre hasarında yer alan başlıca yollar (Yao ve ark.'dan, 2007)

Sisplatin, etkilenen tübüllerin etrafında makrofaj ve lenfosit infiltrasyonu ile fibrozisi de indüklemektedir (Yamate ve ark., 2002). TNF- α 'sı eksik farelerin sisplatin nefrotoksisitesinden büyük oranda korunduğu gözlenmiştir (Ramesh ve Reeves, 2002).

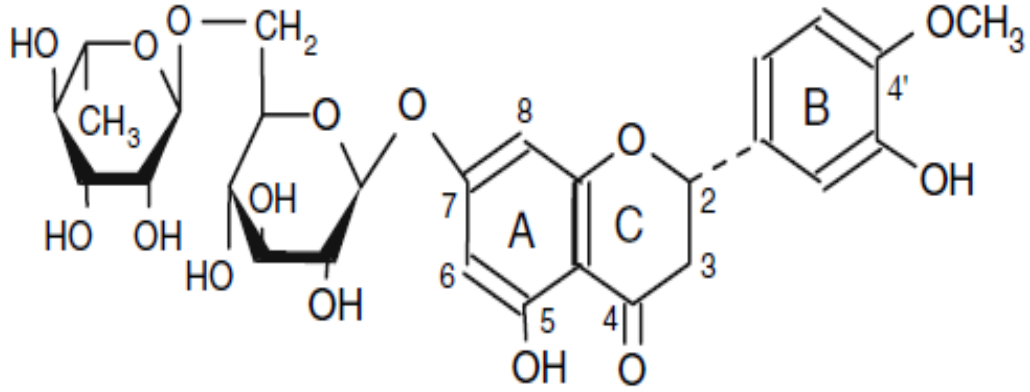
Farelere periton içi tek doz 20 mg/kg sisplatin enjeksiyonunun şiddetli akut böbrek yetmezliğine yol açtığı, TNF- α ve TGF- β up-regülasyonuna neden olduğu ve sisplatin nefrotoksisitesinin proenflamatuar sitokinlerin aktivasyonu ile karakterize olduğu ileri sürülmüştür (Ramesh ve Reeves, 2002). C57BL/6 farelere periton içi sisplatin uygulanmasından 72 saat sonra alınan böbrek dokusunda, TNF-reseptör-1 ve TNF-reseptör-2 mRNA ekspresyonlarının arttığı ve sisplatinle indüklenen böbrek hasarında TNF- α -aracılı enflamasyonun rol oynadığı rapor edilmiştir (Ramesh ve Reeves, 2004). Sisplatin kaynaklı böbrek tübüler hücre ölümünde TNF-reseptör-1 aracılı apoptotik yolların aktive olduğu saptanmıştır (Tsuruya ve ark., 2003).

2.2. Hesperidin

2.2.1. Hesperidin'in Kimyasal Yapısı

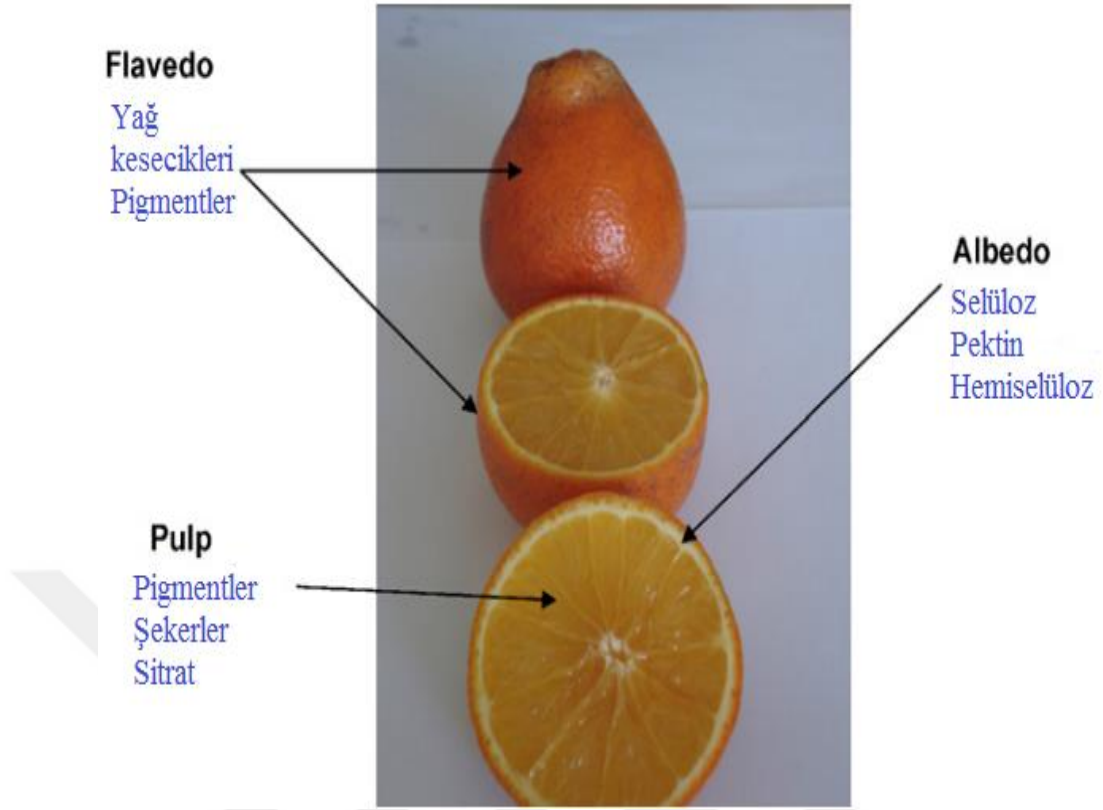
Hesperidin $C_{28}H_{34}O_{15}$ kapalı formülüne sahiptir. Molekül ağırlığı; 610,5606 g/mol, yoğunluğu; 1,65 g/cm³, erime noktası; 258-262°C ve kaynama noktası; 930,1 °C de 760 mmHg olup acı bir tada sahiptir (Garg ve ark., 2008; Mauludin ve Müller, 2013).

Hesperidin'in açık formülü Şekil 12'de sunulmuştur.



Şekil 12. Hesperidin (Etcheverry ve ark.'dan, 2008)

Hesperidin, ana kaynağı olan limon, portakal, mandalina gibi turunçgil ağaçlarının ürettiği meyve anlamına gelen "hesperidium" kelimesinden türetilmiştir. Hesperidin ilk defa 1828 yılında Fransız kimyacı Lebreton tarafından izole edilmiştir (Manthey ve Grohmann, 1998). Narenciye kabuklarında yüksek miktarlarda bulunmaktadır (Şekil 13). Mandalina kabuğunun kuru kütlelerinin %5-10'unun hesperidin içerdiği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2013).



Şekil 13. Turunçgil meyvesinin anatomisi (Ramful ve ark.'dan, 2010)

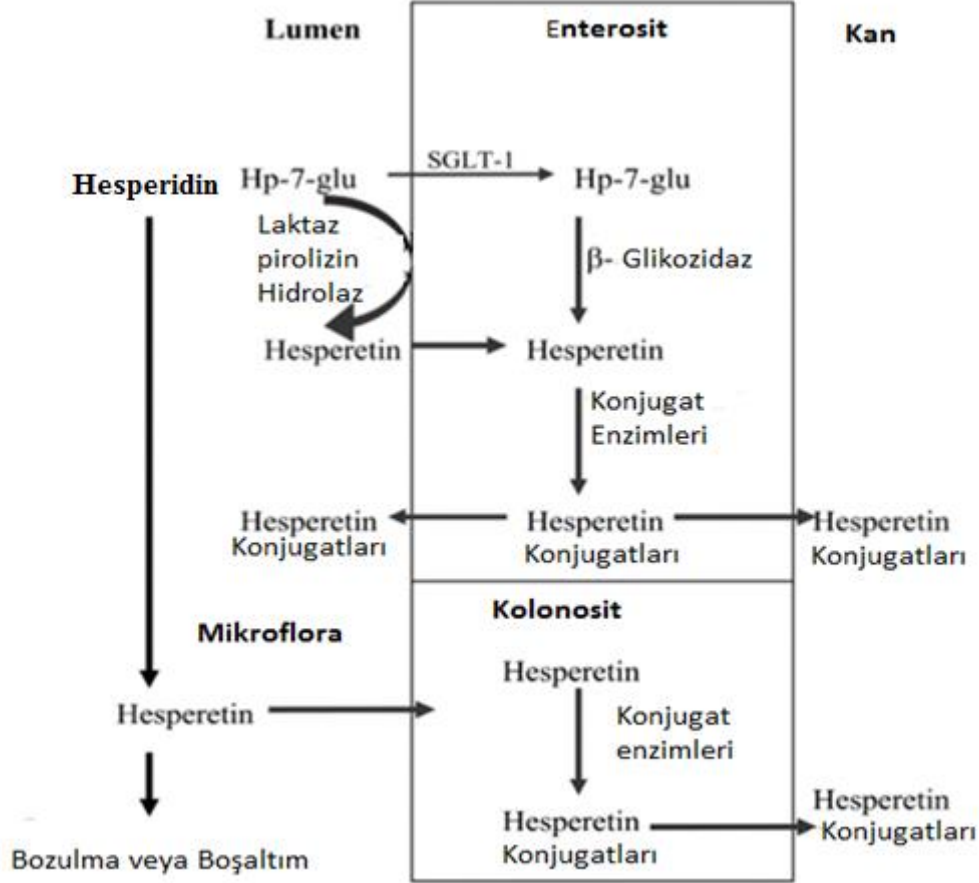
Hesperidin ve hesperetin çeşitli biyolojik aktiviteler göstermektedirler. Hesperidin vitamin-C benzeri aktiviteye sahip olup kapillar permeabiliteyi, sızıntı ve kırılabilirliği azaltabilmektedir. Aynı zamanda antioksidan, antiinflamatuvar, antikarsinojenik ve antialerjik özellik göstermektedir (Garg ve ark., 2001). Hesperidin mikro sirkülasyonu ve venöz tonu geliştirmekte, kan lipid düzeyini düşürmekte, venöz ülserlerin iyileşmesine yardımcı olmaktadır (El-Shafae ve El-Domiaty, 2001).

2.2.2. Hesperidin Metabolizması

Hesperidin bir aglikozid olarak barsaktan emilmektedir. Aglikon hesperetin alındıktan 3 saat sonra plazmada bulunmakta ve 5 ve 7. saatlerde pik düzeye ulaşmaktadır. Hesperetin sirkülasyon formu %87 glukuronid ve %13 sulfaglukuronidlerdir. Hesperidin alımından yaklaşık 24 saat sonra idrarla atılımı gerçekleşmekte ve bu atılım doza bağlı olmamaktadır (Manach ve ark., 2003).

Hesperidin, oral yol ile alındığında kolon tarafından hesperetine dönüştürülmekte ve daha sonra, proton-çiftli aktif nakil ve trans-sellüler pasif difüzyon yoluyla kolonosit tarafından absorbe edilmektedir. Hesperetin ve hesperetin-7-glukozit

incebağırsak enterositleri tarafından direkt olarak emilebilmektedir (Şekil 14) (Manach ve ark., 2003; Nielsen ve ark., 2006).



Şekil 14. Enterosit ve Kolonositlerde hesperidin ve hesperetin-7-glukozit emilimi (Nielsen ve ark.'dan, 2006)

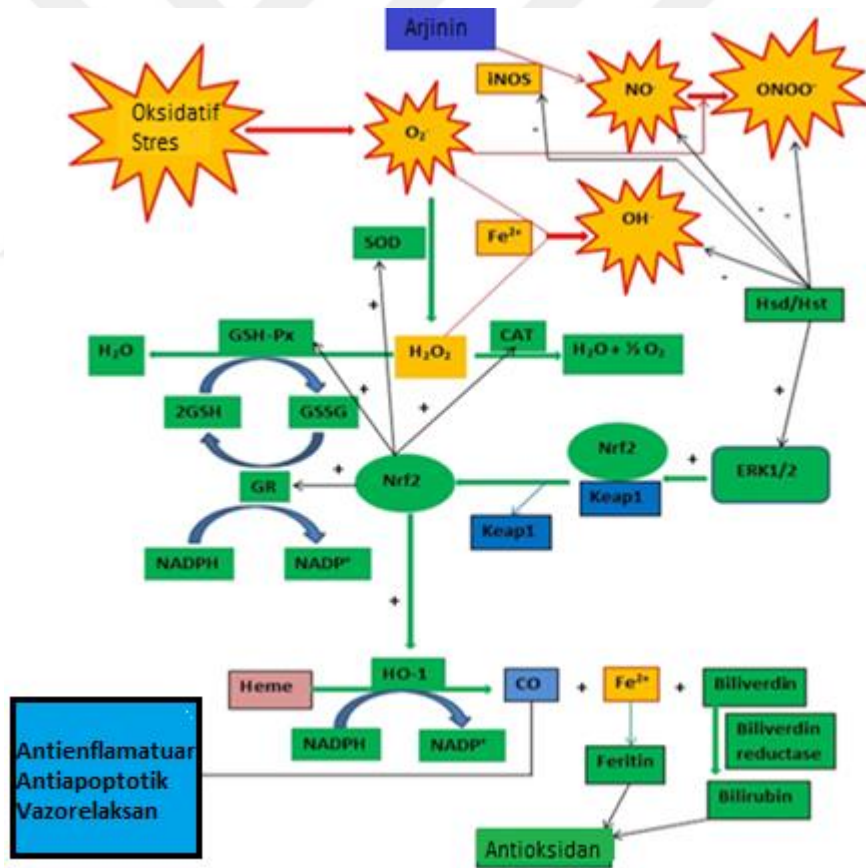
2.2.3. Hesperidin'in Antienflamatuvar Etkileri

Hesperidin'in CD-1 fare derisinde tümör promotörünün neden olduğu nötrofil in filtrasyonunu %73 oranında engelleyerek enflamasyona karşı koruyucu olduğu rapor edilmiştir (Koyuncu ve ark., 1999).

Sıçan hava kesesi iltihabı modelinde hesperidin uygulamasının, eksüdat lipit peroksidasyonu, indirgenmiş glutatyon, TNF- α , katalaz, lökosit ve nötrofil, doku ödemi ve enflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ile birlikte artış gösteren tüm değişikliklerin normalize olmasını sağladığı bildirilmiştir (Jain ve Parmar, 2011).

Metabolik sendromlu hastalarda hesperidin takviyesinin enflamatuar sitokinlerin dolaşımdaki konsantrasyonlarını azalttığı ve çözünebilir adezyon moleküllerini baskıladığı saptanmıştır (Rizza ve ark., 2011).

Hesperidinin, farelerde TNF- α , IL1 β ve IL-6 gibi proenflamatuar sitokinlerin inhibisyonu ve prostaglandinlerin ve enflamatuar yolağı bloke eden NF- κ B ve COX-II genlerinin transkripsiyonunun bastırılmasına bağlı olabilecek ağrı ve enflamatuar değişiklikleri baskıladığı, analjezik ve antienflamatuar etkiler gösterdiği rapor edilmiştir. (Vabeiryureilai ve ark., 2015). LPS ile indüklenmiş RAW 264,7 hücrelerinde hesperidin uygulamasının COX-2 geninin ekspresyonunu güçlü bir şekilde inhibe ettiği anlaşılmıştır (Hirata ve ark., 2005). LPS ile indüklenmiş RAW 264,7 modelinde 20 μ M ve 30 μ M dozlarında hesperidin takviyesinin NO₂ düzeyini azalttığı ve iNOS proteinin salınımını baskıladığı belirtilmiştir (Şekil 15) (Sakata ve ark., 2003).



Şekil 15. Hesperidin ve hesperetin antioksidan aktiviteleri için hücre bazda mekanizmaların gösterilmesi (+, düzenleyen / etkinleştiren; - inaktive eden / inhibe eden) (Parhiz ve ark.'dan, 2015)

Lee ve Kim (2010), hesperidin ve hesperetin NO ve COX-1 üzerinde önemli ölçüde etkisinin olmadığını ancak COX-2 üzerinde kuvvetli inhibitör etkisinin olduğunu belirtmişlerdir. Hirata ve ark. (2005), COX-2 gen salınımının 250 µM konsantrasyonlardaki hesperidin ve hesperetin tarafından inhibe edildiğini saptamışlardır. Bununla birlikte bazı araştırmalarda hesperidin küçük dozlarının COX-2 enzimleri üzerine etkisiz olduğu rapor edilmiştir (Lee ve ark., 2004).

LPS ile stimüle edilmiş makrofajların haricinde hesperidin ve metabolitleri sellüler model enflamasyonlarda da büyük antiinflamatuvar etki göstermektedirler (Nizamutdinova ve ark., 2008; Yamamoto ve ark., 2013).

Rat endotel hücrelerinde H₂O₂ maruziyetinin neden olduğu ICAM-1 ve MCP-1 artışının hesperidin ve Hesperetin-7-O-glukuronid ile tedavi sonrasında dikkate değer düzeyde azaldığı bildirilmiştir (Yamamoto ve ark., 2013).

İnsan mast hücreleri inflamatuvar sitokinlerin üretilmesi ve HIF-1a'yı aktive etmek için Forbol miristat asetat (PMA) ve kalsiyum ionofor A23187 ile stimüle edildi. Bu çalışma sonucunda IL-1β, IL-8, ve TNF-α üretiminin satsuma mandalina kabuk ekstraktı veya hesperidin uygulamasını takiben önemli derecede inhibe edildiği belirlenmiştir (Choi ve ark., 2007).

Adjuvant artrit rat modellerinde synovial membranın proliferasyonu ve bozulmanın ortak gelişmesinde TNF-α, IL-1β ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin artmış serum düzeyleri görülmektedir. Hesperidin aktive olmuş makrofajları azalttığına ve disfonksiyonel T-lenfositlerin fonksiyonlarını arttırdığına inanılmaktadır. Hesperidin ile tedavinin açık bir şekilde IL-1β ve TNF-α üretimini baskıladığı ve IL-10'nun da transkripsiyon düzeyinde üretimini artırdığı bilinmektedir (Li ve ark., 2008a; 2010b).

Lipopolisakkarit uygulamasıyla oluşturulan enflamasyon modelinde, hesperidin NO, IL-10, IL-12 ve TNF-α düzeylerini sırasıyla %56, %47, %29 ve %63 oranında düşürerek lipopolisakkarit ile makrofajlar üzerinde oluşturulan enflamasyonda baskılayıcı etki gösterdiği ifade edilmiştir (Dourado ve ark., 2013).

Farelerde ovalbumin ile oluşturulan alerjik astım modelinde hesperidin uygulamasının bronko alveolar sıvıdaki inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve Th2 sitokin düzeyini önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır (Wei ve ark., 2012). PSNL ile indüklenen mekanik ve termal hiperaljezideki hesperetin uygulaması, mekanik allodinin bulgularının

yanı sıra IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'nın aşağı regülasyonu ve biyokimyasal markırlarda doza bağı azalma ile sonuçlanmıştır (Aswar ve ark., 2014).

Ratlarda hesperetinin solunum ile ilgili akut akciğer hasarı üzerindeki koruyucu etkisinin araştırılması çalışmasında, hesperetin ile tedavinin, akciğer dokusunun histolojisini önemli ölçüde iyileştirdiği ve TNF- α , IL -6 ve IL-1 β ile bronko-alveolar yıkama sıvısında bulunan MIP-2 üretimini azalttığı gözlemlendi (Ma ve ark., 2015).

Şiddetli akut pankreatitis rat modelinde hesperidin uygulamasının TLR4/IRAK1/NF- κ B sinyal yolunun inhibisyonuna ve proenflamatuar sitokin ekspresyonlarının baskılanmasına yol açtığı rapor edilmiştir (Li ve ark., 2017).

Pinho-Ribeiro ve ark. (2015), hesperidin metil kalkanun mekanizmalı olarak, karagenan kaynaklı sitokin (TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve IL-10) üretimini, oksidatif stresi ve NF- κ B aktivasyonunu inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir.

Hesperidinin, TNF- α -indüklü VCAM-1 protein ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığı fakat ICAM-1 üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bu etkisini monositlerin endotele yapışmasını engelleyerek gerçekleştirdiği vurgulanmıştır (Nizamutdinova ve ark., 2008).

Li ve ark. (2013), sentezlenmiş hesperidin türevi DMH'nin (7,3'-dimetoksi Hst), büyük ölçüde TNF- α , IL-1 β , IL-6 'yı azalttığını tespit etmişlerdir.

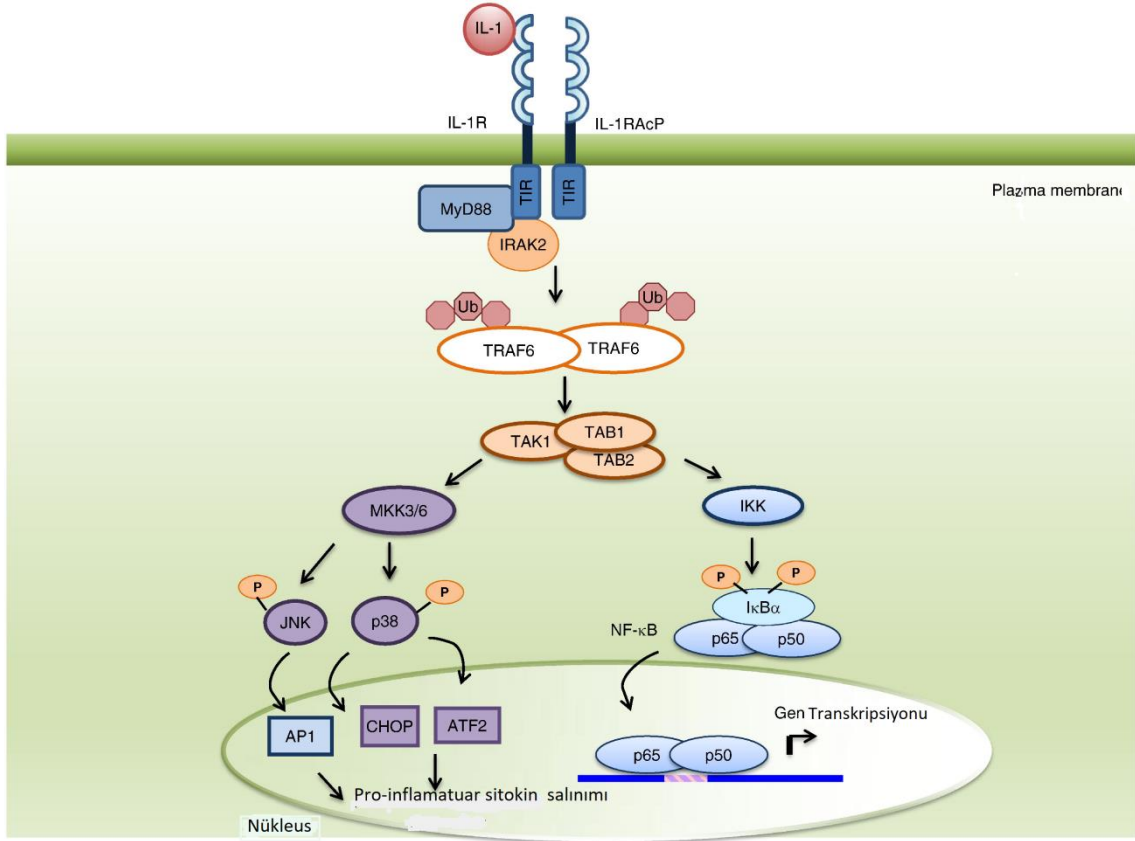
Ratlarda streptozotosin ile indüklenmiş diabetes mellitus üzerine yapılan bir çalışmada hesperidin ve kuersetin uygulamasının; insülin, total kolesterol, trigliserit, düşük dansiteli lipoprotein, kolesterol ve malondialdehit serum seviyelerini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Ayrıca hesperidin ve kuersetin ile tedavi edilen ratlarda, diabetes mellitus grubuna göre daha yüksek IL-6 ve TNF- α sitokin seviyeleri tespit edilmiştir (Dokumacıoğlu ve ark., 2018).

2.3. IL-1 β

IL-1 doğal ve kazanılmış immün sistemi aktive ederek konak defansında akut ve kronik enflamasyonu indükleyen birden çok etkisi olan bir proenflamatuar sitokindir. İnsanlarda IL-1 α , IL-1 β , IL-1 reseptör antagonisti ve IL-18'e ek olarak en az 11 adet IL-1 ailesi üyesi tanımlanmıştır (Thomson ve Lotze, 2003).

IL-1 β 'nın primer kaynağı kandaki monositler, doku makrofajları ve dendritik hücreler olup B lenfositler ve NK hücrelerden de salgılanmaktadır. Hemen hemen her mikrobiyal ürün toll benzeri reseptör aracılığıyla IL-1 β salınımını uyarabilmektedir

(Thomson ve Lotze, 2003). Normal olarak IL-1 β , hedef hücrelerin yüzeyi üzerinde ilk önce IL-1R1'e bağlanır ve daha sonra IL-1RAcP toplanır, böylece bir trimoleküler sinyalleme kompleksi oluşturulur (Şekil 16) (O'Neill, 2008).



Şekil 16. NF-κB aktivasyonunda IL-1 sinyal iletimi (Turner ve ark'dan., 2014)

Kilo kaybı, uykunun düzenlenmesi, endokrin sistem, immün sistem ve sinir sistemi fonksiyonlarını değiştirme, nöronal iletim, epilepsi, sinir hücre ölümü dahil IL-1'in endojen ve ekzojen bir çok etkisi bulunmaktadır (Dinarello, 2000).

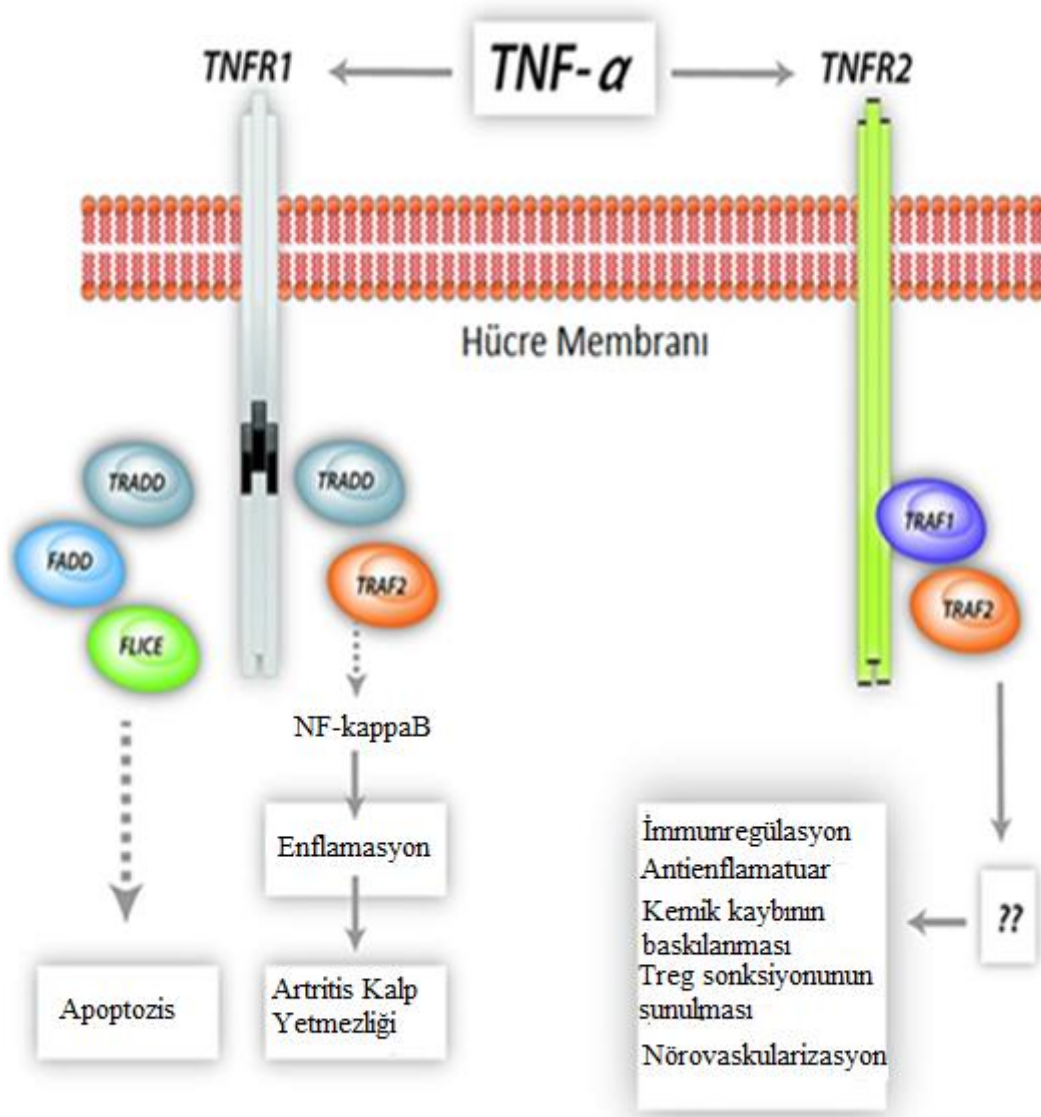
IL-1, IL-1 ailesinin prototipik ve kuşkusuz en kapsamlı olarak incelenen sitokindir ve romatoid artrit, osteo artrit, gut, periyodik ateş ve tip II diyabet dahil olmak üzere geniş bir yelpazede enflamatuar hastalıklarla ilişkilidir (Dinarello, 2009).

2.4.TNF- α

TNF- α , ilk olarak 1975 yılında, Carswell ve arkadaşları tarafından endotoksin (lipopolisakkarit) verilen farelerin serumlarında tümör dokusunda nekroza yol açan bir mediyatör olarak tanımlanmıştır (Carswell ve ark., 1975; Aggarwal ve ark., 1985). TNF- α , çok sayıda sitokin tarafından oluşturulan peptid mediyatör ailesinin bir üyesidir. Bu

aileye ait diğer üyeler arasında lenfotoksin- α , fas ligand ve CD40 ligand yer alır. TNF- α doğal ve kazanılmış immunitte, hücre proliferasyonu ve apoptozda rol oynayan ve önemli proenflamatuar özelliklere sahip olan bir sitokindir. Bu sitokin başta makrofaj ve monositler olmak üzere, T hücreleri, düz kaslar, adipositler ve fibroblastlar tarafından üretilmektedir (Popa ve ark., 2007).

TNF- α ; TNF-RI (P55) ve TNF-II (P75) isimli iki adet reseptörü üzerinden biyolojik aktivite göstermektedir. Bu iki reseptör yapısal olarak benzemekte, fakat fonksiyonel olarak farklı özellik gösterip TNF- α 'nın biyolojik etkilerini düzenlemektedir. Bu iki reseptör birçok hücre üzerinde beraber bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarında TNF- α 'nın biyolojik olarak etkin bir sinyal oluşturabilmesi için TNF-RI üzerinde etki göstermesi gerektiği gösterilmiştir (Şekil 17) (Shalaby ve ark., 1990).



Şekil 17. TNF reseptörü I (TNFR1) ve TNFR2 aracılığıyla tümör nekrozis faktör α (TNF- α) sinyalinde benzerlikler ve farklılıklar. TNFR1'in sitoplazmik alanının, sitoplazmik domen içinde yer alan ölüm bölgesi tarafından TRADD / FADD / FLICE' nin sıralı olarak harekete geçmesi yoluyla apoptoze aracılık ettiği gösterilmiştir. TRADD / TNFR-ilişkili faktör 2'nin (TRAF2) aktive olması, NF- κ B'nin deaktivasyonuna yol açmıştır. Bu durum daha sonra artrit ve kalp yetmezliği dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklara bağlı iltihaplanmaya aracılık eder. Buna karşılık, TNFR2'nin TRAF2'yi TRAF1 yoluyla aktive ettiği ve bununda immünoregülasyon, anjiyogenez ve kardiyoproteksiyonda rol oynadığı gösterilmiştir (Aggarwal'dan, 2014)

Ramesh ve Reeves (2002), yaptıkları bir çalışmada sisplatin uygulaması sonucu böbrekte TNF- α 'nın da dahil olduğu çeşitli kemokin ve sitokinlerin ekspresyonunun

arttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada ayrıca TNF- α bloke edildiğinde, sitokinlerin uyarılmasının azaldığı, nefrotoksisitenin iyileştiği ve sonuç olarak TNF- α 'nın sisplatin nefrotoksisitesinde önemli bir rol oynadığı ifade edilmiştir.

Alhoshani ve ark. (2017), sisplatin ile tedavi edilen ratlarda IL-1 α (%260), TRFA2 (%491), P38 (%410), MKK4 (%263), MKK7 (%412), JNK (%680) ve TNF- α (%300) ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış görüldüğünü rapor etmişlerdir.



3. MATERYAL VE METOT

Hücre kültürünün hazırlanması ve sitotoksosite analizleri Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. ELISA analizleri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yürütüldü.

3.1. Materyal

3.1.1. Vero Hücre Kültürünün Hazırlanması

Sunulan tez projesinde, böbrek hücre hasarı oluşturmak amacıyla Vero kullanıldı. Vero hücre kültürünü üretmek amacıyla Dulbecco tarafından modifiye edilen MEM solusyonu Dulbecco Minimal Essential Medium (DMEM) ve %10 fetal dana serumu ile hazırlanan vasat kullanıldı ve 75 cm²'lik flasklarda hazırlanan hücreler, 37°C'lik etüvde kültüre edildi. Hücre kültürü üretiminde kontaminasyonu önlemek amacıyla filtre kapaklı hücre kültürü flaskları kullanıldı ve besiyeri iki günde bir değiştirilerek hücrelerin canlılıkları ve morfolojik yapıları invert mikroskop ile takip edildi.

3.1.2. Deneme Grupları

1. grup (negatif kontrol grubu): Hiçbir kimyasalla muamele edilmeyen DMEM vasat ortamındaki Vero hücreleri (n=4)
2. grup: Sisplatin eklenmiş DMEM vasat ortamındaki Vero hücreleri (n=4)
3. grup: Hesperidin eklenmiş DMEM vasat ortamındaki Vero hücreleri (n=4)
4. grup: Sisplatin + hesperidin eklenmiş DMEM vasat ortamındaki Vero hücreleri (n=4).

3.2. Metot

3.2.1. Sisplatinin Nefrotoksik Dozunun Belirlenmesi

Sisplatin nefrotoksitesinin oluşturulması amacıyla, daha önceki bir çalışmada kullanılan prosedür uygulandı (Yarım ve ark., 2017).

3.2.2. Hesperidinin Nonsitotoksik Dozunun Belirlenmesi

Hesperidin uygulaması için uygun dozun belirlenmesi amacıyla daha önceki *in vitro* çalışmaların (Choi ve ark., 2003; Yeh ve ark., 2007) sonuçları göz önünde bulundurulmakla birlikte hücreler, 24 saat boyunca farklı hesperidin konsantrasyonları (10 µmol/l, 20 µmol/l, 30 µmol/l, 40 µmol/l, 50 µmol/l, 100 µmol/l, 200 µmol/l) ile inkube edildi ve uygun koruyucu doz hücre sayım testi sonucuna göre belirlendi. Hücre çalışmalarında tüm uygulamalar dört tekrarlı gerçekleştirildi.

3.2.3. Hücre Sayım Testi

Vero hücrelerinde sisplatinin ve hesperidinin sitotoksik etkisi hücre sayım testi (96992, Sigma-Aldrich, USA) ile belirlendi. Testin gerçekleştirilmesinde, üretici firmanın önerdiği prosedür takip edildi. Mikropleyttteki kuyucuklara, 1 ml'sinde 1×10^5 Vero hücresi olan süspansiyondan 100 µl konuldu ve 37°C' lik etüvde 24 saat inkube edildi. Süre sonunda hücreler pleyt yüzeyini kapladığında kuyucuklardaki hücre üretme vasatı boşaltılarak hücre üretme vasatı içerisinde hazırlanan sisplatin (10 µmol/l, 50 µmol/l, 100 µmol/l, 200 µmol/l) ve/veya hesperidin (10 µmol/l, 20 µmol/l, 30 µmol/l, 40 µmol/l, 50 µmol/l, 100 µmol/l, 200 µmol/l) ikişer kuyucuğa 10 µl pipetlendi ve 22°C' lik etüvde inkube edildi. Kontrol hücrelerin kuyucuklarına ise hesperidin yerine 10 µl hücre üretme vasatı pipetlendi. İnkubatörden 12 saat sonra alınan pleytlerin tüm kuyucuklarına hücre sayım solüsyonundan 10 µl eklendi ve 37°C de 2 saat inkube edildi. Mikropleyttteki kuyucukların optik dansitesi, mikropleyt okuyucuda (Tecan Infinite F50) 450 nm dalga boyunda kaydedildi. Test 4 kez tekrarlandı ve sisplatinin sitotoksik dozu ile hesperidinin nonsitotoksik dozu “[1- (OD test) / (OD kontrol)] × 100” formülüne göre hesaplandı.

3.2.4. ELISA Analizleri

IL-1β Düzeyinin Belirlenmesi

Hücre kültürü mediumlarında IL-1β düzeyinin ölçülmesinde maymuna özgü IL-1β ELISA test kiti (LS-F25200, LifeSpan Biosciences Inc., Seattle Downtown, Washington, USA) kullanıldı. Stok standart olan 1.000 pg/ml konsantrasyondaki standart numune sulandırıcı ile sulandırılarak 500 pg/ml 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml ve 15,63 pg/ml, 7,815 pg/ml ve 0 pg/ml'lik standartlar hazırlandı. Mikropleyttteki standart kuyucuklarına 100'er µl standart, test kuyucuklarına 100'er µl

hücre kültürü mediumlarından pipetlendi ve üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatılarak 37° C'de 1 saat bekletildi. Süre sonunda, tüm kuyucuklardaki sıvı aspire edildikten sonra her bir kuyucuğa 100 µl Reaktif A solüsyonu eklenerek mikropleyitin üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatılarak 37° C'de 1 saat inkubasyona tabi tutuldu. Süre sonunda tüm kuyucuklardaki sıvı aspire edildi ve kuyucukların hepsine 350 µl yıkama solüsyonu eklendi ve 1-2 dakika sonra sıvı aspire edilerek mikropleyt kurutma kâğıdı üzerine ters çevirilerek sıvı tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Tüm kuyucuklara 100 µl Reaktif B solüsyonu pipetlenerek üzeri filmle kapatıldı ve 37° C'de 30 dakika inkube edildi. Süre sonunda 5 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Mikropleyttteki tüm kuyucuklara 90 µl TMB substrat solüsyonu eklenerek şeffaf yapışkan filmle kapatıldıktan sonra 37° C'de 15 dakika inkubasyona tabi tutuldu. Süre sonunda tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklendi. Mikropleyitin optik dansitesi 450 nm dalga boyunda okundu. IL-1β düzeyleri standartların optik dansitelerine göre hesaplandı. Sonuçlar pg/ml olarak verildi.

TNF-α düzeyinin belirlenmesi

Hücre kültürü mediumlarında TNF-α düzeyinin belirlenmesi amacıyla maymuna özgü TNF-α ELISA test kitinden (LS-F4818, LifeSpan Biosciences Inc., Seattle Downtown, Washington, USA) yararlanıldı. Analizler çift örnekleme yapılarak gerçekleştirildi ve üretici firmanın belirttiği prosedür takip edildi. Referans standart 500 pg/ml konsantrasyondaki standart numune sulandırıcı ile sulandırılarak 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml ve 15,63 pg/ml, 7,815 pg/ml ve 0 pg/ml'lik standartlar hazırlandı. Mikropleyttteki standart kuyucuklarına 100'er µl standart, test kuyucuklarına 100'er µl hücre kültürü mediumlarından pipetlendi ve üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatılarak 37° C' de 90 dakika bekletildi. Daha sonra kuyucuklara aspire edilerek, 100 µl Reaktif A solüsyonu pipetlendi. Mikropleyt şeffaf yapışkan filmle kapatılarak 37° C'de 1 saat inkube edildi. Süre sonunda bütün kuyucuklardaki sıvı aspire edilerek tüm kuyucuklara 350 µl yıkama solüsyonu eklendi ve 1-2 dakika süreyle bekletildikten sonra aspire edilip mikropleyt kurutma kâğıdı üzerine ters çevrildi. Bu aşama 3 kere tekrarlandı. Bütün kuyucuklara 100 µl Reaktif B solüsyonu pipetlenerek mikropleyt filmle kaplandı ve 37° C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılarak bütün kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 5 kere yıkandı. Bütün kuyucuklara 90 µl TMB substrat solüsyonu eklenerek şeffaf yapışkan filmle kaplandı ve

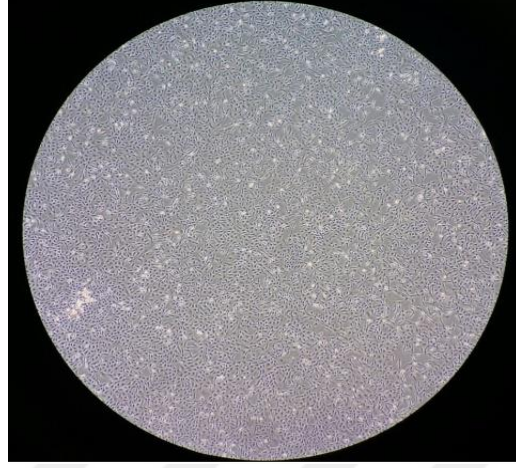
37° C'de 15 dakika bekletildi. Süre sonunda tüm kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu pipetlendi. Mikropleyt okuyucuda her bir kuyucuğun optik dansiteleri kaydedildi ve TNF-α düzeyleri standartların optik dansitelerine göre hesaplandı ve sonuçlar pg/ml olarak verildi.

3.2.5. İstatistiksel Değerlendirme

Projeden elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için istatistiksel paket programı (SPSS Statistics V21.0, IBM Corporation, Armonk, NY) kullanıldı. Sonuçlar ortalama değer ± ortalama değer in standart sapması olarak verildi. Önemlilik testlerinden önce tüm veriler parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro-Wilk, varyansların homojenliği yönünden ise Levene testine tabi tutuldu. Gruplar arası farklılığın anlamlı bulunduğu durumlarda parametrik test varsayımlarını sağlayan değişkenler için Duncan testi kullanıldı. Tüm istatistiksel değerlendirmeler için minimum $p < 0,05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

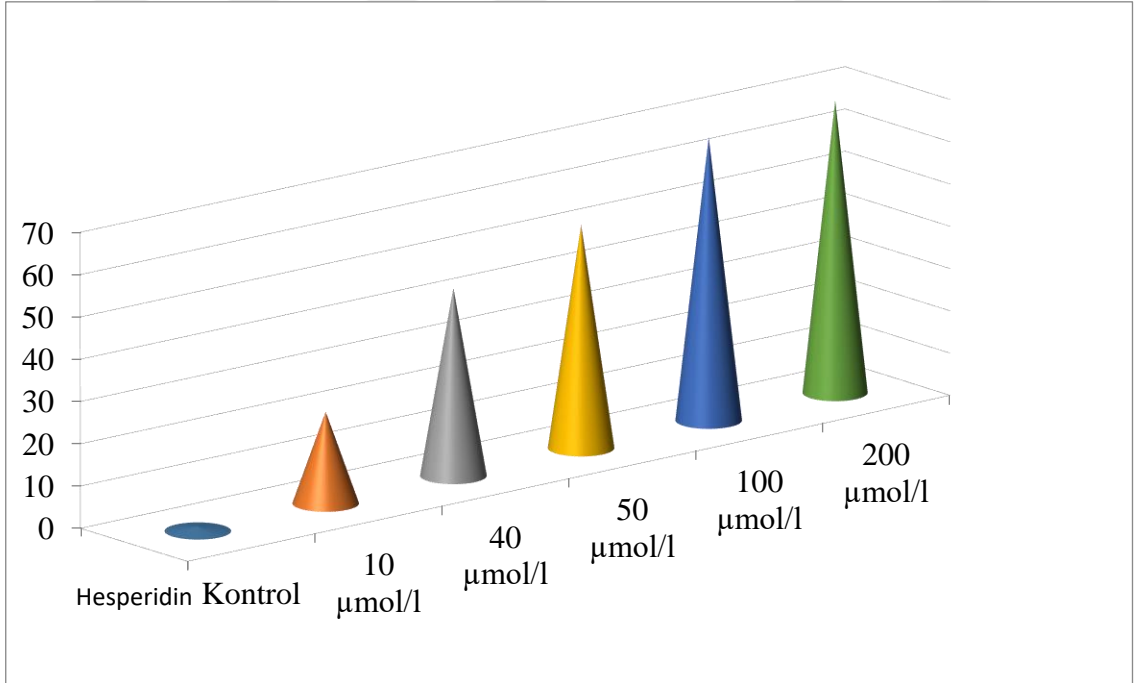
Vero hücrelerinin invert mikroskoftaki görünümü Şekil 18’de sunuldu.



Şekil 18. Vero hücrelerinin invert mikroskoftaki görünümü (x 4 büyütme)

4.1. Hesperidinin Farklı Sulandırmalarına Ait Sitotoksisite Testi Sonuçları

Hesperidinin nonsitotoksik dozunun belirlenmesi amacı ile kullanılan dozlara ait sitotoksisite testi sonuçları Şekil 19’da sunuldu.

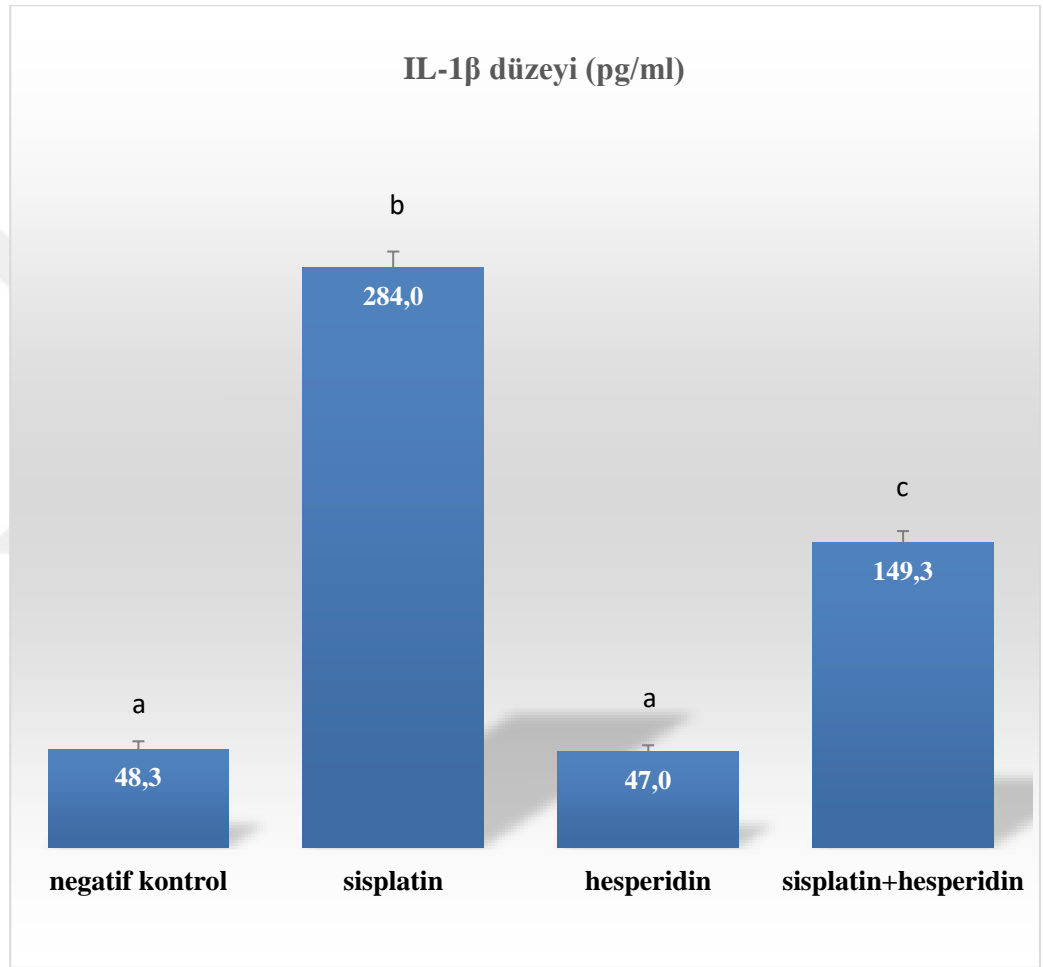


Şekil 19. Hesperidinin farklı sulandırmalarına ait sitotoksisite testi sonuçları (n=4)

24 saat boyunca farklı hesperidin konsantrasyonları (10 $\mu\text{mol/l}$, 20 $\mu\text{mol/l}$, 30 $\mu\text{mol/l}$, 40 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$, 200 $\mu\text{mol/l}$) ile inkube edilen vero hücrelerinde, hücre sayım testi sonucunda 12 saat süre 40 $\mu\text{mol/l}$ hesperidin uygulaması ile hücre canlılığının %55,6 olduğu anlaşıldı (Şekil 19).

4.2. IL-1 β Düzeylerine İlişkin Bulgular

Vero hücre mediumlarında IL-1 β düzeyleri Şekil 20’de sunuldu.



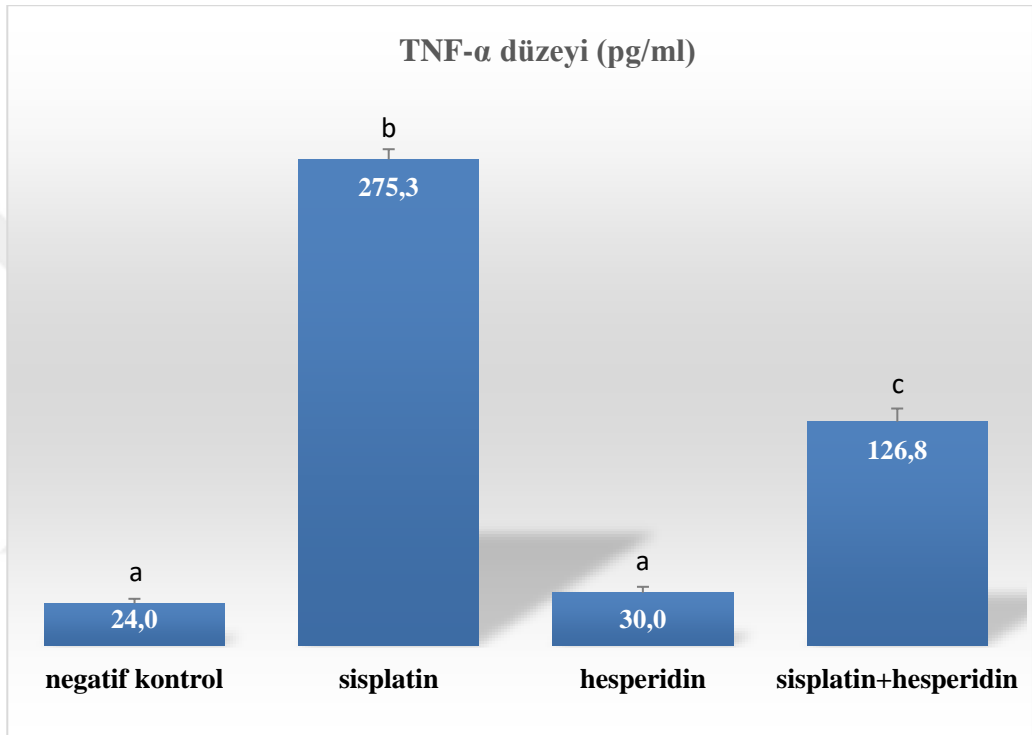
Şekil 20. Vero hücre mediumlarında IL-1 β düzeyleri (n=4).a.b.c: p<0,05

IL-1 β düzeyinin negatif kontrol grubunun hücre mediumunda $48,3\pm 3,9$ pg/ml olduğu belirlendi. Dört saat süre ile 50 $\mu\text{mol/l}$ sisplatin eklenen hücre mediumundaki IL-1 β düzeyi $284,0\pm 7,8$ pg/ml idi. On iki saat boyunca 40 $\mu\text{mol/l}$ hesperidine maruz bırakılan hücre mediumundaki IL-1 β düzeyi $47,0\pm 3,2$ pg/ml olarak ölçüldü. Dört saat süre ile 50 $\mu\text{mol/l}$ sisplatin+12 saat süre ile 40 $\mu\text{mol/l}$ hesperidine maruz bırakılan hücre

mediumundaki IL-1 β düzeyi 149,3 \pm 5,7 pg/ml bulundu. Sisplatine maruz bırakılan hücre mediumlarındaki IL-1 β düzeyinin negatif kontrol hücre mediumundaki, hesperidin uygulanan hücre mediumundaki ve sisplatin+hesperidin uygulanan hücre mediumundaki IL-1 β düzeyine oranla artmış olduğu belirlendi (p<0,05).

4.3. TNF- α düzeylerine ilişkin bulgular

Vero hücre mediumlarında TNF- α düzeyleri Şekil 21’de sunuldu.



Şekil 21. Vero hücre mediumlarında TNF- α düzeyleri (n=4).a.b.c: p<0,05

TNF- α düzeyinin, negatif kontrol grubunda 24,0 \pm 2,6 pg/ml olduğu saptandı. Vero hücrelerinin 4 saat süre ile 50 μ mol/l sisplatine maruz bırakılması 275,3 \pm 5,7 pg/ml düzeyde TNF- α düzeyi ile sonuçlandı. Vero hücrelerinde 12 saat süre ile 40 μ mol/l hesperidin maruziyeti sonucunda TNF- α düzeyinin 30,0 \pm 3,4 pg/ml olduğu anlaşıldı. Vero hücrelerinin, 4 saat boyunca 50 μ mol/l sisplatine ve 12 saat boyunca 40 μ mol/l hesperidin uygulamasına maruz bırakılması ile hücre mediumundaki TNF- α düzeyinin 126,8 \pm 7,5 pg/ml olduğu belirlendi. Sisplatine maruz bırakılan hücre mediumundaki TNF- α düzeyinin, negatif kontrol hücre mediumundaki, hesperidin uygulanan hücre mediumundaki ve sisplatin+hesperidin uygulanan hücre mediumundaki TNF- α düzeyine göre artmış olduğu anlaşıldı (p<0,05).

5. TARTIŞMA

Güncel çalışmalar, hesperidinin enflamasyon mediyatörlerini modüle ederek enflamasyonu hafiflettiğini ya da engellediğini ortaya koymaktadır. Hesperidinin antiinflamatuvar etkili olduğu bilinmekle birlikte, *in vitro* böbrek hücre hasarında, antiinflamatuvar ve proinflamatuvar sitokin protein düzeyleri üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Sunulan tez çalışmasında, hesperidinin antiinflamatuvar etkisinden faydalanılarak, sisplatinle indüklenen böbrek hücre hasarında enflamasyon üzerindeki olası koruyucu etkilerini ortaya koymak amaçlandı.

Sisplatinin nefrotoksisiteye neden olduğu, inflamatuvar sitokin üretimine yol açarak böbrek hücre hasarının oluşmasına katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir. Sisplatin kaynaklı tübüler böbrek hasarında TNF-reseptör-1 aracılı apoptotik yolların rol oynadığı bilinmektedir (Tsuruya ve ark., 2003). Farelere periton içi sisplatin uygulamasından sonra böbrek dokusunda TNF- α ve TGF- β ekspresyonlarının artışıyla birlikte şiddetli akut böbrek yetmezliği olduğu rapor edilmiştir (Ramesh ve Reeves, 2002). C57BL/6 farelere periton içi uygulanan sisplatinin böbrek dokusunda TNF-reseptör-1 ve TNF-reseptör-2 mRNA ekspresyonlarını artırarak enflamasyona neden olduğu bildirilmiştir (Ramesh ve Reeves, 2003). Sisplatin kaynaklı nefrotoksisiteye, böbrek paraneşimal hücreleri tarafından salgılanan TNF- α 'nın aracılık ettiği bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2007).

Böbrek hastalıklarının profilaksisinde ve tedavisinde antiinflamatuvar etkili flavonoid uygulamalarının başarı sağladığı pek çok çalışma ile rapor edilmiştir (Dahal ve Mulukuri, 2015). Son dönem böbrek yetersizliği hastalarında izoflavon içeren diyetin sistemik enflamasyonu baskıladığı ve soya izoflavonlarının kan düzeyleri ile akut faz reaktanları arasında korelasyon olduğu ifade edilmiştir (Fanti ve ark., 2006). Ratlarda adenin uygulamasının yol açtığı böbrek dokusundaki enflamasyonu ve oksidatif stresi krisinin flavonoidinin hafiflettiği rapor edilmiştir (Ali ve ark., 2015). Asetaminofen ile nefrotoksisite oluşturulan ratlarda hesperidin uygulamasının asetaminofenin neden olduğu renal enflamasyonu NF κ B ekspresyonunu baskılayarak hafiflettiği bildirilmiştir (Ahmad ve ark., 2012). Ratlarda yüksek fruktoz diyetinin neden olduğu renal korteks enflamasyonunun flavonoid epikateşin uygulaması ile giderildiği bildirilmiştir (Prince ve ark., 2016). Ratlarda kurşun ile indüklenen enflamasyonda kuersetinin doza bağımlı olarak dolaşımdaki IL-1 β ve TNF- α konsantrasyonlarını düşürdüğü ve böbrek

dokusundaki lökosit infiltrasyonunu engellediği belirlenmiştir (Liu ve ark., 2012). Chtourou ve ark. (2016), yaşlı ratlarda sisplatin uygulamasıyla gelişen böbrek dokusundaki lipit peroksidasyon artışının, protein ve DNA oksidasyonunun, TNF- α ve nitrit seviyeleri ile kaspaz-3 ve p53 ekspresyonlarındaki artışın doza bağımlı olarak naringin takviyesi ile hafifletildiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, naringin uygulamasının sisplatin kaynaklı nefrotoksisitenin gelişiminde oksidatif stresi ve enflamasyonu azaltarak etkili bir terapötik strateji olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Daha önceki çalışmalarda (Ramesh ve Reeves, 2002; Tsuruya ve ark., 2003; Faubel ve ark., 2007) ileri sürüldüğü gibi bu tez çalışmasında sisplatin uygulamasının böbrek hücre sağ kalımını azalttığı ve hücre mediumundaki IL-1 β ve TNF- α düzeyinde artışla sonuçlandığı belirlendi. Sunulan tez çalışmasında, Vero hücrelerinde sisplatin maruziyetinin neden olduğu IL-1 β artışının, hesperidin uygulaması ile baskılandığı gözlemlendi (p<0,05). Benzer şekilde, negatif kontrol hücrelere kıyasla sisplatin uygulanan vero hücrelerden alınan mediumlardaki TNF- α düzeyinin önemli oranda artmış olduğu (p<0,05), bu düzeyin, sisplatin+hesperidin uygulanan hücre mediumunda azalmış olduğu (p<0,05) saptandı. Bu bulgular, hesperidin uygulamasının sisplatinin neden olduğu proenflamatuar yanıtı baskıladığına işaret etmektedir. Sisplatin kaynaklı akut böbrek hasarında, nobiletin ile profilaksinin, böbrek fonksiyonlarını koruduğu, apoptotik yolları ve DNA hasarını inhibe ettiği ve bu şekilde nobiletinin nefroprotektif potansiyeli olduğu belirtilmiştir (Malik ve ark., 2015). Bütün bu çalışmaların sonuçları, enflamasyonla seyreden böbrek hastalıklarının profilaksisinde ve/veya tedavisinde flavonoid uygulamalarının başarı sağladığını göstermektedir.

Sunulan tez çalışmasından elde edilen sonuçlar irdelendiğinde, *in vitro* sisplatin kaynaklı böbrek hücre enflamasyonu modelinde hesperidin uygulamasının proenflamatuar sitokin salınımını baskıladığı belirlendi. Bulgularımız, hesperidin antienflamatuar etkisinden yararlanarak, böbrek hücre hasarında enflamatuar süreçte rol alan IL-1 β ve TNF- α düzeyini azalttığını gösterdi. Sisplatinin en önemli yan etkisi olarak gelişen böbrek hücre hasarında hesperidin koruyucu ve tedavi edici potansiyeli olabileceği hipotezini güçlendiren bu tez projesinin sonuçlarının bilime önemli katkılar sağlayacağı öngörülmektedir.

Tez çalışmasından elde edilen bulguların *in vivo* çalışmalar ve klinik araştırmalarla teyit edilmesine ihtiyaç bulunmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde akciğer, beyin, yumurtalık, serviks ve testis gibi birçok kanser türünde kullanım alanı bulan sisplatinin kullanımından kaynaklı yan etkileri, yapılan birçok bilimsel çalışma ile gösterilmiştir. Karşılaşılan bu yan etkileri içerisinde nefrotoksisite önemli bir yer kaplamaktadır. Bu durumun oluşmasında enflamasyonun, tübüler hücre toksisitesinin, reaktif ara ürünlerin ve apoptoz ile ilişkili mekanizmaların rol oynadığı öne sürülmektedir. Kanser tedavisinde yapılan araştırmalar devam etmekle birlikte yeni ajanların bilim dünyasına katılmasının yanı sıra bugün kullanılan etken maddelerin de yan etkilerinin sınırlandırılarak kullanılması gerekmektedir.

Daha önce yayınlanan bilimsel makaleler bir polimetoksi flavonon olan hesperidinin güçlü antienflamatuar etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Hesperidinin sitokin salınımını baskılayarak antienflamatuar etki gösterdiği bilinmekle birlikte, böbrek hücre hasarı modelinde, antienflamatuar ve proenflamatuar sitokin protein düzeyleri üzerindeki etkisi bilinmemektedir.

Bu doktora çalışmasının amacı, hesperidinin sisplatinle oluşturulan böbrek hücre hasarının *in vitro* modelinde enflamasyon üzerine olası etkilerinin belirlenmesidir. Bu amaçla, sisplatin maruziyeti ile hasar oluşturulan Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattına (Vero) hesperidin uygulamasının olası antienflamatuar etkisi, proenflamatuar sitokinler olan interlökin-1 beta (IL-1 β) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) konsantrasyonlarının ölçülmesi ile değerlendirildi.

Çalışmanın sonuçları;

- 1- Sisplatin ile indüklenmiş Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattındaki (Vero) TNF- α konsantrasyonu 275,3 pg/ml ölçülürken, hesperidin uygulanması sonucunda TNF- α konsantrasyonunda %46'lık bir azalma ile bu miktar 126,8 pg/ml olarak ölçülmüştür.
- 2- Sisplatin ile indüklenmiş Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattındaki (Vero) IL-1 β konsantrasyonu 284,0 pg/ml ölçülürken, hesperidin uygulanması sonucunda IL-1 β konsantrasyonunda %52'lik bir azalma ile bu miktar 149,3 pg/ml olarak ölçülmüştür.

Çalışmadan elde edilen bulgulara göre hesperidinin IL-1 β ve TNF- α düzeylerini azaltarak baskıladığı anlaşıldı. Sisplatinin böbrek hücrelerinde oluşturduğu hasarın engellenmesinde ve/veya hafifletilmesinde yeni yaklaşımların geliştirilmesine

önemli katkılar sağlayacağı öngörülmektedir. Bununla birlikte, bu sonuçların *in vivo* çalışmalar ve klinik araştırmalar ile desteklenmesine ihtiyaç bulunmaktadır.



KAYNAKLAR

- Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, Bringman TS, Nedwin GE, Goeddel DV, Harkins RN. Human necrosis factor: production, purification and characterization. *J Biol Chem.* 1985;260:2345-2354.
- Aggarwal BB. Balancing TNFR1 and TNFR2 jointly for joint inflammation. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66:2657–2660
- Ahmad ST, Arjumand W, Nafees S, Seth A, Ali N, Rashid S, Sultana S. Hesperidin alleviates acetaminophen induced toxicity in Wistar rats by abrogation of oxidative stress, apoptosis and inflammation. *Toxicol Lett.* 2012;208(2):149-161.
- Akaboshi M, Kawai K, Ujeno Y, Takada S, Miyahara T. Binding characteristics of (-) - (R)-2-aminomethylpyrrolidine (1,1-cyclobutanedicarboxylato)-2-platinum (II) to DNA, RNA and protein molecules in HeLa cells and its lethal effect: comparison with cis- and trans-diamminedichloroplatinums (II). *Jpn J Cancer Res.* 1994;85:106-111.
- Alhoshani AR, Hafez MM, Husain S, Al-Sheikh AM, Alotaibi MR, Al Rejaie SS, Alshammari MA, Almutairi MM, Al-Shabanah OA. Protective effect of rutin supplementation against cisplatin-induced Nephrotoxicity in rats. *BMC Nephrol.* 2017;18(1):194.
- Ali BH, Adham SA, Al Za'abi M, Waly MI, Yasin J, Nemmar A, Schupp N. Ameliorative effect of chrysin on adenine-induced chronic kidney disease in rats. *PLoS One* 2015;10(4):e0125285.
- Amidi A, Hosseini SMH, Leemans A, Kesler SR, Agerbaek M, Wu L M, Zachariae R. Changes in brain structural networks and cognitive functions in testicular cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2017;109(12):dix085.
- Arany I, Megyesi JK, Kaneto H, Price PM and Safirstein RL. Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:543–9
- Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 2003;5:460-4.
- Aswar M, Kute P, Mahajan S, Mahajan U, Nerurkar G, Aswar U. Protective effect of hesperetin in rat model of partial sciatic nerve ligation induced painful neuropathic pain: An evidence of anti-inflammatory and anti-oxidative activity. *Pharmacol, Biochem Behav.* 2014;124:101–107.
- Basol N, Savas AY, Meral A, Erbas O. Güçlü antikosidan kurkuminin sisplatinin neden olduğu karaciğer ve böbrek hasarında önemli etkileri. *Cumhuriyet Medical Journal* 2018;40(1):9–18.

- Bertram G. Basic Clinical Pharmacology 9 ed. Tata Mc. 2001;1285-1300.
- Bompart G. Cisplatin-induced changes in cytochrome P-450, lipid peroxidation and drug-metabolizing enzyme activities in rat kidney cortex. *Toxicol Lett.* 1989;48:193–199
- Boulikas T, Vougiouka M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. *Oncol Rep.* 2003;10:1663-1682
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975;72:3666–3670.
- Chen CC, Lin JC, Chen KW. Comparison cisplatin with cisplatin plus 5FU in head and neck cancer patients received postoperative chemoradiotherapy. *Oral Oncology* 2017;69:11-14
- Choi IY, Kim SJ, Jeong HJ, Park SH, Song YS, Lee JH, Kang TH, Park JH, Hwang GS, Lee EJ, Hong SH, Kim HM, Um JY. Hesperidin inhibits expression of hypoxia inducible factor-1 alpha and inflammatory cytokine production from mast cells. *Mol. Cell. Biochem* 2007; 305(1-2): 153-161.
- Chtourou Y, Aouey B, Aroui S, Kebieche M, Fetoui H. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of naringin on cisplatin-induced renal injury in the rat. *Chem Biol Interact.* 2016;5:243:1-9.
- Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota HJ, Haier J, Jaehde U, Zisowsky J, Schlatter E. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol* 2005;167:1477-1484.
- Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2004;350(19):1937-1944.
- Dahal A and Mulukuri S. Flavonoids in kidney protection. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* 2015;4(3):362-382.
- Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014;740:364-78.
- DeConti R, Toftness B, Lange R, Creasey W. Clinical and pharmacological studies with cis-Diamminedichloro platinum (II). *Cancer Res.* 1973;33:1310-1315.
- Dentino M, Luft FC, Moo NY, Williams SD, Einhorn LH. Long term effect of cis-diamminedichloride platinum (CDDP) on renal function and structure in man. *Cancer* 1978;41:1247-1251.
- Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *CHEST* 2000;118:503–508.

- Dinareello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family
Annu. Rev. Immunol 2009;27:519-550
- Dokumacıoğlu E, Hatice İ, Mazlum ŞT, İmran İ, Ali D, Yalçın K, Elif E, Sinan S. Effects of hesperidin and quercetin on serum tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 levels in streptozotocin-induced diabetes model. *Pharmacogn Mag.* 2018;14(54):167–173.
- Dong Z, Atherton SS. Tumor necrosis factor-alpha in cisplatin nephrotoxicity: a homebred foe? *Kidney Int.* 2007;72:5–7
- Dourado GKZS, Ribeiro LCA, Carlos IZ, Cesar TB. Orange juice and hesperidin promote differential innate immune response in macrophages ex vivo. *Int J Vitam Nutr Res.* 2013;83(3):162-7.
- El-Shafae AM, El-Domiaty MM. Improved LC methods for the determination of diosmin and/or hesperidin in plant extracts and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001;26:539–545
- Emim JA, Oliveira AB, Lapa AJ. Pharmacological evaluation of the anti-inflammatory activity of a citrus bioflavonoid, hesperidin, and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. *J Pharm Pharmacol* 1994;46(2):118-22.
- Eren E, Ata A, Arıcan A. Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar ve nefrotoksisite DEU Tıp Fak Dergisi 2012;26:229-35.
- Erdemli E, Ergeneçi D, Atahan Ş, Işıkkay L. Cisplatinin sıçan böbrek ve testisleri üzerine etkileri. *Ankara Üniversitesi Tıp Mecmuası* 1999;52:3.
- Erlund I, Meririnne E, Alftan G, Aro A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J Nutr.* 2001;131:235–41.
- Ernawita, Wahyuono RA, Hesse J, Hipler UC, Elsner P, Böhm V. In Vitro lipophilic antioxidant capacity, antidiabetic and antibacterial activity of citrus fruits extracts from Aceh, Indonesia. *Antioxidants (Basel)* 2017;6(1):11.
- Etcheverry SB, Ferrer EG, Naso L, Rivadeneira J, Salinas V, Williams PA. Antioxidant effects of the VO(IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention *J. Biol. Inorg. Chem.* 2008;13:435-447
- Fanti P, Asmis R, Stephenson TJ, Sawaya BP, Franke AA. Positive effect of dietary soy in ESRD patients with systemic inflammation correlation between blood levels of the soy isoflavones and the acute-phase reactants. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(8):2239-2246.
- Faubel S, Lewis EC, Reznikov L, Ljubanovic D, Hoke TS, et al. Cisplatin-induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1beta,

- IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 322(1):8-15.
- Galati EM, Monforte MT, Kirjavainen S, Forestieri AM, Trovato A, Tripodo MM. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note D): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco* 1994;40(11):709-12.
- Gao S, Chen T, Choi MY, Liang Y, Xue J, Wong YS. Cyanidin reverses cisplatin-induced apoptosis in HK-2 proximal tubular cells through inhibition of ROS-mediated DNA damage and modulation of the ERK and AKT pathways. *Cancer Lett.* 2013;333(1):36-46.
- Garg A, Garg S, Zaneveld LJ, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res.* 2001;15(8):655-69.
- Gately DP, Howell SB. Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 1993;67:1171-1176.
- Gomez CFJ, Gonzalez P, Carrillo A, Estelles MC, Rengel M. Cisplatin nephrotoxicity: symptomatic hypomagnesemia and renal failure. *Int J Pediatr Nephro.* 1986;7(3):151-2.
- Gonzales-Vitale JC, Hayes DM, Cvitkovic E, Sternberg SS. The renal pathology in clinical trials of cis-platinum (II) diamminedichloride. *Cancer* 1977;39(4):1362-71.
- Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol.* 2001;59:657–663
- Gorboulev V, Ulzheimer JC, Akhoundova A, Ulzheimer-Teuber L, Karbach U, Quester S, Baumann C, Lang F, Busch A-E, Koepsell H. Cloning and characterization of two human polyspecific organic cation transporters. *DNA Cell Biol.* 1997;16:871–881.
- Hamilton CR, Bliss JM, Horwich A. The late effects of cis-platinum on renal function. *Eur J Cancer Clin Onco* 1989;25(2):185-9.
- Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther.* 2003;1:47-61.
- Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Kadoma Y and Fujisawa S. kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 Expression. *Anticancer Research* 2005;25:3367-3374
- Holzer AK, Samimi G, Katano K, et al. The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 2004;66:817-823

- Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(14):298-302.
- Ishikawa T and Ali-Osman F. "Glutathione-associated cis-diammine dichloro platinum(II) metabolism and ATP dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance," *Journal of Biological Chemistry* 1993;268(27):20116–20125
- Jain M, Parmar HS. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. *Inflamm Res*. 2011;60(5):483-91.
- Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition and processing of cisplatin–DNA adducts department of chemistry. *Chem. Rev.* 1999;99(9):2467–2498
- Jo SK, Cho WY, Sung SA. et al. MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis. *Kidney Int.* 2005;67:458-466
- Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. Third row transition metals for the treatment of cancer *Philos. Trans. R. Soc. A.* 2015;373:1
- Kaushal GP, Kaushal V, Hong X, Shah SV. Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 2001;60(5):1726-36.
- Kawaii S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M. Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J Agric Food Chem.* 1999;47(9):3565-3571.
- Kelland L. The resurgence of platinum based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 2007;7:573-584
- Koyuncu H, Berkarda B, Baykut F, Soybir G, Alatli C, Gül H, Altun M. Preventive effect of hesperidin against inflammation in CD-1 mouse skin caused by tumor promoter. *Anticancer Res.* 1999;19(4B):3237-41.
- Krız W, Bankır L. A standard nomenclature for structures of the kidney. *Pflugers Arch* 1988;411:113-120.
- Kröning R, Lichtenstein AK, Nagami GT. Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;45:43-49.
- Kuhlmann MK, Burkhardt G, Kohler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol. Dial. Transplant* 1997;12:2478–2480.

- Laurent G, Yernaux V, Nonclercq D, Toubeau G, Maldague P, Tulkens PM, Heuson-Stiennon JA. Tissue injury and proliferative response induced in rat kidney by cis-diamminedichloroplatinum (II). *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1988;55(3):129-145.
- Lee JH and Kim GH. "Evaluation of antioxidant and inhibitory activities for different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis " *Journal of Food Science* 2010;75(7):212–217.
- Lee NK, Choi SH, Park SH, Park EK and Kim DH. Antiallergic activity of hesperidin is activated by intestinal microflora. *Pharmacology* 2004;7:174–180.
- Lee Y, Kollara A, May T and Brown TJ. Wounding promotes ovarian cancer progression and decreases efficacy of cisplatin in a syngeneic mouse model. *Journal of Ovarian Research* 2018;11:56
- Li A, Wei ZJ, Ding H, Tang HS, Zhou HX, Yao X, Feng SQ. Docetaxel versus docetaxel plus cisplatin for non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Oncotarget* 2017;8:57365–57378.
- Li M, Guo Z, Shao H, Qin B. Therapeutic effect of hesperidin on severe acute pancreatitis in rats and its mechanism. *Zhonghua wei Zhong Bing ji jiu yi xue* 2017;29(10):921-925
- Li R, Cai L, Xie XF, Peng L, Wu TN, Li J. 7,3'-dimethoxy hesperetin inhibits inflammation by inducing synovial apoptosis in rats with adjuvant-induced arthritis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2013;35:139–146.
- Li R, Cai L, Xie XF, Yang F, Li J. Hesperidin suppresses adjuvant arthritis in rats by inhibiting synoviocyte activity. *Phytother Res.* 2010b;24:71–76.
- Li R, Li J, Cai L, Hu CM, Zhang L. Suppression of adjuvant arthritis by hesperidin in rats and its mechanisms. *J Pharm Pharmacol* 2008a;60:221–228.
- Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol* 1996;270(4 Pt 2):700-708.
- Litterst CL, Gram TE, Dedrick RL, LeRoy AF and Guarino AM. Distribution and disposition of platinum following intravenous administration of cis-diamminedichloroplatinum (II) (NSC 119875) to dogs. *Cancer Research* 1976;36:2340–2344.
- Liu CM, Sun YZ, Sun JM, Ma JQ, Cheng C. Protective role of quercetin against lead-induced inflammatory response in rat kidney through the ROS-mediated MAPKs and NF- κ B pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(10):1693-1703.

- Liu EH, Zhao P, Duan L, Zheng GD, Guo L, Yang H, Li P. Simultaneous determination of six bioactive flavonoids in *Citri Reticulatae Pericarpium* by rapid resolution liquid chromatography coupled with triple quadrupole electrospray tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2013;141:3977–3983
- Ludwig T, Riethmuller C, Gekle M, Schwerdt G And Oberleithner H. Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. *Kidney Int.* 2004;66:196–202.
- Ma H, Feng X, Ding S. Hesperetin attenuates ventilator-induced acute lung injury through inhibition of NF- κ B-mediated inflammation *European Journal of Pharmacology* 2015;769:333-341.
- MacLeod PM, Tyrell CJ, Keeling DH. The effect of cisplatin on renal function in patients with testicular tumours. *Clin Radiol* 1988;39(2):190-192.
- Malik S, Bhatia J, Suchal K, Gamad N, Dinda AK, Gupta YK, Arya DS. Nobiletin ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury due to its anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Exp Toxicol Pathol* 2015;67(7-8):427-433.
- Manach C, Morand C, Gil-Izquierdo A, Bouteloup-Demange C, Remesy C. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. *Eur J Clin Nutr.* 2003;57:235–242.
- Manthey JA, Grohmann K. Flavonoids of the orange subfamily Aurantioideae. *Adv Exp Med Biol* 1998;439:85-101.
- Mauludin R, Müller RH. Physicochemical properties of hesperidin nanocrystal. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2013;5:954–960.
- Milenkovic D, Deval C, Dubray C, Mazur A, Morand C. Hesperidin displays relevant role in the nutrigenomic effect of orange juice on blood leukocytes in human volunteers: a randomized controlled cross-over study. *PLoS One* 2011;6(11):e26669.
- Mouly P, Gaydou EM, Auffray A. Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography. *J Chromatogr A.* 1998;800(2):171-179.
- Nielsen ILF, Chee WSS, Poulsen L, Offord-Cavin E, Rasmussen SE, Frederiksen H, Enslin M, Barron D, Horcajada MN and Williamson G. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: A randomized, double-blind, crossover trial. *J Nutr.* 2006;136:404–408.
- Nizamutdinova IT, Jeong JJ, Xu GH, Lee SH, Kang SS, Kim YS, Chang KC, Kim HJ. Hesperidin, hesperidin methyl chalone and phellopterin from *Poncirus trifoliata* (Rutaceae) differentially regulate the expression of adhesion molecules in tumor

- necrosis factor-alpha-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Int Immunopharmacol* 2008;(5):670-8.
- O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev.* 2008;226:10-18.
- Oosting SF, Chen TWW, Huang SH, et al: A comparison of weekly versus 3-weekly cisplatin during adjuvant radiotherapy for high-risk head and neck cancer. *Oral Oncol* 2016;59:43-49.
- Ozols RF and Young RC. High-dose cisplatin therapy in ovarian cancer. *Seminars in Oncology* 1985;12(6):21-30
- Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.* 2008;73(9):994-1007.
- Pabla N, Murphy RF, Liu K, Dong Z. The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009;296:505-511.
- Page R, Matus RE, Leifer CE, Loar A. Cisplatin, a new antineoplastic drug in veterinary medicine. *J Am Vet Med Assoc.* 1985;186(3):288-90.
- Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother Res.* 2015;29(3):323-31.
- Parker RJ, Gill I, Tarone R, Vionnet JA, Grunberg S, Muggia FM, et al. Platinum DNA damage in leukocyte DNA of patients receiving carboplatin and cisplatin chemotherapy, measured by atomic absorption spectrometry. *Carcinogenesis* 1991;12:1253-1258.
- Pinho-Ribeiro FA, Hohmann MS, Borghi SM, Zarpelon AC, Guazelli CF, Manchope MF, Casagrande R, Verri WA Jr. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- κ B. *Chem Biol Interact.* 2015;25:228:88-99.
- Popa C, Netea MG, Van Riel PL, Meer van der JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res.* 2007;48:751-62.
- Prince PD, Lanzi CR, Toblli JE, Elesgaray R, Oteiza PI, Fraga CG, Galleano M. Dietary (-)-epicatechin mitigates oxidative stress, no metabolism alterations, and inflammation in renal cortex from fructose-fed rats. *Free Radic. Biol. Med.* 2016;90:35-46.

- Ramesh G, Reeves WB. TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 2002;110(6):835-42.
- Ramesh G, Reeves WB. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(4):610-618.
- Ramesh G, Reeves WB. Inflammatory cytokines in acute renal failure. *Kidney Int Suppl*. 2004;66:56.
- Ramesh G, Reeves WB. p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol* 2005;289:166–174.
- Ramful D, Bahorun T, Bourdon E, Tarnus E and Aruoma OI. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flaveddo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, 2010;278: 75–87.
- Rizza S, Muniyappa R, Iantorno M, Kim JA, Chen H, Pullikotil P, Senese N, Tesauro M, Lauro D, Cardillo C and Quon MJ. Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial function and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:782–792.
- Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, et al. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med*. 1999;340(15):1144-1153.
- Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965;205:698.
- Rosenberg B, Van Camp L, Grimley EB, Thomson AJ. The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum (IV) complexes. *J Biol Chem*. 1967;242:1347.
- Rosenberg B, Van Camp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: A new class of potent antitumor agents. *Nature* 1969;222:385.
- Sabuncuoglu S, Ozgunes H. Cisplatin toxicity: importance of oxidative stress and effect of antioxidants. *J Ist Faculty Med*. 2010;73:3
- Sakata K, Hirose Y, Qiao Z, Tanaka T, Mori H. Inhibition of inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric oxide synthase by flavonoid hesperidin in mouse macrophage cell line. *Cancer Let*. 2003;199(2):139-145.
- Shalaby MR, Surdon A, Loetscher TI, Brockhaus M, Lesslauer W, Esperik T. Binding and regulation of cellular functions by monoclonal antibodies against human tumor necrosis factor receptors. *J Exp Med*. 1990;172:1517-1520

- Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22:7265-7279
- Szturz P, Wouters K, Kiyota N, Tahara M, Prabhash K, Noronha V, Adelstein D, Vermorken JB. Altered fractionation radiotherapy combined with concurrent low-dose or high-dose cisplatin in head and neck cancer: A systematic review of literature and meta-analysis *Oral Oncology* 2018;76:52–60
- Thomson AW, Lotze MT. *The Cytokine Handbook*. 4th ed. London: Academic Press; 2003; 281-304, 643-668, 1049-1081.
- Townsend DM, Deng M, Zhang L, Lapus MG, Hanigan MH. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephro* 2003;14(1):1-10.
- Tsuruya K, Ninomiya T, Tokumoto M, Hirakawa M, Masutani K, et al. Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int* 2003;63(1):72-82.
- Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington Dj. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et biophysica acta* 2014;1843(11):2563–82.
- Turrisi AT, Kim K, Blum R, Sause WT, Livingston RB, et al. Twice-daily compared with once-daily thoracic radiotherapy in limited small-cell lung cancer treated concurrently with cisplatin and etoposide. *N Engl J Med*. 1999;340(4):265-71.
- Vabeiryureilai M, Lalrinzuali K, Jagetia GC. Determination of Anti Inflammatory and Analgesic Activities of a Citrus Bioflavanoid, Hesperidin in Mice. *Immunochem Immunopathol* 2015: Open Access 1: 107. doi: 10.4172/icoa.1000107
- Weatherall DJ, Ledingham JGG, Warrell DA. *Toxic Nephropathy*. Oxford Textbook of Medicine 3rd Ed. Oxford, New York: Tokyo, Oxford University Press, 1996; 3258-3267
- Wei D, Ci X, Chu X, Wei M, Hua S, Deng X. Hesperidin suppresses ovalbumin induced airway inflammation in a mouse allergic asthma model. *Inflammation* 2012;35(1):114-21.
- Yamamoto M, Jokura H, Hashizume K, Ominami H, Shibuya Y, Suzuki A, Hase T, Shimotoyodome A. Hesperidin metabolite hesperetin-7-O-glucuronide, but not hesperetin-3'-O-glucuronide, exerts hypotensive, vasodilatory, and anti-inflammatory activities. *Food Funct*. 2013;4(9):1346-1351.
- Yamate J, Sato K, Ide M, Nakanishi M, Kuwamura M, Sakuma S, And Nakatsuji S. Participation of different macrophage populations and myofibroblastic cells in chronically developed renal interstitial fibrosis after cisplatin-induced renal injury in rats *Vet Pathol* 2002;39:322–333

- Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, et al. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci.* 2007;334(2):115-124
- Yarim GF, Kazak F, Sozmen M, Koca I, Albayrak H, Yarim M, Cenesiz S and Ozan E. Investigation of the effect of cornelian cherry (*Cornus mas L.*) fruit extract against cisplatin-induced renal cell injury in vitro. 2017-07-19
DOI: <https://doi.org/10.1515/tjb-2016-0136>
- Yeh CC, Kao SJ, Lin CC, Wang SD, Liu CJ, Kao ST. The immuno modulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro. *Life Sci* 2007;80(20):1821-31.
- Zanotti Simoes Dourado GK, De Abreu Ribeiro LC, Zeppone Carlos I, Borges César T. Orange juice and hesperidin promote differential innate immune response in macrophages ex vivo. *Int J Vitam Nutr Res.* 2013;83(3):162-167.
- Zhang B, Ramesh G, Norbury CC, Reeves WB. Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor-alpha produced by renal parenchymal cells. *Kidney Int.* 2007;72(1):37-44.
- Zhang L, Hanigan MH. Role of cysteine S-conjugate beta-lyase in the metabolism of cisplatin. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306(3):988-94.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Altan ERSÖZ

Doğum Yeri: Kocaeli

Doğum Tarihi: 01.03.1977

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Leyla ATAKAN İlköğretim Okulu	1984-1987
Emekevler İlköğretim Okulu	1987-1988
Çelik Halat Ortaokulu	1988-1991
Namık Kemal Lisesi	1991-1994
Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	1995-2000

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

İz-Vet Veteriner Kliniği /Kocaeli	2001/2004
Sanovel İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş /Konya	2005-2007
Hendek İlçe Tarım Müdürlüğü/Sakarya	2007-2009
TKDK /Çorum İl Koordinatörlüğü	2009-2018

E-posta: altan.ersoz@tkdk.gov.tr