



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI

**BÖBREK HÜCRELERİNDE LİPOLİSAKKARİTLE  
İNDÜKLENEN ENFLAMASYONA APİGENİNİN OLASI  
KORUYUCU ETKİSİNİN *İN VİTRO* BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Selen AKSOY**

**Samsun  
Aralık – 2017**





ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
VETERİNERLİK BİYOKİMYASI ANABİLİM DALI

**BÖBREK HÜCRELERİNDE LİPOLİSAKKARİTLE  
İNDÜKLENEN ENFLAMASYONA APİGENİNİN OLASI  
KORUYUCU ETKİSİNİN *İN VİTRO* BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Selen AKSOY**

**Danışman  
Prof. Dr. Gül Fatma YARIM**

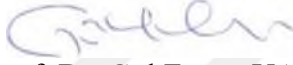
**Samsun  
Aralık-2017**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

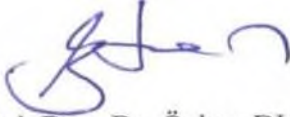
Selen AKSOY tarafından Prof. Dr. Gül Fatma YARIM danışmanlığında hazırlanan "Böbrek hücrelerinde lipopolisakkaritle indüklenen enflamasyona apigeninin olası koruyucu etkisinin *in vitro* belirlenmesi" başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 06/12/2017 tarihinde yapılan sınav ile Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.



Başkan: Prof. Dr. Ali ERTEKİN  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Gül Fatma YARIM  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı



Üye: Yrd. Doç. Dr. Özkan DURU  
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı

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

Lisansüstü eğitimim süresince ve bu tezin hazırlanmasında her konuda sağladığı sonsuz desteği, yardımı ve anlayışının yanı sıra bana kattığı ufuk açıcı bilgilerinden dolayı danışman hocam sayın Prof. Dr. Gül Fatma YARIM'a,

Eğitimim süresince bana emeği geçen Prof. Dr. Ali ERTEKİN, Prof. Dr. Sena ÇENESİZ, Doç. Dr. Cevat NİSBET ve Doç. Dr. Gülay ÇİFTÇİ hocalarıma minnetlerimi ifade etmeyi borç bilirim.

Çalışmama sağladığı katkısını, özverili desteği ile bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Prof. Dr. Semra OKUR GÜMÜŞOVA'ya,

Hücre kültürü çalışmalarının gerçekleştirilmesi ile bu tezde büyük emeği geçen Araş. Gör. Cüneyt TAMER'e ve Dok. Öğr. Bahadır MÜFTÜOĞLU'na,

Çalışmam süresince yardımı ve desteğini eksik etmeyen çok sevgili arkadaşlarım Ayris SALT'a ve Emine İncilay TORUNOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanması süresince ve hayatımın her alanında yardımlarını esirgemeyen, anlayışı ve desteği ile hep yanımda olan çok değerli arkadaşım Burak ÖZSOY'a,

Hayatımın her döneminde cömertçe gösterdikleri sevgi, destek ve emekleri ile varlıklarını her zaman yanımda hissettiğim çok değerli aileme şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma, PYO.VET.1904.17.014 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

### BÖBREK HÜCRELERİNDE LİPOLİSAKKARİTLE İNDÜKLENEN ENFLAMASYONA APİGENİNİN OLASI KORUYUCU ETKİSİNİN *İN VİTRO* BELİRLENMESİ

**Amaç:** Apigeninin iyi bir antienflamatuar etki gösterdiği bilinmekle birlikte, lipopolisakkaritle indüklenen böbrek hücre enflamasyonu üzerine olası koruyucu etkisi bilinmemektedir. Önerilen tez çalışmasında, apigeninin *in vitro* böbrek hücre enflamasyonu modelinde antienflamatuar sitokinler olan IL-10 ve TGF- $\beta$  düzeylerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

**Materyal ve Metot:** Sunulan tez projesinde, böbrek hücre enflamasyonu Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattında (Vero) oluşturuldu. Çalışmamızda, negatif kontrol grubu, lipopolisakkarit (LPS) ile enflamasyonun indüklendiği grup, apigenin uygulanan grup ile LPS+apigenin uygulanan grup olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Apigeninin Vero hücrelerindeki sitotoksik etkisi hücre sayım testi ile değerlendirildi. Lipopolisakkaritin enflamasyon dozu hücre kültürü supernatantlarındaki TNF- $\alpha$  ve IL-6 konsantrasyonlarının ölçümüyle belirlendi. Hücre kültürü mediumlarında TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 ve TGF- $\beta$  konsantrasyonları ELISA test kitleri kullanılarak ELISA yöntemi ile ölçüldü.

**Bulgular:** Lipopolisakkarit uygulanan hücrelerdeki IL-10 ve TGF- $\beta$  konsantrasyonlarının, kontrol hücrelerdeki, apigenin uygulanan hücrelerdeki ve LPS+apigenin uygulanan hücrelerdeki IL-10 ve TGF- $\beta$  konsantrasyonlarından önemli düzeyde ( $p<0,05$ ) yüksek olduğu saptandı.

**Sonuç:** Tez çalışmasından elde edilen bulgular, *in vitro* böbrek hücre enflamasyonu modelinde apigenin uygulamasının IL-10 ve TGF- $\beta$  sitokinlerinin salınımını inhibe ederek enflamasyonu baskıladığını gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Apigenin; Böbrek hücre hasarı; *İn vitro*; Lipopolisakkarit

Selen AKSOY, Yüksek Lisans Tezi  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Aralık-2017

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF POSSIBLE PROTECTIVE EFFECT OF APIGENIN ON LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED INFLAMMATION IN RENAL CELLS *IN VITRO*

**Aim:** It is known that Apigenin has anti-inflammatory effects but the possible protective effects of Apigenin on lipopolysaccharide-induced renal cell inflammation is not known. In the proposed thesis study, it was aimed to determine the effect of apigenin on anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- $\beta$  levels in an *in vitro* model of renal cell inflammation.

**Material and Method:** In the presented thesis project, kidney cell inflammation was formed in the African green monkey kidney cell line (Vero). In our study, four groups, which were called as negative control group, lipopolysaccharide (LPS) -induced inflammation group, apigeninin treated group and LPS + apigenin treated group, were formed. The cytotoxic effect of Apigenin in Vero cells was evaluated by cell count test. Dose of inflammation of lipopolysaccharide was determined by measuring TNF- $\alpha$  and IL-6 concentrations in cell culture supernatants. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 and TGF- $\beta$  concentrations in cell culture medium were measured by ELISA using ELISA test kits.

**Results:** IL-10 and TGF- $\beta$  concentrations in cells treated with lipopolysaccharide were found significantly higher ( $p < 0.05$ ) than IL-10 and TGF- $\beta$  concentrations in control cells, apigenin treated cells and LPS + apigenin treated cells.

**Conclusion:** Findings from thesis study demonstrated that treatment of apigenin *in vitro* inhibited inflammation via suppressed the IL-10 and TGF- $\beta$  release.

**Keywords:** Apigenin; *In vitro*; Lipopolysaccharide; Renal cell damage

Selen AKSOY, Master Thesis,  
Ondokuz Mayıs University - Samsun, December-2017

## SİMGELER VE KISALTMALAR

COX-2	: Siklooksijenaz-2
GFR	: Glomeruler filtrasyon hızı
ICAM-1	: Hücrelerarası adhezyon molekül-1
IL-1 $\beta$	: İnterlökin-1 beta
IL-6	: İnterlökin-6
IL-10	: İnterlökin-10
LPS	: Lipopolisakkarit
MCP-1	: Monosit kemoatraktant protein-1
NF-kB	: Nükleer faktör kappa b
PDGF	: Trombosit türevli büyüme faktörü
TGF- $\beta$ 1	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta1
Th1	: T yardımcı hücre-1
Th2	: T yardımcı hücre-2
TNF- $\alpha$	: Tümör nekroz faktör-alfa



## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	vii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Böbrek Hastalıkları.....	3
2.2. Böbrek Hastalıklarında Enflamasyonun Rolü .....	3
2.3. Enflamasyonun Vasküler ve Hücrel Yanıtları.....	6
2.4. Enflamatuvar Süreçte Bilgi Akışı.....	7
2.5. Lipopolisakkaritlerin Yapısı .....	9
2.6. Lipopolisakkaritlerin Fonksiyonel Özellikleri .....	10
2.7. Enflamasyon ile İlişkisi Olan Bazı Flavonoidler .....	10
2.8. Flavonoidlerin <i>in vitro</i> ve Hücre Modellerinde Antienflamatuvar Özellikleri .....	10
2.9. Apigenin .....	11
2.10. Bitkilerdeki Apigenin Türevleri .....	14
2.11. Apigeninin Metabolizması .....	15
2.12. Apigeninin Antienflamatuvar Etkileri.....	15
2.13. İnterlökin-10'un Böbrek Hastalıklarındaki Rolü .....	17
2.14. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF- $\beta$ )'nın Böbrek Hastalıklarındaki Rolü .....	18
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	20
3.1. MATERYAL .....	20
3.1.1. Vero Hücre Kültürü .....	20
3.1.2. Deneme Planı .....	20
3.2. METOT .....	21
3.2.1. Analizler.....	21
3.2.2. İstatistiksel Değerlendirme .....	25
<b>4. BULGULAR</b> .....	26
4.1. Apigeninin Vero Hücrelerindeki Sitotoksisite Yüzdeleri.....	26
4.2. Lipopolisakkarit Uygulamasının Vero Hücrelerinde Proenflamatuvar Sitokin Yanıtına Etkileri .....	27

4.3. Lipopolisakkarit Uygulanan Vero Hücrelerinde Apigeninin IL-10 Konsantrasyonuna Etkisi.....	29
4.4. Lipopolisakkarit Uygulanan Vero Hücrelerinde Apigeninin TGF- $\beta$ Konsantrasyonuna Etkisi.....	30
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>31</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>35</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>37</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>47</b>



## 1. GİRİŞ

Böbrek hastalıkları, ülkemizde ve diğer ülkelerde hem insanlarda hem de hayvanlarda önemli bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir (Meguid El Nahas ve Bello, 2005; Jha ve ark., 2013; Grauer, 2016; Hill ve ark., 2016). Böbrek hastalıklarının patogeneğinde enflamasyonun rol oynadığı bilinmektedir. Enflamasyon böbrek dokusunda sitokinlerin salınımını uyararak, adhezyon moleküllerinin üretimini ve aktivitesini artırarak böbrek hastalığının ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Grandaliano ve ark., 1996; Oberg ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2008; Silverstein, 2009; Tucci ve ark., 2010; Lepenies ve ark., 2011; Vianna ve ark., 2011; Tbahriti ve ark., 2013; Akchurin ve Kaskel., 2015). Böbrek enflamasyonunda interlökin (IL)-6, tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) gibi enflamatuvar sitokinlerin rol oynadığı bilinmektedir (Wada ve ark., 2003; Glassock, 2011). Nefrotik sendromlu hastalarda, mononükleer hücre TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-4 ve IL-13 düzeyleri, IL-18 düzey ve ekspresyonu ile IL-2 ekspresyonunu artmaktadır (Suranyi ve ark., 1993; Shimoyama ve ark., 2004; Shalaby ve ark., 2013).

Son yıllarda, enflamatuvar hastalıkların tedavisi konusundaki bilimsel çalışmalar antienflamatuvar etkili flavonoidlerin kullanımına yoğunlaşmaktadır. Birçok flavonoid antibakteriyel, antioksidatif aktivite, serbest radikal süpürme kapasitesi, koroner kalp hastalığının önlenmesi, hepatoprotektif, antienflamatuvar, antikanser ve antiviral ajan olarak tıbbi etkinlik göstermektedir (Kumar ve Pandey, 2013). Benzer yapıdaki bitkiler tarafından sentezlenen bir polifenolik bileşik ailesi olan flavonoidler, antosiyanidin, flavanol, flavanon, flavonol, flavon ve isoflavon gibi alt sınıflara ayrılmaktadır. Meyve ve sebzelerde doğal olarak bol miktarda bulunan bir bitki flavonu olan apigenin çeşitli hücresel süreçlerde antienflamatuvar, antioksidan ve antikanser, antiproliferatif, antimetastatik, antiviral, anti-mikrobiyal özellikler de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteleri gösteren biyoaktif bir flavonoid olarak bilinmektedir (Kowalski ve ark., 2005; Yano ve ark., 2006; Chong ve ark., 2009; Jeong ve ark., 2009; Kang ve ark., 2009; Li ve ark., 2010; Shukla ve Gupta, 2010; Chan ve ark., 2012; Johnson ve Mejia, 2013; Wang ve Huang, 2013; Wójcik ve ark., 2013; Fu ve ark., 2014; Shibata ve ark., 2014; Morimoto ve ark., 2015; Karamese ve ark., 2016). Apigenin, monosit hücreleri

tarafından mitojenle aktive protein kinaz yollarını modüle ederek T yardımcı hücre-1 ve -2 ilişkili kemokin üretimini baskılamakta ve antienflamatuar etki göstermektedir (Huang ve ark., 2010). Fare makrofajlarında, lipopolisakkarit ile uyarılan siklooksijenaz (COX-2) ve nitrik oksit sentetaz-2 aktivitelerinin ve ekspresyonlarının apigenin tarafından baskılandığı ve bu şekilde apigeninin antienflamatuar etkisinin ortaya çıktığı ifade edilmiştir (Liang ve ark., 1999). İntratrakeal akut akciğer hasarı fare modelinde apigeninin profilaktik kullanımının bronkoalveoler lavaj sıvısında interlökin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) konsantrasyonlarını azalttığı, lökosit sayısını ve nötrofil yüzdesini azaltarak, COX-2 ve NF-kB yollarını baskıladığı ve enflamasyonu hafiflettiği bildirilmiştir (Wang ve ark., 2014).

Sunulan proje kapsamında apigeninin *in vitro* böbrek hücre enflamasyonu modelinde antienflamatuar sitokinler olan IL-10 ve TGF- $\beta$  düzeylerine etkisi değerlendirildi. Sunulan proje ile böbrek hücrelerinde lipopolisakkaritle indüklenen enflamasyona apigeninin olası koruyucu etkisinin *in vitro* belirlenmesi amaçlandı.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Böbrek Hastalıkları

Böbrek hastalıkları hem insanlarda hem de hayvanlarda yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Böbrek hastalıklarının erken tanısı ve tedavisi ilerleyici böbrek fonksiyon kaybının engellenmesinde ve morbiditenin azaltılmasında büyük önem taşımaktadır (Locatelli ve ark., 2002). Böbrek hastalıkları başlıca; akut böbrek yetmezliği, kronik böbrek yetmezliği, kalıtsal böbrek hastalıkları, böbrek taşı hastalığı, böbrek tümörü, böbrek enfeksiyonu, ilaç kaynaklı böbrek hastalığı ile diyabet ve hipertansiyon-ilişkili böbrek hastalıkları olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Akdemir ve Birol, 2005).

### 2.2. Böbrek Hastalıklarında Enflamasyonun Rolü

Akut ve kronik böbrek hastalıklarının etiopatogenezinde enflamasyon ve bağışıklık sisteminin aktive olması rol oynamaktadır. Enflamasyonun glomeruler, tubuler ve interstisyel hasara yol açtığı bildirilmektedir (Imig ve Ryan, 2013). İmmun sistem aktivasyonu ve enflamasyonun akut böbrek hasarı ve kronik böbrek hastalığı patogenezindeki rolü Şekil 1’de özetlendi.

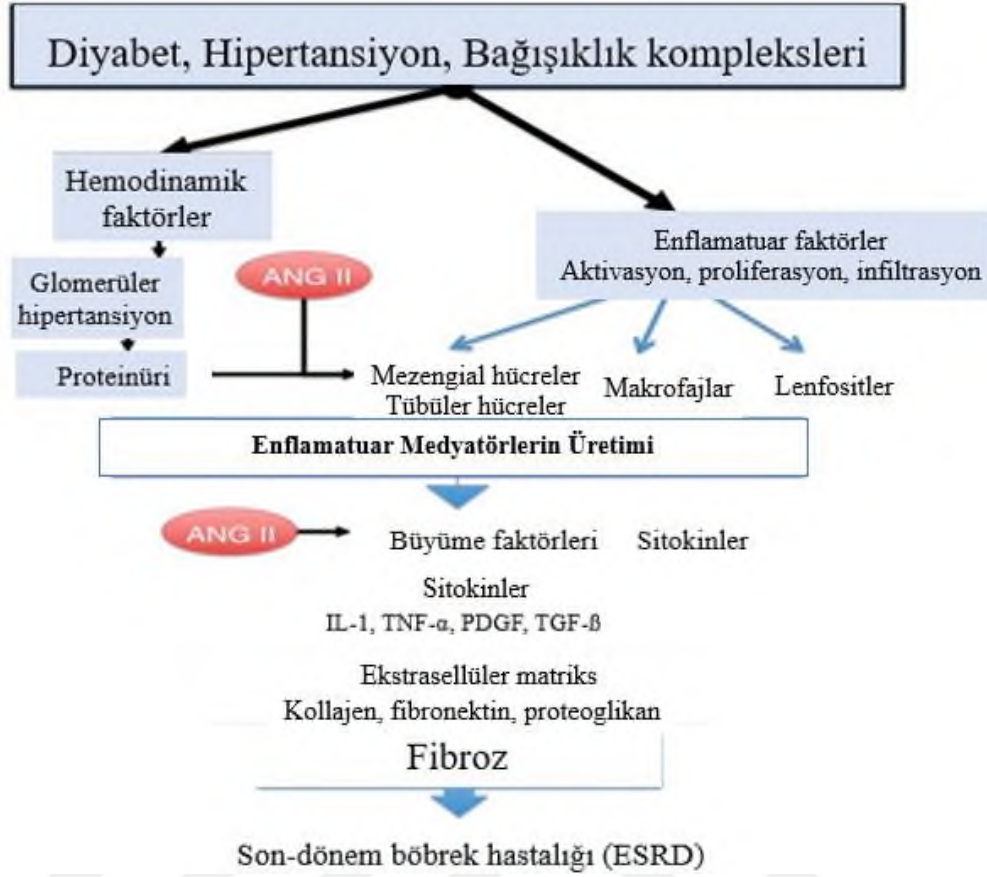


Şekil 1. İmmun sistem aktivasyonu ve enflamasyonun akut böbrek hasarı ve kronik böbrek hastalığı patogenezindeki rolü (Imig ve Ryan, 2013)

Nefrit, böbreğin iltihaplanması olup glomeruluslar ve tubulleri ve bunların etrafındaki interstisyel dokuyu da tutan yangısal bir tablodur. Akut nefrit, kronik nefrit ve nefrotik sendrom olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır. Nefritte IL-6, TNF- $\alpha$ , PDGF ve TGF- $\beta$ 1 gibi enflamatuvar sitokinler önemli rol oynamaktadır (Wada ve ark., 2003; Glassock, 2011). Nefrit tablosunda immün sistem aktivasyonunun ve enflamasyonun rol oynadığı bilinmektedir. Nefrotik sendromlu hastalarda mononükleer hücre TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-4 ve IL-13 düzeylerinin, IL-18 düzey ve ekspresyonu ile IL-2 ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir (Suranyi ve ark., 1993; Shimoyama ve ark., 2004; Shalaby ve ark., 2013). İmmün sistem bileşenleri ve böbrek hastalığının patogenezinde rol oynayan proteinler Şekil 2’de gösterildi (Imig ve Ryan, 2013).

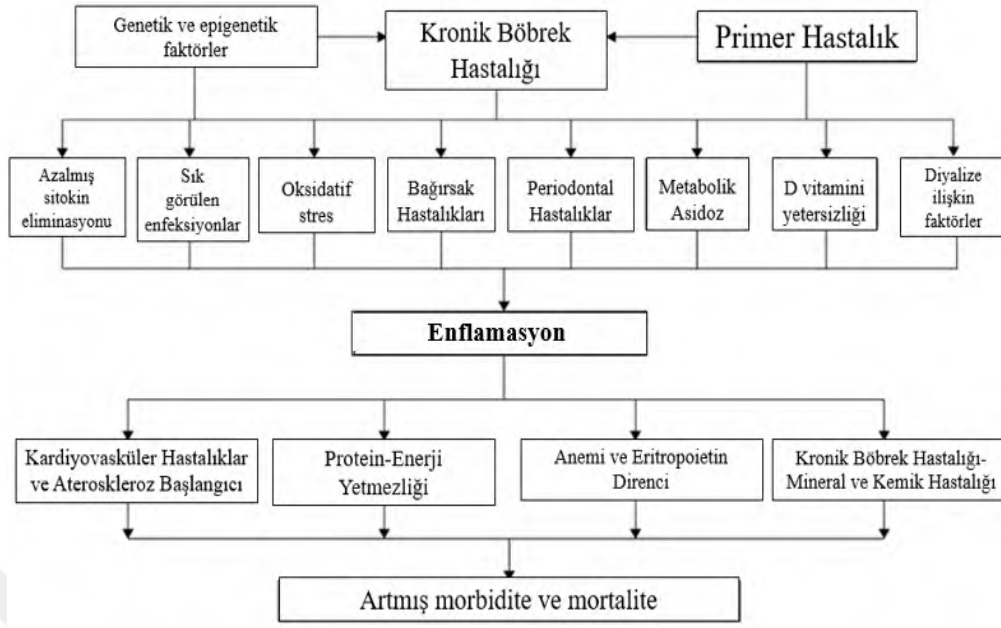


**Şekil 2.** İmmün sistem bileşenleri ve böbrek hastalığının patogenezinde rol oynayan proteinler (Imig ve Ryan, 2013)



Şekil 3. Böbrek hastalığının ilerlemesinde yangısal süreçlerin şematik gösterimi (Imig ve Ryan, 2013)

Enflamasyonun böbrek dokusunda sitokinlerin üretimini uyararak ve adhezyon moleküllerinin sentezini ve aktivasyonunu uyararak böbrek hasarına neden olduğu öne sürülmüştür (Hill ve ark., 1994). Böbreğin enflamasyonu böbrekteki kan akımında ve glomeruler filtrasyon hızında (GFR) düşmeye yol açmaktadır (Noronha ve ark., 2002).



Şekil 4. Kronik böbrek hastalığında enflamasyonun nedenleri ve sonuçları (Akchurin ve Kaskel, 2015)

### 2.3. Enflamasyonun Vasküler ve Hücrel Yanıtları

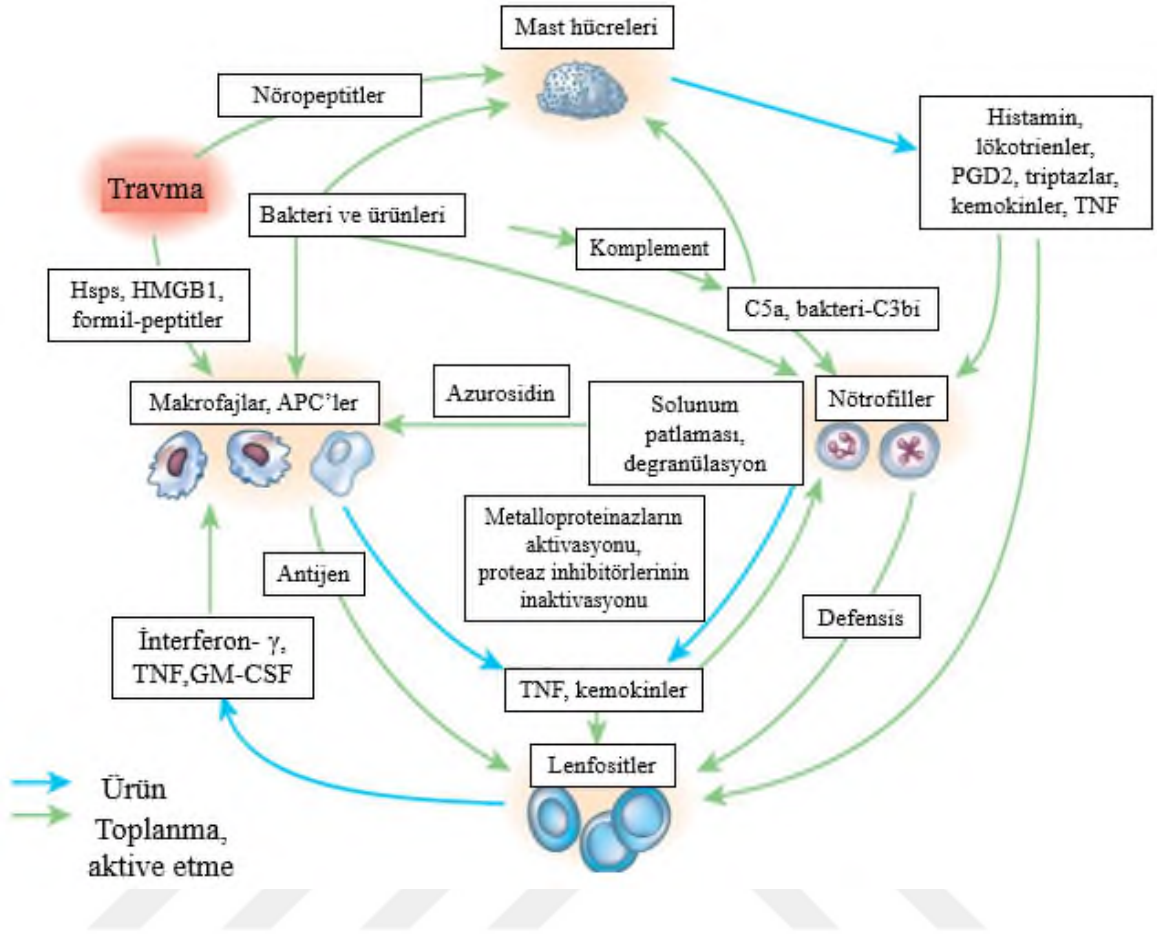
Enflamasyon vasküler ve hücrel yanıtların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Aktive olan lenfosit ve makrofajlardan sitokinler üretilerek endoteli aktive etmekte ve büyüme faktörlerinin salgılanmasına, adhezyon artışına, nötrofillerin fagositik ve sitotoksik etki göstermesine ve nitrik oksit sentezine yol açmaktadır (Conner ve Grisham, 1996; Selders ve ark., 2017). Enflamatuvar yanıtta IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$ 'nın başlıca rol oynadığı bilinmektedir (Tan ve ark., 1999; Medzhitov, 2008). Akut enflamasyon fazında hasarlı dokunun mikro damar sisteminde sıvı, plazma proteinleri ve lökositlerin transvasküler kaymaları gerçekleşmektedir ve mediyatörler lokal bir enflamatuvar eksudat oluşturmaktadır. Vasküler endotel, bağışıklığın düzenlenmesi ve hemostazın sürdürülmesinde görev yapmaktadır. Vasküler endotel normalde inaktif durumdadır ancak uyarının kendisi ile ya da zararlı uyarıya karşı üretilen enflamatuvar sitokinler ile yara ve enflamasyon bölgelerinde aktifleşmektedir. Aktifleşen vasküler endotel, lökosit-endotel hücresi adhezyon molekülleri (CAM) dahil bir takım zara bağlı proenflamatuvar molekülleri açığa çıkarmakta, periferal kan lökositlerini çeken ve pıhtılaşmaya neden olan çözünür faktörleri salgılamaktadır. Vasküler hasar, homeostazın sürdürülmesinde görevli platalet ve koagülasyon proteinlerinin



aktivasyonunu uyararak, enflamasyon alanında lökosit alımı ve platelet trombozunu gerçekleştirmektedir. Enflamatuvar sitokinler, endotoksin, immun kompleksler, fiziksel ve kimyasal hasar gibi zararlı uyaranlara karşı aktif doku makrofajları ve lenfositler tarafından primer yanıt olarak salgılanan küçük peptidlerdir. Sitokinler farklı hücreler üzerinde geniş bir etki alanına sahiptir. Sitokinlerin ana etkileri akut faz reaksiyonu başlatmak ve vasküler endotel, lökositler, trombositler ile fibroblastları aktive ederek enflamatuvar yanıtı oluşturan vasküler, hücresele ve humoral olayları kademeli olarak başlatmaktır. İnterlökin-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  enflamatuvar yanıt oluşturan başlıca sitokinlerdir (Tan ve ark., 1999; Medzhitov, 2008).

#### **2.4. Enflamatuvar Süreçte Bilgi Akışı**

Enflamatuvar süreç travmaya karşı doku bazlı bir dizi reaksiyon içermektedir. Travmaya ilk yanıt hücrelerin biyoaktif peptitleri serbest bırakması, ikinci yanıt ise hasarlı hücrelerin hücre dışı alanda bulduklarında yapısal olarak hücre içinde eksprese edilen ve sitokin üretimini tetikleyen proteinleri salgılamasıdır (Nathan, 2002). Şekil 5'te hafif travma ve enfeksiyonu takiben bilgi akışının şematik görünümü yer almaktadır.

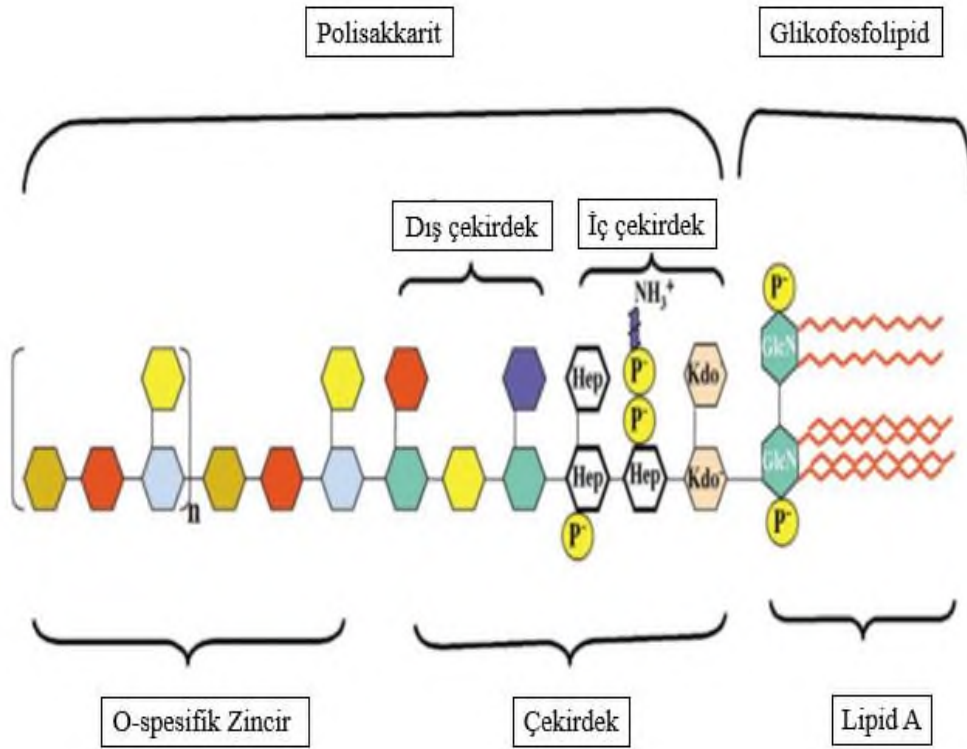


Şekil 5. Hafif travma ve enfeksiyonu takiben bilgi akışı (Nathan, 2002)

Sinyallere tepki olarak, perivasküler mast hücreleri histamin, sitokin, kemokin, eikozanoid, triptaz ve proteaz salgılamaktadır. Makrofaj ve monosit-türevi TNF ve kemokinler nötrofilleri enflamasyon alanına çekerek etkin hale getirmektedir (Nathan, 2002). Enflamasyon ve immün yanıt için protein tirozin kinazlar, protein kinaz C, fosfodiesteraz, fosfolipaz A2, lipoksijenazlar ve siklooksijenaz gibi düzenleyici enzimlerin aktivasyonları gereklidir. Bu enzimler, endotel hücreleri ve enflamasyona katılan birçok özel hücrenin aktivasyonu için oldukça önemlidir. Araşidonik asit salınımı, enflamatuar yanıt için başlangıç noktasıdır (Rathee, 2009).

## 2.5. Lipopolisakkaritlerin Yapısı

Lipopolisakkaritler (LPS) gram-negatif bakterilerin dış zarında bulunan ve bakterilerin fonksiyonel bütünlüğü için hayati önem taşıyan yapılardır (Erridge ve ark., 2002). Lipopolisakkarit molekülleri bir bisfosforillenmiş lipit ve bakterinin dışına doğru uzanan bir hidrofilik polisakkaritten oluşmaktadır. Lipit parçacığı iki değerlikli katyonlar tarafından stabilize edilmektedir ve LPS moleküllerinin en dış membran yaprağının matriksini oluşturmaktadır. Polisakkaritten ise genellikle 10-12 monosakkaritten oluşan bir çekirdek oligosakkarit ve tekrar eden birimlerden oluşan bir polisakkarit zinciri olan O-spesifik zincir olmak üzere iki ayrı bölgeden oluşmaktadır. O-zincir yapısı, türe veya bakteri soyuna serotip özgünlüğünü vermekte ve birimler bakterilerin konakçı savunma sisteminden ve serum kompleksinin saldırısından kaçışına yardım etmektedir (Caroff ve ark., 2002).



**Şekil 6.** Enterobakteriyel LPS kimyasal yapısının şematik gösterimi. Kısaltmalar: GlcN: glukozamin; Kdo: 2-keto-3-deoksioktulosonik asit; Hep: L-glisero-D-manno-heptoz; P: fosfat; Zikzak çizgiler: yağ asitleri (Caroff ve ark., 2002)

## 2.6. Lipopolisakkaritlerin Fonksiyonel Özellikleri

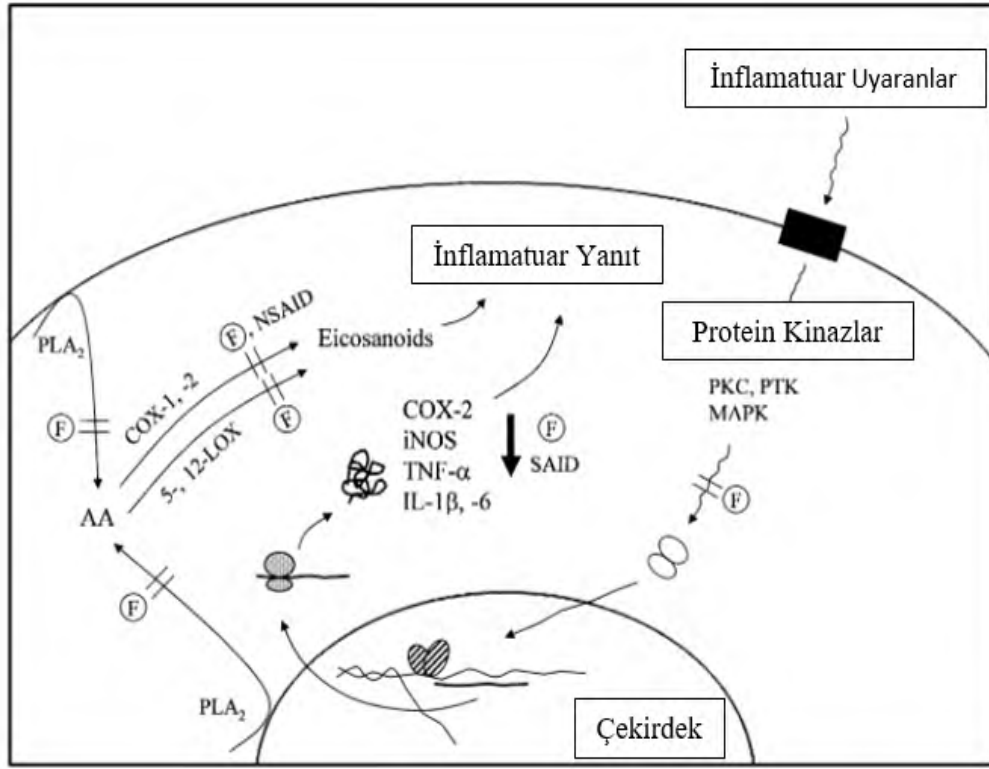
Bakteri LPS'leri enfekte olmuş konakçılarda bağışıklık sistemini güçlü bir şekilde düzenlemekte ve endotoksik şoka neden olabilmektedirler (Caroff ve ark., 2002). Lipopolisakkarite yanıt hızlı gelişmekte, TNF- $\alpha$ , IL-6 ve IL-1 $\beta$  gibi bir dizi proenflamatuar mediyatör salınımına yol açmakta ve enflamasyonu tetikleyerek konakçı savunmasına katkıda bulunmaktadır (Erridge ve ark., 2002).

## 2.7. Enflamasyon ile İlişkisi Olan Bazı Flavonoidler

Flavonoidler ve diğer bitki fenolikleri antikanserojenik, antienflamatuar, antibakteriyel, bağışıklık uyarıcı, antialerjik, antiviral serbest radikal temizleme, vazodilatör ve östrojenik etkilerinin yanı sıra fosfolipaz A2, siklooksijenaz ve lipoksijenaz, glutatyon redüktaz ve ksantin oksidaz inhibitörleri olarak çok çeşitli biyolojik aktivite gösterirler (Rice-Evans ve ark., 1996; Havsteen, 2002; Williams ve ark., 2004; Kumar ve Pandey, 2013; Lu ve ark., 2013).

## 2.8. Flavonoidlerin *in vitro* ve Hücre Modellerinde Antienflamatuar Özellikleri

Bitkisel flavonoidlerin *in vitro* ve *in vivo* antienflamatuar etkinliğe sahip olduğu bilinmektedir. Bitkisel flavonoidler bu etkilerini fosfolipaz A2, siklooksijenazlar ve lipoksijenazlar da dahil olmak üzere eikozanoid üreten enzimlerin inhibisyonu ile gerçekleştirmektedir. Bu inhibisyon prostanooidlerin ve lökotrienlerin konsantrasyonunu azaltır. Bazı flavonoidler, özellikle flavon türevleri, siklooksijenaz-2, indüklenebilir nitrik oksit sentaz ve bazı önemli sitokinler gibi proenflamatuar etki gösteren moleküllerin gen ekspresyonu modüle ederek antienflamatuar aktivite gösterir (Kim ve ark., 2004). Flavonoidlerin etki mekanizması Şekil 7'de sunuldu.

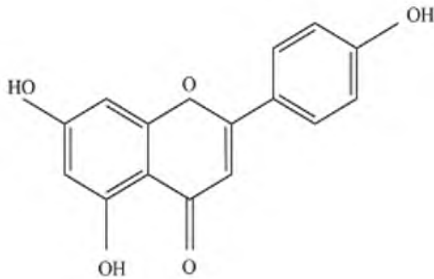


Şekil 7. Flavonoidlerin etki mekanizması, F: flavonoid, NSAID: nonsteroid antiinflatuar ilaçlar, SAID: steroidal antiinflatuar ilaçlar, =: enzim inhibisyonu ifadesi ve ↓ ekspresyonun down regülasyonu (Kim ve ark., 2004)

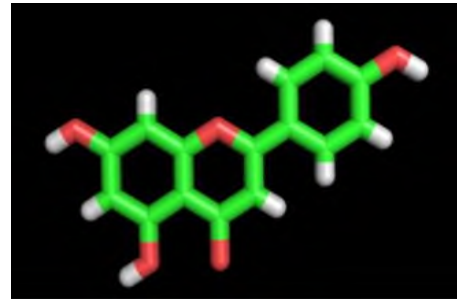
## 2.9. Apigenin

Apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon), moleküler ağırlığı 270,24 g ve kimyasal formülü  $C_{15}H_{10}O_5$  olan bitkisel bir flavonoiddir (Shukla ve Gupta, 2010).

Apigeninin iki boyutlu yapısı

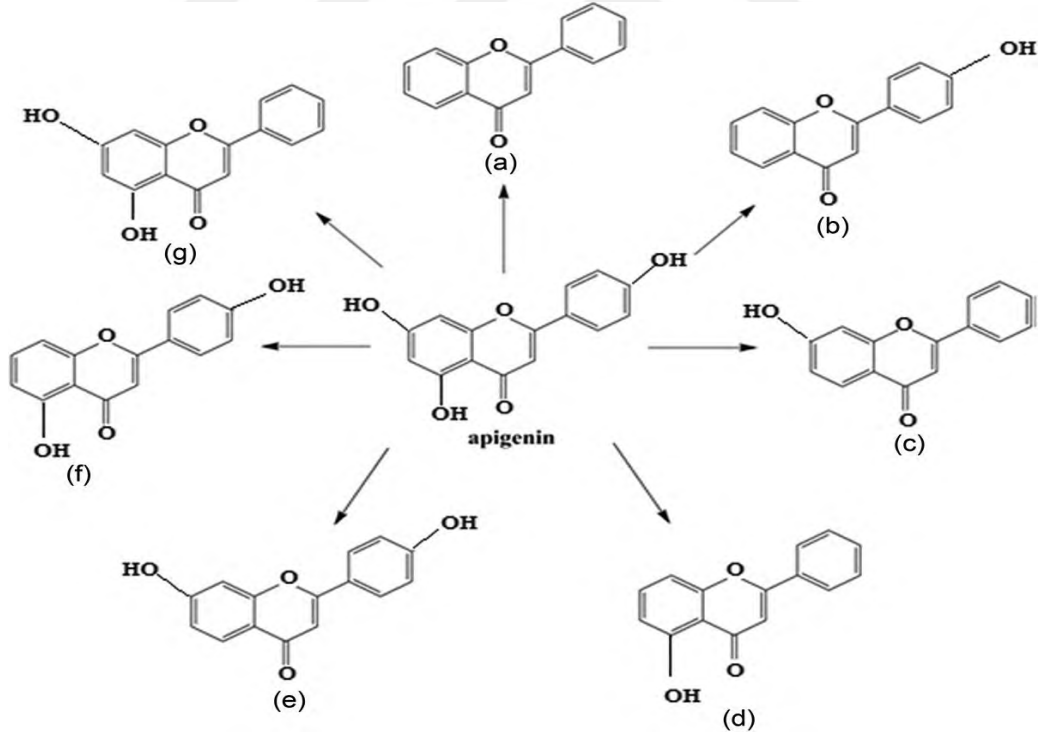


Apigeninin üç boyutlu yapısı



Şekil 8. Apigeninin iki boyutlu ve üç boyutlu yapısı (Pashaei, 2016)

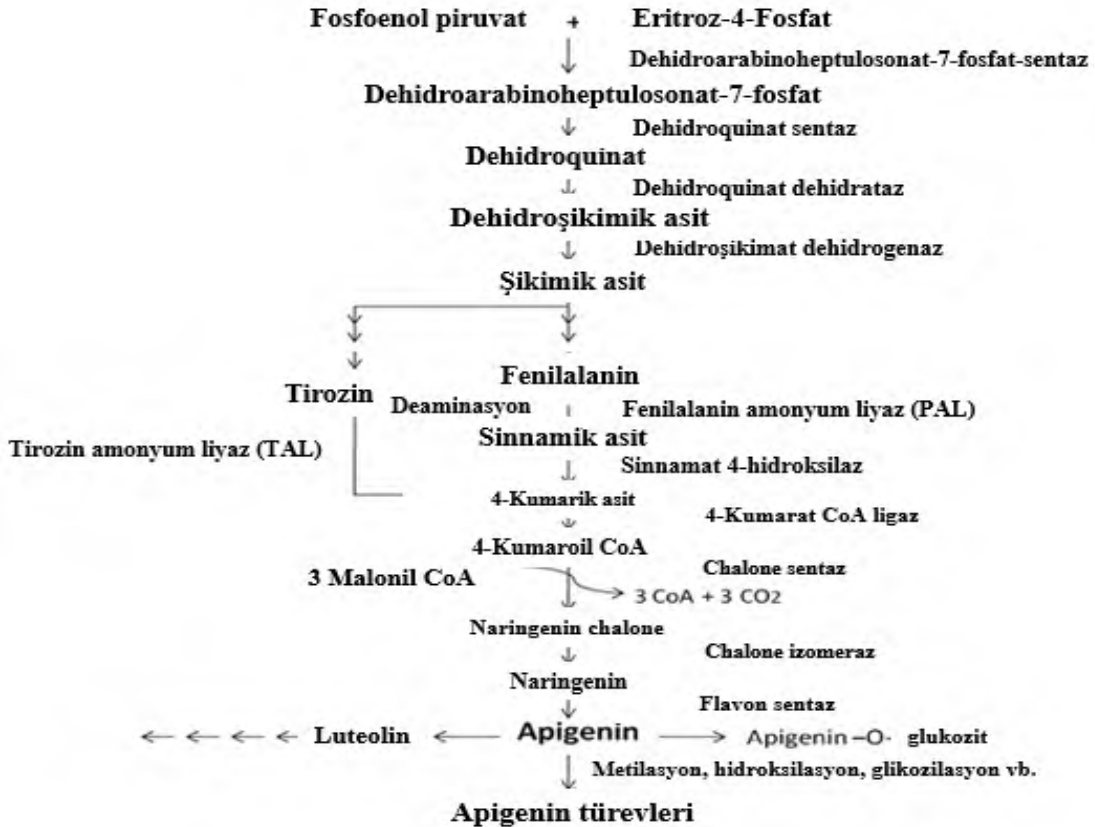
Apigenin elma, portakal, limon, greyfurt, çay, maydanoz, kereviz, biberiye, kekik, fesleğen, kişniş, sarı papatya, karanfil, enginar ve ıspanakta bol miktarda bulunmaktadır (Shukla ve Gupta, 2010; Pashaei, 2016). Apigenin 4',5,7 - trihidroksiflavon olarak üç hidroksil ikame edicisine sahip bir flavonoid türevidir. Hidroksil gruplarının uzaklaştırılması, flavonların temel yapısını vermektedir (a). Apigenin 4', 5 ve 7 pozisyonlarında ayrı ayrı mono-sübstitüsyonlu hale getirilmekte ve sonuçta farklı bileşikler olan 4'-hidroksiflavon (b), 7-hidroksiflavon (c) ve 5-hidroksiflavon (d) oluşmaktadır. Daha fazla hidroksilasyon ile 4', 7-dihidroksiflavon (e), 4', 5-dihidroksiflavon (f) ve 5,7-dihidroksi flavonları (g) şeklinde üç adet dihidroksi-flavon üretebilmektedir. Apigenin, temel flavonoid iskeletinin 4', 5 ve 7 konumlarındaki seçici hidroksil substitusyonlarından üretilen en çok yedi olası analoga sahiptir (Ali ve ark., 2017). Apigenin türevleri ve doğal analogları Şekil 9'da gösterildi.



**Şekil 9.** Apigenin türevleri ve doğal analogları (Ali ve ark., 2017)

- (a) Flavon temel yapısı, (b) 4'-hidroksiflavon, (c) 7-hidroksiflavon ve (d) 5-hidroksiflavon  
(e) 4', 7-dihidroksiflavon, (f) 4', 5-dihidroksiflavon, (g) 5,7-dihidroksi flavon

Apigenin, ikincil metabolit olarak bitkilerde sentezlenmektedir. Bütün flavonoidler temel olarak, bitkilerde şikimik asit yolu tek bir temel yoldan sentezlenmektedir. Bu yolda eritroz-4-fosfat ve fosfoenol piruvat aromatik amino asitlere dönüştürülmektedir. Eritroz-4-fosfat ve fosfoenol piruvat dihidroarabinoheptulosonat-7-fosfat sentaz etkisi altında birleşerek dihidroarabinoheptulosonat-7-fosfatı oluşturmaktadır. Dihidroarabinoheptulosonat-7-fosfat daha sonra dehidrokinat, dehidro şikimik asit, şikimik asit ve amino asitler içeren aromatik halkaya dönüştürülmektedir. Halkalar sinamik asit gibi fenil propanoid bileşiklerinden oluşmaktadır. Sinamik asitten birkaç biyosentetik basamak ile naringenin üretilmektedir. Naringenin, flavon sentaz enzimi ile apigenine, apigenin ise glikozilasyon, metilasyon ve hidroksilasyon ile türevlerine dönüştürülmektedir (Kahraman ve ark., 2002; Ali ve ark., 2017). Apigeninin ve apigenin türevlerinin biyosentezi Şekil 10'da sunuldu.

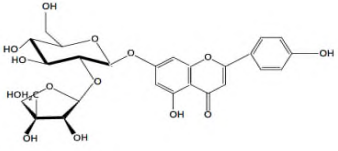
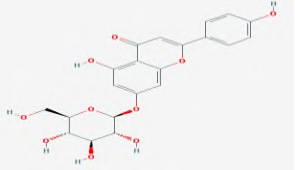
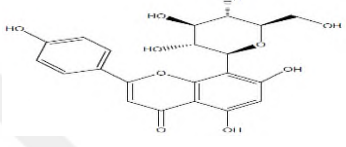
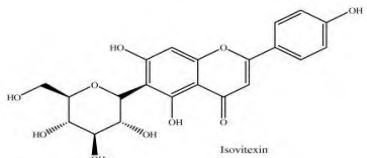

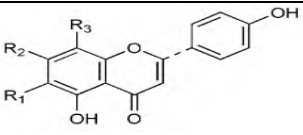
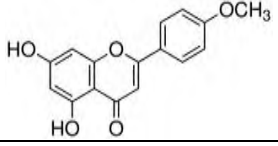


Şekil 10. Apigenin ve türevlerinin biyosentezi (Ali ve ark., 2017)

## 2.10. Bitkilerdeki Apigenin Türevleri

Bitkilerde bulunan bazı apigenin türevleri Tablo 1’de sunuldu.

**Tablo 1.** Bitkilerdeki apigenin türevleri.

İsim	Kaynağı	Kimyasal yapısı
Apiin (apigenin 7-O-apio-glukozit)	Maydanoz ve kereviz (Mencherini ve ark, 2007; Kasthuri ve ark, 2009)	
Apigetrin (apigenin 7-glukozit)	Papatya (Lim ve ark, 2016)	
Viteksin (apigenin 8-C-glukozit)	Mung fasulyesi, bambu yaprağı, alıç yaprağı (Prabhakar ve ark, 1981)	
İzoviteksin (apigenin 6-C-glukozit)	Mung fasulyesi, bambu yaprağı, bezelye yaprağı (Peng ve ark, 2008)	
Rhoifolin (apigenin 7-O-neohesperidoside)	Sumak yaprağı, greylift (Rao ve ark, 2011)	
Schaftoside (apigenin 6-C-glukozit 8-C-arabinoside)	Yılan yastığı (Wohlmuth ve ark., 2010)	
Acacetin (4'-metoksi dihidroksiflavon)	Propolis, damiana ve huş ağacı (Kim ve ark., 2014; Jiang ve ark, 2017)	



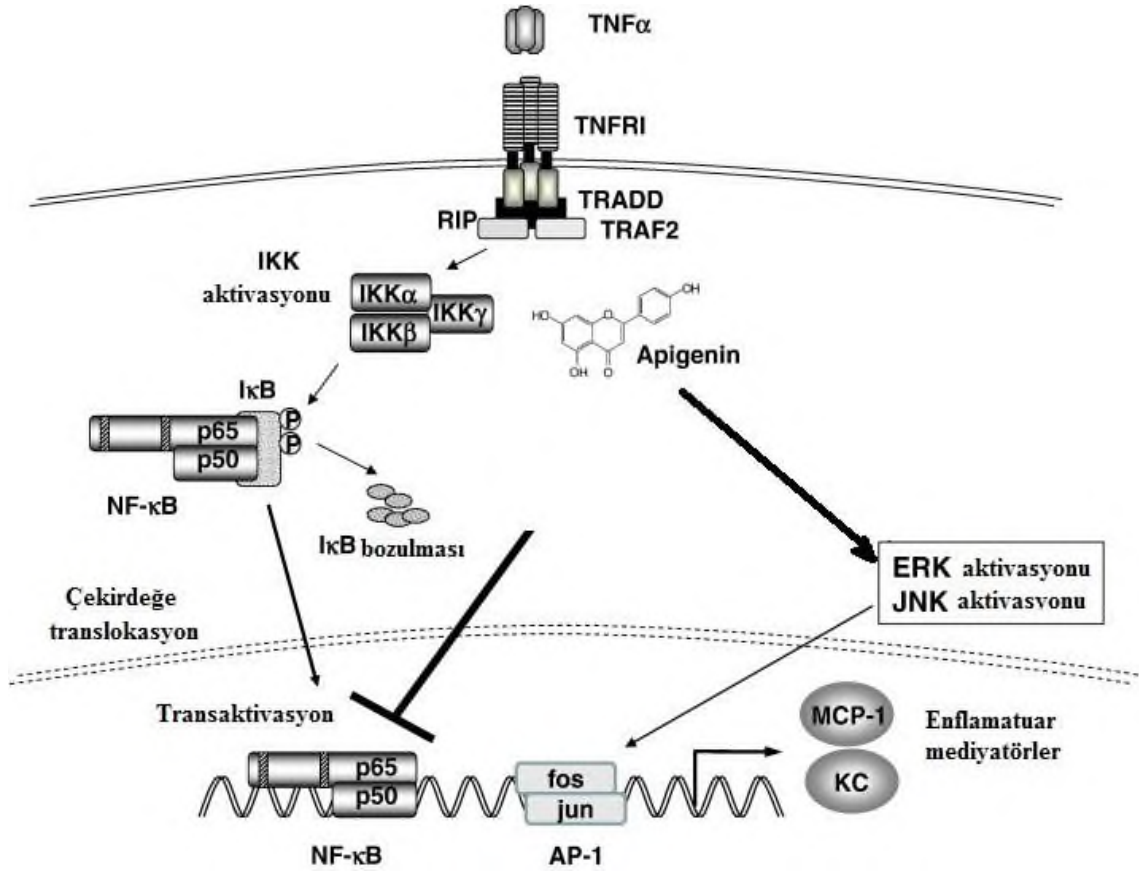
### **2.11. Apigeninin Metabolizması**

Polifenollerin emilimi başlıca bağırsaklarda olmaktadır. Glikozitler ince bağırsakta veya kolonda hidrolize edilerek salınan aglikonlar emilmektedir (D'Archivio ve ark., 2010). Bir polifenol türevinin serbest aglikona hidrolizinden sonra, polifenoller metilasyon, sülfasyon ve glukuronidasyon ile konjuge edilmektedir. Gıda polifenollerini farmakolojik dozlarda uygulandığında dolaşımında serbest formda bulunmaktadır (Scalbert ve ark., 2002). Büyük dozdaki polifenoller kan dolaşımına geçmeden önce esas başlıca karaciğerde konjugasyona maruz kalarak yapısal değişikliklere uğramaktadır (D'Archivio ve ark., 2010). Küçük dozda ise bağırsak mukozası tarafından metabolize edilmektedir (Scalbert ve ark., 2002). Midede ya da ince bağırsakta emilen, karaciğerde metabolize olan ve safra içine atılan veya enterositten doğrudan ince bağırsağa atılan polifenoller glukuronit formunda kolona ulaşmaktadır. Midede ya da ince bağırsakta emilime uğramayan polifenoller ise kolona taşınmakta ve kolon mikroflorası polifenolün fenolik asitler gibi daha basit bileşiklere parçalanmasını sağlamaktadır (Scalbert ve Williamson, 2000).

### **2.12. Apigeninin Antienflamatuar Etkileri**

Apigeninin antienflamatuar özelliklere sahip olduğu pek çok araştırma ile ortaya konulmuştur (Nicholas ve ark., 2007; Rezai-Zadeh ve ark., 2008; Funakoshi-Tago ve ark., 2011; Rithidech ve ark., 2012; Wang ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2014). Farelerde intratrakeal akut akciğer hasarı modelinde profilaktik apigenin uygulamasının bronkoalveoler lavaj sıvısında IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  konsantrasyonlarını, lökosit sayısını ve nötrofil yüzdesini azaltarak, COX-2 ve nükleer faktör kappa b (NF- $\kappa$ B) yollarını baskılayarak antienflamatuar etki gösterdiği rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2014). Apigeninin akciğer dokusunda lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen NF- $\kappa$ B aktivitesini baskıladığı, enflamatuar hücrelerin infiltrasyonunu azalttığı ve kemotaktik faktörlerin birikimini azalttığı rapor edilmiştir (Cardenas ve ark., 2016). Apigeninin, insan monosit hücreleri tarafından T yardımcı hücre-1 ve -2 (Th1- Th2) ilişkili kemokin üretimini mitojenle aktive protein kinaz yollarını modüle ederek baskıladığı antienflamatuar potansiyeli olduğu bildirilmiştir (Huang ve ark., 2010). Apigeninin fare

makrofajlarında, LPS ile indüklenmiş COX-2 ve nitrik oksit sentetaz-2 aktivitelerini ve ekspresyonlarını baskılayarak antiinflamatuvar etki gösterdiği anlaşılmıştır (Liang ve ark., 1999). Ovalbumin ile duyarlılaştırılmış BALB/c farelere diyetle apigenin uygulamasının, Th2 hücrelerden interlökin-4 (IL-4) salınımını inhibe ettiği belirlenmiştir (Yano ve ark., 2007). Apigenin, TNF- $\alpha$  kaynaklı NF- $\kappa$ B transkripsiyonel aktivasyonunu baskılamaktadır (Funakoshi-Tago ve ark., 2011). Apigeninin TNF- $\alpha$  sinyal yolağına etkisi Şekil 11’de sunuldu.



**Şekil 11.** Apigeninin TNF- $\alpha$  sinyal yolağına etkisi. Apigenin TNF- $\alpha$  kaynaklı NF- $\kappa$ B transkripsiyonel aktivasyonunu önemli ölçüde inhibe etmektedir (Funakoshi-Tago ve ark., 2011)

### 2.13. İnterlökin-10'un Böbrek Hastalıklarındaki Rolü

İnterlökin-10, Th1 ve Th2 hücre cevaplarını baskılayan, NK hücrelerin sitotoksik etkisini artıran antienflamatuvar bir sitokindir (Del Prete ve ark., 1993). Th2-polarize hücreleri Th1 hücrelerini azaltarak ve makrofaj aktivasyonunu baskılayarak IL-4, IL-5 ve IL-10 gibi antienflamatuvar sitokinleri salgılamaktadırlar. İnterlökin 10, Th1 hücrelerinin ürettiği sitokin üretimini engelleyebilen bir Th2 yardımcı T-hücresi ürünü olup B hücrelerini aktive ederek fazla miktarda IgG, IgA ve IgM salgılanmasını indüklemektedir. İnterlökin-10, humoral yanıtların düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Rousset ve ark., 1992; Mosmann ve Sad, 1996).

Yetişkin sağlıklı böbrekte IL-10'un en büyük lokal kaynağı mesangiyal hücreler olup bu hücreler böbrek fonksiyonlarının anahtar regülatörleri olarak hücre dışı matriksin salgılanması ve bakımı ile glomerulun normal yapısının ve fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemli görev almaktadır. Mesangiyal hücre çoğalması ile ilişkilendirilen IL-10 artışının glomerulonefrit, IgA nefropatisi (Berger hastalığı) ve mikroskopik polianjit gibi çeşitli böbrek hastalıklarının patofizyolojisinde rol oynadığı öne sürülmektedir (Sinuani ve ark., 2010; Sinuani ve ark., 2013).

Son dönem böbrek hastalığı olan bireylerde, renal replasman tedavisi boyunca biyo-uyumsuzluk reaksiyonlarına neden olan ajanlar, endotoksinler, aktif tamamlayıcı parçacıklar nedeniyle monosit ve makrofajlarda IL-10 üretimi artmakta ve bu durum artmış IL-10 plazma düzeylerine yol açmaktadır. Kronik böbrek hastalığı bulunan üremik hastalarda kronik monosit aktivasyonunun bir sonucu olarak sağlıklı bireylere kıyasla IL-10 konsantrasyonları daha yüksek seviyelerdedir (Stenvinkel ve ark., 2005). Diyabetik nefropatili hastaların dolaşımındaki IL-10 seviyelerinin yükseldiği ve albuminuri ile birlikte serumda artmış IL-10 konsantrasyonları ile diyabetik nefropatinin şiddeti arasında korelasyon ve IL-10 artışının dolaylı olarak diyabetik nefropati progresyonuna katkıda bulunabileceği bildirilmektedir (Myśliwska ve ark., 2005). Dalaktan üretilen IL-10'un obezite kaynaklı böbrek hastalıklarına karşı koruyucu olabileceği ve obez bireylerde ise dalaktan IL-10 indüklenmesinin azaldığı bildirilmiştir (Gotoh ve ark., 2013; Spoto ve Zoccali, 2013). İnterlökin 10 eksikliği tek taraflı uretral tıkanıklık oluşturulan fare modelinde böbrek enflamasyonunu ve fibrozisini artırmaktadır (Jin ve ark., 2013).

## **2.14. Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF- $\beta$ )'nın Böbrek Hastalıklarındaki Rolü**

Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ), hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, apoptozunu, migrasyonunu ve birçok farklı hücrenin adhezyonunu düzenleyen sitokin ailesinin bir üyesidir. Dönüştürücü büyüme faktörü beta ailesi embriyogenezis, doku onarımı ve doku homeostazının korunmasında rol oynamakta ve enflamasyon ve fibrozisin büyük bir düzenleyicisi olarak bilinmektedir. Epitelyal mikro yaralanmalarda TGF- $\beta$  sinyal dizisi aktivasyonu epitelyal apoptozis ve epitelyal/mezenkimal geçiş dahil olmak üzere, fibrojenik odakları tetikleyen ve kronik böbrek hasarında progresif fibrogenezise neden olan, hücre türüne bağlı çeşitli sinyalizasyon ve aktivasyonu başlatabilmektedir. Dönüştürücü büyüme faktörü beta'nın, kronik böbrek hastalığı gelişimi sırasında fibroblast çoğalması, epitelyal geçiş, tubuler ve ekstraselluler fibroblast üretimi, tubuler hücre silinmesine ve interstisyel fibroza yol açan epitelyal hücre ölümü gibi önemli patolojik olaylara aracılık ettiği gösterilmiştir (Chang ve ark., 2002; Böttinger, 2007; López-Hernández ve López-Novoa, 2012).

Farklı patolojik durumlarda glomerullardan TGF- $\beta$  üretimi artmaktadır. Glomerulonefritlerde, antiglomeruler taban membranı nefritlerinde, Habu-venom glomerulonefritlerinde, puromisin kaynaklı nefrozda, diyabetik glomerulopatide, nefropati ile ilişkili üretral tıkanıklık durumlarında TGF- $\beta$  sekresyonu uyarılmaktadır (Border ve ark., 1992; Kitamura ve Sütö, 1997; Koya ve ark., 1997; Murakami ve ark., 1997). Tip 2 diyabet fare modelinde nötrleştirici bir anti-TGF- $\beta$  antikoru ile yapılan tedavinin diyabetik nefropati gelişimini önleyebileceği gösterilmiştir. Renal TGF- $\beta$  aktivitesinin inhibe edilmesinin, bu fare modelinde glomeruler bazal membran kalınlaşmasını ve mesangiyal matriks genişlemesini kısmen tersine döndürdüğü gösterilmiştir (Chen ve ark., 2003). Nefrotik sendromda idrarda TGF- $\beta$  düzeyinin arttığı bildirilmiştir (Wasilewska ve Zoch-Zwierz, 2004). Nefrotik sendromlu olgularda yapılan bir çalışmada ağır proteinuriden muzdarip hastaların böbrek dokusunda TGF- $\beta$  sentezi ve ekspresyonu tubuler epitel hücreleri sitoplazması içinde lokalizedir. Üriner TGF- $\beta$  salgılanması nefrotik hastalarda sağlıklı kişilere kıyasla anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (Goumenos ve ark., 2002). Fokal segmental glomeruloskleroz da TGF-

$\beta$ 'nin anlamlı olarak yüksek olduğu bildirilmiştir (Akagi ve ark., 1996; Kim ve ark., 2003).

Ekstraselluler matriks birikimi ile TGF- $\beta$ 'nin yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Schnaper ve ark., 2009). Tekrarlanan glomeruler yaralanmalar sonrasında glomeruler turevli TGF- $\beta$ 'nin tubulointerstisyel hucreleri aktive ederek TGF- $\beta$  uretebileceği ortaya konulmuştur. Glomeruler ve tubulointerstisyel hucreler tarafından surekli olarak TGF- $\beta$  ekspresyonunun hucre dışı matris birikimine ve ilerleyici bobrek fibrozunun gelişimine yol acağı bildirilmiştir (Yamamoto ve ark., 1994).

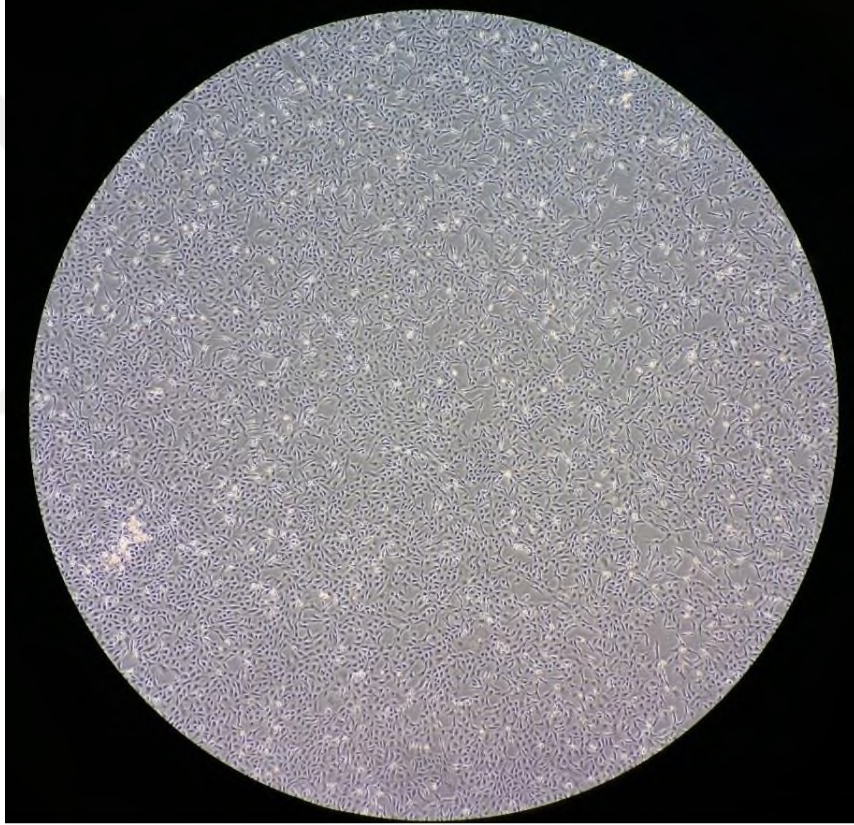


### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Vero Hücre Kültürü

Sunulan tez çalışmasında, *in vitro* böbrek hücre enflamasyonu modeli Afrika yeşil maymun böbrek hücre hattında (Vero) oluşturuldu. Hücre kültürü Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda hazırlandı.



Şekil 12. Vero hücrelerinin invert mikroskoptaki görünümü (x 4 büyütme)

##### 3.1.2. Deneme Planı

Vero hücre kültürü Dulbecco tarafından modifiye edilen MEM solusyonu (DMEM) ve %10 fotal dana serumu ile hazırlanan vasatta üretildi. Olası kontaminasyonu engellemek amacıyla filtre kapaklı hücre kültürü flaskları kullanıldı ve besiyeri iki günde bir değiştirildi. Hücre sağkalımı ve morfolojik yapısı invert

mikroskop ile değerlendirildi.

Enflamasyon oluşturulması amacıyla, hücreler, 2, 4, 8, 16 ve 24 saat boyunca farklı lipopolisakkarit (*E. coli* O111: B4) konsantrasyonları (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml) ile kültüre edildi. Lipopolisakkaritin enflamasyon dozu daha önceki bilimsel çalışmalar (Huang ve ark., 2005; Oda ve ark., 2007; Zager ve ark., 2007; Hu ve ark., 2012; Etoh ve ark., 2013; Neiva ve ark., 2014) baz alınarak Vero hücre kültürü supernatantlarındaki TNF- $\alpha$  ve IL-6 konsantrasyonlarının ölçümüyle belirlendi. Vero hücrelerine 4 saat boyunca 5 µg/ml dozda LPS uygulamasının enflamatuar sitokinler olan TNF- $\alpha$  ve IL-6 konsantrasyonlarını artırdığı saptandı. Apigenin uygulaması için uygun dozun belirlenmesi amacıyla daha önceki *in vitro* çalışma (Smolinski ve Pestka, 2003) göz önünde bulundurulmakla birlikte hücreler, 12 saat boyunca farklı apigenin konsantrasyonları (1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml) ile kültüre edildi ve uygun koruyucu doz hücre sayım testi sonucuna göre belirlendi. Buna göre, Vero hücrelerine apigenin uygulamasının uygun koruyucu dozu 5 µg/ml ve süresi 12 saat olarak seçildi. Tüm uygulamalar dört tekrarlı gerçekleştirildi.

## **Gruplar**

Tez çalışması kapsamında 4 grup oluşturuldu.

**1. grup (negatif kontrol grubu):** Herhangi bir uygulama yapılmayan DMEM vasat ortamındaki Vero hücreleri

**2. grup:** Lipopolisakkarit eklenen DMEM vasat ortamındaki Vero hücreleri

**3. grup:** Apigenin eklenen DMEM vasat ortamındaki Vero hücreleri

**4. grup:** Lipopolisakkarit + apigenin eklenen DMEM vasat ortamındaki Vero hücreleri

Uygulamalardan sonra hücre kültürü mediumları 2.500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve üstteki supernatantlarda ELISA analizleri gerçekleştirildi (Li ve ark., 2017).

## **3.2. Metot**

### **3.2.1. Analizler**

Hücre kültürünün 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 gerçekleştirildi.

### **Apigeninin Non-sitotoksik Dozunun Hesaplanması (Sitotoksikite Testleri)**

Apigeninin Vero hücrelerindeki sitotoksik etkisi hücre sayım testi (96992, Sigma-Aldrich, USA) ile değerlendirildi. Test, üretici firma tarafından bildirilen yöntemine göre uygulandı. Bu amaçla, 96 kuyucuklu pleyte mililitresinde  $1 \times 10^5$  Vero hücresi olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonundan 100 µl ilave edilerek 37°C'lik etüvde inkube edildi. Hücreler 24 saat sonunda pleyt yüzeyini kapladığında kuyucuklardaki hücre üretme vasatı boşaltıldı ve hücre üretme vasatı içerisinde hazırlanan, stok apigeninin 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml olmak üzere 3 farklı konsantrasyonundan ve her sulandırmadan 2'şer kuyucuğa 10 µl ilave edilerek pleytler 22°C'lik etüvde inkube edildi. Kontrol hücrelerin kuyucuklarına ise apigenin yerine 10 µl hücre üretme vasatı ilave edildi. İnkubatörden 12 saat sonra alınan pleytlerin kuyucukları içerisindeki apigenin pipet yardımı ile boşaltılıp, tüm kuyucuklara hücre sayım solüsyonundan 10 µl eklendi ve 37°C de 2 saat inkube edildi. Süre sonunda Mikropleytin optik dansitesi, mikropleyt okuyucuda (Tecan Infinite F50) 450 nm dalga boyunda okundu. Test 4 kez tekrarlandı ve apigeninin non sitotoksik dozu "[1- (OD test) / (OD kontrol)] × 100" formülüne göre hesaplandı.

### **ELISA analizleri**

#### **IL-6 Konsantrasyonunun Ölçümü**

Hücre kültürü supernatantlarında IL-6 konsantrasyonunun ölçümünde maymuna özgü ELISA test kiti (LS-F4822, LifeSpan Biosciences Inc., Seattle Downtown, Washington, USA) kullanıldı. Tüm örnekler çift çalışıldı. ELISA basamakları üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Kitin ölçüm aralığı 0-1.000 pg/ml idi. Referens standart olan 1.000 pg/ml konsantrasyondaki standart örnek sulandırıcı ile sulandırılarak 1.000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,63 pg/ml ve 0 pg/ml'lik standartlar hazırlandı. Mikropleyttteki standart kuyucuklarına 100'er µl standart örneklerinden, test kuyucuklarına 100'er µl hücre kültürü supernatantlarından pipetlendi. Mikropleytin üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatılarak 37° C'de 1 saat inkube edildi. Süre sonunda, kuyucukların tamamı boşaltılarak tüm kuyucuklara 100 µl Reaktif A solüsyonu pipetlendi. Mikropleytin üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatılarak 37° C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. Ardından tüm kuyucuklardaki



sıvı boşaltılarak her bir kuyucuğa 350 µl yıkama solüsyonu eklendi ve 1-2 dakika süreyle bekletildikten sonra aspire edilip mikropleyt kurutma kâğıdı üzerine ters çevirilerek kuyucuklardaki sıvı tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama aşaması 3 kez tekrarlandı. Tüm kuyucuklara 100 µl Reaktif B konulduktan sonra üzeri filmle kapatılarak 37° C'de 30 dakika inkube edildi. Süre sonunda kuyucuklardaki sıvı aspire edilerek tüm kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Ardından her bir kuyucuğa 90 µl TMB substrat solüsyonu pipetlendi, yeni bir şeffaf yapışkan filmle kapatılarak ve 37 ° C'de 15 dakika inkube edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Mikropleytin optik dansitesi 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Test sonunda her kuyucuğun absorbansı mikropleyt okuyucuda kaydedilerek IL-6 konsantrasyonları standart optik dansitelerine göre hesaplandı. Sonuçlar pg/ml olarak sunuldu.

### **Tümör Nekroz Faktör- $\alpha$ Konsantrasyonunun Ölçümü**

Hücre kültürü supernatantlarında TNF- $\alpha$  konsantrasyonu ELISA yöntemi ile maymuna özgü ELISA test kiti (LS-F4818, LifeSpan Biosciences Inc., Seattle Downtown, Washington, USA) kullanılarak ölçüldü. Tüm örnekler çift çalışıldı. ELISA basamakları üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Kitin ölçüm aralığı 0-500 pg/ml idi. Referens standart olan 500 pg/ml konsantrasyondaki standart örnek 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 örneklerinden, test kuyucuklarına 100'er µl hücre kültürü supernatantlarından pipetlendi. Mikropleytin üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatılarak 37° C' de 90 dakika inkube edildi. Süre sonunda, kuyucukların tamamı boşaltılarak tüm kuyucuklara 100 µl Reaktif A solüsyonu pipetlendi. Mikropleytin üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatılarak 37° C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. Ardından tüm kuyucuklardaki sıvı boşaltılarak her bir kuyucuğa 350 µl yıkama solüsyonu eklendi ve 1-2 dakika süreyle bekletildikten sonra aspire edilip mikropleyt kurutma kâğıdı üzerine ters çevirilerek kuyucuklardaki sıvı tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama aşaması 3 kez tekrarlandı. Tüm kuyucuklara 100 µl Reaktif B solüsyonu konulduktan sonra üzeri filmle kapatılarak 37° C'de 30 dakika inkube edildi. Süre sonunda kuyucuklardaki sıvı aspire edilerek tüm kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Ardından her bir

kuyucuğa 90 µl TMB substrat solüsyonu pipetlendi, yeni bir şeffaf yapışkan filmle kapatılarak ve 37° C'de yaklaşık 15 dakika inkube edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Mikropleytin optik dansitesi 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Mikropleyt okuyucuda her bir kuyucuğun optik dansiteleri okundu ve TNF-α konsantrasyonları standartların optik dansitelerine göre hesaplandı ve sonuçlar pg/ml olarak sunuldu.

### **IL-10 Konsantrasyonunun Ölçümü**

Hücre kültürü supernatantlarında IL-10 düzeyi ELISA yöntemi kullanılarak maymuna özgü ELISA kiti (LS-F25130, LifeSpan Biosciences Inc., Seattle Downtown, Washington, USA) ile ölçüldü. Kitin ölçüm aralığı 0-1.000 pg/ml olup tüm örnekler çift çalışıldı. Stok standart olan 1.000 pg/ml konsantrasyondaki standart örnek 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 ve 0 pg/ml'lik standartlar hazırlandı. Mikropleyttteki standart kuyucuklarına 100'er µl standart örneklerinden, test kuyucuklarına 100'er µl hücre kültürü supernatantlarından pipetlendi. Mikropleytin üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatılarak 37° C'de 1 saat inkube edildi. Daha sonra kuyucuklardaki sıvı aspire edilerek bütün kuyucuklara 100 µl Reaktif A solüsyonu eklendi. Mikropleyt, üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatılarak 37° C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. Tüm kuyucuklardaki sıvı boşaltılarak kuyucukların hepsine 350 µl yıkama solüsyonu eklendi ve 1-2 dakika süreyle bekletildikten sonra aspire edilip mikropleyt kurutma kâğıdı üzerine ters çevirilerek kuyucuklardaki sıvı tamamen uzaklaştırıldı. Yıkama aşaması 3 kez tekrarlandı. Tüm kuyucuklara 100 µl Reaktif B solüsyonu konulduktan sonra üzeri filmle kapatılarak 37° C'de 30 dakika inkube edildi. Süre sonunda kuyucuklardaki sıvı aspire edilerek tüm kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Ardından her bir kuyucuğa 90 µl TMB substrat solüsyonu pipetlendi, yeni bir şeffaf yapışkan filmle kapatılarak ve 37° C'de yaklaşık 15 dakika inkube edildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Reaksiyon sonunda mikropleytin optik dansitesi 450 nm dalga boyunda kaydedildi. Mikropleyt okuyucuda her bir kuyucuğun optik dansiteleri okundu ve IL-10 konsantrasyonları standartların optik dansitelerine göre hesaplandı. Sonuçlar pg/ml olarak sunuldu.

### **Dönüştürücü Büyüme Faktörü- $\beta$ Konsantrasyonunun Ölçümü**

Hücre kültürü supernatantlarında TGF- $\beta$  konsantrasyonunun belirlenmesinde ELISA maymuna özgü ELISA kiti (MBS737903, MyBioSource, Inc., San Diego, CA, USA) kullanıldı. Tüm örnekler çift çalışıldı. ELISA basamakları üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Kitin ölçüm aralığı 0-1.000 pg/ml idi. Standartlar kiti içinde 0 pg/ml, 50 pg/ml, 100 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml ve 1000 pg/ml olarak mevcuttu. Mikropleyetteki standart kuyucuklarına 100'er  $\mu$ l standart örneklerinden, test kuyucuklarına 100'er  $\mu$ l hücre kültürü supernatantlarından pipetlendi. Tüm kuyucuklara önce 10  $\mu$ l balans solüsyonu eklenerek mikropleyt nazikçe çalkalandı ve ardından kuyucuklara 50  $\mu$ l konjugat pipetlendi ve mikropleyet çalkalandı. Üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatılan mikropleyt 37° C'de 1 saat inkubasyona bırakıldı. Süre sonunda, kuyucukların tamamı boşaltılarak tüm kuyucuklar yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Bütün kuyucuklara 50  $\mu$ l substrat A ve 50  $\mu$ l substrat B solüsyonu eklendi. Mikropleyitin üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatılarak ve ışıktan uzak tutularak 25° C'de 15 dakika bekletildi. Daha sonra her bir kuyucuğa 50  $\mu$ l stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Mikropleyitin optik dansitesi 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Test sonunda her kuyucuğun absorbansı mikropleyt okuyucuda kaydedilerek TGF- $\beta$  konsantrasyonları standart optik dansitelerine göre hesaplandı. Sonuçlar pg/ml olarak sunuldu.

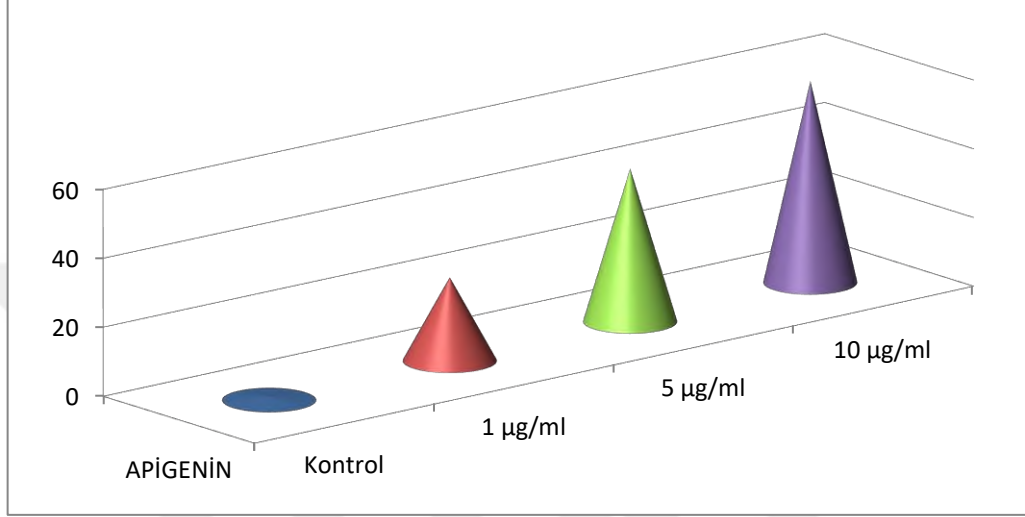
### **3.2.2. İstatistiksel Değerlendirme**

Tez çalışmasından elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için SPSS 22.0 paket programından yararlanıldı. Önemlilik testlerine geçilmeden önce tüm veriler parametrik test varsayımlarından normallik yönünden Shapiro Wilk ile, varyansların homojenliği yönünden ise Levene testi ile değerlendirildi. Gruplar arası farklılığın anlamlı bulunduğu durumlarda ileri aşama (post-hoc) testi olarak parametrik test varsayımlarını sağlayan değişkenler için Duncan testinden yararlanıldı. Tüm istatistiksel değerlendirmeler için minimum  $p < 0,05$  değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Apigeninin Vero Hücrelerindeki Sitotoksosite Yüzdeleri

Apigeninin, 12 saat boyunca, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyondaki farklı dozlarının Vero hücrelerinde oluşturduğu sitotoksosite düzeyleri Şekil 13'te sunuldu.

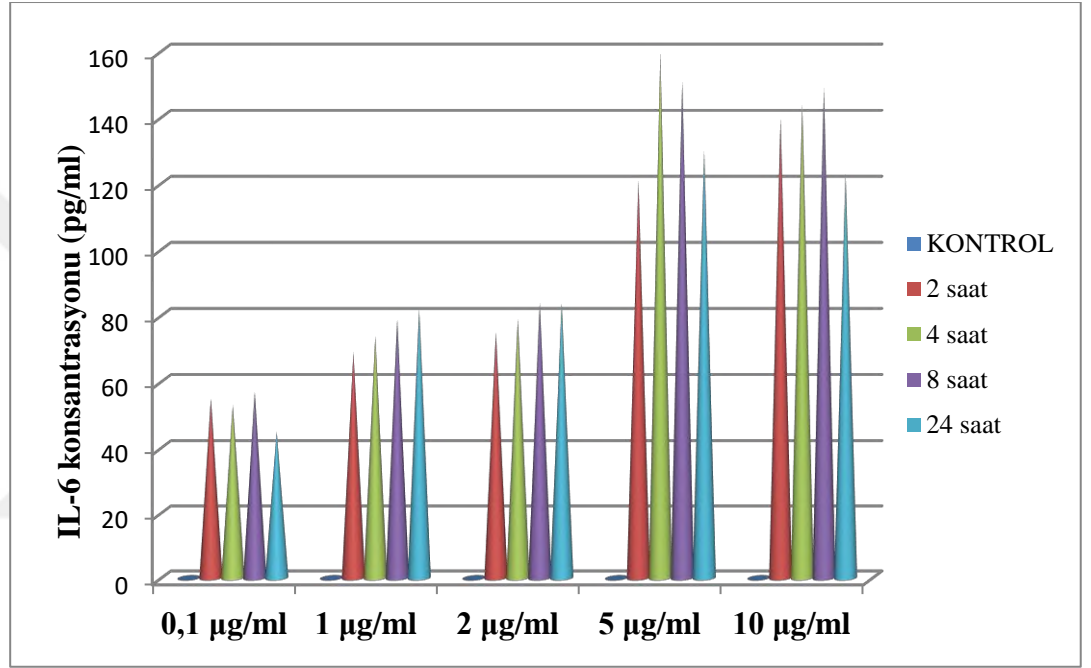


Şekil 13. Apigeninin farklı dozlarındaki sitotoksosite yüzdeleri (4 tekrarlı)

Apigeninin, 12 saat boyunca, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyondaki farklı dozlarının Vero hücrelerinde oluşturduğu sitotoksosite düzeyleri sırası ile % 24,2, % 44,5 ve % 58,6 olarak belirlendi.

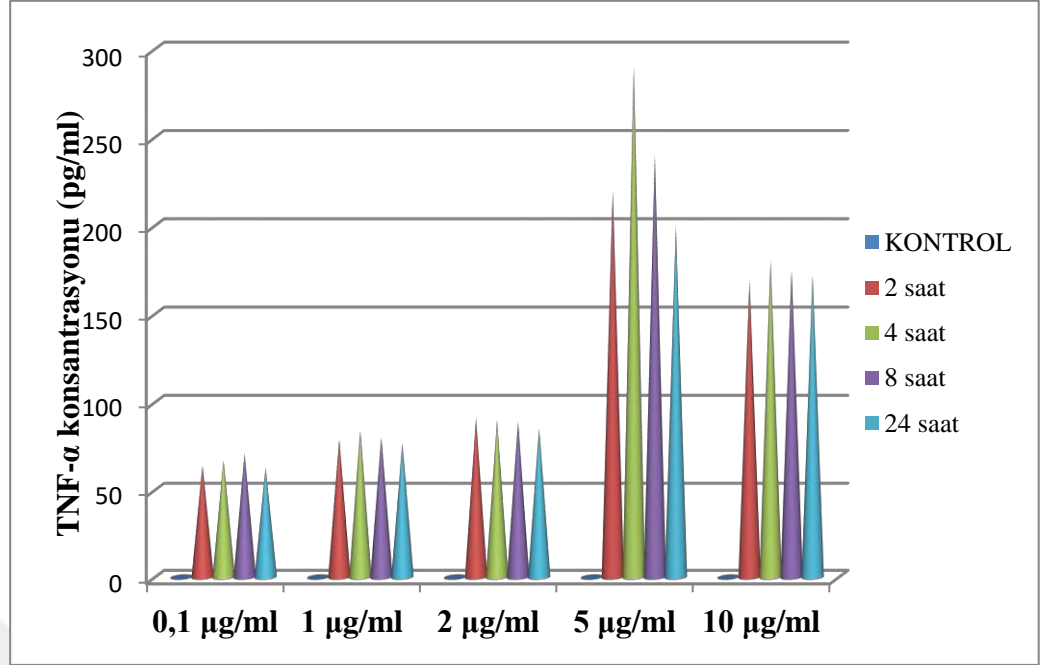
## 4.2. Lipopolisakkarit Uygulamasının Vero Hücrelerinde Proenflamatuar Sitokin Yanıtına Etkileri

Lipopolisakkarit uygulamasının Vero hücrelerinde proenflamatuar sitokinler olan IL-6 konsantrasyonuna olan etkileri Şekil 14'te ve TNF- $\alpha$  konsantrasyonuna olan etkileri Şekil 15'te sunuldu.



Şekil 14.LPS'nin farklı dozlarındaki IL-6 konsantrasyonları (4 tekrarlı)

Hücre kültürüne 2, 4, 8 ve 24 saat boyunca 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında LPS uygulaması sonucu Vero hücre kültürü mediumlarında IL-6 konsantrasyonu ölçüldüğünde, en yüksek  $160 \pm 7,35$  pg/ml IL-6 konsantrasyonu olarak 4 saat boyunca 5 µg/ml dozda LPS uygulaması ile ulaşıldığı anlaşıldı. Negatif kontrol hücrelerinde IL-6 konsantrasyonu  $53 \pm 3,92$  pg/ml olarak ölçüldü.

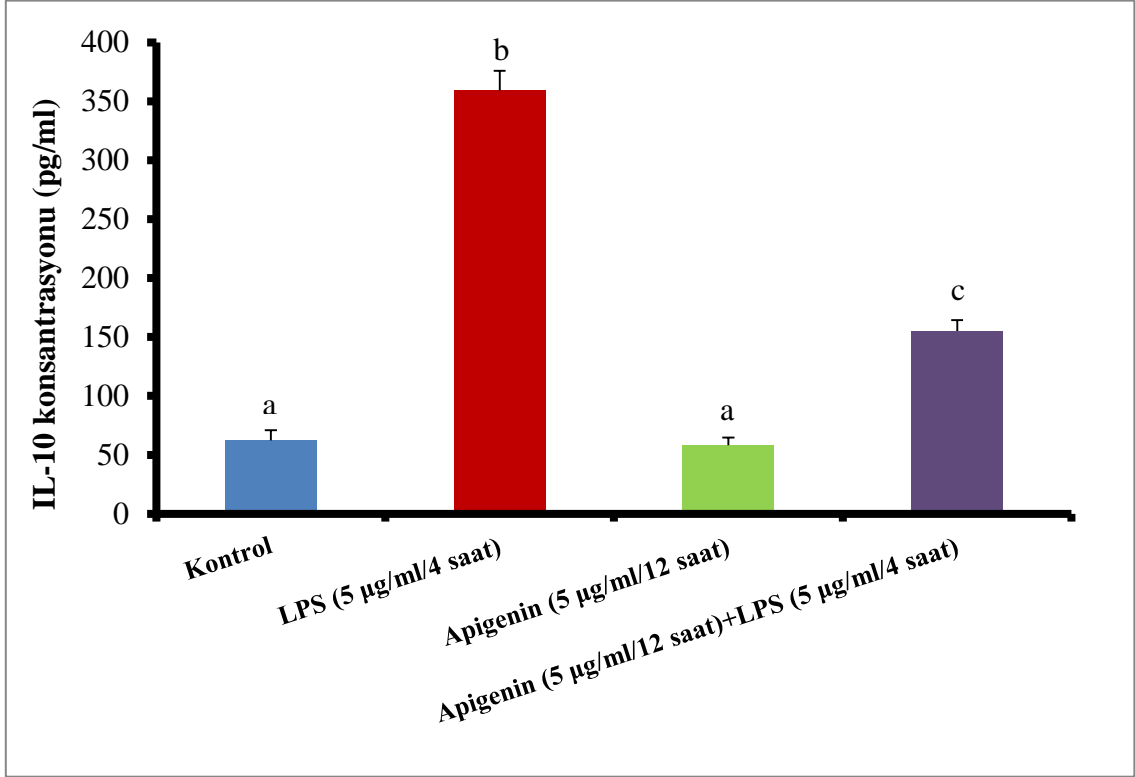


Şekil 15. LPS'nin farklı dozlarındaki TNF- $\alpha$  konsantrasyonları (4 tekrarlı)

Enflamasyon oluşturulması amacıyla 2, 4, 8 ve 24 saat boyunca 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , 1  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  ve 10  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlarında LPS ile kültüre edilen Vero hücre mediumlarından TNF- $\alpha$  konsantrasyonlarına dair elde edilen sonuçlara göre 4 saat boyunca 5  $\mu\text{g/ml}$  dozda LPS uygulamasının  $290 \pm 14,49$  pg/ml TNF- $\alpha$  konsantrasyonuna neden olduğu anlaşıldı. Negatif kontrol hücrelerinde TNF- $\alpha$  konsantrasyonunun  $67 \pm 5,72$  pg/ml olduğu belirlendi.

### 4.3. Lipopolisakkarit Uygulanan Vero Hücrelerinde Apigeninin IL-10 Konsantrasyonuna Etkisi

Lipopolisakkarit uygulanan Vero hücrelerinde apigeninin IL-10 konsantrasyonuna etkisi Şekil 16'da sunuldu.

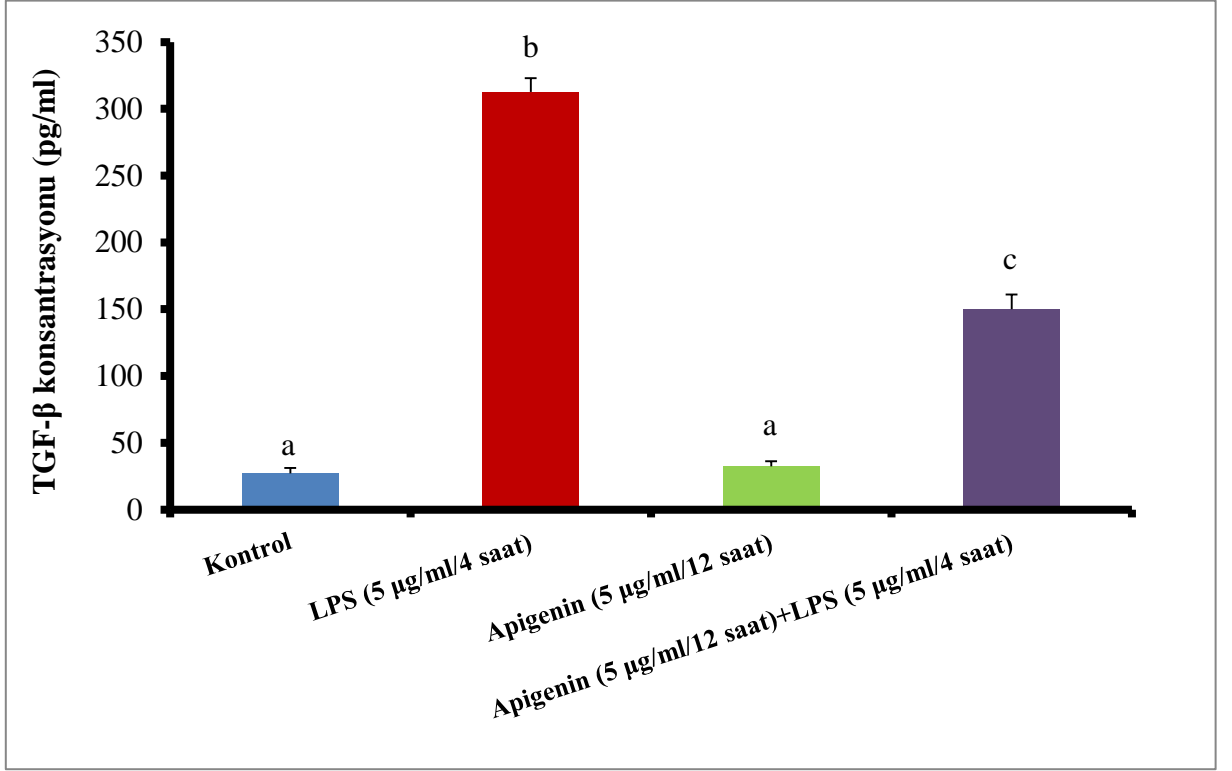


Şekil 16. LPS uygulanan Vero hücrelerinde apigeninin IL-10 konsantrasyonuna etkisi (4 tekrarlı)

Negatif kontrol grubundaki Vero hücrelerinin IL-10 konsantrasyonu  $62,3 \pm 8,5$  pg/ml olarak ölçüldü. Dört saat boyunca  $5 \mu\text{g/ml}$  dozda LPS uygulamasının Vero hücrelerinde  $359,0 \pm 16,9$  pg/ml IL-10 konsantrasyonuna neden olduğu anlaşıldı. Vero hücrelerinin 12 saat boyunca  $5 \mu\text{g/ml}$  apigenine maruz bırakılması ile  $58,3 \pm 6,4$  pg/ml IL-10 düzeyi ölçüldü. Hücrelerin önce 4 saat boyunca  $5 \mu\text{g/ml}$  dozda LPS uygulamasına ve ardından 12 saat boyunca  $5 \mu\text{g/ml}$  apigenin uygulamasına tabi tutulması ile IL-10 konsantrasyonunun  $155,0 \pm 9,5$  pg/ml olduğu belirlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda LPS uygulanan hücrelerdeki IL-10 konsantrasyonun, kontrol hücrelerdeki, apigenin uygulanan hücrelerdeki ve LPS+apigenin uygulanan hücrelerdeki IL-10 konsantrasyonuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4. Lipopolisakkarit Uygulanan Vero Hücrelerinde Apigeninin TGF- $\beta$ Konsantrasyonuna Etkisi

Lipopolisakkarit uygulanan Vero hücrelerinde apigeninin TGF- $\beta$  konsantrasyonuna etkisi Şekil 17’de sunuldu.



Şekil 17. LPS uygulanan Vero hücrelerinde apigeninin TGF- $\beta$  konsantrasyonuna etkisi (4 tekrarlı)

Dönüştürücü büyüme faktörü-beta konsantrasyonlarının, negatif kontrol grubunda  $27,0\pm 4,2$  pg/ml olduğu belirlendi. Vero hücrelerine 4 saat boyunca 5 µg/ml dozda LPS uygulaması sonucunda TGF- $\beta$  konsantrasyonunun  $312,8\pm 10,2$  pg/ml olduğu anlaşıldı. Vero hücrelerine 12 saat boyunca 5 µg/ml apigenin uygulamasının  $32,3\pm 3,9$  pg/ml TGF- $\beta$  konsantrasyonuna neden olduğu tespit edildi. Vero hücrelerinin, 4 saat boyunca 5 µg/ml dozda LPS uygulamasına ve hemen ardından 12 saat boyunca 5 µg/ml apigenin uygulamasına maruz bırakılması sonucunda TGF- $\beta$  düzeyinin  $150,0\pm 11,0$  pg/ml olduğu anlaşıldı. LPS uygulanan hücrelerdeki TGF- $\beta$  düzeyinin, kontrol hücrelerdeki, apigenin uygulanan hücrelerdeki ve LPS+apigenin uygulanan hücrelerdeki TGF- $\beta$  düzeylerinden önemli düzeyde ( $p<0,05$ ) yüksek olduğu saptandı.



## 5. TARTIŞMA

Böbrek hastalıkları hem insanlarda hem de hayvanlarda önemli bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Bilimsel araştırmalar böbrek hastalıklarının patogeneğinde enflamasyonun rol oynadığını göstermektedir (Grandaliano ve ark., 1996; Oberg ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2008; Silverstein, 2009; Tucci ve ark., 2010; Lepenies ve ark., 2011; Vianna ve ark., 2011; Tbahriti ve ark., 2013; Akchurin ve Kaskel, 2015). Böbrek hastalıklarında enflamasyon, sitokinlerin salınımını uyararak ve adhezyon moleküllerinin üretimini ve aktivitesini artırarak böbrek hastalığının ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Grandaliano ve ark., 1996; Oberg ve ark., 2004; Zhang ve ark., 2008; Silverstein, 2009; Tucci ve ark., 2010; Lepenies ve ark., 2011; Vianna ve ark., 2011; Tbahriti ve ark., 2013; Akchurin ve Kaskel, 2015). Son yıllarda, enflamatuar hastalıkların tedavisi konusundaki bilimsel çalışmalar antienflamatuar etkili flavonoidlerin kullanımına yoğunlaşmaktadır. Flavonoidler, enflamasyon mediyatörlerini modüle ederek enflamasyonu engellemek ya da hafifletmek amaçlı kullanım alanı bulmaktadır (Serafini ve ark., 2010; Ribeiro ve ark., 2015). Enflamatuar böbrek hastalığı modellerinde flavonoid uygulamalarının, enflamasyonu baskılayarak böbrek hasarını hafiflettiği rapor edilmiştir (Impellizzeri ve ark., 2015; Xu ve ark., 2015; Kandemir ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2017). Apigeninin iyi bir antienflamatuar etki gösterdiği bilinmekle birlikte, LPS ile indüklenen böbrek hücre enflamasyonu üzerine olası etkisi bilinmemektedir. Sunulan tez çalışmasında, apigeninin böbrek hücre hattında oluşturulan enflamasyon üzerine olası etkisi, antienflamatuar sitokinler olan IL-10 ve TGF- $\beta$  konsantrasyonlarının ölçülmesiyle belirlendi.

Flavonoid kullanımının, böbrek hastalıklarının profilaksisinde ve tedavisinde etkili olduğu bilinmektedir. Flavonoidlerin antiviral, antienflamatuar ve antioksidan etki göstererek böbrekteki olası koruyucu etkileri üzerine yoğun araştırmalar devam etmektedir (Dahal ve Mulukuri, 2015). Hesperidinin, asetaminofen kaynaklı oksidatif stres ve toksisite üzerine hepatoprotektif ve nefroprotektif etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada ratlara 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarında hesperidin verilmiştir. Çalışma sonucunda, asetaminofenden kaynaklı proksimal ve distal kıvrımlı tüplerde aktifleşen NF $\kappa$ B ekspresyonunun renal enflamasyona yol açtığı ve hesperidinin NF $\kappa$ B ekspresyonunu inhibe ederek ratları böbrek enflamasyonundan koruduğu gösterilmiştir (Ahmad ve ark., 2012). İzoflavon bakımından zengin soya gıdalarının alımının

hemodiyaliz hastalarında enflamatuar mediyatörler aracılığı ile sistemik enflamasyonu hafifletebileceği bildirilmiştir (Fanti ve ark., 2006). Ratlarda adeninle indüklenen deneysel kronik böbrek hastalığında bitkisel bir flavonoid olan krisinin 10 mg/kg, 50 mg/kg ve 250 mg/kg dozlarındaki uygulamasının, böbrekteki hasarı hafiflettiği rapor edilmiştir (Ali ve ark., 2015). Fruktoz ile beslenen ratlarda diyetle epikateşin takviyesinin renal korteksteki enflamasyonu hafiflettiği anlaşılmıştır (Prince ve ark., 2016).

İnsan renal proksimal tübüler epitel hücrelerinde (HK-2), 0,1-10 µg/ml doz aralığında LPS uygulamasının IL-6 salınımını artırdığı rapor edilmiştir (Huang ve ark., 2005). Araştırmacılar, 24 saat süre ile 0,1 µg/mL konsantrasyonda LPS uygulanan HK-2 hücrelerinin IL-6 düzeyinin 467±50 pg/ml, negatif kontrol hücrelerin IL-6 düzeyinin 97±12 pg/ml olduğunu saptamışlardır. Doz 10 µg/ml olarak uygulandığında HK-2 hücrelerindeki IL-6 düzeyinin 1204±130 pg/ml olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile uyumlu olarak, çalışmamız sonucunda, negatif kontrol hücrelerinde IL-6 konsantrasyonu 53±3,92 pg/ml iken 4 saat boyunca 5 µg/ml dozda LPS uygulandıktan sonra IL-6 konsantrasyonunun yaklaşık üç kat artarak 160±7,35 pg/ml'ye yükseldiği anlaşıldı. Hu ve ark., (2012) HK-2 hücrelerine 8 saat boyunca, 0-10 µg/ml konsantrasyonda LPS uygulamasının doza bağımlı olarak monosit kemoatraktan protein-1 düzeyini önemli ölçüde artırdığı rapor edilmiştir. Üç saat boyunca 10 µg/ml LPS'ye maruz bırakılan HK-2 hücrelerinde TNF-α konsantrasyonunun belirgin düzeyde yükseldiği rapor edilmiştir (Zager ve ark., 2007). Çalışmamızda, Vero hücrelerine 4 saat boyunca 5 µg/ml dozda LPS uygulamasının, hücre kültürü supernatantındaki TNF-α konsantrasyonunu negatif kontrol hücrelerinde 67±5,72 pg/ml olan düzeyden 290±14,49 pg/ml'ye yükselttiği belirlendi.

Rat makrofaj hücre hattına 12 saat boyunca 0,1 µg/ml, 1 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonlarda apigenin uygulanmış ve her üç dozun da sitotoksik etki göstermediği belirtilmiştir (Smolinski ve Pestka, 2003). Araştırmacılar, apigeninin sırasıyla 1 µg/ml ve 10 µg/ml dozlarının, LPS ile indüklenen IL-6 konsantrasyon artışını baskıladığını ancak TNF-α konsantrasyonu üzerine etki göstermediğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızın bulguları, Vero hücrelerine 12 saat boyunca, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonda apigeninin uygulanması sonucunda sitotoksikite düzeylerinin sırası ile % 24,2, % 44,5 ve % 58,6 olduğunu gösterdi.

Apigeninin TNF- $\alpha$  kaynaklı NF- $\kappa$ B transkripsiyonel aktivasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir (Funakoshi-Tago ve ark., 2011). Bu araştırmacılar, farelerde apigenin uygulamasının, akut keregenen-indüklü ayak ödemi belirgin şekilde hafiflettiğini ortaya koymuşlardır. Apigenin LPS ile uyarılan fare makrofajlarında NF- $\kappa$ B aktivitesini baskılayarak proenflamatuar sitokinler olan IL-1 $\beta$ , IL-8 ve TNF üretimini inhibe ettiği ve apigenin inflamasyonu baskılayıp bağışıklık cevaplarını *in vivo* olarak modüle ettiği ortaya konulmuştur (Nicholas ve ark., 2007). İntratrakeal akut akciğer hasarı oluşturulmuş farelerde apigeninin profilaktik olarak uygulanmasının, COX-2 ve NF- $\kappa$ B yollarını baskılamak suretiyle bronkoalveoler lavaj sıvısında artmış IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  düzeylerini, lökosit sayısını ve nötrofil yüzdesini azaltarak, antiinflamatuvar etki gösterdiği belirtilmiştir (Wang ve ark., 2014). Ratlarda kurşun uygulaması ile oluşturulan renal oksidatif stres ve enflamasyon üzerine 25 mg/kg ve 50 mg/kg dozlarında kuersetin uygulamasının plazma IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  konsantrasyonlarını anlamlı olarak ( $p < 0,01$ ) azalttığı ve kuersetinin rat böbreklerinde lökosit infiltrasyonunu etkili bir şekilde baskıladığı rapor edilmiştir (Liu ve ark., 2012).

Sisplatin kaynaklı nefrotoksisitede naringin tedavisinin böbrek dokusundaki TNF- $\alpha$  düzeylerini azalttığı bildirilmiştir (Chtourou ve ark., 2016). Diyabete bağlı böbrek hasarının azaltılmasında genisteinin çeşitli enflamatuar belirteçler üzerine olası etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada diyabetik farelere 10 hafta boyunca haftada üç kez, 10 mg/kg genistein verilerek üriner monosit kemoatraktant protein-1 (MCP-1) atılımı ve böbrek hücrelerarası adhezyon molekül-1 (ICAM-1) protein ekspresyonu üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Genistein tedavisinin diyabetik farelerde üriner MCP-1 atılımını ve böbrekte ICAM-1 ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (Elmarakby ve ark., 2011). Tek taraflı üreteral tıkanıklık oluşturulan farelerde tubulointerstisyel fibrozisin iyileştirilmesi amacıyla uygulanan baialeinin, NF- $\kappa$ B ve Mitojen aktif protein kinaz sinyal yollarının inaktivasyonu yoluyla enflamatuar süreci inhibe ettiği rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2015). Malik ve ark., (2015), sisplatin kaynaklı akut böbrek hasarında 1,25 mg/kg, 2,5 mg/kg ve 5 mg/kg nobiletin uygulamasının antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özelliklerini değerlendirmişler ve nobiletin tedavisinin TNF- $\alpha$  düzeylerini doza bağımlı olarak baskıladığını ve en önemli baskılayanın ise 5 mg/kg dozunda olduğunu rapor etmişlerdir. Bütün bu çalışmaların sonuçları, enflamasyonla seyreden hastalıkların

tedavisinde flavonoid takviyesinin umut vaad ettiğini göstermektedir.

Farelerde sisplatin ile indüklenen böbrek hasarı üzerine apigeninin etkilerinin ve moleküler mekanizmalarının araştırıldığı bir çalışmada farelere sisplatin ile birlikte 5 mg/kg, 10 mg/kg ve 20 mg/kg apigenin uygulaması yapılmıştır. Çalışma sonucunda apigeninin, sisplatin ile indüklenen patolojik değişiklikleri doza bağımlı şekilde iyileştirdiği, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve TGF- $\beta$  mRNA ekspresyonlarındaki artışları doza bağımlı olarak azalttığı gösterilmiştir (He ve ark., 2016). Sunulan çalışmada, dört saat boyunca 5  $\mu$ g/ml dozda LPS uygulamasının Vero hücrelerinde 359,0 $\pm$ 16,9 pg/ml IL-10 konsantrasyonuna neden olduğu anlaşıldı. Vero hücrelerinin önce 4 saat boyunca 5  $\mu$ g/ml dozda LPS uygulamasına ve ardından 12 saat boyunca 5  $\mu$ g/ml apigenin uygulamasına tabi tutulması ile IL-10 konsantrasyonunun 155,0 $\pm$ 9,5 pg/ml olduğu belirlendi. Lipopolisakkarit uygulanan hücrelerdeki IL-10 konsantrasyonunun, kontrol hücrelerdeki, apigenin uygulanan hücrelerdeki ve LPS+apigenin uygulanan hücrelerdeki IL-10 konsantrasyonuna göre önemli ölçüde artmış olduğu belirlendi (p<0,05). Benzer şekilde, LPS uygulanan hücrelerdeki TGF- $\beta$  düzeyinin, kontrol hücrelerdeki, apigenin uygulanan hücrelerdeki ve LPS+apigenin uygulanan hücrelerdeki TGF- $\beta$  düzeylerinden önemli düzeyde (p<0,05) yüksek olduğu saptandı.

Tez çalışmasından elde edilen veriler bir bütün olarak dikkate alındığında apigeninin *in vitro* LPS-indüklü böbrek hücre hasarının iyileştirilmesi sürecinde belirlenen olumlu etkilerinin ortaya çıkmasında enflamasyon mediyatörleri olan proenflamatuar ve antienflamatuar sitokin yanıtlarını modüle etmesinin rol oynadığı anlaşıldı. Tez bulguları, *in vitro* böbrek hücre enflamasyonu modelinde apigenin uygulamasının IL-10 ve TGF- $\beta$  sitokinlerinin salınımını inhibe ederek enflamasyonu baskıladığını gösterdi. Projeden elde edilen veriler, hem insanlarda hem de hayvanlarda enflamasyonla seyreden böbrek hastalıklarının tedavisinde kullanılma potansiyeli taşıdığını göstermesi bakımından önem arz etmektedir. Elde edilen sonuçların bilimsel merkezler tarafından teyit edilmesi yanında klinik uygulamalarla desteklenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Böbrek hastalıklarının patogenezinde enflamasyon önemli bir rol oynamaktadır. Enflamasyon, böbrek dokusunda sitokinlerin salınımını indükleyerek, adhezyon moleküllerinin hem üretimini hem de aktivitesini artırarak enflamatuvar hasara yol açmaktadır. Antienflamatuvar, antioksidan ve antikanser, antiproliferatif, antimetastatik, antiviral ve antimikrobiyal etkisi kanıtlanmış bir flavonoid olan apigenin pek çok enflamatuvar bozukluğun hafifletilmesinde ve/veya giderilmesinde kullanım potansiyeli taşımaktadır. Sunulan tez çalışması ile apigeninin LPS ile indüklenen *in vitro* böbrek hücre enflamasyonu üzerine olası etkisi değerlendirildi. Apigeninin, 12 saat boyunca, 1 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyondaki farklı dozlarının Vero hücrelerinde oluşturduğu sitotoksikite düzeylerinin sırası ile % 24,2, % 44,5 ve % 58,6 olduğu tespit edildi. Vero hücre kültürünün, 2, 4, 8 ve 24 saat boyunca 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında LPS'ye maruz bırakılması sonucu hücre kültürü mediumlarındaki IL-6 konsantrasyonunun, 4 saat boyunca 5 µg/ml dozda LPS uygulaması ile en yüksek değer olan 160±7,35 pg/ml'ye ulaştığı belirlendi. Negatif kontrol hücrelerinde IL-6 konsantrasyonu 53±3,92 pg/ml olarak bulundu. Enflamasyon oluşturulması amacıyla 2, 4, 8 ve 24 saat boyunca 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında LPS ile kültüre edilen Vero hücre mediumlarından TNF-α konsantrasyonlarına dair elde edilen sonuçlara göre 4 saat boyunca 5 µg/ml dozda LPS uygulamasının 290 ±14,49 pg/ml TNF-α düzeyine yol açtığı saptandı. Negatif kontrol hücrelerinde TNF-α düzeyinin 67±5,72 pg/ml olduğu kaydedildi. Vero hücrelerinin önce 4 saat boyunca 5 µg/ml dozda LPS uygulamasına ve ardından 12 saat boyunca 5 µg/ml apigenin uygulamasına maruz bırakılması ile IL-10 konsantrasyonunun 155,0±9,5 pg/ml olduğu anlaşıldı. Lipopolisakkarit uygulanan hücrelerdeki IL-10 ve TGF-β düzeylerinin, kontrol hücrelerdeki, apigenin uygulanan hücrelerdeki ve LPS+apigenin uygulanan hücrelerdeki IL-10 ve TGF-β düzeylerine yükseldiği tespit edildi (p<0,05).

Sunulan tez çalışmasının bulguları, *in vitro* böbrek hücre enflamasyonuna apigenin takviyesi ile IL-10 ve TGF- $\beta$  sitokinlerinin salınımının baskılandığını gösterdi. Tez çalışmasının, enflamatuvar böbrek hastalıklarının tedavisi konusunda yapılacak bilimsel çalışmalara katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte, tez çalışmasından elde edilen bulguların, klinik uygulamalardaki kullanılabilirliği açısından *in vivo* denemelerle desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

- 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.
- Akagi Y, Isaka Y, Arai M, Kaneko T, Takenaka M, Moriyama T, Kaneda Y, Ando A, Orita Y, Kamada T, Ueda N, Imai E. Inhibition of TGF-beta 1 expression by antisense oligonucleotides suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1996;50(1):148-155.
- Akchurin OM, Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif* 2015;39(1-3):84-92.
- Akdemir N, Birol L. İç hastalıkları ve hemşirelik bakımı. 2. Baskı, Ankara, Sistem ofset 2005;565-589.
- 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.
- Ali F, Rahul, Naz F, Jyoti S, Siddique YH. Health functionality of apigenin: A review. *International Journal of Food Properties* 2017; 20:6,1197-1238.
- Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Yu, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 1992;360(6402):361-364.
- Böttinger EP. TGF-beta in renal injury and disease. *Semin Nephrol* 2007;27(3):309-320.
- Cardenas H, Arango D, Nicholas C, Duarte S, Nuovo GJ, He W, Voss OH, Gonzalez-Mejia ME, Guttridge DC, Grotewold E, Doseff AI. dietary apigenin exerts immune-regulatory activity *in vivo* by reducing NF- $\kappa$ B Activity, Halting Leukocyte Infiltration and Restoring Normal Metabolic Function. *Int J Mol Sci* 2016;17(3):323.
- Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM, Haeffner-Cavaillon N. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 2002;4(9):915-26.
- Chan LP, Chou TH, Ding HY, Chen PR, Chiang FY, Kuo PL, Liang CH. Apigenin induces apoptosis via tumor necrosis factor receptor- and Bcl-2-mediated pathway and enhances susceptibility of head and neck squamous cell carcinoma to 5-fluorouracil and cisplatin. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820(7):1081-1091.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 2002;23:787-823.
- Chen S, Iglesias-de la Cruz MC, Jim B, Hong SW, Isono M, Ziyadeh FN. Reversibility of established diabetic glomerulopathy by anti-TGF-beta antibodies in db/db mice *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300(1):16-22.

- Chong FW, Chakravarthi S, Nagaraja HS, Thanikachalam PM, Lee N. Expression of transforming growth factor-beta and determination of apoptotic index in histopathological sections for assessment of the effects of Apigenin (4', 5', 7'-Trihydroxyflavone) on Cyclosporine A induced renal damage. *Malays J Pathol* 2009;31(1):35-43.
- 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.
- Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996;12(4):274-247.
- D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *Int J Mol Sci* 2010;11(4):1321-1342.
- Dahal A, Mulukuri S. Flavonoids in kidney protection. *WJPPS* 2015;4(3):362-382.
- Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigenspecific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 1993;150(2),353-360.
- Elmarakby AA, Ibrahim AS, Faulkner J, Mozaffari MS, Liou GI, Abdelsayed R. Tyrosine kinase inhibitor, genistein, reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced diabetic mice. *Vascul Pharmacol* 2011;55(5-6):149-56.
- Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes Infect* 2002;4(8):837-851.
- Etoh T, Kim YP, Hayashi M, Suzawa M, Li S, Ho CT, Komiyama K. Inhibitory effect of a formulated extract from multiple citrus peels on LPS-induced inflammation in RAW 246.7 macrophages. *Func Foods Health Dis* 2013;3(6):242-253.
- 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.
- Fu MS, Zhu BJ, Luo DW. Apigenin prevents TNF- $\alpha$  induced apoptosis of primary rat retinal ganglion cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2014;25;60(4):37-42.
- Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, Mashino T, Kasahara T. Anti-Inflammatory Activity of Structurally Related Flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *International Immunopharmacology* 2011;11:1150-1159.
- Glasscock RJ. The pathogenesis of IgA nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011;20(2):153-160.



- Gotoh K, Inoue M, Masaki T, Chiba S, Shiraishi K, Shimasaki T, Matsuoka K, Ando H, Fujiwara K, Fukunaga N, Aoki K, Nawata T, Katsuragi I, Kakuma T, Seike M, Yoshimatsu H. Obesity-related chronic kidney disease is associated with spleen-derived IL-10. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(5):1120-1130.
- Goumenos DS, Tsakas S, El Nahas AM, Alexandri S, Oldroyd S, Kalliakmani P, Vlachojannis JG. Transforming growth factor-beta(1) in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(12):2145-2152.
- Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Montinaro V, Marra F, Schena FP. Monocyte chemotactic peptide-1 expression in acute and chronic human nephritides: a pathogenetic role in interstitial monocytes recruitment. *J Am Soc Nephrol* 1996;6:906-913.
- Grauer GF. Early Diagnosis Of Chronic Kidney Disease in Dogs & Cats. *NAVCC* 2016;6;2:68-72.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002;96(2-3):67-202.
- He X, Li C, Wei Z, Wang J, Kou J, Liu W, Shi M, Yang Z, Fu Y. Protective role of apigenin in cisplatin-induced renal injury. *Eur J Pharmacol* 2016;15;789:215-221.
- Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, Hirst JA, O'Callaghan CA, Lasserson DS, Hobbs FDR. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease -A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2016;11(7): e0158765.
- Hill PA, Lan HY, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC. ICAM-1 directs migration and localization of interstitial leukocytes in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 1994;45(1):32-42.
- Hu F, Liang W, Ren Z, Wang G, Ding G. Surfactant protein D inhibits lipopolysaccharide-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in human renal tubular epithelial cells: implication for tubulointerstitial fibrosis. *Clin Exp Immunol* 2012;167(3):514-522.
- Huang CH, Kuo PL, Hsu YL, Chang TT, Tseng HI, Chu YT, Kuo CH, Chen HN, Hung CH. The natural flavonoid apigenin suppresses Th1- and Th2-related chemokine production by human monocyte THP-1 cells through mitogen-activated protein kinase pathways. *J Med Food* 2010;13(2):391-398.
- Huang MY, Chaturvedi LS, Koul S, Koul HK. Oxalate stimulates IL-6 production in HK-2 cells, a line of human renal proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 2005;68(2):497-503.
- Imig J, Ryan M. Immune and Inflammatory Role in Renal Disease. *Compr Physiol* 2013;3(2): 957-976.
- Impellizzeri D, Bruschetta G, Ahmad A, Crupi R, Siracusa R, Di Paola R, Paterniti I, Prosdociami M, Esposito E, Cuzzocrea S. Effects of palmitoylethanolamide and

- silymarin combination treatment in an animal model of kidney ischemia and reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2015;5;762:136-149.
- Jeong GS, Lee SH, Jeong SN, Kim YC, Kim EC. Anti-inflammatory effects of apigenin on nicotine-and lipopolysaccharide stimulated human periodontal ligament cells via heme oxygenase-1. *Int Immunopharmacol* 2009;9(12):1374-1380.
- Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet* 2013; 382(9888):260-272.
- Jiang H, Yu J, Zheng H, Chen J, Wu J, Qi X, Wang Y, Wang X, Hu M, Zhu L, Liu Z. Breast Cancer Resistance Protein and Multidrug Resistance Protein 2 Regulate the Disposition of Acacetin Glucuronides. *Pharm Res* 2017;34(7):1402-1415.
- Jin Y, Liu R, Xie J, Xiong H, He JC, Chen N. Interleukin-10 deficiency aggravates kidney inflammation and fibrosis in the unilateral ureteral obstruction mouse model. *Lab Invest* 2013;93(7):801-811.
- Johnson JL, de Mejia EG. Flavonoid apigenin modified gene expression associated with inflammation and cancer and induced apoptosis in human pancreatic cancer cells through inhibition of GSK-3 $\beta$ /NF- $\kappa$ B signaling cascade. *Mol Nutr Food Res* 2013;57(12):2112-2127.
- Kahraman A, Serteser M, Köken T. Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2002;3:01-08.
- Kandemir FM, Kucukler S, Eldutar E, Caglayan C, Gulcin I. Chrysin Protects Rat Kidney from Paracetamol-Induced Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis, and Autophagy: A Multi-Biomarker Approach. *Sci Pharm* 2017;85(1):4.
- Kang HK, Ecklund D, Liu M, Datta SK. Apigenin, a non-mutagenic dietary flavonoid, suppresses lupus by inhibiting autoantigen presentation for expansion of autoreactive Th1 and Th17 cells. *Arthritis Res Ther* 2009;11(2):R59.
- Karamese M, Erol HS, Albayrak M, Findik Guvendi G, Aydin E, Aksak Karamese S. Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of apigenin in a rat model of sepsis: an immunological, biochemical, and histopathological study. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2016;38(3):228-237.
- Kasthuri J, Veerapandian S, Rajendiran N. Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using apigenin as reducing agent. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009;1;68(1):55-60.
- Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci* 2004;96(3):229-245.
- Kim HR, Park CG, Jung JY. Acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone) exhibits *in vitro* and *in vivo* anticancer activity through the suppression of NF- $\kappa$ B/Akt signaling in prostate cancer cells. *Int J Mol Med* 2014;33(2):317-324.
- Kim JH, Kim BK, Moon KC, Hong HK, Lee HS. Activation of the TGF-beta/Smad signaling pathway in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2003;64(5):1715-1721.

- Kitamura M, Sütö TS. TGF-beta and glomerulonephritis: anti-inflammatory versus pro-sclerotic actions. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12(4):669-679.
- Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol Rep* 2005;57(3):390-394.
- Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* 1997;1;100(1):115-126.
- Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal* 2013;2013:1-16.
- Lepeniec J, Eardley KS, Kienitz T, Hewison M, Ihl T, Stewart PM, Cockwell P, Quinkler M. Renal TLR4 mRNA expression correlates with inflammatory marker MCP-1 and profibrotic molecule TGF- $\beta$  in patients with chronic kidney disease. *Nephron Clin Pract* 2011;119(2):97-104.
- Li RR, Pang LL, Du Q, Shi Y, Dai WJ, Yin KS. Apigenin inhibits allergen-induced airway inflammation and switches immune response in a murine model of asthma. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2010;32(3):364-370.
- Liang Y.C, Huang Y.T, Tsai S.H, Lin-Shiau S.Y, Chen C.F, Lin J.K. Suppression of Inducible Cyclooxygenase and Inducible Nitric Oxide Synthase by Apigenin and Related Flavonoids in Mouse Macrophages. *Carcinogenesis* 1999;20:1945-1952.
- Lim HS, Kim OS, Kim BY, Jeong SJ. Apigenin from *Scutellaria baicalensis* Georgi Inhibits Neuroinflammation in BV-2 Microglia and Exerts Neuroprotective Effect in HT22 Hippocampal Cells. *J Med Food* 2016;19(11):1032-1040.
- 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- $\kappa$ B pathway. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820(10):1693-1703.
- Locatelli F, Vecchio LD, Pozzoni P. The importance of early detection of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17 Suppl 11:2-7.
- López-Hernández FJ, López-Novoa JM. Role of TGF- $\beta$  in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res* 2012;347(1):141-154.
- Lu MF, Xiao ZT, Zhang HY. Where do health benefits of flavonoids come from? Insights from flavonoid targets and their evolutionary history. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;434(4):701-704.
- 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.

- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 2008;454(7203):428-435.
- Meguid ENA, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* 2005;22-28;365(9456):331-340.
- Mencherini T, Cau A, Bianco G, Della Loggia R, Aquino RP, Autore G. An extract of *Apium graveolens* var. *dulce* leaves: structure of the major constituent, apiin, and its anti-inflammatory properties. *J Pharm Pharmacol* 2007;59(6):891-897.
- Morimoto Y, Baba T, Sasaki T, Hiramatsu K. Apigenin as an anti-quinolone-resistance antibiotic. *Int J Antimicrob Agents* 2015;46(6):666-673.
- Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-146.
- Murakami K, Takemura T, Hino S, Yoshioka K. Urinary transforming growth factor-beta in patients with glomerular diseases. *Pediatr Nephrol* 1997;11(3):334-336.
- Myśliwska J, Zorena K, Semetkowska-Jurkiewicz E, Rachoń D, Suchanek H, Myśliwski A. High levels of circulating interleukin-10 in diabetic nephropathy patients. *Eur Cytokine Netw* 2005;16(2):117-122.
- Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature* 2002;420(6917):846-852.
- Neiva KG, Catalfamo DL, Holliday S, Wallet SM, Pileggi R. Propolis decreases lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators in pulp cells and osteoclasts. *Dent Traumatol* 2014, 30(5):362-367.
- Nicholas C, Batra S, Vargo MA, Voss OH, Gavrilin MA, Wewers MD, Guttridge DC, Grotewold E, Doseff AI. Apigenin blocks lipopolysaccharide-induced lethality *in vivo* and proinflammatory cytokines expression by inactivating NF-kappaB through the suppression of p65 phosphorylation. *J Immunol* 2007;15;179(10):7121-7127.
- Noronha IL, Fujihara CK, Zatz R. The inflammatory component in progressive renal disease--are interventions possible?. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(3):363-368.
- Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, Himmelfarb J. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 2004;65(3):1009-1016.
- Oda T, Wang W, Ukai K, Nakazawa T, Mochizuki M. A sesquiterpene quinone, 5-Epi-smenospongine, promotes TNF- $\alpha$  production in LPS-stimulated RAW 264.7 Cells. *Mar Drugs* 2007;5(4):151-156.
- Pashaei R. Features of Apigenin, Luteolin, Hesperetin and Naringenin in Crop and Body. *Int J Food Sci Nutr Diet* 2016;5(6):300-304.
- Peng X, Zheng Z, Cheng KW, Shan F, Ren G, Chen F, Wang M. Inhibitory effect of mung bean extract and its constituents vitexin and isovitexin on the formation of advanced glycation endproducts. *Food Chem* 2008;106:475-481.

- Prabhakar MC, Bano H, Kumar I, Shamsi MA, Khan MS. Pharmacological investigations on vitexin. *Planta Med* 1981;43(4):396-403.
- 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.
- Rao Y.K, Lee M.J, Chen K, Lee Y.C, Wu W.S, Tzeng Y.M. Insulin-Mimetic Action of Rhoifolin and Cosmosiin Isolated from *Citrus Grandis* (L.) Osbeck Leaves: Enhanced Adiponectin Secretion and Insulin Receptor Phosphorylation in 3T3-L1 Cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011;2011,1-9.
- Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009;8(3):229-235.
- Rezai-Zadeh K, Ehrhart J, Bai Y, Sanberg PR, Bickford P, Tan J, Shytle RD. Apigenin and luteolin modulate microglial activation via inhibition of STAT1-induced CD40 expression. *J Neuroinflammation* 2008;5:41.
- Ribeiro D, Freitas M, Lima JL, Fernandes E. Proinflammatory Pathways: The Modulation by Flavonoids. *Medicinal Research Reviews* 2015;35:877-936.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G; Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996;20(7):933-956.
- Rithidech KN, Tungjai M, Reungpatthanaphong P, Honikel L, Simon SR. Attenuation of oxidative damage and inflammatory responses by apigenin given to mice after irradiation. *Mutat Res* 2012;12;749(1-2):29-38.
- Rousset F, Garcia E, Defrance T, Péronne C, Vezzio N, Hsu DH, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;1;89(5):1890-1893.
- Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 2002;56(6):276-282.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000;130(8S Suppl):2073S-2085S.
- Schnaper HW, Jandeska S, Runyan CE, Hubchak SC, Basu RK, Curley JF, Smith RD, Hayashida T. TGF-beta signal transduction in chronic kidney disease. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2009;14:2448-2465.
- Selders GS, Fetz AE, Radic MZ, Bowlin GL. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regen Biomater* 2017;4(1): 55-68.
- Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc* 2010;69(3):273-278.

- Shalaby SA, Al-Edressi HM, El-Tarhouny SA, Fath El-Bab M, Zolaly MA. Type 1/type 2 cytokine serum levels and role of interleukin-18 in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Arab J Nephrol Transplant* 2013;6(2):83-88.
- Shibata C, Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, Goto K, Muroyama R, Kato N, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. The flavonoid apigenin inhibits hepatitis C virus replication by decreasing mature microRNA122 levels. *Virology* 2014;462-463:42-48.
- Shimoyama H, Nakajima M, Naka H, Maruhashi Y, Akazawa H, Ueda T, Nishiguchi M, Yamoto Y, Kamitsuji H, Yoshioka A. Up-regulation of interleukin-2 mRNA in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2004;19(10):1115-1121.
- Shukla S, Gupta S. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. *Pharm Res* 2010;27(6): 962-978.
- Silverstein DM. Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renal and cardiovascular disease. *Pediatr Nephrol* 2009;24(8):1445-1452.
- Sinuani I, Beberashvili I, Averbukh Z, Sandbank J. Role of IL-10 in the progression of kidney disease. *World J Transplant* 2013;3(4): 91-98.
- Sinuani I, Beberashvili I, Averbukh Z, Cohn M, Gitelman I, Weissgarten J. Mesangial cells initiate compensatory tubular cell hypertrophy. *Am J Nephrol* 2010;31(4):326-331.
- Smolinski AT, Pestka JJ. Modulation of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production *in vitro* and *in vivo* by the herbal constituents apigenin (chamomile), ginsenoside Rb(1) (ginseng) and parthenolide (feverfew). *Food Chem Toxicol* 2003;41(10):1381-1390.
- Spoto B, Zoccali C, Spleen IL-10, a key player in obesity-driven renal risk. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2013;28;5;1061-1064.
- Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int* 2005;67(4):1216-1233.
- Suranyi MG, Guasch A, Hall BM, Myers BD. Elevated levels of tumor necrosis factor-alpha in the nephrotic syndrome in humans. *Am J Kidney Dis* 1993;21(3):251-259.
- Tan P, Luscinskas FW, Homer-Vanniasinkam S. Cellular and molecular mechanisms of inflammation and thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1999;17(5):373-389.
- Tbahriti FH, Meknassi D, Moussaoui R, Messaoudi A, Zemour L, Kaddous A, Bouchenak M, Mekki K. Inflammatory status in chronic renal failure: The role of homocysteinemia and pro-inflammatory cytokines *World J Nephrol* 2013;6;2(2):31-37.
- Tucci M, Stucci S, Strippoli S, Silvestris F. Cytokine overproduction, T-cell activation, and defective T-regulatory functions promote nephritis in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:457146.

- Vianna HR, Soares CM, Tavares MS, Teixeira MM, Silva AC. Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines. *J Bras Nefrol* 2011;33(3):351-364.
- Wada J, Sugiyama H, Makino H. Pathogenesis of IgA nephropathy. *Semin Nephrol* 2003;23:556-563.
- Wang J, Liu YT, Xiao L, Zhu L, Wang Q, Yan T. Anti-inflammatory effects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF- $\kappa$ B pathway. *Inflammation* 2014;37(6):2085-2090.
- Wang W, Zhou PH, Xu CG, Zhou XJ, Hu W, Zhang J. Baicalein attenuates renal fibrosis by inhibiting inflammation via down-regulating NF- $\kappa$ B and MAPK signal pathways. *J Mol Histol* 2015;46(3):283-290.
- Wang YC, Huang KM. *In vitro* anti-inflammatory effect of apigenin in the *Helicobacter pylori* infected gastric adenocarcinoma cells. *Food Chem Toxicol* 2013;53:376-383.
- Wasilewska AM, Zoch-Zwierz WM. Transforming growth factor-beta1 in nephrotic syndrome treated with cyclosporine and ACE inhibitors. *Pediatr Nephrol* 2004;19(12):1349-1353.
- Williams RJ, Spencer JP, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. *Free Radic Biol Med* 2004;36(7):838-849.
- Wohlmuth H, Penman KG, Pearson T, Lehmann RP. Pharmacognosy and chemotypes of passionflower (*Passiflora incarnata* L.). *Biol Pharm Bull* 2010;33(6):1015-1018.
- Wójcik KA, Skoda M, Koczurkiewicz P, Sanak M, Czyż J, Michalik M. Apigenin inhibits TGF- $\beta$ 1 induced fibroblast-to-myofibroblast transition in human lung fibroblast populations. *Pharmacol Rep* 2013;65(1):164-172.
- Xu Y, Zhang J, Liu J, Li S, Li C, Wang W, Ma R, Liu Y. Luteolin attenuate the D-galactose-induced renal damage by attenuation of oxidative stress and inflammation. *Nat Prod Res* 2015;29(11):1078-1082.
- Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA. Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis. *Kidney Int* 1994;45(3):916-927.
- Yano S, Umeda D, Maeda N, Fujimura Y, Yamada K, Tachibana H. Dietary apigenin suppresses IgE and inflammatory cytokines production in C57BL/6N mice. *J Agric Food Chem* 2006;12;54(14):5203-5207.
- Yano S, Umeda D, Yamashita T, Ninomiya Y, Sumida M, Fujimura Y, Yamada K, Tachibana H. Dietary flavones suppresses IgE and Th2 cytokines in OVA-immunized BALB/c mice. *Eur J Nutr* 2007;46(5):257-263.
- Zager RA1, Johnson AC, Geballe A. Gentamicin suppresses endotoxin-driven TNF-alpha production in human and mouse proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293(4):F1373-1380.

- Zhang B, Ramesh G, Uematsu S, Akira S, Reeves WB. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* 2008;5:923-932.
- Zhang J, Yang S, Li H, Chen F, Shi J. Naringin ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting NADPH oxidase 4. *Eur J Pharmacol* 2017;5;804:1-6.
- Zhang X, Wang G, Gurley EC, Zhou H. Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. *PLoS One* 2014;5;9(9):e107072.





## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Selen AKSOY

Doğum Yeri: Yozgat

Doğum Tarihi: 17.09.1990

Medeni Hali: Bekâr

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Agahefendi İlköğretim Okulu 1996-2004

Sorgun Anadolu Lisesi 2004-2008

Erciyes Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik 2009-2013

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2013-

E-posta: selenaksoy\_@outlook.com