

Tıbbi Bitkilerde Bulunan Kaempferol'ün LPS ile İndüklenmiş THP-1 Makrofajları Üzerine Etkisi*

Effect of Kaempferol in Medicinal Plants on LPS-induced THP-1 Macrophages

Metin Yıldırımⁱ

ⁱDr. Öğr. Üyesi, Tarsus Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Eczane Hizmetleri Bölümü
<https://orcid.org/0000-0003-1346-312X>

ÖZ

Giriş: İnflamasyon, immün sisteminin toksik bileşikler, hasarlı hücreler ve patojenlerinde içinde yer aldığı çeşitli faktörler ile tetiklendiğinde verdiği biyolojik bir cevaptır. Tıbbi bitkilerden izole edilen etkin maddeler, inflamatuvar hastalıkların tedavisinde yeni bir terapötik strateji olarak kullanılırken dikkatle seçilmelidir. Kaempferol tıbbi bitkilerde sebzelerde meyvelerde bolca bulunan bir polifenoldür. Kaempferol anti-kanser, anti-viral, anti-bakteriyel özelliklere sahiptir.

Amaç: Bu çalışmada amaç LPS ile indüklenmiş THP-1 makrofaj hücrelerinde kaempferolün hücre canlılığı ve inflamasyonun tedavisi için yapılan çalışmalarda hedef molekül olan NO ve PGE₂ düzeyleri üzerine etkisini incelemektir.

Bulgular: 2022 yılında yapmış olduğumuz çalışmada LPS ile indüklenmiş THP-1 makrofaj hücrelerine 2,5, 5, 7,5, 10 µM konsantrasyonunda kaempferol uygulandı. Hücre canlılığı, PGE₂ düzeyi ve NO üretimi incelendi. Farklı dozlarda kaempferol uygulaması THP-1 makrofaj hücrelerinde hücre canlılığını azaltmadığı belirlendi. Ayrıca LPS ile indüklenen THP-1 makrofaj hücrelerinde 2,5 µM kaempferol uygulaması % NO düzeyini ve 7,5 µM kaempferol uygulaması PGE₂ düzeyini istatistiksel olarak anlamlı azaltmıştır.

Tartışma ve sonuç: 7,5 µM kaempferol uygulaması makrofaj hücrelerinin proliferasyonu negatif etki göstermeyip hem NO düzeyini hemde PGE₂ düzeni azaltıp iyi anti inflamatuvar etki göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Kaempferol, THP-1, Makrofaj, NO, PGE₂, LPS

ABSTRACT

Introduction: Inflammation is a biological response of the immune system when triggered by various factors including toxic compounds, damaged cells and pathogens. Active substances isolated from medicinal plants should be chosen carefully when using them as a new therapeutic strategy in the treatment of inflammatory diseases. Kaempferol is a polyphenol abundantly found in medicinal plants, vegetables, fruits. Kaempferol has anti-cancer, anti-viral, anti-bacterial properties.

Aim: The aim of this study is to examine the effect of kaempferol on NO and PGE₂ levels, which are target molecules in studies for the treatment of inflammation, and cell viability in LPS-induced THP-1 macrophage cells.

Result: In 2022, Kaempferol was applied to LPS-induced THP-1 macrophage cells at a concentration of 2.5, 5, 7.5, 10 µM. Kaempferol administration to THP-1 macrophage cells did not affect cell viability and also decreased PGE₂ and NO % levels. It was determined that administration of kaempferol at different doses did not decrease cell viability in THP-1 macrophage cells. In addition, in THP-1 macrophage cells induced by LPS, 2.5 µM kaempferol application decreased NO % level and 7.5 µM kaempferol application decreased PGE₂ level statistically.

Discussion and Conclusion: The application of 7.5 µM kaempferol does not have a negative effect on the proliferation of macrophage cells, but decreases both NO level and PGE₂ order and shows good anti-inflammatory effect.

Keywords: Kaempferol, THP-1, Macrophage, NO, PGE₂, LPS

*Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi 2023; 13 (1):118-124

DOI: 10.31020/mutfd.1200352

e-ISSN: 1309-8004

Geliş Tarihi – Received: 07 Kasım 2022; Kabul Tarihi - Accepted: 19 Aralık 2022

İletişim - Correspondence Author: Metin Yıldırım <metinyildirim4@gmail.com>

Giriş

Bitki kökenli etkin maddeler inflamasyonun önlenmesi ve insan sağlığının iyileştirilmesinde yeni seçenek olarak popülerleşmektedir. Son yıllarda biyoaktif maddeler ve onların sağlık üzerine etkileri yaygın olarak çalışılmaktadır.

Flavonoidler difenilpropan yapısı ile karakterize edilen ikincil bitki metabolitidir. Bazı içeceklerde, sebze ve meyvelerde bolca bulunur. Kimyasal yapılarına göre flavonoidler antisiyanodinler, flavonoller, flavanonlar, flavanoller, flavonlar ve izosiyanidin olmak üzere 6 gruba ayrılır. Flavonoller, batı toplumlarının diyetinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yapılar, gıdaya renk ve lezzet vermekten, yağın oksidasyonunu önlemekten, vitaminleri ve enzimleri korumaktan sorumludur.¹

Kaempferol, bitkisel kaynaklı besinlerde bol bulunan düşük moleküler ağırlığa sahip sarı renkli doğal bir flavonoldür. Yapısında kaempferol içeren laden otu Anadolu halk hekimliğinde infüzyon halinde hazırlanıp kabızlık giderici, balgam söktürücü, mide ve romatizmal hastalıkların tedavisinde, ayrıca mikroorganizma enfeksiyonlarına karşı koruyucu ve tedavi edici olarak yüzyıllardır geleneksel olarak kullanılmaktadır.

Kaempferol geleneksel tıpta soğuk algınlığı, sakinleştirici, sindirim sistemi rahatsızlıkları, öksürük ve bronşit gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan anason, adaçayı, defne, melisa, nane ve reyhan gibi bitki türlerinden izole edilmiştir. Anti-kanser, anti-viral, anti-bakteriyel ve anti-inflamatuvar gibi çeşitli özelliklere sahiptir.²⁻⁷

İnflamasyon, yaralanma, kimyasal irritasyon, patojen enfeksiyonu sonucunda meydana gelen doku hasarına karşı fizyolojik bir tepkidir. Hasarlı dokuyu iyileştirmek adına doku hasarından sonra kimyasal sinyaller indüklenir. Lökositlerin aktivasyonu, migrasyonu ve inflamatuvar cevapta kritik rol alan nitrojen, reaktif oksijen, sitokin ve büyüme faktörleri salınır.⁸

İnsan monositik lösemi hücreleri (THP-1), monositlerin ve monosit kökenli makrofajların immün cevap kapasitesi ile ilgili çalışmalarda model olarak yaygın kullanılmaktadır. Bu hücreler PMA ile tedavi sonucunda makrofaj benzeri hücrelere dönüştürüldü. Dönüştürülmüş THP-1 hücreleri inflamatuvar sinyallere cevap olarak inflamatuvar mediyatörlerin salınımını yapar. Bu sayede, bu hücreler yeni tedavi edici ajanların inflamatuvar hastalıklar üzerine etkilerinin incelenmesinde ve tedaviye etki ettikleri mekanizmaların keşfedilmesinde kullanılmaktadır.^{9,10}

Lipopolisakkarit (LPS) gram negatif bakterilerin hücre duvarında eksprese edilir.¹¹ LPS indüklenmesi makrofajlarda değişime sebebiyet verir ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 ekspresyonunu arttırır (COX-2).¹² İNOS ve COX-2'nin üretimi inflamasyon mekanizmasında transkripsiyon faktörü olan NF-κB ile kontrol edilir.¹³

Nitrik oksit (NO), kısa yarı ömürlü inflamasyonun patogeneğinde anahtar role sahip sinyal molekülüdür.¹⁴ Normal fizyolojik şartlarda düşük seviyede NO endotelial NO sentaz (eNOS) tarafından üretilir ve anti-inflamatuvar etkiye sahiptir. Ancak anormal şartlarda Fosforile eNOS ve iNOS aşırı üretilen NO inflamasyonu tetikleyen pro-inflamatuvar mediyatör olarak davranır.¹⁵

Prostaglandinler, inflamasyon, platelet agregasyonu, nörotransmitter salımı gibi patolojik ve fizyolojik aktiviteler üzerine biyolojik etkilere sahiptir. PGE₂ ağrı, ateş, ödem ve vazodilatasyona neden olan ve üzerinde en çok çalışma yapılan inflamatuvar prostaglandinlerden biridir.¹⁶ Bu nedenle son yıllarda inflamasyonun tedavisi üzerine yapılan çalışmalarda NO ve PGE₂ moleküler hedef olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada LPS ile indüklenmiş THP-1 makrofaj hücrelerinde kaempferolün hücre canlılığı ve NO ve PGE₂ düzeyleri üzerine etkisi incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Hücre kültürü

Akut lösemi monosit hücreleri (THP-1 hücreleri) %10 FCS ile zenginleştirilmiş RPMI hücre mediumunda kültür edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları %5 CO₂ atmosferinde 37°C nemlendirilmiş inkübatörde kültür edilmiştir.

Hücre canlılığı testi

Ticari olarak satın alınan kaempferolün THP-1 makrofajları hücrelerinde hücre canlılığı MTT testi kullanılarak belirlenmiştir. THP-1 hücreleri 80.000 hücre/kuyucuk ayarlandıktan sonra 30 ng/mL PMA eklenmiştir. THP-1 hücreleri pleytlere ekildikten sonra 48 saat boyunca dönüşüm için inkübe edilmiştir. Daha sonra besi yeri PMA içermeyen taze besi yeri ile değiştirilmiştir. Hücreler 2,5-10 µM kaempferol ile 24 saat inkübasyon edilmiştir. İnkübasyondan sonra besi yeri aspire edilmiş, hücreler PBS ile yıkanmıştır ve 4 saat boyunca MTT çözeltisi ile inkübe edilmiştir. Çözelti aspire edilmiştir ve 20 dakika DMSO ile inkübe edilmiştir. Absorbans 550 nm'de TECAN reader'da ölçülmüştür. Bu deney en az 3 kere yapılmıştır.

Sitokin düzeylerinin belirlenmesi

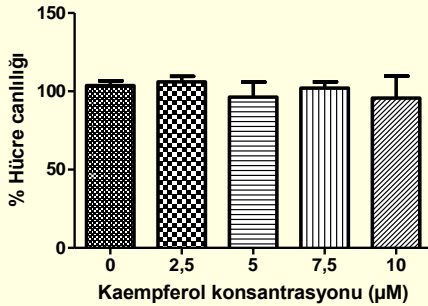
NO ve PGE₂ düzeyleri ticari ELISA kit yardımıyla firmanın protokolüne göre ölçülmüştür. Kısaca, PMA ile dönüştürülen THP-1 makrofajları 24 kuyucuklu playte 5x10⁵ (hücre sayısı/kuyucuk) ekilmiştir. Tutunmayan hücreler 3 kere PBS ile yıkandıktan sonra LPS ile indüklenmiştir. Hücreler 24 saat boyunca 2,5-10 µM konsantrasyonda kaempferol ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben süpernatantlar toplanmıştır. 40 µl süpernatant, 10 µl antibody and 50 µl streptavidin-HRP örnek kuyularına eklenmiş ve 37 °C'de 60 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon karışımı boşaltılıp her kuyu yıkama solüsyonu ile 5 kere yıkanmıştır. Daha sonra 50 µl substrat solüsyonu A ve 50 µl substrat solüsyonu B eklenip 37 °C'de 60 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. 50 µl durdurma solüsyonu eklendikten sonra absorbans 450 nm'de mikropate okuyucu yardımıyla ölçülmüştür.

İstatistiksel analiz

Veriler en az 3 bağımsız deney sonucunda ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir. İstatistik analizler Graphpad Prism 5.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Hücre canlılığı için t testi kullanılmıştır.

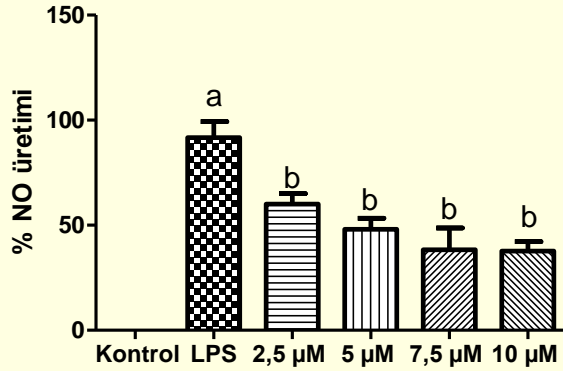
Bulgular

Kaempferolün THP-1 makrofaj hücrelerinde NO ve PGE₂ düzeyleri üzerine etkilerini incelemeye önce toksik olmayan dozları MTT ölçümü ile belirlendi. Kaempferolün THP-1 hücrelerinde sitotoksik etkilerini araştırmak için hücrelere çeşitli konsantrasyonda kaempferol uygulandı (0, 2,5, 5, 7,5, 10 µM). Kaempferol 10 µM ve daha düşük dozlarda hücre canlılığına etki etmedi (**Şekil 1**).



Şekil 1. Kaempferolün THP-1 makrofajlarına sitotoksik etkisi

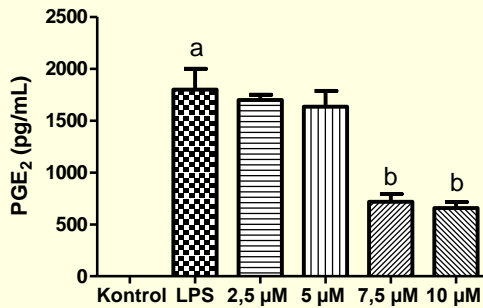
Kaempferolün LPS ile indüklenmiş THP-1 makrofajlarında NO üzerine potansiyel anti inflamatuvar etkisini inceledik. NO üretimi kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında LPS ile indüklenmiş hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükseldiği **Şekil 2'**de gösterilmiştir. Ayrıca 2,5, 5, 7,5, 10 μ M kaempferol tedavisi NO düzeyini tedavi uygulanmayan LPS ile indüklenmiş hücrelere göre %31,66, %43,66, %53,33, %53,99 oranında azaltmıştır.



Şekil 2. Kaempferolün LPS ile indüklenen THP-1 makrofajlarında NO üretimi üzerine etkisi

^ap<0.05, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, ^bp<0.05 LPS ile indüklenen hücreler ile karşılaştırıldığında

Kaempferolün PGE₂ düzeyi üzerine etkisi hesaplanmıştır. LPS ile indüklenen hücreler ile kaempferol tedavisi verilen gruplar karşılaştırıldığında 2.5 ve 5 μ M kaempferol tedavisinin PGE₂ düzeyin azda olsa düştüğü ancak bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (p>0,05). Ancak, dozlar 7,5 μ M ve 10 μ M' a çıkartıldığında PGE₂ düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı düştüğü bulunmuştur (p<0,05) (**Şekil 3**).



Şekil 3. Kaempferolün LPS ile indüklenen THP-1 makrofajlarında PGE₂ düzeyi üzerine etkisi

^ap<0,05, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, ^bp<0,05 LPS ile indüklenen hücreler ile karşılaştırıldığında

Tartışma ve Sonuç

LPS maruziyeti THP-1 makrofajlarında pro-inflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-1 β ve TNF- α) yanı sıra COX-2, NO ve PGE₂ düzeylerinin artmasına neden olur.⁹ İndüklenebilir NO sentazın aşırı ekspresyonu makrofajlarda LPS indüklü stresin önemli bir göstergesidir.¹⁷ Bunun neticesinde NO'in aşırı üretimine ve sonuç olarak inflamasyona neden olur. Aşırı NO eksprese edilmesi vücudun diyabet, endotoksemi gibi patolojik semptomlardan etkilendiğini gösterir. Ayrıca, COX-2 pro-inflamatuvar faktör PGE₂'nin salınımını sağlar.¹⁸ Çalışmamızda THP-1 makrofajlarına LPS indüklemesi yapıldığında NO ve PGE₂ düzeyleri artmıştır.

iNOS ve COX-2 gibi inflamatuvar markerlerinin indüklenmesi karaciğerinde içinde yer aldığı çeşitli organlarda zararlı etkilere neden olacağı belirtilmiştir.¹⁹ Ayrıca, COX-2 pro-inflamatuvar faktör PGE₂'nin salınımını sağlar.¹⁸ iNOS ve COX-2 inflamatuvar cevabın ana düzenleyici faktörleri olarak bilinmektedir. Böylece birçok çalışmada anti-inflamatuvar ajanların geliştirilmesinde bu faktörlerin düzeyleri incelenmiştir. Yapılan birçok

çalışmada flavanoidlerin anti-oksidan ve anti-inflamatuvar etki göstererek metabolik dengenin düzenlenmesinde rol aldığı bildirilmiştir.²⁰

LPS ile indüklenmiş THP-1 makrofajlarında nontoksik, doğal flavonoid apigenin ERK 1/2 yolağını baskılayarak IL-6 ve IL-1 β üretimini inhibe eder.²¹ Olea europaea kaynaklı biyoaktif molekül olan oleacein (OLC) THP-1 makrofajlarında LPS maruziyetinden sonra artan COX-2, NO ve PGE₂ düzeylerini azaltmıştır.²²

Kaempferol halk tarafından geleneksel tıpta olarak sakinleştirici olarak kullanılan anasondan, gastrointestinal rahatsızlıklarını giderici olarak kullanılan nane, depresyonu yatıştırmak amacıyla kullanılan melissa bitkisinden izole edilebilir.⁶

Melissa bitkisi özütünün çalışmamızda kullandığımız PGE₂ parametresinin düzeyini azalttığı bildirilmiştir.²³

NO temizleyici etkisi incelendiğinde Kaempferolün izoflavonlardan etkin olduğu ve ayrıca LPS ile indüklenmiş RAW 264.7 makrofajlarında iNOS üzerine inhibe edici etki göstermiştir.²⁴ Ayrıca, LPS ile indüklenmiş J774.2 hücrelerinde nitrit birikiminin inhibisyonunda kaempferolün kuersetine oranla daha aktif olduğu bildirilmiştir.²⁵ Bu çalışma ile LPS ile indüklenmiş THP-1 makrofajlarında düşük konsantrasyonlarda kaempferol tedavisinin NO düzeyini azalttığı kanıtlanmıştır. PGE₂ düzeyi doza bağlı olarak (7,5-10 μ M) kaempferol tedavisi ile azalmıştır.

RAW 264.7 makrofajlarında 10 μ M' a kadar kaempferol uygulaması hücre canlılığını etkilememiştir.²⁶ Bir başka çalışmada 2,5-10 μ g/ml kaempferol tedavisi THP-1 makrofajlarına sitotoksik etki göstermemiştir.²⁷ Aynı dozlar çalışmamızda kullandığımız THP-1 makrofajları içinde toksik değildir.

Kaempferol, LPS ile indüklenmiş mikroglial BV2 hücrelerinde NO, PGE₂, TNF- α , IL-1 β ve ROS üretimini doza bağımlı olarak azaltmıştır. Ayrıca, TLR-4, NF- κ B, p38 MAPK, JNK ve AKT aşağı doğru regüle etmiştir. Bu sayede kaempferolün nöroinflamatuvar hastalıkların tedavisi teröpatik potansiyele sahip olduğunu bildirilmiştir.²⁸ Bir başka çalışmada, AGS hücrelerinde (Fare fibroblast hücreleri) helicobacter pylori enfeksiyonunun neden olduğu inflamasyonda kaempferolün rolü incelenmiştir. TNF- α , IL-1 β , IL-8 ekspresyonunun ve IL-8 üretiminin azaldığı sonucunu elde edilmiştir.²⁹ Bu çalışma ile literatürde yer alan flavonoidlerin NO ve PGE₂ düzeyini paralel şekilde azalttığı verileri desteklemektedir. Sonuç olarak bu çalışmanın sonuçları açıkça göstermiştir ki kaempferol THP-1 makrofajlarının proliferasyonunu etkilememiştir. Kaempferolün PGE₂ üzerindeki belirgin inhibitör etkisi, özellikle 7,5 μ M konsantrasyonda gözlenirken %NO için bu konsantrasyon 2,5 μ M dir. Bu çalışma, kaempferol tedavisinin özellikle inflamasyon faktörlerinin düzeylerinin azalması yoluyla inflamasyonu inhibe etti. Bu çalışma sayesinde geleneksel tıpta sıklıkla kullanılan bitkilerde bulunan kaempferol'ün inflamatuvar hastalıkların tedavisindeki rolü açığa çıkmıştır. Çalışmamız kaempferolün insan makrofajlarında meydana gelen inflamasyon üzerinde yapılan ilk araştırma çalışması olması nedeniyle diğer etkin maddelerin araştırılmasına yönelik ön veriler sunmaktadır. Ayrıca daha ileriki çalışmalarda bu etkin maddenin ve bu etkin maddeyi içeren geleneksel tıpta kullanılan bitkilerin moleküler yollar üzerine etki mekanizmalarını aydınlatmayı amaçlayan yeni çalışmalara öncülük edecektir.

Bilgi

Yazarın bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır. Bu çalışma için herhangi bir kurumdan mali destek alınmamıştır. Hücre kültürü çalışmalarından dolayı Marijas Jurisic'e teşekkür ederiz. Laboratuvarında doktora sonrası çalışmalarına izin verdiği için Prof. Dr. Marc Schneider'e teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Silva Dos Santos J, et al. The pharmacological action of kaempferol in central nervous system diseases: A Review. *Frontiers in Pharmacology* 2020; 11:565700.
2. Bangar SP, et al. Kaempferol: A flavonoid with wider biological activities and its applications. *Critical Reviews in Food science and nutrition* 2022; 1-25.
3. Nagarajan, S. Polyphenolic compounds - a promising leads for antiviral therapy. *Pharmacophore* 2021;31(1):36-47.
4. Golli R, Thummaneni C, Vangalapati M. Green synthesis and characterization for the extraction of kaempferol from *Brassica oleracea* var. *italica* - Antibacterial activity. *Mater today* 2022;62:3457-61.
5. Chang SQ, et al. Kaempferol exerts a neuroprotective effect to reduce neuropathic pain through TLR4/NF-kappa B signaling pathway. *Phytotherapy Research* 2022;36(4):1678-91.
6. Karadag A. Türkiye'deki bazı tıbbi ve aromatik bitkilerin antioksidan potansiyelleri ve fenolik kompozisyonları. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* 2019;16: 631-37.
7. Şekeroglu N, Gezici, S. Türkiye'nin virüs savar bitkisi *Laden (Cistus spp.)* türleri: Geleneksel kullanımları, biyoaktif kimyasal bileşenleri ve farmakolojik aktiviteleri. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi Ve Folklorik Tıp Dergisi* 2021;11(2): 258-268.
8. Calderon-Montano J.M, et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini-reviews in medicinal chemistry* 2011;11(4):298-344.
9. Lund ME, et al. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *Journal of Immunological Methods* 2016;430:64-70.
10. Tedesco, S., et al. Convenience versus biological significance: are PMA-differentiated THP-1 cells a reliable substitute for blood-derived macrophages when studying in vitro polarization?. *Frontiers in Pharmacology* 2018;9:71.
11. Maldonado RF, Sa-Correia I, Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiology Reviews* 2016;40(4):480-93.
12. Yıldırım M, et al. Anti-Inflammatory effects of Coumarin-Selenophene derivatives on LPS-Stimulated RAW 264.7 macrophage cells. *Russian journal of bioorganic chemistry* 2022,
13. Altinoz MA, Elmaci I. Targeting nitric oxide and NMDA receptor-associated pathways in treatment of high grade glial tumors. Hypotheses for nitro-memantine and nitrones. *Nitric oxide: Chemistry and Biology* 2018;79:68-83.
14. Stachlewitz R, et al. Role of nitric oxide and peroxynitrite production in the development of inflammatory injury in a rat model of periodontal disease. *Portland Press* 2000;16:192.
15. Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 2007;15(6):252-59.
16. Medeiros A, et al. Prostaglandin E2 and the suppression of phagocyte innate immune responses in different organs. *Mediators of Inflammation* 2012;2012:327568.
17. Yuan J, et al. Gold clusters attenuate inflammation in rat mesangial cells via inhibiting the activation of NF-kappaB pathway. *Nanomaterials* 2020;10(4):712.
18. Tang T, et al. Macrophage responses to lipopolysaccharide are modulated by a feedback loop involving prostaglandin E2, dual specificity phosphatase 1 and tristetraproline. *Scientific Reports* 2017;7(1): 4350.
19. Suliburk JW, et al. Ketamine attenuates liver injury attributed to endotoxemia: role of cyclooxygenase-2. *Surgery* 2005;138(2):134-140.
20. Alam W, et al. Kaempferol as a dietary anti-inflammatory agent: current therapeutic standing. *Molecules* 2020;25(18).
21. Zhang XX, et al. Flavonoid Apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. *Plos One* 2014;9(9).
22. Cirmi S, et al. Oleacein attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in THP-1- derived macrophages by the inhibition of TLR4/MyD88/NF-kappa B pathway dagger. *International Journal of Molecular Sciences* 2022;23(3):1206.
23. Abd Allah HN, et al. *Melissa officinalis* L. ameliorates oxidative stress and inflammation and upregulates Nrf2/HO-1 signaling in the hippocampus of pilocarpine-induced rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 2022;29(2):2214-2226.
24. Kim BH, et al. Down-regulatory effect of quercitrin gallate on nuclear factor-kappa B- dependent inducible nitric oxide synthase expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages RAW 264.7. *Biochemical Pharmacology* 2005;69(11):1577-83.
25. Garcia-Mediavilla V, et al. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *European Journal of Pharmacology* 2007;557(2-3):221-29.
26. Kim CJ, et al. The effects of Kaempferol-Inhibited autophagy on osteoclast formation. *International Journal of Molecular Sciences* 2018;19(1):125.

27. Li, XY, et al. Kaempferol suppresses lipid accumulation in macrophages through the downregulation of cluster of differentiation 36 and the upregulation of scavenger receptor class B type I and ATP-binding cassette transporters A1 and G1. *International Journal of Molecular Medicine* 2013;31(2), 331-338.
28. Park SE, et al. Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells. *British Journal of Pharmacology* 2011;164(3):1008-25.
29. Yeon MJ, et al. Anti-inflammatory effects of Kaempferol on *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2019;83(1):166-173.