



**RATLARDA OLEİK ASİDİN NEDEN OLDUĞU AKUT
AKCİĞER HASARINI TAKİBEN HİSPİDULİNİN AKUT
BÖBREK HASARI ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİSİ**

Bahri AVCI

Danışman: Prof. Dr. Hakan AŞKIN
Yüksek Lisans Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı
2023
(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**RATLARDA OLEİK ASİDİN NEDEN OLDUĞU AKUT AKCİĞER HASARINI
TAKİBEN HİSPİDULİNİN AKUT BÖBREK HASARI ÜZERİNDEKİ KORUYUCU
ETKİSİ**

(Protective Effect of Hispidulin on Acute Kidney Injury Following Oleic Acid-Induced
Acute Lung Injury in Rats)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bahri AVCI

Danışman: Prof. Dr. Hakan AŞKIN

Erzurum
Ocak, 2023

KABUL VE ONAY TUTANAĞI

Bahri AVCI tarafından hazırlanan “Ratlarda Oleik Asidin Neden Olduğu Akut Akciğer Hasarını Takiben Hispidulinin Akut Böbrek Hasarı Üzerine Koruyucu Etkisi” başlıklı çalışması tarihinde 10.01.2023 yapılan tez savunma sınavı sonucunda başarılı bulunarak jürimiz tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Orhan ERDOĞAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Hakan AŞKIN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes ARSLAN <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek lisans Tezi olarak Prof. Dr. Hakan AŞKIN danışmanlığında sunulan “Ratlarda Oleik Asidin Neden Olduğu Akut Akciğer Hasarını Takiben Hispidulinin Akut Böbrek Hasarı Üzerine Koruyucu Etkisi” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	7	30
Kuramsal Temeller	19	30
Materyal ve Yöntem	14	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	6	20
Sonuçlar ve Öneriler	0	20
Tezin Geneli	11	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Bahri AVCI	Prof. Dr. Hakan AŞKIN
10.01.2023	10.01.2023
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☐ Enstitü Yönetim Kurulunun/....../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB) teşekkür ederim.

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma için danışmanlığımı üstlenen çalışmanın yürütülmesinden tezin yazım sürecine dek her türlü yardımını, bilgi ve deneyimini esirgemeyen çok kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Hakan AŞKIN' a en içten saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Gerek lisans gerekse yüksek lisans eğitimim süresince bilgileri, güler yüzleri ve yüreklendirici sözleriyle her konuda yardımcı olan Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümündeki tüm hocalarıma,

Patolojik analiz ve uygulama sürecinde yardımlarını esirgemeyen dayım Ekrem YILDIRIM ve abim Taner YILDIRIM'a

Benden samimiyetlerini, güzel sözlerini ve yardımlarını esirgemeyen, dostluklarını hep arayacağım çok değerli ekip arkadaşlarım Esra PALABIYIK' a, Handan UĞUZ' a ve Ayşe Nurseli SULUMER'e,

Lisansta ve yüksek lisansta neredeyse her günümü, her anımı paylaştığım varlıklarını daima hissettiğim en değerlilerim, canım arkadaşlarım Mustafa SONKAYA, Berrin ALGÜL, Fatma Özge ASLAN, Furkan AÇAR ve Emrullah DAĞ'a

Evlatları olmaktan gurur duyduğum, varlıkları ve dualarıyla beni desteklemekten bir an olsun vazgeçmeyen, hayattaki duruşları ile beni bugünlere kadar taşıyan en büyük şanslarım babam Ömer AVCI'ya, annem Sebahat AVCI'ya, kardeşlerim Murat AVCI, Ahmet AVCI, Edanur AVCI ve Yakup AVCI' ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Bahri AVCI

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

RATLARDA OLEİK ASİDİN NEDEN OLDUĞU AKUT AKCİĞER HASARINI TAKİBEN HİSPİDULİNİN AKUT BÖBREK HASARI ÜZERİNDEKİ KORUYUCU ETKİSİ

Bahri AVCI

Danışman: Prof. Dr. Hakan AŞKIN

Amaç: Hispidulin (4',5,7-trihidroksi-6-metoksiflavon), *Saussurea involucrata* gibi birçok bitkiden farklı yöntemler ile ekstrakte edilen doğal bir flavonoiddir. Mevcut çalışma, oleik asit ile indüklenen erkek *Sprague Dawley* ratlarda hispidulinin etkisinin antioksidan, histopatolojik ve moleküler olarak değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

Yöntem: Ratlar üç gruba ayrıldı. Grup A; Kontrol grubu, grup B; oleik asit grubu (k.v enjeksiyonla uygulaması) ve grup C; hispidulin + oleik asit kombine grup (k.v ve i.p uygulama). Uygulama grupları hayvanlarından elde edilen böbrek dokusundan oksidatif stres belirteçleri (MDA, SOD, CAT, MPO, GSH) değerlendirildi. Aynı dokular histopatolojik incelemeye tabi tutuldu. Ayrıca Oleik asidin nefrotoksik etkilerinden sorumlu moleküler yapıyı belirlemek amacıyla inflamasyon, apoptoz ve hücre metabolizma için kritik düzenleyicilerin gen ekspresyon seviyeleri real-time PCR ile araştırıldı.

Bulgular: Rat böbrek dokularında oleik asitin glutatyon (GSH) seviyesinde azalmaya ve malondialdehit (MDA) ve Miyeloperoksidaz (MPO) seviyesinde ise artışa neden olduğu gözlenmiştir. Antioksidan sistem bileşenlerinden süperoksit dismutazın (SOD), katalazın (CAT), seviyelerinde düşüşe sebep olduğu tespit edilmiştir. Ek olarak böbrek hasar biyobelirteci (*Kim-1*), inflamasyon genleri (*Il-6*, *Nf-Kβ*), apoptotik gen (*Casp3*) ve hücre dışı matrisin yenilenmesinde rol alan (*Mmp2*) geni oleik asit maruziyeti sonucunda olumsuz etkilendiği gözlemlenmiştir. Fakat hispidulinin, OA uygulaması ile ortaya çıkan tüm dereglasyonları tersine çevirebildiği gözlenmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak, akut böbrek hasarı indükleyicisi olarak kullanılan oleik asit; oksidan ve antioksidan dengeyi bozarak doku hasarına ve inflamatuvar mediatörlerin düzeylerinde artışa neden olarak böbrek dokularında disfonksiyona yol açtı. Akut böbrek hasarında renoprotektif ajan olarak kullandığımız hispidulin, enflamasyonu, oksidatif stresi ve tübüler hücre ölümünü inhibe ederek böbrek hasarını hafifletici alternatif, çok yönlü ve etkin bir yaklaşım olarak kabul edilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akut böbrek hasarı, Hispidulin, Oleik asit, Rat, q-RT PCR

Ocak 2023, 58 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

PROTECTIVE EFFECT OF HISPIDULIN ON ACUTE KIDNEY INJURY FOLLOWING OLEIC ACID-INDUCED ACUTE LUNG INJURY IN RATS

Bahri AVCI

Supervisor: Prof. Dr. Hakan AŞKIN

Purpose: Hispidulin (4',5,7-trihydroxy-6-methoxyflavone) is a natural flavonoid extracted from many plants such as *Saussurea involucreata* by different methods. The present study aims to evaluate the effect of hispidulin as antioxidant, histopathologically and molecularly in male Sprague Dawley rats induced by oleic acid.

Method: Rats were divided into three groups. Group A; the Control group, group B; the oleic acid group (administration by k.v injection) and group C; the hispidulin + oleic acid combined group (k.v and i.p administration). Oxidative stress markers (MDA, SOD, CAT, MPO, GSH) were evaluated from kidney tissue obtained from application groups animals. The same tissues were subjected to histopathological examination. In addition, gene expression levels of critical regulators for inflammation, apoptosis, and cellular metabolism were investigated by real-time PCR in order to determine the molecular structure responsible for the nephrotoxic effects of oleic acid.

Results: Oleic acid caused a decrease in glutathione (GSH) levels and an increase in malondialdehyde (MDA) and Myeloperoxidase (MPO) levels in rat kidney tissues. It has been determined that the antioxidant system components superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) cause a decrease in their levels. In addition, it was observed that kidney damage biomarker (Kim-1), inflammation genes (Il-6, Nf-K β), apoptotic gene (Casp3) and gene (Mmp2), which are involved in the regeneration of the extracellular matrix, were negatively affected by oleic acid exposure. However, it has been observed that hispidulin can reverse all deregulations that occur with OA administration.

Conclusion: As a result, oleic acid used as an inducer of acute kidney injury; It caused tissue damage by disrupting the oxidant and antioxidant balance and caused dysfunction in kidney tissues by increasing the levels of inflammatory mediators. Hispidulin, which we use as a renoprotective agent in acute kidney injury, is thought to be an alternative, versatile and effective approach to alleviate kidney damage by inhibiting inflammation, oxidative stress and tubular cell death.

Keywords: Acute kidney injury, Hispidulin, Oleic acid, Rat, q-RT PCR

January 2023, 58 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	3
Akut Akciğer Hasarı	3
Akut Böbrek Hasarı.....	4
RIFLE kriterleri.....	5
AKIN kriterleri.....	5
KDIGO kriterleri	5
Etiyoloji.....	6
Prerenal akut böbrek hasarı	6
Renal akut böbrek hasarı	7
Postrenal akut böbrek hasarı	7
Oleik Asit	8
Flavonoidler	9
Hispidulin.....	9
Kaspaz-3 (<i>Casp3</i>).....	10
İnterlökin-6 (<i>Il-6</i>)	10
Nükleer faktör kappa β (<i>Nf-Kβ</i>)	11
Matris metalloproteinaz (<i>Mmp2</i>).....	11
Böbrek hasarı molekülü (<i>Kim-1</i>).....	11
Reaktif Oksijen Türleri, Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem	11
MATERYAL VE METOT	14
Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları	14

Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler.....	15
Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanlarının Hazırlanması	15
Uygulama grupları	15
Hispidulin uygulaması	16
Oleik asit (OA) uygulaması	16
Dokuların alınması.....	17
Formalin Hazırlanışı.....	17
Homojenizasyon işlemi.....	17
Oksidatif stres incelemeleri.....	18
MDA, MPO, IL-8, GSH, SOD ve CAT analizleri	18
Histopatolojik çalışma.....	18
Dokulardan RNA izolasyonu	19
Elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık değerlerinin belirlenmesi.....	20
cDNA eldesi	20
Genlerin Primer Dizaynı ve Real-Time PCR.....	21
İstatistiksel Analizlerin Yapılması	22
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	23
Oksidatif Stres Değişkenleri	23
Süperoksit dismutaz (SOD)	23
Miyeloperoksidaz (MPO).....	23
Malondialdehit (MDA)	24
Glutasyon (GSH)	25
Katalaz (CAT).....	25
Dokusu İçin Histopatolojik Bulgular	26
Real-Time PCR (q-RT PCR) Kullanılarak Elde Edilen Genlerin Ekspresyon Düzeyleri	27
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	35
KAYNAKLAR.....	36
EKLER	44
EK-1. ATADEMDEM'de Çalışma İzni.....	44
ÖZGEÇMİŞ.....	45

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. AAH ARDS Tanımları	3
Tablo 2. ARDS Sınıflandırılması.....	3
Tablo 3. RIFLE Kriterleri	5
Tablo 4. AKIN Kriterleri	5
Tablo 5. KDIGO Kriterleri	6
Tablo 6. Çalışmada Kullanılan Genlere Yönelik Primer Dizileri.....	21
Tablo 7. Master Mix İçeriği	21
Tablo 8. Real-Time PCR	22

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Akut böbrek hasarı nedenleri	8
Şekil 2. Oleik asitin kimyasal yapısı	8
Şekil 3. Hispidulin eldesi için ekstrakte edilen bitkiler ve yöntemleri.....	10
Şekil 4. Çalışmada kullanılan grupların gösterimi	16
Şekil 5. Ratlara i.p yolla hispidulin uygulanışı	16
Şekil 6. Kuyruk veninden OA uygulanışı	17
Şekil 7. Dokuların bloklanması, kesit alınması, lamlara alınmış halleri ve boyanmış halleri.....	19
Şekil 8. Nanodropta RNA konsantrasyon ölçümü	20
Şekil 9. qPCR rotorları	22
Şekil 10. Kontrol ve uygulama gruplarına ait rat böbrek dokularındaki SOD enzim spesifik aktivitesi	23
Şekil 11. Kontrol ve uygulama gruplarına ait rat böbrek dokularındaki MPO enzim spesifik aktivitesi	24
Şekil 12. Kontrol ve uygulama gruplarına ait rat böbrek dokularındaki MDA enzim spesifik aktivitesi	24
Şekil 13. Kontrol ve uygulama gruplarına ait rat böbrek dokularındaki GSH enzim spesifik aktivitesi	25
Şekil 14. Kontrol ve uygulama gruplarına ait rat böbrek dokularındaki CAT enzim spesifik aktivitesi	26
Şekil 15. Böbrek kontrol grubu histoloji görüntüleri (normal histolojik yapısı, H&E, Bar:100 µm.).....	26
Şekil 16. Böbrek OA grubu için patolojik bulgular; kalin ok: Hiperemi ok başı: Dilatasyon (Bowman kapsülünde), kare: Atrofi (Glomerulusta)	27
Şekil 17. Böbrek His+OA grubu için patolojik bulgular; kalin ok: Hiperemi ok başı: Dilatasyon (Bowman kapsülünde)	27
Şekil 18. <i>IL-6</i> 'nın böbrek dokularında q-RT PCR yöntemi ile belirlenen gen ekspresyon ifadeleri.....	28
Şekil 19. <i>Casp3</i> 'ün böbrek dokularında q-RT PCR yöntemi ile belirlenen gen ekspresyon ifadeleri.....	28

Şekil 20. <i>Kim-1</i> 'in böbrek dokularında q-RT PCR yöntemi ile belirlenen gen	
ekspresyon ifadeleri.....	29
Şekil 21. <i>Mmp2</i> 'nin böbrek dokularında q-RT PCR yöntemi ile belirlenen gen	
ekspresyon ifadeleri.....	29
Şekil 22. <i>Nf-Kβ</i> 'nin böbrek dokularında q-RT PCR yöntemi ile belirlenen gen	
ekspresyon ifadeleri.....	30



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat
µl	: Mikrolitre
AAH	: Akut Akciğer Hasarı
ABH	: Akut Böbrek Hasarı
AECC	: Amerikan Avrupa Konsensüs Konferansı
AKIN	: Akut Böbrek Hasarı Ağı
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi
ARDS	: Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu
ATN	: Akut Tübüler Nekroz
BSA	: Sığır Serum Albumin
CAT	: Katalaz
cDNA	: Tamamlayıcı Deoksiribo Nükleik Asit
CPAP	: Devamlı Pozitif Hava Yolu Basıncı
CRS	: İstirahatte Akciğer Kompliyansı
DEPC	: Dietil Pirokarbonat
dk	: Dakika
DM	: <i>Diabetes Mellitus</i>
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünoSorbent Testi
ERSD	: Son Dönem Böbrek Hastalığı
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FiO ₂	: İnspire Edilen Oksijen Fraksiyonu
Gapdh	: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz
GFH	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
gr	: Gram
GSH	: Glutatyon
H&E	: Hemotoksilen-Eozin
His	: Hispidulin

Il-6	: İnterlökin-6
Il-8	: İnterlökin-8
i.p	: İntraperitoneal
K₂H₂PO₄	: Dipotasyum Monohidrojen Fosfat
KDIGO	: Böbrek Hastalığı/Küresel Sonuçları İyileştirme
Kim-1	: Böbrek Hasarı Molekülü
KKH	: Koroner Kalp Hastalığı
kPa	: Kilopascal
MDA	: Malondialdehit
ml	: Mililitre
MMP	: Matris Metalloproteinaz
MPO	: Miyeloperoksidaz
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
Na₂HPO₄	: Disodyum Hidrojen Fosfat
NaH₂PO₄ · 2H₂O	: Sodyum Fosfat Monobazik Dihidrat
NF-Kβ	: Nükleer faktör kappa β
Nrf2	: Nükleer Faktör Eritroid 2
OA	: Oleik Asit
PaCO₂	: Parsiyel Arteriyel Karbondioksit Basıncı
PaO₂	: Parsiyel Arteriyel Oksijen Basıncı
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCWP	: Pulmoner Kapiller Kama Basıncı
PEEP	: Ekspiryum Sonu Pozitif Basınç
pH	: Hidrojen Gücü
Postrenal ABH	: Postrenal Akut Böbrek Hasarı
Q	: Kiagen
q-RT PCR	: Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR
Renal ABH	: Renal Akut Böbrek Hasarı
RIFLE	: Risk, Hasar, Yetmezlik, Kayıp, Son
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
SOD	: Süperoksit Dismutaz
Str-HRP	: Streptavidin-Horseradish Peroxidase
VEcorr	: Vücut Yüzey Alanı İle Düzeltilmiş Dakika Ventilasyonu

GİRİŞ

Akut akciğer hasarı (AAH) ve daha ciddi formu olan akut respiratuar distres sendromu (ARDS), normal kardiyak dolum basınçları ile kendini akut hipoksemik solunum yetmezliği, artmış alveolar permeabilite ve ciddi alveolar ödem ile gösteren mortalitesi yüksek bir solunum hastalığıdır (Shaw *et al.* 2019). Çok sayıda çalışma, AAH/ARDS insidansı ve mortalitesinin mevsim, ileri yaş, cinsiyet, sigara ve alkol kullanımı gibi faktörlerden etkilendiğini ortaya koymuştur. Günümüzde AAH/ARDS için mevcut tedaviler destekleyici tedavi ve farmakolojik müdahale olarak iki kısma ayrılabilir (Luh and Chiang 2007). Mekanik ventilasyonun akciğer koruyucu stratejisi, sağkalımı etkili bir şekilde iyileştiren tek destekleyici tedavi olarak kabul edilir. Farmakolojik tedavi ise antiinflamatuvar ve fizyolojik tedavi olarak sınıflandırılmaktadır (Sweeney *et al.* 2013).

AAH oluşumu sonrasında gelişen akut böbrek hasarı (ABH) ise, artan serum kreatinin düzeyleri (böbrek boşaltım fonksiyonunun bir belirteci) ve azalan idrar çıkışı (oligüri) (idrar üretiminin kantitatif bir belirteci) temel alınarak belirlenen ve 7 gün ile sınırlı olan ani böbrek fonksiyon kaybını tanımlar. Ayrıca hafif ve kendi kendini sınırlayandan şiddetli ve kalıcıya kadar değişebilen bir sıkalaya sahip çeşitli fonksiyonel böbrek koşullarının bir parçasıdır (KDIGO Group 2012). Sağlıklı bir insanda birkaç saatlik hacim azalmasının uzun vadeli sağlık etkileri olmayabilir. Benzer şekilde, renin-anjiyotensin sistemi inhibitörleri veya glomerüler filtrasyonu etkileyen diğer ilaçlar, serum kreatinin düzeylerinde böbrek hasarının göstergesi olmayan küçük değişikliklere neden olabilir (Bhatraju *et al.* 2020). Bununla birlikte, hacim tedavisine rağmen devam eden ABH, muhtemelen böbrekte yapısal hasar olduğunu gösterir (Chu *et al.* 2014). Meydana gelen hasarın doğrudan değerlendirilmesi biyopsi dışında çok mümkün olmamakla beraber üriner biyobelirteçler de kullanılmaktadır (Kane-Gill *et al.* 2020).

ABH'ı indüklemek için kullanılan en yaygın deney modellerinden biri de oleik asit (OA) kullanımıdır (Talebi *et al.* 2021; Akella *et al.* 2014). OA, genel olarak donyağı ve domuz yağı gibi hayvansal yağlarda olduğu gibi zeytinyağı, ayçiçek yağı ve kanola yağı gibi yüksek OA içeren bitkisel yağlarda da bulunmaktadır (Poudyal *et al.* 2013). OA üzerine yapılan araştırmalar, OA'nın çeşitli dokular üzerinde olumlu (İskemik kalp hastalıklarının önlenmesi, kolesterol ve ateroskleroz üzerindeki etkileri gibi) (Cocchi *et al.* 2009) ya da olumsuz etkilere (Sistolik duvar stresinin artması ve Reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini

indüklemesi gibi) (Mendez *et al.* 2005; Poudyal *et al.* 2013) neden olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Bitkiler; tıp, nutrasötikler, parfümeri, içecek, koku, kozmetik ve boya sanayi gibi farklı alanlarda farklı amaçlarla kullanıldıklarından insan uygarlığında önemli bir yere sahiptir (Zheng *et al.* 2001). Çeşitli hastalıklara karşı savunma sisteminde oldukça önemli bir rol üstlenirler (Patel *et al.* 2012). Bu nedenle ABH'nin tedavisi için flavonoidler, alkaloidler ve terpenoidler gibi çoklu anti-enflamatuar aktiviteye ve böbrek koruyucu etkiye sahip çeşitli doğal ürünlerin kullanımı oldukça önem kazanmaktadır.

Hispidulin de, çok çeşitli bitkilerde bolca bulunan bir monometoksi ve trihidroksi flavon bileşimidir. Flavonlar, flavonoidlerin en önemli biyoaktif alt gruplarından biridir. Flavonlar çoğunlukla bitkilerin iek, yaprak ve meyve gibi farklı kısımlarında bulunur (Manach *et al.* 2004). Hem *in vivo* hem de *in vitro* araştırmalar hispidulinin epilepsi, nöral bozukluklar, mantar enfeksiyonları, oksidatif stres, osteoporoz, astım ve mikrobiyal bozuklukların tedavisinde de anahtar göreve sahip olduğu bildirilmiştir (Nepal *et al.* 2013; Niu *et al.* 2014). Ayrıca lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği (Sanz *et al.* 1994), antioksidan ve antikanser özelliklere sahip olduğu da yapılan diğer çalışmalar ile desteklenmiştir (Kavvadias *et al.* 2004; Lin *et al.* 2010).

Yaptığımız bu çalışmada hispidulinin OA'nın neden olduğu ABH'a karşı koruyucu etkisi araştırılmıştır. Bunun için de OA uygulaması ile böbrek hasarına ilişkin bir hayvan modeli hazırlandı ve erkek *Sprague Dawley* ratlarda hispidulinin koruyucu rolü değerlendirildi.

KURAMSAL TEMELLER

Akut Akciğer Hasarı

Akut akciğer hasarı (AAH) ve daha ciddi aşaması olan akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), yaygın alveoler hasar, nötrofil türevi inflamasyon ve yüzey aktif madde görev bozukluğu ile ilişkilendirilen bir akciğer hastalığıdır. (Force *et al.* 2012). İlk olarak Ashbaugh ve arkadaşları tarafından 1967 yılında ARDS olarak tanımlanmıştır. Akut başlayan, klinik açıdan nefes darlığı, hızlı solunum, hipoksi ve kalp yetersizliği tanısı konmamış bilateral infiltrasyon ile karakterize edilmiştir (Ashbaugh *et al.* 1967). AAH'nin her zaman ARDS'ye dönüşmesi beklenmez. 1994 yılında Amerikan Avrupa Konsensüs Konferansı (AECC) (Tablo 1), $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ oranı < 300 ve < 200 mmHg olan arteriyel hipokseminin sırasıyla AAH ve ARDS olarak tanımlanabileceğini öne sürdü (Bernard *et al.* 1194).

Tablo 1. AAH ARDS Tanımları (1994- AECC)

Klinik	Akut Akciğer Hasarı	Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu
Başlangıç	Akut	Akut
Hipoksemi	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ (40kPa)	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ (27kPa)
Radyoloji	Pulmoner ödem ile uyumlu bilateral infiltrasyonlar	Pulmoner ödem ile uyumlu bilateral infiltrasyonlar
Nonkardiyak neden	Sol atriyal hipertansiyonun klinik bulgusunun olmaması veya $\text{PCWP} \leq 18$ mmHg	Sol atriyal hipertansiyonun klinik bulgusunun olmaması veya $\text{PCWP} \leq 18$ mmHg

AECC oluşturduğu tanımın duyarlılığı ve özgüllüğü açısından problemler bulunmaktadır (Ferguson *et al.* 2005). Berlin konferansında oksejinasyon oranına ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) bağlı olarak üç kategoride tanımlandı (Tablo 2).

Tablo 2. ARDS Sınıflandırılması

Kriter	Hafif	Orta	Ağır
Başlangıç Zamanlaması	Akut başlangıç	Akut başlangıç	Akut başlangıç
Hipoksemi	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 = 201-300$ ve $\text{PEEP}/\text{CPAP} \geq 5$	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 200$ ve $\text{PEEP} \geq 5$	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$ ve $\text{PEEP} \geq 10$
Radyolojik Anormallikler	Bilateral opasiteler	Bilateral opasiteler	En az üç kadranı kaplayan opasiteler
Ek fizyolojik düzensizlikler	Uygulanabilir değil	Uygulanabilir değil	$\text{CRS} < 40$ mL/cmH ₂ O veya $\text{VEcorr} > 10$ L/dakika

VEcorr: $\text{VE} \times \text{PaCO}_2/40$ (vücut yüzey alanı ile düzeltilmiş dakika ventilasyonu), CRS: İstirahatte akciğer kompliyansı, CPAP: Devamlı pozitif hava yolu basıncı.

Tabloda verilen bilateral opasiteler, lobar/akciğer kollapsı, kitle, nodül veya efüzyon ile tamamen açıklanamamıştır. En az üç kadranı kaplayan opasiteler ise herhangi bir risk faktörü bulunmaması durumunda objektif değerlendirmeye ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde AAH/ARDS Berlin tanımının AECC'nin tanımına göre mortalite için daha öngörücü geçerliliği olduğu düşünülmektedir. Normal endotelial-epitelial bariyerlerindeki işlev bozukluğunun AAH gelişiminde temel rol oynadığı düşünülmektedir. AAH her ne kadar 10 bin de 50-70 kişide görülme sıklığının yanı sıra %30-40 oranında mortaliteye sahiptir (Ishizaka *et al.* 2004). Tedavi yöntemlerindeki ilerlemelere rağmen AAH hasta olma sıklığı ve mortalitesi yüksek olarak devam etmektedir (He *et al.* 2021). Günümüzdeki mevcut tedaviler destekleyici ve farmakolojik müdahale olmak üzere 2 başlık altında incelenebilir. Mortaliteyi engelleyici tek destekleyici tedavi olarak mekanik ventilasyon kabul edilmektedir. Mekanik ventilasyona ek olarak pozisyon verme ve pozitif ekspratuvar sonu basınç terapötik olarak kullanılır (Luh & Chiang 2007). Farmakolojik olarak ventilasyon, difüzyon ve perfüzyonu etkileyen ilaçların yanı sıra farmako-besinler, proteaz inhibitörleri, antioksidanlar, matris metaloproteaz modifikasyonu kortikosteroidler içeren anti inflamatuvar tedavilerin etkinliği araştırılmaktadır (Bosma & Lewis 2007). Buna rağmen henüz etkili farmakolojik bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır (Fan *et al.* 2009). Bu nedenle son yıllarda AAH tedavisinde flavonoidleri ve alkaloidler gibi anti- inflamatuvar etkiye sahip doğal ürünler çalışılmaktadır.

Akut Böbrek Hasarı

Akut böbrek hasarı (Acute Kidney Injury) (ABH) ,dünya genelinde milyonlarca hastayı etkileyen büyük bir halk sağlığı sıkıntısıdır. Böbrekte hızla gelişen disfonksiyona bağlı olarak üre ve azot gibi metabolitlerin vücuttan atılamaması, hücre dışı sıvı hacmi ve elektrolit içeriğinin bozulmasıyla gerçekleşen bir klinik tablodur.

ABH, genellikle saatler veya günler içerisinde ortaya çıkan idrar seviyesinden azalışla beraber, böbreğin boşaltım fonksiyonlarındaki ani kayıp olarak tanımlanır. Daha sonra ABH hastalarının böbrek fonksiyonlarında düzelme görülür fakat mortalitesi ve diyalize bağımlı hale gelme oranı oldukça yüksektir. ABH böbreklerde gelişen ciddi hastalıklara yol açabilir ve diğer hastalıklarının gidişatını olumsuz yönde etkileyebilir.

ABH'na bağlı mortalite ve diğer olumsuz etkiler, hastalığın şiddetiyle doğru orantılıdır. Bu nedenle hastalığın şiddetini iyi tanımlamak uygulanacak tedavi yönteminin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. ABH şiddetinin belirlenmesi ve değerlendirilmesi üç sınıflandırma kullanılmaktadır (Mehta *et al.* 2007).

RIFLE kriterleri

RIFLE (risk, hasar, yetmezlik, kayıp, son) kriterleri ABH'ı 3 aşamalı tanımlar ve klinik olarak 2 sonuçtan bahseder. RIFLE idrar çıkışı, serum kreatin seviyesinde değişiklik ve GFH (Glomerüler filtrasyon hızı) temel alınarak oluşturur (Tablo 3) (Bellomo *et al.* 2004).

Tablo 3. RIFLE Kriterleri

Sınıf	GFH veya Serum Kreatinin Kriterleri	İdrar Çıkış Kriterleri
R-Risk	SCr x1.5 yükselmesi veya %25<GFH azalışı	6 saattir <0,5 ml/kg/saat
I-Injury (Hasar)	SCr x2 yükselmesi veya %50<GFH azalışı	12 saattir <0.5 ml/kg/saat
F-Failure (Yetmezlik)	SCr x3 yükselmesi veya %75<GFH azalışı veya SCr>4mg/dl olması	24 saattir <0.3 ml/kg/saat veya 12 saattir anüri
L-Loss (Kayıp)	Kalıcı böbrek fonksiyon kaybı (>4 hafta)	
E-ESRD (SDBY)	Son dönem böbrek hastalığı (>3 ay)	

*Tabloda belirtildiği gibi ilk 3 evre akut böbrek hasarının tanımını içerirken diğer 2 evre klinik sonuçları kapsamaktadır.

AKIN kriterleri

RIFLE kriterleri 2007 yılında AKIN (Akut Böbrek Hasarı Ağı) grubu tarafından gözden geçirilmiş olup bir takım düzenlemeler gerçekleştirilmiştir. AKIN tanımlamasında akut böbrek hasarı üç evreye ayrılmış (Tablo 4) ve 48 saat içerisinde gerçekleşen değişiklikler göz önünde bulundurulmaktadır (Rocha & McCullough 2018).

Tablo 4. AKIN Kriterleri

Evre	Serum Kreatinin Kriteri	İdrar Çıkışı Kriteri
1	0.3 mg/dl ve üzerinde veya; %150-%200 (1.5-2 kat) oranında yükselme	6 saatlik zaman diliminde saatlik idrar çıkışı 0.5 ml/kg.dan düşük
2	%200-%300 (2-3 kat) oranında yükselme	12 saatlik zaman diliminde saatlik idrar çıkışı 0.5 ml/kg.dan düşük
3	%300 (3 kattan fazla) yükselme veya; serum kreatinin 4 mg/dl iken 0.5 mg/dl ve üzerinde ani yükselme	24 saatlik zaman diliminde saatlik idrar çıkışı 0.3 ml/kg.dan düşük veya; 12 saat boyunca anüri

KDIGO kriterleri

“The Kidney Disease/Improving Global Outcomes-Böbrek Hastalığı/Küresel Sonuçları İyileştirme” (KDIGO), AKIN ve RIFLE kriterleri temel alınarak halk sağlığı, araştırmalar ve klinik uygulamalar için temel tanımlama yapmak amacıyla geliştirilmiştir.

Ana unsur olarak serum kreatinin düzeyi ve idrar çıkış seviyesi kullanılmaktadır. 3 evrede ele alınmıştır (Tablo 5) (Khwaja 2012).

Tablo 5. KDIGO Kriterleri

Evre	Serum Keratin Kriteri	İdrar Çıkışı Kriteri
1	Bazal değerden 1,5-1,9 kat ya da $\geq 0,3$ mg/dl artış	6-12 saattir $< 0,5$ ml/kg/saat
2	Bazal değerden 2-2,9 kat artış	≥ 12 saattir $< 0,5$ ml/kg/saat
3	Bazal değerden 3 kat artış ya da Serum kreatinin $> 4,0$ mg dl1 ya da RRT başlanması ya da < 18 yaşta eGFH < 35 ml/dk/1.73 m2 Olması	≥ 12 saat Anüri veya 24 saat boyunca < 0.3 ml/kg/saat

Etiyoloji

Klinik olarak ABH, uygun bir şekilde prerenal, renal ve postrenal olmak üzere üç ana etiyolojiye ayrılabilir (Basile *et al.* 2021). Kısaca prerenal; böbreğe sıvı gelmesini azaltan durumlar, renal; süzme aşamasını etkileyen böbrek hastalıkları ve postrenal; süzme işlemi gerçekleşip idrar oluşuktan sonra idrar atılımına engel olan durumlardır.

Prerenal akut böbrek hasarı

Prerenal böbrek yetmezliği, nefronların yetersiz perfüzyonu nedeniyle oluşur ve bu da GFH'de bir azalmaya yol açar. Temel olarak, artan enerji talebi dönemlerinde nefronlara beslenme ve oksijen sunumundaki bir dengesizlik ile ilgilidir. Bu nedenle, sistemik dolaşımı etkileyen veya renal perfüzyonu azaltan herhangi bir süreç GFH'yi tehlikeye atabilir.

Prerenal akut böbrek hasarı, dokunun bütününe zarar vermeden GFH'de azalma ile tanımlanmaktadır. Hipovolemi (kanama, ishal, kusma), azalmış kardiyak output (kardiyojenik şok, masif pulmoner emboli,) ve sistemik vazodilatasyonun (septik şok, anafilaksi, anestezi uygulaması) neden olduğu hipotansiyon prerenal akut böbrek hasarının oluşmasına sebep olabilir (Manzoor & Bhatt 2020).

Başlangıçta renal yapı ve fonksiyonun normal olması nedeniyle kan basıncı, hemodinamik durum hızlı düzeltildiği zaman geri dönüştürülebilir. Fakat dirençli hale gelirse hipoksi/iskeminin sebep olduğu akut tübüler nekroz (ATN) ile ABH' a kadar ilerleyebilir. ABH'ın en büyük bölümü, yaklaşık %60-70'i prerenal kaynaklıdır (Andreoli 2009; Downes *et al.* 2017).

Renal akut böbrek hasarı

Böbreğin dört ana yapısı olan tübüler, interstisyum, glomüler ve intrarenal kan damarlarının hasar görmesidir.

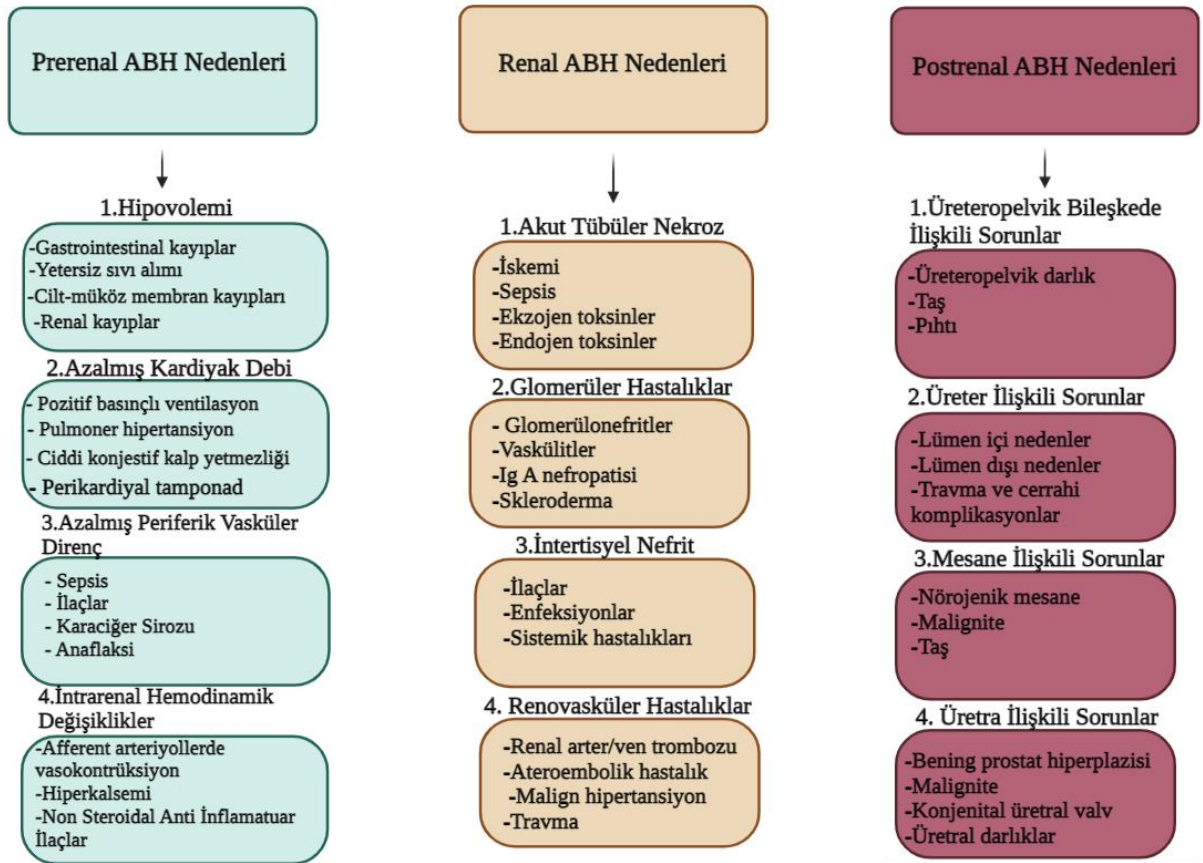
ATN, tübüler hasardan kaynaklanan ABH olarak tanımlanmaktadır. Renal akut böbrek hasarının (Renal ABH) yaklaşık % 60'ını oluşturmaktadır. Morfolojik açıdan çekirdek kaybı, apoptoz/nekroz ve epitelyal hücre düzleşmesi gibi değişiklikler gözlemlenmektedir. Genellikle iskemi, antimikroniyaller ve nefrotoksik ilaçlar neden olmaktadır. Ayrıca iskemik ATN'ye hipovolemik durumlar, düşük kan basıncı ve sepsis neden olurken nefrotoksik ATN'ye ilaçlar, rabdomiyoliz, multipl miyelom ve kontrast madde neden olabilir (Erge 2019).

Glomüler nefritler, hızlı ve ciddi bir şekilde ABH bulguları ortaya çıkarır. Ödem, ani yükselen üre ve hipertasyon ile de kendini gösterir.

İnterstisyum herhangi bir ilaca bağlı olarak alerjik reaksiyon ve nedeni bilinmeyen bir şekilde karşımıza çıkmaktadır. Genelde eklemlere de ağrı, yüksek ateş ve döküntü ile ortaya çıkar (Vohra *et al.* 1999).

Postrenal akut böbrek hasarı

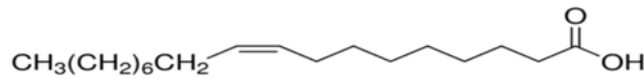
Prenal nedenlere oranla çok daha az karşılaşılan ve tedavi edilebilirler. Üriner sistemde iç (intra-renal) ve dış (ekstra-renal) kısımdan basıya bağlı tıkanıklar ile ortaya çıkmaktadır. Sistemde çözilemeyen protein ve kristallerin tübüler de birikmesiyle iyon hızında azalmaya neden olur. Sonuç olarak dış toplayıcı sistemde gerçekleşen tıkanıklıklar postrenal akut böbrek hasarına (Postrenal ABH) neden olmaktadır (De Mendonça *et al.* 2000).



Şekil 1. Akut böbrek hasarı nedenleri

Oleik Asit

Oleik asit (OA) ismi Latince yağ anlamına gelen “oleum” kelimesinden türemiştir (El-Tanany & Abdallah 2019). Hayvanlarda ve bitkilerde doymamış bir yağ asididir. OA, sağlıklı bireylerin vücudunda en yaygın bulunan yağ asididir. İnsan plazmasında, yağ dokusunda ve hücre zarlarında bulunur (Gonçalves-de-Albuquerque *et al.* 2015). OA, 18 karbonlu tek çift bağa sahip doymamış yağ asidi olup diğer yağ asitlerinin sentezinde rol oynayan bir moleküldür (Şekil 2) (Andersson & Holman 1974; Rustan & Drevon 2001).



Şekil 2. Oleik asitin kimyasal yapısı

OA'nın hücreler üzerindeki etkilerine, hücre yüzeyi reseptörleri veya nükleer reseptörler yoluyla sinyal gönderme gibi mekanizmalar aracılık eder (Hara *et al.* 2011). Farklı hücreler, yağ asidine maruz kaldıktan sonra apoptoz ve nekrozun morfolojik özelliklerini sergiler (Rockenfeller *et al.* 2010). Değişen dolaşımdaki yağ asidi seviyeleri, obezite, *Diabetes mellitus* (DM), koroner kalp hastalığı (KKH), ateroskleroz ve kanser gibi patolojilerle bağlantılıdır (Das 2006). Daha da önemlisi, sepsis, leptospiroz, pankreatit ve preeklamps gibi hastalıkların ciddiyeti, artan serum yağ asitleri seviyeleri ve plazma albümin

konsantrasyonundaki düşüş ile ilişkilidir (Nogueira *et al.* 2008). AAH ve ARDS’de yeni tedavi modellerinin araştırılmasında en çok kullanılan yöntem OA ile oluşturulmuş olan ARDS modelidir (Zazzeron *et al.* 2019).

Flavonoidler

Flavonoidler, meyvelerde, sebzelerde, kabuklu yemişlerde, tohumlarda, saplarda, çiçeklerde, çayda, şarapta, propoliste ve balda yaygın olarak bulunan çeşitli doğal fenolik bileşikler ailesidir (Havsteen 1983; Khan *et al.* 2021). Flavonoidler, iki aromatik halka ve bir piran halkasından oluşan temel bir C6–C3–C6 15 karbon iskeletine sahiptir. Flavonoid bileşikler, karbon yapılarına ve oksidasyon derecelerine göre flavonlar, flavonoller, flavanonlar, izoflavonlar, flavanol ve antosiyaninler olmak üzere altı alt sınıfa ayrılır ve araştırmacılar 5000'den fazla flavonoid tanımlamıştır (Rufino *et al.* 2021; Ross & Kasum 2002). İyi bilinen antioksidan aktiviteye ek olarak, flavonoidler ayrıca anti-inflamatuar, vazodilatör, antikoagülan, kardiyoprotektif, antidiyabetik, kimyasal koruma, nöroprotektif ve anti-obezite aktivitelerine sahiptir (Fan *et al.* 2022).

Hispidulin

Hispidulin (4',5,7-trihidroksi-6-metoksiflavon), *Saussurea involucrata* gibi birçok bitkiden farklı yöntemler ile ekstrakte edilen (Şekil 3) doğal bir flavonoiddir (Liu *et al.* 2020).



*Clerodendrum
petasites* S. Moore

Fotodiyot dizisi (PDA) ve kütle spektrometresi (MS) tespiti ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).



*Saussurea
involucrata*

Yüksek performanslı sıvı kromatografi elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometri yöntemi (LC-ESI-MS)



*Salvia
plebeia* R.Br

Fotodiyot dizi dedektörü (HPLC-DAD) ile birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi.



*Centaurea
jacea* L

Biyoanaliz kılavuzlu fraksiyonlama, UV, MS ve NMR spektroskopisi.



Belamcanda

Orta basınçlı sıvı kromatografisi (MPLC) ve hazırlayıcı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (Prep-HPLC), yüksek hızlı ters akım kromatografisi (HSCCC) ile birlikte.

Şekil 3. Hispidulin eldesi için ekstrakte edilen bitkiler ve yöntemleri

Hispidulin, laboratuvar hayvanlarında ve hücre kültürlerinde antiinflamatuvar, antioksidan, antifungal, antiepileptik, nöroprotektif ve antiosteoporotik aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (Nepal *et al.* 2013). Hispidulin, yağ asidi metabolizmasında rol oynayan bir ligandla aktive olan transkripsiyon faktörünü aktive eden reseptör ile doğrudan bağlanarak lipid metabolizmasını geliştirir (Wu & Xu 2016). Hispidulin bazı tümör ilaçları ile glioblastomadaki hücre proliferasyonu ve hücre apoptozu üzerinde inhibe edici etkisi anti-tümör aktivitesi olduğunu ortaya çıkardı. Ayrıca karaciğer kanser hücrelerinde antiproliferatif etkisinin olduğu, matris metalloproteinazların (*Mmp2*, *Mmp9*) ekspresyonunu inhibe ederek hücre göçünü durdurduğunu göstermişlerdir (Wang *et al.* 2015).

Kaspaz-3 (*Casp3*)

Mitokondri tarafından düzenlenen; programlanmış hücre ölümü (apoptozis) mekanizması hücre içi (intrinsik) ve hücre dışı (ekstrinsik) yollar ile meydana gelebilmektedir. Kaspaz olarak adlandırılan proteolitik enzimler aracılığıyla gerçekleştirilir (Galluzzi *et al.* 2012). Kaspazlar'lar, apoptozis mekanizmasının gerçekleşmesi için önemli araçlarıdır. Kaspaz-3 (*Casp3*), önemli birçok hücre proteinin bölünmesini katalize eder ve sık sık aktive olan bir ölüm proteazıdır (Taylor *et al.* 2008). Kaspazlar, birçok farklı türleri tanımlanan, sitoplazmada inaktif proenzimler halinde bulunan, substratlarını aspartat içeren ve katalitik bölgesinde sistein bulunduran spesifik bir bölgeden kesen proteaz enzimlerdir (Nicholson 1999). Kaspaz-3 doku farklılaşması, yenilenmesi ve nöral gelişimdeki önemli özellikleri sebebiyle son yıllarda çok dikkat çekmiştir. Bu enzim hücre apoptozisinde anahtar bir proenzimdir ve apoptotik süreç esnasında başlatıcı kaspaz'lar tarafından parçalanana kadar aktif hale gelmezler (Parrish *et al.* 2013).

İnterlökin-6 (*Il-6*)

İnterlökin-6 (*Il-6*), T hücreleri, B hücreleri, fibroblastlar, endotel hücreler, monositler ve bazı tümör hücreleri gibi birçok hücre tarafından üretilirler. Bulaşıcı hastalıklar ve otoimmün bozukluklar da içeren çeşitli inflamatuvar hastalıklarda mediyatör olarak rol oynar. Bağışıklık sisteminin ve sinir sisteminin düzenlenmesinde geniş kapsamlı biyolojik etkilesi olan pro-inflamatuvar bir sitokindir (Zhou *et al.* 2016). *Il-6*'nın hücre siklusunun devamı ve apoptoz inhibisyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Bu nedenle tümör gelişiminde *Il-6*'nın önemli bir rolü vardır. Ayrıca kanser ve otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığın patogeneğinde *Il-6*'de gerçekleşen bozuklukların da etkisi vardır (Taniguchi & Karin 2014).

Nükleer faktör kappa β (*Nf-K β*)

Nükleer faktör kappa β (*Nf-K β*), B-lenfosit hücre çekirdeğinde Ranjan Sen ve David Baltimore tarafından 1986 yılında keşfedildi (Sen & Baltimore 1986). Bütün hücre tiplerinde var olan transkripsiyon faktörüdür. *Nf-K β* immünolojik fonksiyonuna ek olarak pro-inflamatuar sitokinlerin üretiminde, serbest radikaller ve bakteriyel antijenler gibi uyaranlara karşı hücrel tepkilerde önemli rol oynar (Gammoh & Rink 2017). Yapılan birçok araştırmada, çeşitli toksik ajanların NF-kB aktivasyonuna yol açarak pro-enflamatuar sitokinlerin seviyelerinin yükselmesine sebep olduğu ve böylece enflamatuar oluşumu ile doku hasarına yol açtığı öngörülmektedir.

Matris metalloproteinaz (*Mmp2*)

Matris Metalloproteinaz (*Mmp2*) geni tarafından kodlanan protein, matris metalopeptidaz 2 olarak bilinir ve çinko bağımlı endopeptidazların geniş ailesine aittir (Hagemann *et al.* 2009). Hücre dışı matrisin yapısındaki bazı ürünleri parçalama özelliğine sahip bir protein, X kromozomu inaktivasyonu, dokuya özgü gen ekspresyonu ve morfogenez gibi fizyolojik süreçlerde yer alır (Senceviçiüté *et al.* 2012).

Böbrek hasarı molekülü (*Kim-1*)

Böbrek Hasarı Molekülü (*Kim-1*), 1998 yılında, iskemi sonrası böbrek dokusunda saptanabilen ancak normal böbrek dokusunda izlenmeyen bir molekül olarak bildirilmiştir (Waanders *et al.* 2010). Kim-1 en hassas biyobelirteçlerden biri olarak Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır. ABH bulunan hastalardan biyopsi örneklerine bakıldığında *Kim-1* ekspresyon seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir (Ichimura *et al.* 2008).

Reaktif Oksijen Türleri, Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

Reaktif oksijen türleri (ROS) havaküredeki oksijenin kısmen indirgenmiş veya uyarılmış formlarıdır (Halliwell & Gutteridge 2015). Hücrelerde sinyal molekülleri olarak işlev görürler, ancak aynı zamanda aerobik metabolizmanın kaçınılmaz toksik yan ürünleri olarak da düşünülürler (Mignolet-Spruyt *et al.* 2016). Hücrelerin yapısında ROS'ların üretimini etkileyen birçok aktivatörler ve inhibitörler bulunur (Martinon 2020). ROS'lar, sinyal iletimi ve fagositlerin etkinliğinin devamlılığında önemli rol oynamaktadır (Brown & Griendling 2015). ROS'lar, mitokondriyal solunum esnasında indirgenen oksijen kaynaklı süperoksit radikali (O_2^-) oluşumu gerçekleşir. Oluşan süperoksit radikali, süperoksit dismutaz (SOD) enziminin katalizlemesi ile birlikte daha az reaktif olan hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülür. Metal iyonlarının varlığında ya da direkt olarak süperoksit radikali ile

tepkimeye giren hidrojen peroksit çok daha reaktif olan ve en çok tanınan hidroksil radikaline ($\text{OH}^\cdot$) dönüşümü gerçekleşir (Halliwell & Gutteridge 2015).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) normal aerobik metabolizma ürünleri tarafından üretilmesi kaçınılmazdır ve stres koşulları altında artmaktadır (Paździoch-Czochra & Wideńska 2002). İnsan vücudunda yüksek konsantrasyonda ROS bulunması durumunda var olan dengenin bozulması ile doku hasarı gerçekleşir ve oksidatif stres olarak adlandırılır. Bunun sonucunda lipid, protein ve nükleik asitler gibi hücre içeriğinde hasar meydana gelmekte ve böylece birçok hastalığın patogenezi ortaya çıkmış olur (Kucukler *et al.* 2021). Oksidatif stres sonucunda oluşan hasarın yanı sıra enflamasyon oluşumu da gerçekleşmektedir. Antioksidan savunma sistemleri, son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron bulunduran serbest radikallerin diğer moleküllerle reaksiyona girerek oluşturdukları yüksek hasarı koruma ve tamir etme özellikleri ile ortadan kaldırmaya çalışır (Valko *et al.* 2007).

Serbest radikaller tarafından oluşturulabilecek oksidatif stresi önlemek için en önemli ajanlar antioksidanlardır. Antioksidanlar serbest radikalleri zararlı etkisini azaltabilen ve hücre hasarını engelleyebilen maddelerdir (Shinde *et al.* 2012). Antioksidanlar, radikallerle oldukça hızlı bir şekilde reaksiyona girerek otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddelerdir (Durna Aydın *et al.* 2021). Antioksidanların rolleri arasında serbest radikallerin fazlasını etkisizleştirmek, serbest radikallerin toksik etkilerine karşı hücreleri korumak ve hastalıkları önlemede katkı sağlamak sayılabilir (Pham-Huy *et al.* 2008). Antioksidanlar, endojen ve eksojen olmak üzere iki grup altında ayrılır (Radomska-Leśniewska *et al.* 2017). Endojen antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Nonenzimatik antioksidanlar arasında glutatyon (GSH), ürik asit, albümin ve selenyum gibi kimyasal bileşikler bulunmaktadır (Sen & Chakraborty 2011). GSH neredeyse bütün ökaryotik hücrelerde sentezlenmektedir. Hücrenin redoks durumunu korumada, hücre sinyal mekanizmasının düzenlenmesinde, gen ekspresyonunda ve apoptozisde de antioksidan olarak bulunmaktadır (Sies 1999). GSH, GPx'in katalitik etkisiyle lipid peroksitleri ve H_2O_2 'yi detoksifiye etmektedir. Vitamin (E) ve vitamin (C) GSH tarafından düzenlenir. Ayrıca bazı antioksidanları yeniden oluşturur (Redza-Dutordoir & Averill-Bates 2016). Enzimatik antioksidanlar grubunda Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutatyon peroksidaz (GPx) ve Glutatyon redüktaz (GR) bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz enzimi(SOD), reaktif oksijen türlerine karşı ilk savunma hattını oluşturur. Süperoksit radikalini ($\text{O}_2^\cdot$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) katalizleyen enzimatik bir antioksidandır (Young & Woodside 2001). Katalaz, dört protein alt birimden

meydana gelir. Katalaz, büyük ölçüde peroksizomlar gibi hücre içi organellerde ve daha az olarak mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunur. Hücreler için toksik olan hidrojen peroksitin H_2O 'ya dönüşümü katalaz enzimi aracılığı ile gerçekleştirilir (Chen *et al.* 2020). Serbest radikaller, bir organizmada lipid peroksidasyon sürecini oluşturur. Malondialdehit (MDA), hücrelerde çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir. Serbest radikallerdeki artış, MDA'nın aşırı üretimine neden olur. Malondialdehit seviyesi, kanserli hastalarda oksidatif stres ve antioksidan durumunun bir belirteci olarak bilinir (Gawel *et al.* 2004). Miyeloperoksidaz (MPO), hidrojen peroksit ile hidroklorik asit gibi kuvvetli bir oksidan üretir. Hücreler arası etkileşimde katalitik aktivite ve enflamatuvar yanıtlar oluşturabilir. MPO'nun aşırı üretimi akut ve kronik iltihaplanmalarla karakterize olup doku hasarı oluşturabilir ve birçok alt türünün enflamatuvar hastalıklarla bağlantılı olduğu çalışmalarda saptanmıştır (Van der Veen *et al.* 2009).

Yapılan birçok çalışmada ROS seviyesindeki artış ve antioksidan enzim miktarındaki dengesizlik oksidatif stres ile sonuçlandığı aktarılmaktadır. Ek olarak ROS'ların ortaya çıkardığı olumsuz etkileri antioksidan özellikteki flavonoidlerin minimum seviyeye indirdiği ve tedavi sırasında koruyucu etki gösterebileceği düşünülmektedir (Aksu *et al.* 2021).

MATERYAL VE METOT

Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Markaları

Cihazlar	Marka
Spekrofotometre	Bio-Tek Power Wave XS
Hassas Terazı	Ohaus Pioneer
Vorteks	Fisons WhirhMixer
Q-PCR Cihazı	Qiagene Rotor-Gene
PCR Cihazı	SensQuest Labcycler
Nanodrop	Thermo Scientific Multiskan GO
Santrifüj	HettichZentrifugen Mikro 220R
Buzdolabı (+4/-20)	Bosch
Derin Dondurucu (-86)	Glacier Ultralow Scientific
Kar Makinesi	Angelantoni
Otoklav	Hirayama Hıclave
Saf Su Cihazı	Mp MINI Pure DestUp
Homojenizatör	Bead Blaster
Doku takibi cihazı	Tissue-Tek VIP® 6 AI Vacuum Infiltration Processor
Otomatik boyama cihazı	Leica ST5010 Autostainer XL
Fully Automated Glass Coverslipper	Leica CV5030
Mikrotom	HistoCore Multicut
Doku bloklama cihazı	Tissue-Tek® TEC™ 6 Tissue Embedding Console System
Su banyosu	Apex
Etüv	Binder

Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler

Etanol
β-markaptoetanol
DEPC (dietil pirokarbonat)
Sevofluran
Hispidulin
EcoPURE RNA İzolasyon Kiti
cDNA İzolasyon Kiti
Gen primerleri
Rack
PCR tüpleri
1,5 ml endorf tüpleri
2 ml endorf tüpleri
Pipet uçları
Otomatik pipetler
Petri kabı
Enjektör
Kan tüpü
Falcon tüp
Makas
Klips
Bistüri

Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Yapılan çalışma, 01/12/2021 tarihli ve 236643897-000-EBYS-1 sayılı, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve araştırma Merkezi (ATADEM) etik kurulunun onayı ile gerçekleştirildi. Yapılan çalışmada 250-270 g ağırlığında 30 adet erkek *Sprague Dawley* tipi ratlar kullanıldı. Tüm hayvanlar oda sıcaklığında (20-24°C) 12 saat aydınlık/karanlık döngüde, metal kafesler içerisinde, yiyecek ve suya serbest erişim (ad libitum) ile uygun standart şartlar sağlandı (Hagawane *et al.* 2016).

Uygulama grupları

Deneye başlamadan önce ratlar rastgele olacak şekilde 3 gruba ayrıldı (n=10). (A) Kontrol; (B) Hasta kontrol (Oleik asit); (C) Hispidulin+Oleik asit grubu (Şekil 4). Hispidulin (80 mg/kg,) konsantrasyonları, yapılan literatür taraması ile saptandı (Lin *et al.* 2015).

UYGULAMA GRUPLARI

İÇERİKLERİ



A: Kontrol (K) Grubu

Herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Fizyolojik su [2,5 mL/kg, intraperitoneal (i.p)] alan grup



B: Hasta (Oleik asit) Grubu

Fizyolojik su (2,5 mL/kg, i.p) uygulamasından 30 dk sonra Oleik asit (50 µl/kg, kuyruk veni k.v) alan grup



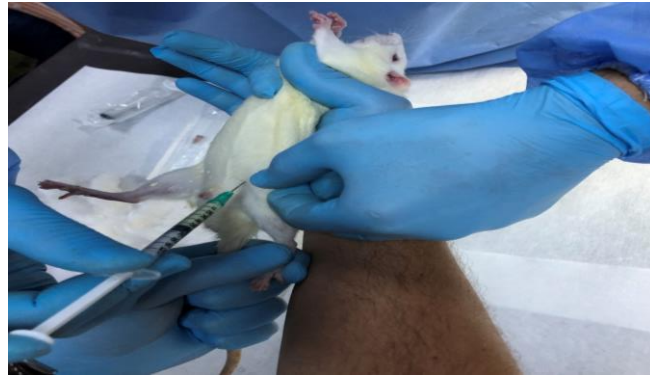
C: Hispidulin+ Oleik Asit Grubu

Oleik asit (50 µl/kg, kuyruk veni k.v), Hispidulin (80 mg/kg, intraperitoneal i.p) alan grup

Şekil 4. Çalışmada kullanılan grupların gösterimi

Hispidulin uygulaması

Hispidulin (saflık $\geq 98\%$) maddesi (Sigma-Aldrich) ticari olarak temin edildi. OA uygulamasından 1 saat önce (80mg/kg) %0,1 dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmüş halde i.p olarak verildi (Xie *et al.* 2015).



Şekil 5. Ratlara i.p yolla hispidulin uygulaması

Oleik asit (OA) uygulaması

Sigma-Aldrich firmasından satın alınan OA 250 µl %1 Sığır Serum Albumin (BSA) içinde çözdürüldü. Hispidulin uygulamasından 1 saat sonra ratlara 50µl/kg olacak şekilde kuyruk venlerinden enjeksiyonla verildi. 24 saatlik bir sürenin ardından hayvanlarda, ABH gerçekleştiği kabul edildi.



Şekil 6. Kuyruk veninden OA uygulaması

Dokuların alınması

Her bir rat göğüs hizasından dikey insizyon açılarak böbrek dokuları titizlikle uzman bir ekip tarafından çıkarıldı. Çıkarılan dokuların bir bölümü deney boyunca sıvı azot içerisinde bekletilip mümkün olan en kısa süre içerisinde sonra -80 °C' ye bırakıldı. Diğer bölümü ise patolojik bulgular için formalin içerisine aktarıldı.

Formalin Hazırlanışı

- Distile su (900mL)
- Disodyum hidrojen fosfat, Na_2HPO_4 (6,5 g)
- Sodyum fosfat monobazik dihidrat $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4 g)
- %40'lık formalin (100 mL)

Maddelerin birleşiminden elde edilen çözelti manyetik karıştırıcıyla ile 30 dakika karıştırıldı ve oda sıcaklığında bekletildi.

Homojenizasyon işlemi

Homojenizasyon işlemi total RNA izolasyonu ve enzim aktiviteleri olmak üzere iki farklı deney prosedürü için 2 farklı şekilde gerçekleştirildi.

Enzim aktiviteleri için daha önce -80 °C' de kaldırılan dokular +4 °C' ye alındı ve bir gün bekletildikten sonra homojenizasyon işlemine başlandı. Her bir dokudan 0,2 g kesit alındı makroparçalama işlemi gerçekleştirilerek homojen bir yapı elde edildi. Daha sonra dokular vidalı tüplere aktarıldı ve üzerine 1 ml (0,1 M KH_2PO_4 -10 mM EDTA, pH:7) içeriğindeki homojenizasyon tamponu ve homojenat boncukları eklendi. Tüpler homojenizasyon cihazına konularak 5 döngü olacak şekilde 3000 rpm'de homojenize edildi. Cihazdan çıkarılan tüpler 25 dakika boyunca 13000 rpm'de +4 °C sıcaklıkta santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısımları 1,5 ml'lik ependorflara alınarak pellet kısmından uzaklaştırıldı.

Oksidatif stres incelemeleri

Oksidatif stres parametrelerinden katalaz (CAT), malondialdehit (MDA) ve süperoksit dismutaz (SOD) miktar tayini yapılmıştır. Dokulardan alınan numunelerin CAT, MDA ve CAT seviyelerinin belirlenmesi için (SunRed Biotechnology) şirketinden alınan Elisa Kitleri kullanılmıştır.

MDA, MPO, IL-8, GSH, SOD ve CAT analizleri

Başlangıçta dilue solüsyon ile 5 farklı tüp içerisinde standartlar oluşturuldu. 96'lık well-platelerin ilk sütundaki her bir kuyucuğa 50 µl reaktif standart ve diğer sütunlara ise 40' ar µl homojenize haldeki numuneler pipet yardımıyla eklendi. Daha sonra numunelerin bulunduğu kuyucuklara 10'ar µl Biotin Ab (CAT, SOD, MDA, MPO, IL-8, GSH) aktarıldı. Bu işlemin ardından bütün kuyucuklara 50' er µl Str-HRP (Streptavidin-Horseradish Peroxidase) konjuge reaktifi aktarıldı ve 37 °C' de 60 dk inkübatörde bekletildi. İnkübasyon işleminin ardından yıkama tamponu ile 5 defa yıkama işlemi yapıldı. Yıkama işleminden sonra kuyucuklara 5'er µl Kromojen A ve Kromojen B aktarıldı folyo ile kapatılarak dış ortamdaki ışıktan muhafaza edildi ve 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa 50'er µl durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırıldı. Kuyucuklarda mavi rengin sarı renge dönüşmesi reaksiyonun sonlandığını belirtmektedir. Son olarak spektrofotometrede 450'nm dalga boyutunda ölçüm gerçekleştirildi. KC Junior yazılımı kullanılarak standart eğri oluşturuldu ve ölçümler analiz edildi.

Histopatolojik çalışma

İlk olarak formalin içerisinde bekletilen dokular, uygun biçimde kasetlere yerleştirildi. Kasetlenen dokular, doku takibine alınarak 13 saat boyunca (Tissue-Tek VIP® 6 AI Vacuum Infiltration Processor) cihazında alkol, ksilen ve parafin aşamalarından geçirildi. Doku takip işleminden sonra (Tissue-Tek® TEC™ 6 Tissue Embedding Console System) cihazı aracılığıyla doku gömme işlemi gerçekleştirildi. Doku gömme işleminden sonra dokular daha iyi kesim gerçekleşmesi için -20°C bekletildi. Kesit aşamasında ise ilk olarak 30 mikron kalınlığında kaba tıraş gerçekleştirilerek dokumuzun bütün alanları eşit seviyeye getirildi. Ardından 5 mikron boyutunda kesitler alındı. Alınan kesitler su banyosunda pürüzsüz bir hale getirilerek lam üzerine aktarıldı. Daha sonra üzerinde kesit bulunan lamlar 30 dakika boyunca 80°C etüvde bekletildi. Etüvden çıkarılan lamlar (Leica ST5010 Autostainer XL) cihazı aracılığıyla otomatize bir şekilde ksilol, alkol ve eozin solüsyonlarından geçerek hemotoksilen-eozin boyama işlemi gerçekleşti. Boyama işleminin ardından (Leica CV5030 Fully Automated Glass Coverslipper) cihazı entellan ile lamaların

üzerini kapatıp mikroskopta incelenebilecek duruma getirildi. Deney aşamasında çekilen resimler Şekil 7’de gösterilmiştir.



Şekil 7. Dokuların bloklanması, kesit alınması, lamlara alınmış halleri ve boyanmış halleri

Dokulardan RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için başlangıçta -80°C ’ de bekletilen dokular bir gün $+4^{\circ}\text{C}$ ’ de bekletildi. EcoPURE RNA İzolasyon Kit (EcoTech) kullanılarak saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Böbrek dokuları 0,03 gr boyutunda alınarak öncelikle makroparçalama işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra parçalanan dokular ependorf tüpleri içerisine alınarak kit içerisinde bulunan Lysis Buffer’ dan 400 μl ayrıca β -merkaptoetanol ve homojenat boncukları eklendi. Tüpler homojenizasyon cihazına konularak 5 döngü olacak şekilde 3000 rpm’de homojenize edildi. Cihazdan çıkarılan tüpler 25 dakika boyunca 13000 rpm’de $+4^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısımları 1,5 ml’lik ependorflara alınarak pellet kısmından uzaklaştırıldı.

Tüpler içerisindeki süpernatant miktarı kadar etanol eklenerek 10 saniye vorteksleme işlemi yapıldı. Ardından 700 μl kolona alınarak 2 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj yapıldı. Filtrede kalan RNA tutuldu geri kalan kısım uzaklaştırıldı. 400 μl yıkama tamponu-1 ve 500 μl yıkama tamponu-2 kolona eklenerek 30 saniye maksimum hızda santrifüj işlemleri sırasıyla gerçekleştirildi. 200 μl yıkama tamponu-2 daha eklenip 2 dakika santrifüj işlemi yapılarak son yıkama işlemi de tamamlanmış oldu. Kolonda tutunan RNA’ları yeni ependorflara almak için 50 μl elüsyon tamponu eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 30 saniye maksimum hızda santrifüj yapılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık değerlerinin belirlenmesi

Kontrol olarak elüsyon tamponu kullanıldı. Elde edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyon ölçümü Nanodrop cihazı ile gerçekleştirildi. RNA örnekleri -80 °C'ye kaldırıldı.

cDNA eldesi

cDNA eldesi iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad) kiti ile gerçekleştirildi. PCR tüpünün içerisine;

- 4 µl 5x iScript Reaksiyon miks
- 1 µl iScript Ters transkriptaz
- 3 µl RNA kalıbı
- 12 µl Nükleazsız su

eklenerek tüpün içerisi total hacim 20 µl e tamamlandı. Daha sonra PCR tüpleri SensoQuest Thermal Cycler cihazına aktarıldı. Sıcaklık ve süreleri;

- 25°C 'de 5 dakika
- 46°C'de 20 dakika
- 95°C'de 1 dakika
- 4°C'de ∞ olarak ayarlandı.



Şekil 8. Nanodropta RNA konsantrasyon ölçümü

Elde edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyon ölçümü Nanodrop cihazı ile gerçekleştirildi. cDNA örnekleri -20 °C'ye kaldırıldı.

Genlerin Primer Dizaynı ve Real-Time PCR

Çalışmada *Gapdh* (Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz) housekeeping gen olarak kullanıldı. Sentebiolab Biokim firmasından sipariş edilen, *Il-6*, *Casp3*, *Mmp2*, *NF- κ B* ve *Kim-1* ve housekeeping gen olarak *Gapdh* primerleri kullanıldı. Kullanılan primerler Tablo 6. gösterilmiştir.

Tablo 6. Çalışmada Kullanılan Genlere Yönelik Primer Dizileri

GEN (RAT)	PRİMER DİZİSİ
<i>Il-6</i>	F: 5'-AGT TGC CTT CTT GGG ACT GA-3' R: 5'-ACT GGT CTG TTG TGG GTG GT-3'
<i>Gapdh</i>	F: 5'-AAA CCC ATC ACC ATC TTC CA-3' R: 5'-ATA CTC AGC ACC AGC ATC ACC-3'
<i>Casp3</i>	F:5' AGG AGC AGT TTT GTG TGT GTG-3' R:5' AGT TTC GGC TTT CCA GTC AG-3'
<i>Mmp2</i>	F: 5'- ACC ACG GAT CTG AGC AAT-3' R: 5'- TAC TGG ACC CAC GCC TAC-3'
<i>NF-κB</i>	F:5'- TCT GCT TCC AGG TGA CAG TG-3' R:5'- ATC TTG AGC TCG GCA GTG TT-3'
<i>Kim-1</i>	F:5'- TGT ATT GTT GCC GAG TGG AG-3' R:5'- TGT GGG TCT TGT TGG AGG A-3'

Real-time PCR (Bio-Rad) kiti ile gerçekleştirildi. Her bir örnek için 3 tekrar yapıldı.

Tablo 7. Master Mix İçeriği

İÇERİK	MİKTAR
SYBR Green Mix	10 μ l
Reverse primer	0,5 μ l
Forward primer	0,5 μ l
Nükleaz içermeyen su	7 μ l
cDNA	2 μ l

Master mix oluşturuldu ve her tüp için 18 μ l boyutunda ekleme yapıldı. Daha sonra mastermix eklenen tüplere cDNA örnekleri 2'şer μ l eklendi. Hazırlanan örnekler Rotor-Gene PCR cihazına yerleştirilerek döngüler şu şekilde ayarlandı;



Şekil 9. qPCR rotorları

Tablo 8. Real-Time PCR

SICAKLIK	SÜRE	DÖNGÜ
50 °C	2 dakika	(1 döngü)
95 °C	30 saniye	(1 döngü)
95 °C	5 saniye	
60 °C	30 saniye	(40 döngü)
72 °C	20 saniye	

Her bir gen için bütün basamaklar uygulanıp sonuçlar analiz edildi.

İstatistiksel Analizlerin Yapılması

Çalışmaya ait deneyler 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara air değerlendirmeler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Verilerin değerlendirmesi için GraphPad Prism version 8.0.2 paket programı (GraphPad Software, San Diego, USA) kullanıldı. İstatiksel önemlilik seviyeleri $p > 0,05$ (ns; önemsiz), $p < 0,05$ (*; önemli), $p < 0,01$ (**; çok önemli), $p < 0,001$ ve $p < 0,001$ (***) ve ****; yüksek derecede önemli) olarak değerlendirildi.

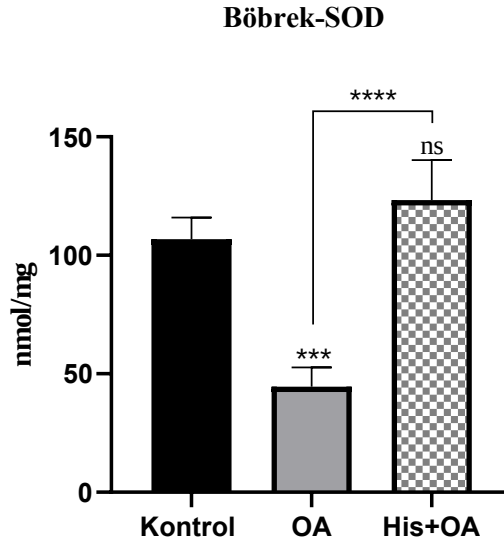
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Oksidatif Stres Değişkenleri

Çalışmamızın bu kısmında böbrek dokuları için, Glutasyon (GSH), İnterlökin-8 (IL-8), Süperoksit dismutaz (SOD), Miyeloperoksidaz (MPO) Malondialdehit (MDA) ve Katalaz (CAT) tayini yapılmıştır.

Süperoksit dismutaz (SOD)

Çalışmada kullanılan tüm uygulama gruplarına ait dokular için SOD değerleri (Şekil 10)'da gösterilmiştir.



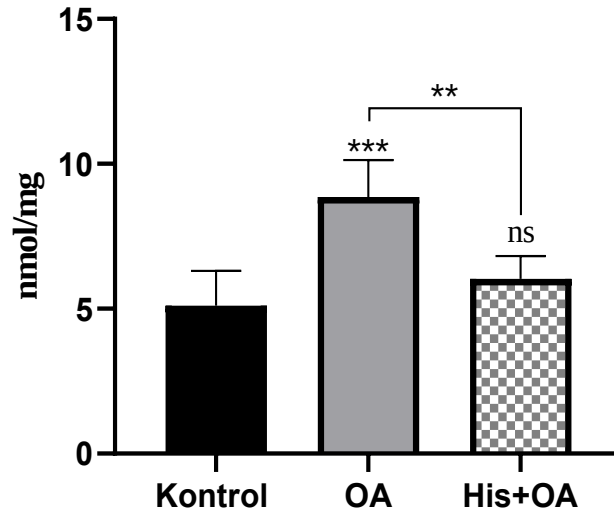
Şekil 10. Kontrol ve uygulama gruplarına ait rat böbrek dokularındaki SOD enzim spesifik aktivitesi

SOD enzim aktivitesinde kontrole kıyasla OA grubunun istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu gözlemlendi ($p < 0,001$). Kontrol grubu ile His+OA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir ($p > 0,05$). Ancak tek başına OA uygulamasına göre His+OA uygulaması enzim aktivitesini kontrol grubuna yaklaştırdığı gözlemlenmiştir ($p < 0,001$).

Miyeloperoksidaz (MPO)

Çalışmada kullanılan tüm uygulama gruplarına ait dokular için MPO değerleri (Şekil 11)'de gösterilmiştir.

Böbrek-MPO



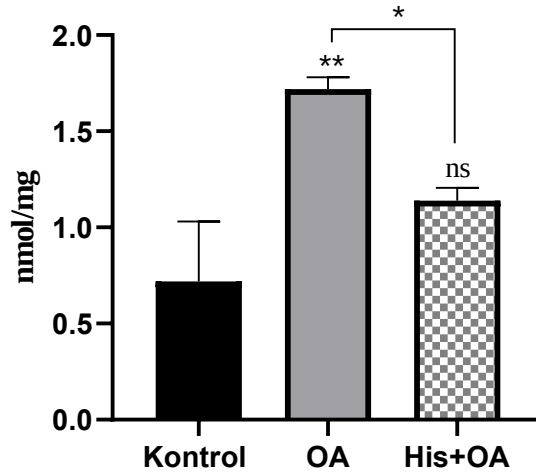
Şekil 11. Kontrol ve uygulama gruplarına ait rat böbrek dokularındaki MPO enzim spesifik aktivitesi

MPO enzim aktivitesinde kontrole kıyasla OA grubunun istatistiksel olarak anlamlı derecede artış olduğu gözlemlendi ($p < 0,001$). Kontrol grubu ile His+OA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir ($p > 0,05$). Ancak tek başına OA uygulamasına göre His+OA uygulaması enzim aktivitesini kontrol grubuna yaklaştırdığı gözlemlenmiştir ($p < 0,01$).

Malondialdehit (MDA)

Çalışmada kullanılan tüm uygulama gruplarına ait dokular için MDA değerleri (Şekil 12)'de gösterilmiştir.

Böbrek-MDA

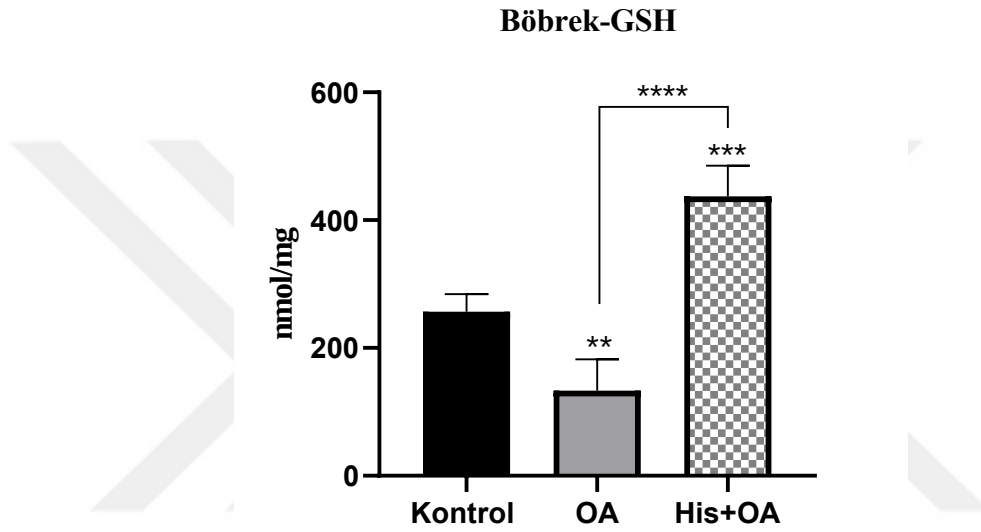


Şekil 12. Kontrol ve uygulama gruplarına ait rat böbrek dokularındaki MDA enzim spesifik aktivitesi

MDA enzim aktivitesinde kontrole kıyasla OA grubunun istatistiksel olarak anlamlı derecede artış olduğu gözlemlendi ($p<0,01$). Kontrol grubu ile His+OA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir ($p>0,05$). Ancak tek başına OA uygulamasına göre His+OA uygulaması enzim aktivitesini kontrol grubuna yaklaştırdığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$).

Glutasyon (GSH)

Çalışmada kullanılan tüm uygulama gruplarına ait dokular için GSH değerleri (Şekil 13)'de gösterilmiştir.

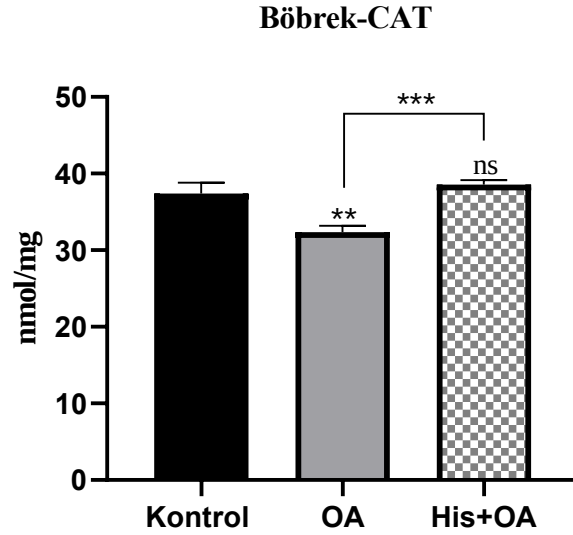


Şekil 13. Kontrol ve uygulama gruplarına ait rat böbrek dokularındaki GSH enzim spesifik aktivitesi

GSH enzim aktivitesinde kontrole kıyasla OA grubunun istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu gözlemlendi ($p<0,01$). Kontrol grubu ile His+OA grubu arasında uygulanan grupta bu etkinin anlamlı derecede tersine çevrildiği anlaşılmıştır ($p<0,001$). Ancak tek başına OA uygulamasına göre His+OA uygulaması enzim aktivitesini kontrol grubuna yaklaştırdığı hatta kontrolden daha fazla oranda GSH aktivitesi olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,001$).

Katalaz (CAT)

Çalışmada kullanılan tüm uygulama gruplarına ait dokular için CAT değerleri (Şekil 14)'de gösterilmiştir.

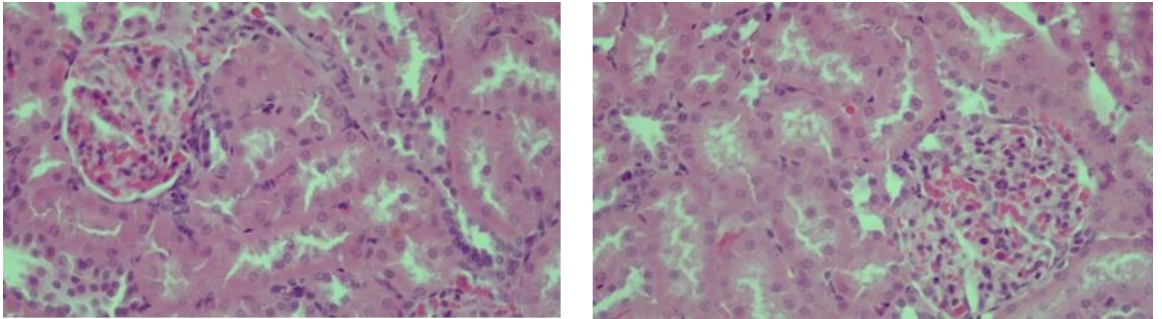


Şekil 14. Kontrol ve uygulama gruplarına ait rat böbrek dokularındaki CAT enzim spesifik aktivitesi

CAT enzim aktivitesinde kontrole kıyasla OA grubunun istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu gözlemlendi ($p < 0,01$). Kontrol grubu ile His+OA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir ($p > 0,05$). Ancak tek başına OA uygulamasına göre His+OA uygulaması enzim aktivitesini kontrol grubuna yaklaştırdığı gözlemlenmiştir ($p < 0,001$).

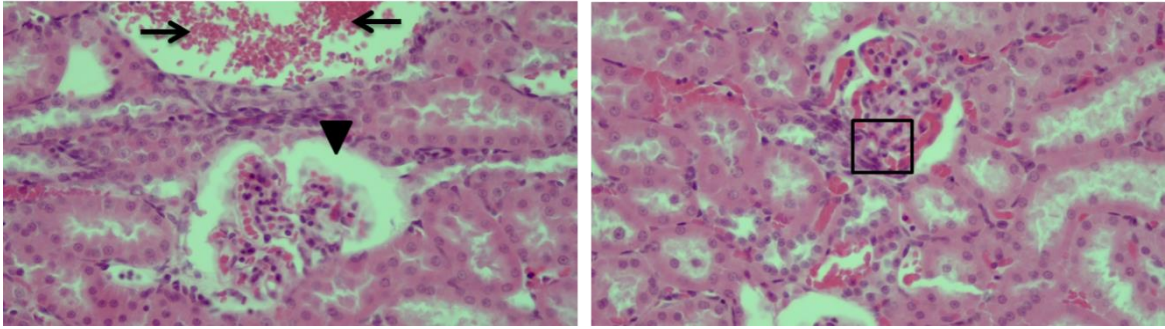
Dokusu İçin Histopatolojik Bulgular

Oluşturulan deney gruplarından için hemotoksilen-eozin (H&E) boyama tekniği ile böbrek dokusu preparatları hazırlandı ve görüntüleme işlemi tamamlandı. Buna göre kontrol grubundan alınan dokularda patolojik bulguya gözlemlenmemiştir ve (Şekil 15)'de gösterilmiştir.



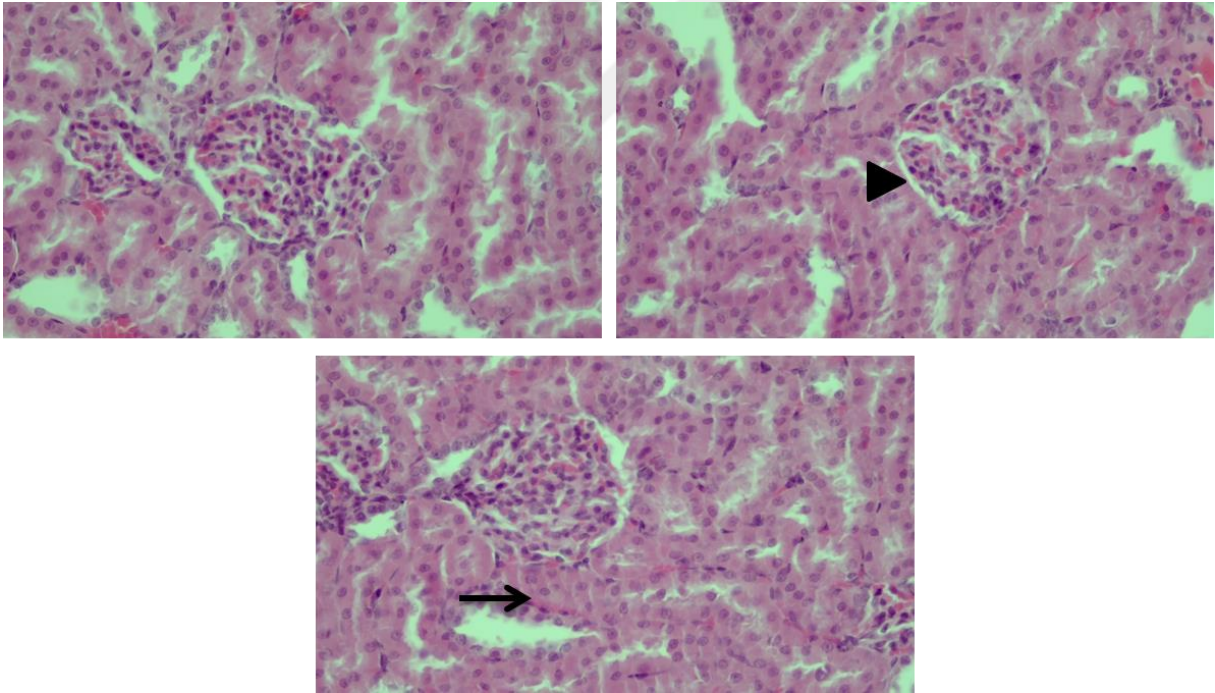
Şekil 15. Böbrek kontrol grubu histoloji görüntüleri (normal histolojik yapısı, H&E, Bar:100 µm.)

OA ile oluşturulan ABH'lı grup dokularındaki patolojik değerlendirme sonucunda hiperemi, Bowman kapsülünde dilatasyon ve Glomerulusta atrofi gibi önemli patolojik bulgular gözlemlenmiştir ve (Şekil 16)'da gösterilmiştir.



Şekil 16. Böbrek OA grubu için patolojik bulgular; **kalın ok:** Hiperemi **ok başı:** Dilatasyon (Bowman kapsülünde), **kare:** Atrofi (Glomerulusta)

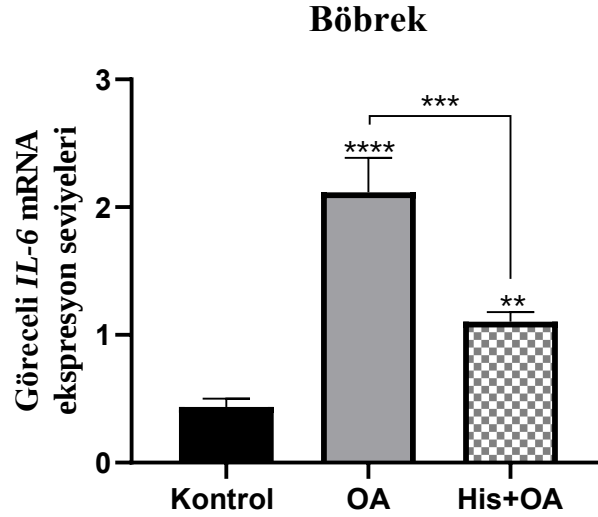
Deney hayvanlarında oluşturulan ABH'a karşı koruyucu etki için uygulanan hispidulin OA grubunda görülen patolojik bulguların hispidulin uygulanan gruplarda görülmediği, hipereminin ve dilatasyonun büyük oranda azaldığı yapılan mikroskopik görüntüleme ile (Şekil 17)'da açıkça gösterilmiştir.



Şekil 17. Böbrek His+OA grubu için patolojik bulgular; **kalın ok:** Hiperemi **ok başı:** Dilatasyon (Bowman kapsülünde)

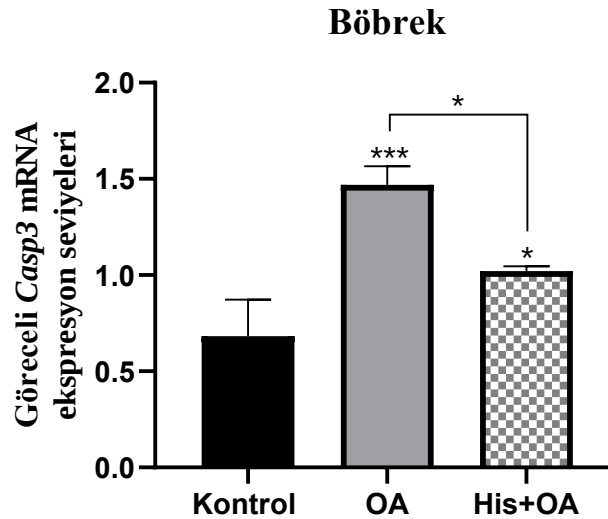
Real-Time PCR (q-RT PCR) Kullanılarak Elde Edilen Genlerin Ekspresyon Düzeyleri

Çalışmada kullanılan Hispidulin maddesinin böbrek dokusundaki etkilerini gözlemek için *Il-6*, *Casp3*, *Kim-1*, *Mmp2*, *Nf-K β* genlerinin düzeyleri Real-Time PCR yöntemi kullanılarak dokular için ayrı ayrı belirlenmiştir.



Şekil 18. *IL-6*'nın böbrek dokularında q-RT PCR yöntemi ile belirlenen gen ekspresyon ifadeleri

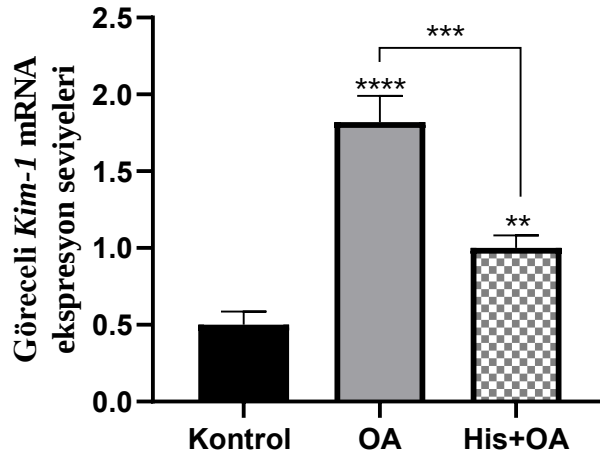
IL-6 geninin mRNA ifade seviyesi incelendiğinde, OA uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede artış olduğu gözlemlendi ($p<0,001$). Ayrıca OA uygulanan gruba göre His+OA kombinasyonu uygulanan grupta *IL-6* mRNA seviyesinde istatistiki açıdan oldukça önemli bir azalmanın meydana geldiği ve kontrol grubuna yaklaştığı gözlemlenmiştir ($p<0,001$) ve (Şekil 18)'de gösterilmiştir.



Şekil 19. *Casp3*'ün böbrek dokularında q-RT PCR yöntemi ile belirlenen gen ekspresyon ifadeleri

Casp3 geninin mRNA ifade seviyesi incelendiğinde, OA uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede artış olduğu gözlemlendi ($p<0,001$). Ayrıca OA uygulanan gruba göre His+OA kombinasyonu uygulanan grupta *Casp3* mRNA seviyesinde istatistiki açıdan önemli bir azalmanın meydana geldiği ve kontrol grubuna yaklaştığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$) ve (Şekil 19)'da gösterilmiştir.

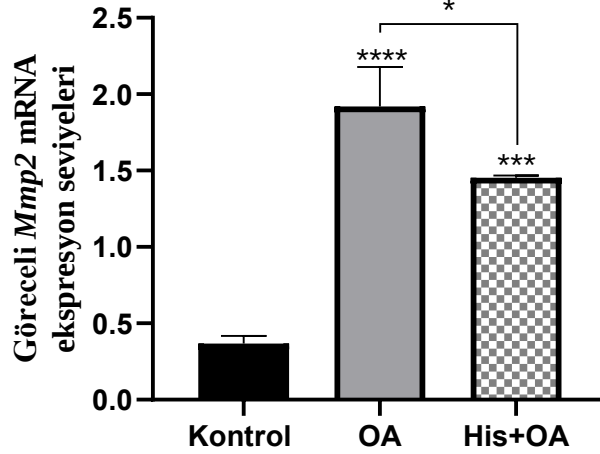
Böbrek



Şekil 20. *Kim-1*'in böbrek dokularında q-RT PCR yöntemi ile belirlenen gen ekspresyon ifadeleri

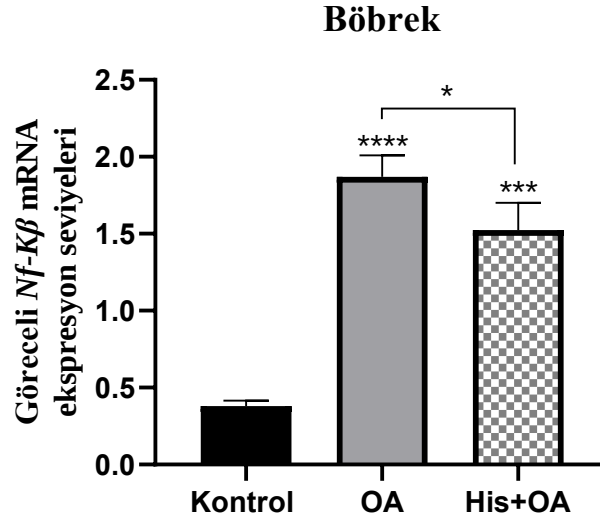
Kim-1 geninin mRNA ifade seviyesi incelendiğinde, OA uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede artış olduğu gözlemlendi ($p<0,001$). Ayrıca OA uygulanan gruba göre His+OA kombinasyonu uygulanan grupta *Kim-1* mRNA seviyesinde istatistiki açıdan oldukça önemli bir azalmanın meydana geldiği ve kontrol grubuna yaklaştığı gözlemlenmiştir ($p<0,001$) ve (Şekil 20)'de gösterilmiştir.

Böbrek



Şekil 21. *Mmp2*'nin böbrek dokularında q-RT PCR yöntemi ile belirlenen gen ekspresyon ifadeleri

Mmp2 geninin mRNA ifade seviyesi incelendiğinde, OA uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede artış olduğu gözlemlendi ($p<0,001$). Ayrıca OA uygulanan gruba göre His+OA kombinasyonu uygulanan grupta *Mmp2* mRNA seviyesinde istatistiki açıdan önemli bir azalmanın meydana geldiği ve kontrol grubuna yaklaştığı gözlemlenmiştir ($p<0,05$) ve (Şekil 21)'de gösterilmiştir.



Şekil 22. *Nf-Kβ*'nin böbrek dokularında q-RT PCR yöntemi ile belirlenen gen ekspresyon ifadeleri

Nf-Kβ geninin mRNA ifade seviyesi incelendiğinde, OA uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede artış olduğu gözlemlendi ($p < 0,001$). Ayrıca OA uygulanan gruba göre His+OA kombinasyonu uygulanan grupta *Nf-Kβ* mRNA seviyesinde istatistiki açıdan önemli bir azalmanın meydana geldiği ve kontrol grubuna yaklaştığı gözlemlenmiştir ($p < 0,05$) ve (Şekil 22)'de gösterilmiştir.

Hispidulin, hidrofobikliği nedeniyle çeşitli biyolojik işlevleri yerine getirmek için hücre zarlarına nüfuz edebilen doğal bir flavonoiddir. Yapılan çalışmaların artması ile hispidulin'in antikanser, antioksidan, antiapoptotik, antitrombotik ve antiproliferatif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Chaiprasongsuk *et al.* 2017; He *et al.* 2011; Kavvadias *et al.* 2004; Gao *et al.* 2015). Hispidulin'in, öncelikle nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2'nin (Nrf2) aktivasyonu yoluyla antioksidan özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Chaiprasongsuk *et al.* 2017). Yaptığımız çalışmada, SOD ve CAT antioksidan enzim seviyelerinde, yapılan yüksek doz OA uygulaması ile beraber kontrol grubuna göre önemli bir azalma görülmüştür. Çünkü aşırı doz ile fosfolipidlerin parçalanması sonucu oluşan oksidatif stres bu durumu indüklemiş olabilir. Fakat hispidulinin verilmesiyle birlikte iki enzim aktivitesi anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. İki enzim açısından yaptığımız değerlendirmede, OA ile indüklenen AAH'a bağlı oluşan ABH'da hispidulin önemli bir koruyucu etki göstermiştir. Wang ve ark. (2020)'ları tarafından yapılan çalışmada SOD enzimi proteini olan SOD1 ekspresyonu hispidulin ile artarak ROS hasarına karşı antioksidan enzim savunma sisteminin işlevini iyileştirmiştir (Wang *et al.* 2020). Ayrıca diğer çalışmada endotoksin ile indüklenen ABH'da inhibe olan SOD ve CAT enzim aktiviteleri hispidulin ile tam tersine çevrilerek (Kim & Leem 2022) elde edilen sonuçlar çalışmamızla paralellik göstermiştir.

MDA, AAH ve asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarı gibi çeşitli hastalıkların hayvan modellerine uyarlanarak oksidatif stresin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Wang *et al.* 2021; Almatroodi *et al.* 2020). Çalışmamızda hispidulinin iyileştirici etkisi, OA indüksiyonu ile oluşturulan AAH bağlantılı ABH’nda artış gösteren ve hispidulin uygulaması sonucu bir oksidatif stres biyobelirteci olan MDA seviyelerinin kontrol grubu değerlerine yaklaşması ile açıkça belirtilmiştir.

Yapılan önceki çalışmalarda hasarlı böbrek dokularında artmış glomerüler proliferasyon, glomerüler duvarda dejenerasyon, mezangial matriks, tübüler dilatasyon ve hücre ayrılması gibi patolojik bulgular bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2019, Kim & Leem 2022). Liu ve arkadaşlarının (2013) domuz yavruları ile yaptığı çalışmada, böbrek dokusu üzerinde oleik asit tübül zarlarında pul benzeri dökülme, inflamatuvar infiltrasyon ve tübüllerde genişleme gözlemlendiğini bildirmiştir. Çalışmamızda ise OA grubunda patolojik bulgu olarak hiperemi, Bowman kapsülünde dilatasyon ve glomerülusta atrofiye rastlandı. OA grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli farklılıkların olduğu görüldü. Farklılıkların gözlenmesi oluşturulmaya çalışılan böbrek hasarı modelinin başarılı olduğunun bir kanıtıdır. Ayrıca His+OA grubunda OA’nın neden olduğu patolojik bulgularda azalma görüldü ve bu sonuca bağlı olarak koruyucu amaçlı verilen hispidulinin etkili olduğu anlaşıldı. Yaptığımız çalışmada, GSH nonenzimatik antioksidan enzim seviyelerinde, yapılan yüksek doz OA uygulaması ile beraber kontrol grubuna göre önemli bir azalma görülmüştür. Çünkü aşırı doz ile GPx’in katalitik etkisi lipid peroksidleri ve H₂O₂’yi detoksifiye edememiş ve böylece hücre zarında bulunan fosfolipidlerin parçalanması sonucu oluşan oksidatif stres bu durumu indüklemiş olabilir. Hispidulinin verilmesiyle birlikte GSH enzim aktivitesinde kontrol ve OA (hasta grup) grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı derece de artış göstermiştir. Bu da OA ile indüklenen akut akciğer hasarına (AAH) bağlı oluşan akut böbrek hasarında (ABH) hispidulin önemli bir koruyucu etki gösterdiği ortaya çıkarmıştır. GSH, hücreleri oksidatif hücre hasardan koruyan endojen bir antioksidandır. Kim ve Lim (2022) tarafından yapılan çalışmada, hispidulinin farelerde endotoksin kaynaklı akut böbrek hasarını iyileştirdiğini, enflamasyonu azaltmış ve ROS hasarına karşı antioksidan enzim savunma sisteminin işlevini iyileştirmiştir (Kim and Lim, 2022). Ferrandiz ve ark. (2004)’ları tarafından yapılan çalışmada hispidulin’in (6-metoksi-5,7,4’-trihidroksiflavon) farelerde bromobenzen kaynaklı hepatotoksisite üzerindeki etkileri araştırılmış ve hepatotoksisite üzerinde tedavi edici etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu da hispidulin’in antioksidan özellikleriyle ilişkili olabilir (Ferrandiz *et al.* 1994). Ratlarda böbrek iskemi perfüzyon ile oluşturulan böbrek hasarında flavonoid içeriği bakımından zengin *Rosa laevigata* Michx meyvesinden elde edilen ekstrakstın

oksidatif stres (MDA, SOD ve GSH) ve enflamasyonu bastırma yoluyla renal iskemi-reperfüzyon hasarı üzerinde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Zhao *et al.* 2016).

Flavonoidlerin miyeloperoksidaz, aldoz redüktaz, protein kinaz, fosfolipaz, NADPH oksidaz ve lipooksijenaz, katalaz gibi enzimlerin aktivitesini etkilediği bilinmektedir (Işık, 2022). Bu enzimlerden biri olan miyeloperoksidaz, lökositlerde yüksek miktarlarda ROS'a yanıt olarak üretilen katalitik aktivite gösteren lizozomal bir enzimdir (Tay, 2011). Gu ve ark. (2011)'ları tarafından yapılan çalışmada, α -45 dakikalık renal iskemi ve ardından 6 saatlik reperfüzyonun sıçanlarda önemli akciğer yaralanmalarına ve artmış MPO aktivitesine neden olduğunu göstermişlerdir (Gu *et al.* 2011). OA ile indüklenen akut akciğer hasarına (AAH) bağlı oluşan akut böbrek hasarında elde ettiğimiz MPO enzim miktarının kontrol grubuna göre arttığını, OA+His grubunun ise OA grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Hispidulin'in böbrek hasarına karşı koruyucu etkili olduğunu söyleyebiliriz. Akut iskemik inmeli hastaların plazmalarıyla yapılan bir çalışmada, hastaların plazmalarında miyeloperoksidaz enzim miktarlarının normal seviyenin üzerinde bulunduğu, bununda hastalıkla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Tay, 2011). Bu sonuçlar önceki çalışmalarla uyumludur. ROS'un I/R işlemi sırasında oksidatif stresi başlatmada önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (Walker *et al.* 2001). SOD ve GSH gibi enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından detoksifiye edilirler (Ighodaro & Akinloye, 2018) MPO böbrekte iskemi-reperfüzyon koşullarında nötrofil birikiminin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Chatterjee ve ark. 2005). Aksakal ve ark. (2020)'ları tarafından ratlar ile yapılan çalışmada, renal iskemi-reperfüzyonun neden olduğu uzak organ hasarında umbelliferonun ön tedavisi, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon (GSH), seviyelerini arttırmış, MDA ve MPO seviyelerini düşürmüştür. Bu da oksidatif stresi baskılayarak ve inflamatuvar yanıtları modüle ederek renal I/R tarafından indüklenen uzak organda umbelliferon ile iyileştirilmiş hasarların ön tedavisinin yapıldığını göstermiştir (Aksakal *et al.* 2021). Yaptığımız çalışmada oleik asite bağlı dolaylı olarak oluşan akut böbrek hasarına karşı hispidulinin antagonistik etkisi araştırıldı. Aşırı doz oleik asitin, toksik etkisini düşürmek için yapılan hispidulinin çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Flavonoid kullanılarak oluşturulan deneysel modellerde maruziyetten kaynaklanan toksisite, moleküler böbrek hasarı belirteçleri, antioksidan sistem bileşenleri, anahtar rejeneratif ve transkripsiyon faktörleri ve majör inflamatuvar ve apoptotik sistemlerin üyeleri incelenerek değerlendirildi (Yesilkent & Ceylan 2022). Ayrıca parametreler incelenerek hispidulinin koruyucu mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. Enflamasyon, vücudun belirli bir bölümünün enfeksiyona ve yaralanmaya şişme, kızarıklık ve ağrı gibi durumlarla verdiği yanıttır. Bu patolojide çok önemli bir süreçtir. Doku yapısını ve işlevini eski haline getirmedeki temel rolü nedeniyle, hücrel homeostazda önemli bir yanıttır

(Hannoodde & Nasuruddin 2021). Enflamasyon, yerleşik hücrelerin, çözünür araçların ve hücre dışı matris moleküllerinin etkileşimini içerir. Başarılı bir inflammatuar yanıtı takiben, zararlı uyaranlar uzaklaştırılır ve fizyolojik fonksiyonlar normale döner. Hatalı inflammatuar yanıtlar morbiditeye yol açabilir ve yaşam süresini olumsuz etkileyebilir (Tasneem *et al.* 2019). İnflamasyonun akut böbrek hasarı patofizyolojisinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Nötrofiller, makrofajlar, doğal öldürücü hücreler ve lenfositler gibi lökositler hasarlı böbreğe sızar. Yaralanma, sitokinler ve kemokinler gibi inflammatuar mediatörlerin oluşumunu indükler, bu nedenle inflamasyonun AKI'nın ilk ve uzun vadeli aşamalarında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Akçay *et al.* 2009). Nf-K β 'nın (Şekil 22) *Il-6*, *Il-8*, *Il-1* gibi proinflammatuar sitokinlerin üretiminde, rol alır (Liu *et al.* 2017). *Il-6*, enfeksiyöz ve otoimmün hastalıklar gibi çeşitli inflammatuar hastalıklarda aracı görevi görür. Bağışıklık ve sinir sistemlerinin düzenlenmesinde geniş biyolojik etkileri olan proinflammatuar bir sitokindir (Lago *et al.* 2008). *Il-6* sonuçları incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla OA grubunda önemli oranda bir artış gözlenmiştir. Ancak koruyucu amaçlı verilen hispidulin bu artışı tersine çevirdi (Şekil 18). Böbrek hasarını takiben apoptoz hızı, kaspaz ekspresyonu ve fonksiyonu esas olarak önceden oluşturulmuş proteinler aracılığıyla gerçekleştirilir. Bununla birlikte, böbrek hasarında kaspazlar 3 ve 8 için genler aşırı eksprese edilir. Örnek çalışma, kaspaz 3 ve 8'in aşağı regülasyonunun böbrek hasarı üzerinde güçlü bir pozitif etkiye sahip olduğunu gösterdi (Zhang *et al.* 2006). Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda sonuçlarımız neticesinde OA grubunda aşırı eksprese olan kaspaz 3'ü kombine grupta uyguladığımız hispidulin maddesi tekrar kontrol grubuna yaklaştırarak (Şekil 19) bozulan hücresel dengenin tekrardan normalleşebileceği kanıtlanmıştır. Böbrek hasarında hassas ve güvenilir olan Kim-1, hasarın oluşumunu gözlemlemek amacıyla birçok araştırmacı tarafından çalışmalarda biyobelirteç olarak kullanılmıştır. ABH hastalarından alınan biyopsi örnekleri incelendiğinde Kim-1 ekspresyon düzeylerinin çalışmamızla paralel olarak arttığı (Şekil 20) gösterildi (Tian *et al.* 2017). Matris metaloproteinazlar (MMP'ler), hücre dışı matrisin yenilenmesinden ve biyoaktif proteinlerin parçalanmasından sorumlu çinko bağımlı proteazların bir ailesidir. Bu aile kollajenazları, jelatinazları, stromelisinleri ve membran tipi matriks metaloproteinazları içerir. Son zamanlarda MMP'lerin, özellikle jelatinazların (MMP-2 ve MMP-9), merkezi sinir sistemi, kalp, karaciğer, akciğer ve diğer dokular dahil olmak üzere birçok organda akut böbrek hasarının patofizyolojisinde önemli olduğu gösterilmiştir. Böbrekte, çok sayıda çalışma, MMP-2 ve MMP-9'un böbrek hasarı modeli oluşturulduktan sonra yukarı doğru düzenlendiğini ve MMP aktivasyonunun renal mikrovasküler geçirgenliği düzenlediğini göstermiştir (Kunugi *et al.* 2011; Mathalone *et al.* 2007). Yapılan çalışmalara paralel olarak

hasar oluşturduğumuz grupta *Mmp2* ekspresyon seviyesi artış gösterirken kombine grubumuzda önemli ölçüde azalmıştır (**şekil 21**).



SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonucunda oleik asidin, akut böbrek hasarı olan sıçanlarda yaralanma indükleyici olarak kullanıldığı, oksidan ve antioksidatif dengeyi bozarak doku hasarına neden olduğu ve inflamatuvar mediyatör düzeylerini artırarak renal doku disfonksiyonuna neden olduğu belirlendi.

Yukarıdaki parametreleri ortadan kaldırmak için, akut böbrek hasarında bir nefroprotektan olarak hispidulin kullanımımız, enflamasyonu, oksidatif stresi ve tübüler hücre ölümünü inhibe ederek böbrek hasarını hafifletmek için alternatif, genel ve etkili bir yaklaşım olarak kabul edilir.

Bununla birlikte, bu bileşiğin etki mekanizmasını aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Akcay, A., Nguyen, Q., & Edelstein, C. L., 2009. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators of inflammation*, 2009.
- Akella, A., Sharma, P., Pandey, R., & Deshpande, S. B., 2014. Characterization of oleic acid-induced acute respiratory distress syndrome model in rat. *Indian journal of experimental biology*, 52(7), 712–719.
- Aksu, E. H., Kandemir, F. M., & Küçükler, S., 2021. Ameliorative effect of hesperidin on streptozotocin-diabetes mellitus-induced testicular DNA damage and sperm quality degradation in Sprague–Dawley rats. *Journal of Food Biochemistry*, 45(10), e13938.
- Almatroodi, S. A., Almatroudi, A., Alsahli, M. A., Aljasir, M. A., Syed, M. A., & Rahmani, A. H., 2020. Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG), an Active Compound of Green Tea Attenuates Acute Lung Injury Regulating Macrophage Polarization and Krüppel-Like-Factor 4 (KLF4) Expression. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(12), 2853.
- Andersson, B. A., & Holman, R. T., 1974. Pyrrolidides for mass spectrometric determination of the position of the double bond in monounsaturated fatty acids. *Lipids*, 9(3), 185-190.
- Andreoli, S. P., 2009. Acute kidney injury in children. *Pediatric nephrology*, 24(2), 253-263.
- Ashbaugh, D., Bigelow, D. B., Petty, T., & Levine, B., 1967. Acute respiratory distress in adults. *The Lancet*, 290(7511), 319-323.
- Basile, D. P., Anderson, M. D., & Sutton, T. A., 2012. Pathophysiology of acute kidney injury. *Comprehensive Physiology*, 2(2), 1303–1353.
- Bellomo, R., Ronco, C., Kellum, J. A., Mehta, R. L., & Palevsky, P., 2004. Acute renal failure—definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical care*, 8(4), 1-9.
- Bernard, G. R., Artigas, A., Brigham, K. L., Carlet, J., Falke, K., Hudson, L., Lamy, M., Legall, J. R., Morris, A., & Spragg, R., 1994. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 149(3 Pt 1), 818–824.
- Bhatraju, P. K., Zelnick, L. R., Chinchilli, V. M., Moledina, D. G., Coca, S. G., Parikh, C. R., ... & Wurfel, M. M., 2020. Association between early recovery of kidney function after acute kidney injury and long-term clinical outcomes. *JAMA network open*, 3(4), e202682-e202682.
- Bosma, K. J., & Lewis, J. F., 2007. Emerging therapies for treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 12(3), 461-477.
- Brown, D. I., & Griendling, K. K., 2015. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circulation research*, 116(3), 531-549.
- Chaiprasongsuk, A., Lohakul, J., Soontrapa, K., Sampattavanich, S., Akarasereenont, P., & Panich, U., 2017. Activation of Nrf2 Reduces UVA-Mediated MMP-1 Upregulation

via MAPK/AP-1 Signaling Cascades: The Photoprotective Effects of Sulforaphane and Hispidulin. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 360(3), 388–398.

- Chatterjee, P. K., Todorovic, Z., Sivarajah, A., Mota-Filipe, H., Brown, P. A., Stewart, K. N., ... & Thiernemann, C., 2005. Inhibitors of calpain activation (PD150606 and E-64) and renal ischemia-reperfusion injury. *Biochemical pharmacology*, 69(7), 1121-1131.
- Chen, Z., Tian, R., She, Z., Cai, J., & Li, H., 2020. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 152, 116-141.
- Chu, R., Li, C., Wang, S., Zou, W., Liu, G., & Yang, L., 2014. Assessment of KDIGO definitions in patients with histopathologic evidence of acute renal disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 9(7), 1175-1182.
- Das, U. N., 2006. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 1(4), 420-439.
- De Mendonça, A., Vincent, J. L., Suter, P. M., Moreno, R., Dearden, N. M., Antonelli, M., ... & Cantraine, F., 2000. Acute renal failure in the ICU: risk factors and outcome evaluated by the SOFA score. *Intensive care medicine*, 26(7), 915-921.
- Downes, K. J., Cowden, C., Laskin, B. L., Huang, Y. S., Gong, W., Bryan, M., ... & Zaoutis, T. E., 2017. Association of acute kidney injury with concomitant vancomycin and piperacillin/tazobactam treatment among hospitalized children. *JAMA pediatrics*, 171(12), e173219-e173219.
- Durna Aydın, O., Yıldız, G., Merhan, O., Ulufer Bulut, S., Kanıcı Tarhane, A., Ambarcıoğlu, P., ... & Akyüz, E., 2021. Use of *Lactobacillus farciminis* to improve antioxidant status of Tuj lambs. *South African Journal of Animal Science*, 51(4), 505-512.
- El-Tanany, M. M., & Abdallah, H. R., 2019. Valencia orange productivity, fruit quality and storability as affected by foliar application with potassium sulphate, oleic acid, salicylic acid and phenylalanine. *Middle East J Appl Sci*, 9(4), 943-962.
- Erge, Ü., 2019. *Deneyisel miyoglobiniürik akut böbrek hasarında kannabinoid reseptör agonist ve antagonistlerinin etkileri* (Master's thesis, Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
- Fan, X., Fan, Z., Yang, Z., Huang, T., Tong, Y., Yang, D., ... & Yang, M., 2022. Flavonoids—Natural gifts to promote health and longevity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2176.
- Ferguson, N. D., Frutos-Vivar, F., Esteban, A., Fernández-Segoviano, P., Aramburu, J. A., Nájera, L., & Stewart, T. E., 2005. Acute respiratory distress syndrome: underrecognition by clinicians and diagnostic accuracy of three clinical definitions. *Critical care medicine*, 33(10), 2228-2234.
- Ferrandiz, M. L., Bustos, G., Paya, M., Gunasegaran, R., & Alcaraz, M. J., 1994. Hispidulin protection against hepatotoxicity induced by bromobenzene in mice. *Life sciences*, 55(8), PL145-PL150.
- Force, A. D. T., Ranieri, V. M., Rubenfeld, G. D., Thompson, B., Ferguson, N., Caldwell, E., ... & Slutsky, A. S., 2012. Acute respiratory distress syndrome. *Jama*, 307(23), 2526-2533.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., ... & Kroemer, G., 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*, 19(1), 107-120.

- Gammoh, N. Z., & Rink, L., 2017. Zinc in infection and inflammation. *Nutrients*, 9(6), 624.
- Gao, H., Xie, J., Peng, J., Han, Y., Jiang, Q., Han, M., & Wang, C., 2015. Hispidulin inhibits proliferation and enhances chemosensitivity of gallbladder cancer cells by targeting HIF-1 α . *Experimental cell research*, 332(2), 236–246.
- Gaweł, S., Wardas, M., Niedworok, E., & Wardas, P., 2004. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiadomosci lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 57(9-10), 453-455.
- Gonçalves-de-Albuquerque, C. F., Silva, A. R., Burth, P., Castro-Faria, M. V., & Castro-Faria-Neto, H. C., 2015. Acute respiratory distress syndrome: role of oleic acid-triggered lung injury and inflammation. *Mediators of Inflammation*, 2015.
- Gu, J., Chen, J., Xia, P., Tao, G., Zhao, H., & Ma, D., 2011. Dexmedetomidine attenuates remote lung injury induced by renal ischemia-reperfusion in mice. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 55(10), 1272-1278.
- Hagawane, T. N., Gaikwad, R. V., & Kshirsagar, N. A., 2016. Dual hit lipopolysaccharide & oleic acid combination induced rat model of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *The Indian Journal of Medical Research*, 143(5), 624.
- Hagemann, C., Anacker, J., Ernestus, R. I., & Vince, G. H., 2012. A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. *World journal of clinical oncology*, 3(5).
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M., 2015. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press, USA.
- Hannood, S., & Nasuruddin, D. N., 2021. Acute inflammatory response. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Hara, T., Hirasawa, A., Ichimura, A., Kimura, I., & Tsujimoto, G., 2011. Free fatty acid receptors FFAR1 and GPR120 as novel therapeutic targets for metabolic disorders. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(9), 3594-3601.
- Havsteen, B., 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical pharmacology*, 32(7), 1141-1148.
- He, L., Wu, Y., Lin, L., Wang, J., Wu, Y., Chen, Y., Yi, Z., Liu, M., & Pang, X., 2011. Hispidulin, a small flavonoid molecule, suppresses the angiogenesis and growth of human pancreatic cancer by targeting vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Cancer science*, 102(1), 219–225.
- He, Y. Q., Zhou, C. C., Yu, L. Y., Wang, L., Deng, J. L., Tao, Y. L., ... & Chen, W. S., 2021. Natural product derived phytochemicals in managing acute lung injury by multiple mechanisms. *Pharmacological Research*, 163, 105224.
- Ichimura, T., Asseldonk, E. J., Humphreys, B. D., Gunaratnam, L., Duffield, J. S., & Bonventre, J. V., 2008. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *The Journal of clinical investigation*, 118(5), 1657-1668.
- Icoglu Aksakal, F., Koc, K., Geyikoglu, F., & Karakaya, S., 2021. Ameliorative effect of umbelliferone in remote organ injury induced by renal ischemia-reperfusion in rats. *Journal of Food Biochemistry*, 45(2), e13628.
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria journal of medicine*, 54(4), 287-293.

- Ishizaka, A., Matsuda, T., Albertine, K. H., Koh, H., Tasaka, S., Hasegawa, N., ... & Hashimoto, S., 2004. Elevation of KL-6, a lung epithelial cell marker, in plasma and epithelial lining fluid in acute respiratory distress syndrome. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 286(6), L1088-L1094.
- Kane-Gill, S. L., Meersch, M., & Bell, M., 2020. Biomarker-guided management of acute kidney injury. *Current opinion in critical care*, 26(6), 556-562.
- Kavvadias, D., Sand, P., Youdim, K. A., Qaiser, M. Z., Rice-Evans, C., Baur, R., Sigel, E., Rausch, W. D., Riederer, P., & Schreier, P., 2004. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. *British journal of pharmacology*, 142(5), 811–820.
- Kavvadias, D., Sand, P., Youdim, K. A., Qaiser, M. Z., Rice-Evans, C., Baur, R., ... Schreier, P., 2004. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. *British Journal of Pharmacology*, 142(5), 811–820
- KDIGO AKI Work Group., 2012. KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. *Kidney Int. Suppl.* 2, 1–138.
- Khan, H., Belwal, T., Efferth, T., Farooqi, A. A., Sanches-Silva, A., Vacca, R. A., ... & Nabavi, S. M., 2021. Targeting epigenetics in cancer: therapeutic potential of flavonoids. *Critical reviews in food science and nutrition*, 61(10), 1616-1639.
- Khwaja, A., 2012. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clinical Practice*, 120(4), c179-c184.
- Kim, K., & Leem, J., 2022. Hispidulin Ameliorates Endotoxin-Induced Acute Kidney Injury in Mice. *Molecules*, 27(6), 2019.
- Kim, K., & Leem, J., 2022. Hispidulin Ameliorates Endotoxin-Induced Acute Kidney Injury in Mice. *Molecules*, 27(6), 2019.
- Kucukler, S., Benzer, F., Yildirim, S., Gur, C., Kandemir, F. M., Bengu, A. S., ... & Dortbudak, M. B., 2021. Protective effects of chrysin against oxidative stress and inflammation induced by lead acetate in rat kidneys: a biochemical and histopathological approach. *Biological Trace Element Research*, 199(4), 1501-1514.
- Kunugi, S., Shimizu, A., Kuwahara, N., Du, X., Takahashi, M., Terasaki, Y., Fujita, E., Mii, A., Nagasaka, S., Akimoto, T., Masuda, Y., & Fukuda, Y., 2011. Inhibition of matrix metalloproteinases reduces ischemia-reperfusion acute kidney injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 91(2), 170–180.
- Lago, R., Gomez, R., Lago, F., Gómez-Reino, J., & Gualillo, O., 2008. Leptin beyond body weight regulation—current concepts concerning its role in immune function and inflammation. *Cellular immunology*, 252(1-2), 139-145.
- Lin, T. Y., Lu, C. W., Wang, S. J., & Huang, S. K., 2015. Protective effect of hispidulin on kainic acid-induced seizures and neurotoxicity in rats. *European journal of pharmacology*, 755, 6-15.
- Lin, Y. C., Hung, C. M., Tsai, J. C., Lee, J. C., Chen, Y. L. S., Wei, C. W., ... Way, T. D., 2010. Hispidulin potently inhibits human glioblastoma multiforme cells through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9511–9517

- Liu, A. J., Ling, F., Li, Z. Q., Li, X. F., Liu, Y. L., DU, J., & Han, L., 2013. Effect of oleic acid-induced acute lung injury and conventional mechanical ventilation on renal function in piglets. *Chinese medical journal*, 126(13), 2530–2535.
- Liu, K., Zhao, F., Yan, J., Xia, Z., Jiang, D., & Ma, P., 2020. Hispidulin: A promising flavonoid with diverse anti-cancer properties. *Life Sciences*, 259, 118395.
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., & Sun, S. C., 2017. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2(1), 1-9.
- Luh, S. P., & Chiang, C. H., 2007. Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. *Journal of Zhejiang University Science B*, 8(1), 60-69.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L., 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727–747.
- Manzoor, H., & Bhatt, H., 2020. Prerenal Kidney Failure.
- Martinon, F., 2010. Signaling by ROS drives inflammasome activation. *European journal of immunology*, 40(3), 616-619.
- Massimo, C., Lucio, T., Jesus, M. A., Giovanni, L., & Caramia, G. M., 2009. Extra virgin olive oil and oleic acid. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 29(3), 12-24.
- Mathalone, N., Lahat, N., Rahat, M. A., Bahar-Shany, K., Oron, Y., & Geyer, O., 2007. The involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9 in rat retinal ischemia. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 245(5), 725-732.
- Mehta, R. L., Kellum, J. A., Shah, S. V., Molitoris, B. A., Ronco, C., Warnock, D. G., & Levin, A., 2007. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical care*, 11(2), 1-8.
- Mendez JA, Vellon L, Colomer R, Lupu R., 2005. Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erbB-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin™) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. *European Society for Medical Oncology*
- Mignolet-Spruyt, L., Xu, E., Idänheimo, N., Hoeberichts, F. A., Mühlenbock, P., Brosché, M., ... & Kangasjärvi, J., 2016. Spreading the news: subcellular and organellar reactive oxygen species production and signalling. *Journal of experimental botany*, 67(13), 3831-3844.
- Nepal, M., Choi, HJ, Choi, BY, Yang, MS, Chae, JI, Li, L., & Soh, Y., 2013. Hispidulin, RANKL kaynaklı NF- κ B ve NFATc1 yolları yoluyla kemik rezorpsiyonunu ve osteoklastogenezisi azaltır. *Avrupa farmakoloji dergisi*, 715 (1-3), 96-104.
- Nicholson, D. W., 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death & Differentiation*, 6(11), 1028-1042.
- Niu, X., Chen, J., Wang, P., Zhou, H., Li, S., & Zhang, M., 2014. The effects of hispidulin on bupivacaine-induced neurotoxicity: Role of AMPK signaling pathway. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 70(1), 241–249.
- Nogueira, A. C., Kawabata, V., Biselli, P., Lins, M. H., Valeri, C., Seckler, M., ... & Soriano, F. G., 2008. Changes in plasma free fatty acid levels in septic patients are associated with cardiac damage and reduction in heart rate variability. *Shock*, 29(3), 342-348.
- Parrish, A. B., Freel, C. D., & Kornbluth, S., 2013. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6), a008672.

- Patel, D. K., Patel, K., Duraiswamy, B., & Dhanabal, S. P., 2012. Phytochemical analysis and standardization of *Strychnos nux-vomica* extract through HPTLC techniques. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, S56-S60.
- Paździoch-Czochra, M., & Wideńska, A., 2002. Spectrofluorimetric determination of hydrogen peroxide scavenging activity. *Analytica Chimica Acta*, 452(2), 177-184.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, 4(2), 89.
- Poudyal, H., Kumar, S. A., Iyer, A., Waanders, J., Ward, L. C., & Brown, L., 2013. Responses to oleic, linoleic and α -linolenic acids in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(7), 1381–1392.
- Radomska-Leśniewska, D. M., Bałan, B. J., & Skopiński, P., 2017. Angiogenesis modulation by exogenous antioxidants. *Central European Journal of Immunology*, 42(4), 370-376.
- Redza-Dutordoir, M., & Averill-Bates, D. A., 2016. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1863(12), 2977-2992.
- Rocha, N. A., & McCullough, P. A., 2018. Cardiovascular outcomes in diabetic kidney disease: insights from recent clinical trials. *Kidney International Supplements*, 8(1), 8-17.
- Rockenfeller, P., Ring, J., Muschett, V., Beranek, A., Buettner, S., Carmona-Gutierrez, D., ... & Madeo, F., 2010. Fatty acids trigger mitochondrion-dependent necrosis. *Cell cycle*, 9(14), 2908-2914.
- Ross, J. A., & Kasum, C. M., 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of Nutrition*, 22, 19.
- Rufino, A. T., Costa, V. M., Carvalho, F., & Fernandes, E., 2021. Flavonoids as antiobesity agents: A review. *Medicinal Research Reviews*, 41(1), 556-585.
- Rustan, A. C., & Drevon, C. A., 2001. Fatty acids: structures and properties. *e LS*.
- Sanz, M. J., Ferrandiz, M. L., Cejudo, M., Terencio, M. C., Gil, B., Bustos, G.,...Alcaraz, M. J., 1994. Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress. *Xenobiotica*, 24(7), 689–699.
- Sen, R., & Baltimore, D., 1986. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 47(6), 921-928.
- Sen, S., & Chakraborty, R., 2011. The role of antioxidants in human health. In *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy* (pp. 1-37). American Chemical Society.
- Shaw, T. D., McAuley, D. F., & O’Kane, C. M., 2019. Emerging drugs for treating the acute respiratory distress syndrome. *Expert opinion on emerging drugs*, 24(1), 29-41.
- Shinde, A., Ganu, J., & Naik, P., 2012. Effect of free radicals & antioxidants on oxidative stress: a review. *Journal of Dental and Allied Sciences*, 1(2), 63.
- Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9-10), 916-921.
- Sincevičiūtė, R., Vaitkienė, P., Urbanavičiūtė, R., Steponaitis, G., Tamašauskas, A., & Skiriutė, D., 2018. MMP2 is associated with glioma malignancy and patient outcome. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 11(6), 3010.

- Sweeney, R. M., Griffiths, M., & McAuley, D., 2013. Treatment of acute lung injury: current and emerging pharmacological therapies. *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 34(4), 487–498.
- Talebi, A., Emami, F., Biranvand, R., Moosavi, Z., Ramtin, K., Sadeghi, S., Baghaei, K., Lak, Z., & Nematbakhsh, M., 2021. Protective Role of Angiotensin II Type 1 Receptor Blocker on Short Time Effect of Oleic Acid Induced Lung and Kidney Injury. *International journal of preventive medicine*, 12, 4.
- Taniguchi, K., & Karin, M., 2014. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. In *Seminars in immunology* (Vol. 26, No. 1, pp. 54-74). Academic Press.
- Tasneem, S., Liu, B., Li, B., Choudhary, M. I., & Wang, W., 2019. Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. *Pharmacological research*, 139, 126-140.
- Tay, A., 2011. Akut İskemik İnmede Plazma Miyeloperoksidaz Seviyeleri ve Prognoz Üzerine Etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı, Diyarbakır.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology*, 9(3), 231-241.
- Tian, L., Shao, X., Xie, Y., Wang, Q., Che, X., Zhang, M., ... & Mou, S., 2017. Kidney injury molecule-1 is elevated in nephropathy and mediates macrophage activation via the Mapk signalling pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 41(2), 769-783.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Van der Veen, B. S., de Winther, M. P., & Heeringa, P., 2009. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxidants & redox signaling*, 11(11), 2899-2937.
- Vohra, S., Eddy, A., Levin, A. V., Taylor, G., & Laxer, R. M., 1999. Tubulointerstitial nephritis and uveitis in children and adolescents. *Pediatric Nephrology*, 13(5), 426-432.
- Waanders, F., van Timmeren, M. M., Stegeman, C. A., Bakker, S. J., & van Goor, H., 2010. Kidney injury molecule-1 in renal disease. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 220(1), 7-16.
- Walker, L. M., York, J. L., Imam, S. Z., Ali, S. F., Muldrew, K. L., & Mayeux, P. R., 2001. Oxidative stress and reactive nitrogen species generation during renal ischemia. *Toxicological Sciences*, 63(1), 143-148.
- Wang, C., Liu, T., Tong, Y., Cui, R., Qu, K., Liu, C., & Zhang, J., 2021. Ulinastatin protects against acetaminophen-induced liver injury by alleviating ferroptosis via the SIRT1/NRF2/HO-1 pathway. *American journal of translational research*, 13(6), 6031–6042.
- Wang, Y., Liu, W., He, X., & Fei, Z., 2015. Hispidulin enhances the anti-tumor effects of temozolomide in glioblastoma by activating AMPK. *Cell biochemistry and biophysics*, 71(2), 701-706.
- Wang, Y., Xie, Z., Jiang, N., Wu, Z., Xue, R., Dong, B., ... & Liu, C., 2020. Hispidulin attenuates cardiac hypertrophy by improving mitochondrial dysfunction. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7, 582890.

- Wu, X., & Xu, J., 2016. New role of hispidulin in lipid metabolism: PPAR α activator. *Lipids*, 51(11), 1249-1257.
- Xie, J., Gao, H., Peng, J., Han, Y., Chen, X., Jiang, Q., & Wang, C., 2015. Hispidulin prevents hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in human colon carcinoma cells. *American journal of cancer research*, 5(3), 1047–1061. (Retraction published Am J Cancer Res. 2020 Jun 01;10(6):1922)
- Yesilkent, E. N., & Ceylan, H., 2022. Investigation of the multi-targeted protection potential of tannic acid against doxorubicin-induced kidney damage in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 365, 110111.
- Young, I. S., & Woodside, J. V., 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176-186.
- Zazzeron, L., Fischbach, A., Franco, W., Farinelli, W. A., Ichinose, F., Bloch, D. B., ... & Zapol, W. M., 2019. Phototherapy and extracorporeal membrane oxygenation facilitate removal of carbon monoxide in rats. *Science Translational Medicine*, 11(513), eaau4217.
- Zhang, M., Chen, Y., Yang, M. J., Fan, X. R., Xie, H., Zhang, L., Nie, Y. S., & Yan, M., 2019. Celastrol attenuates renal injury in diabetic rats via MAPK/NF- κ B pathway. *Phytotherapy research : PTR*, 33(4), 1191–1198.
- Zhang, X., Zheng, X., Sun, H., Feng, B., Chen, G., Vladau, C., ... & Min, W. P., 2006. Prevention of renal ischemic injury by silencing the expression of renal caspase 3 and caspase 8. *Transplantation*, 82(12), 1728-1732.
- Zhao, L., Xu, L., Tao, X., Han, X., Yin, L., Qi, Y., & Peng, J., 2016. Protective effect of the total flavonoids from *Rosa laevigata* Michx fruit on renal ischemia-reperfusion injury through suppression of oxidative stress and inflammation. *Molecules*, 21(7), 952.
- Zheng, W., & Wang, S. Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(11), 5165-5170.
- Zhou, Y. Q., Liu, Z., Liu, Z. H., Chen, S. P., Li, M., Shahveranov, A., ... & Tian, Y. K., 2016. Interleukin-6: an emerging regulator of pathological pain. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 1-9.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Bahri AVCI
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Lise:	Cumhuriyet Anadolu Lisesi
Lisans:	Erzurum Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce:	Orta